

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta**

LABORATOŘ RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ  
Univerzita Palackého v Olomouci  
& Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.



## **Identifikace a charakterizace mutantních rostlin ječmene T1 generace *ABI5***

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Jana Zahradníková**

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Zahradníková
Název práce	Identifikace a charakterizace mutantních rostlin ječmene T1 generace ABI5
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>ABA Insensitive 5 (ABI5) je jeden z významných transkripčních faktorů leucinového zipu ovlivňující proces regulace genové exprese v oblasti vývoje semen, laterálních kořenů a růstu rostliny. Rostliny s mutací genu <i>abi5</i> vykazují sníženou citlivost na inhibici těchto procesů způsobenou fytohormonem kyselinou abscisovou (ABA).</p> <p>V praktické části bakalářské práce byla provedena charakterizace transformovaných rostlin T0, T1 a T2 generace jarního ječmene (<i>Hordeum vulgare</i>) kultivaru Golden Promise, u kterých byla předpokládána přítomnost mutace v genu <i>abi5</i>. K vyvolání mutace byla využita technologie CRISPR/Cas9, transgenní rostliny byly charakterizovány pomocí molekulárních technik.</p>
Klíčová slova	ABI5, jarní ječmen, abiotický stres, mutace, kyselina abscisová
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jana Zahradníková
Title of thesis	Identification and characterization transgenic barley plants T1 generation ABI5
Type of thesis	Bakalářská
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>ABA Insensitive 5 (ABI5) is a basic leucine zipper transcription factor playing an important role in regulating gene expression in the area of seed and lateral roots development and plant growth. Plants with the <i>abi5</i> gene mutation show reduced sensitivity to the inhibition of these processes caused by the phytohormone abscisic acid (ABA).</p> <p>In this bachelor thesis T0, T1 and T2 generation plants cultivar Golden Promise of spring barley (<i>Hordeum vulgare</i>) were characterized. In these plants the presence of a mutation in the <i>abi5</i> gene was assumed. The mutation was mediated using CRISPR / Cas9 molecular technology and the identification of transgenes was carried out by PCR and Sanger sequencing techniques.</p>
Keywords	ABI5, barley, abiotic stress, mutation, abscisic acid
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. V práci jsem uvedla veškeré použité zdroje, jejichž celkový soupis je v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

Podpis autorky:

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. a Mgr. Tomáši Vlčkovi, Ph.D. za odborný dohled, pomoc při provádění experimentů a rady při zhotovování teoretické části práce.

# Obsah

Seznam zkratek .....	8
1 Úvod .....	9
2 Cíle práce .....	10
3 Současný stav řešené problematiky .....	11
3.1 Ječmen .....	11
3.1.1 Využití a původ .....	11
3.1.2 Genetický kód ječmene .....	11
3.1.3 Transformace ječmene .....	11
3.1.4 Historie transformace .....	12
3.2 Geneticky modifikované organismy .....	12
3.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	12
3.3.1 Transformace rostlin pomocí <i>Agrobacteria tumefaciens</i> .....	13
3.3.2 Využití v genetickém inženýrství .....	13
4 ABA Insensitive 5 (ABI5) .....	14
4.1 Kyselina abscisová .....	14
4.2 Regulace exprese <i>ABI5</i> .....	15
4.2.1 Transkripční faktory .....	15
4.2.2 Pozitivní regulace <i>ABI5</i> .....	15
4.2.3 Negativní regulace <i>ABI5</i> .....	16
4.3 Exprese <i>ABI5</i> v rostlině .....	17
4.4 Význam <i>ABI5</i> při klíčení v abiotickém stresu .....	17
4.5 Ortology <i>ABI5</i> u ječmene .....	18
5 Materiál a metodika .....	19
5.1 Přístrojové vybavení .....	19
5.2 Použité chemikálie a roztoky .....	19
Roztoky .....	20
5.3 Rostlinný materiál .....	21
5.4 Metody .....	22
5.4.1 Izolace genomické DNA Edwardsovou metodou (1991) .....	22
5.4.2 Precipitace DNA s využitím octanu sodného .....	24
5.4.3 Detekce T-DNA <i>sgRNA</i> s U6 promotorem u rostlin T0 a T1 generace pomocí PCR .....	24
5.4.4 Izolace genomické DNA paramagnetickými částicemi z rostlin T1 generace .....	25
5.4.5 Amplifikace genu <i>ABI5</i> a detekce mutací Sangerovou metodou sekvenování .....	26

5.4.6 Detekce genu <i>Cas9</i> , <i>Hyg</i> a <i>U6_sgRNA</i> v rostlinách T2 generace .....	27
5.4.7 Izolace RNA z rostlin T2 generace.....	29
5.4.8 Degradace DNA a inaktivace DNázy.....	30
5.4.9 Přepis izolované RNA do cDNA.....	30
5.4.10 Detekce transkripce housekeeping genu elongačního faktoru ( <i>EF</i> ) a genu <i>Cas9</i> .....	31
5.4.11 Vytvoření teplotního gradientu RT-PCR s plazmidem s potvrzenou přítomností genu <i>ABI5</i> .....	32
5.4.12 Detekce transkripce transgenů <i>sgRNA</i> v rostlinách T2 generace .....	33
6 Výsledky.....	34
6.1 Detekce <i>sgRNA</i> s U6 promotorem u rostlin T0 a T1 generace.....	34
6.1.1 Detekce u rostlin T0 generace .....	34
6.1.1 Detekce u rostlin T1 generace .....	35
6.2 Amplifikace genu <i>ABI5</i> a detekce mutací Sangerovou metodou sekvenování .....	36
6.3 Detekce genu <i>Cas9</i> , <i>Hyg</i> a <i>U6_sgRNA</i> v rostlinách T2 generace.....	38
6.3.1 Detekce genu <i>Cas9</i> .....	39
6.3.2 Detekce genu <i>Hyg</i> .....	39
6.3.2 Detekce genu <i>U6_sgRNA</i> .....	40
6.4 Detekce transkripce housekeeping genu elongačního faktoru a genu <i>Cas9</i> .....	41
6.4.1 Detekce transkripce genu <i>Cas9</i> .....	41
6.4.1 Detekce transkripce genu elongačního faktoru ( <i>EF</i> ).....	42
6.5 Teplotní gradient RT-PCR s plazmidy s potvrzenou přítomností transgenů <i>sgRNA</i> .....	42
6.6 Detekce transkripce transgenů <i>U6_sgRNA</i> v rostlinách T2 generace .....	43
7 Diskuze.....	45
8 Závěr.....	47
REFERENCE .....	48

## Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ABI5	Abscisic Acid Insensitive 5
AHT1	ABA-HypersensitiveBTB/POZProtein1
ApE	A plasmid Editor
bp	párů bází
Cas	CRISPR asociovaná nukleáza
CRISPR	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindomic
DOG1	Delay of Germination 1
GA	kyselina gibberelová
GMO	geneticky modifikované organismy
EDTA	ethylendiamintetraacetát
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů
ORI	místo replikačního počátku
PCR	polymerázová řetězová reakce
PED3	Peroxisome Defective 3
PED	polyethylenglykol
Primer F	Forward primer
Primer R	Reverse primer
SAG	Senzitivity ABA During Germination
RAV1	Related to ABI 3/VP1
rpm	otáčky za minutu
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsíran sodný
sgRNA	single-guide RNA
TAE	tris-acetát EDTA
T-DNA	transferová DNA
Ti	tumor indukující
WRKY18	WRKY DNA-binding Protein 18



# 1 Úvod

Kyselina abscisová (ABA) patří mezi důležité fytohormony významně ovlivňující vývoj a růst rostliny v přítomnosti abiotického a biotického stresu. Buněčné odpovědi na ABA jsou zprostředkovány řadou transkripčních faktorů, mezi které se řadí i faktor ABI5 – Abscisic Acid Insensitive 5. Gen *ABI5* se podílí na signalizaci kyseliny abscisové během zrání a klíčení semen. Rostliny s mutovaným genem *abi5* (citlivé na kyselinu ABA) mají pleiotropní defekty v odpovědi ABA, jako je snížená citlivosti na inhibici klíčení způsobovanou ABA a změna exprese některých ABA-regulovaných genů. Objasnění signální dráhy ABA v rostlinách jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise je možno provést pomocí izolace rostlin, které mají mutovaný gen *abi5* a jejich porovnání s rostlinami, u kterých mutace neproběhla.

## **2 Cíle práce**

### **Teoretická část**

Vypracování literární rešerše poznatků týkajících se transformace rostlin, transformace jarního ječmene, transkripčních faktorů a *ABI5* (Abscisic Acid Insensitive 5).

### **Praktická část**

Provedení identifikace transgenů v T0 a T1 generaci u rostlin jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise, u kterých se předpokládá vyvolání mutace genu *abi5* pomocí technologie CRISPR/Cas. Pomocí molekulárních technik PCR, RT-PCR, případně sekvenování provést genotypizaci rostlin.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Ječmen

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) se řadí společně s pšenicí, kukuřicí, žitem a ovsem mezi čeleď lipnicovité (*Poaceae*). Mezi charakteristické znaky lipnicovitých patří převažující souběžná žilnatina na jednoduchých, střídavě uspořádaných listech. Květenstvím je klas, složený z klásků a plodem je nejčastěji obilka. Ječmen se dá rozpoznat od ostatních obilnin především dlouhými osinami na zmech a límcem listů, který na sobě nese přívěsky tzv. boltce.

#### 3.1.1 Využití a původ

Ječmen patří již po tisíciletí mezi významné hospodářské plodiny. Pravděpodobně byl poprvé domestikován v zemích úrodného půlměsíce asi 8000 let př. n. l. z divokého typu *Hordeum spontaneum*. I když jiná studie naznačuje, že původním předkem byl *H. agriocrithon* z oblasti Tibetu. Dnešní forma ječmene vznikla až zkřížením domestikovaného *H. agriocrithon* s *H. spontaneum*, když byl v průběhu migrace lidstva zanesen na východ (Dickson a kol., 1979).

Hospodářská plocha, na které je pěstován ječmen, zaobírá celosvětově okolo 70 mil. hektarů. Globální produkce 160 milionů tun je využívána především pro krmné účely a v potravinářské výrobě a sladovnictví (FAO, 2020; Taner et al., 2004). V roce 2018 byl ječmen v České republice pěstován na 324 724 ha a jeho celková produkce přesáhla 1,6 tuny. (FAO, 2020).

#### 3.1.2 Genetický kód ječmene

Genetický kód ječmene byl přečten v roce 2017, přičemž 3,7 GB (tj. 80,8 %) tvoří transpozony. Z tohoto množství je pouze okolo 10 % genů potenciálně aktivních a zbylá procenta zaujímají degradované nebo zkrácené kopie. Ječmen má celkem 14 chromozomů ( $2n=2x=14$ ), haploidní ječmen má 7 chromozomů (Mascher a kol., 2017).

#### 3.1.3 Transformace ječmene

Genetická transformace je děj, při kterém je cizorodá DNA začleněna do původní DNA buňky, kde je následně touto buňkou využívána. Přírozená transformace je typická pro některé bakteriální rody, kterým tato schopnost pomáhá přežít v nepříznivých podmínkách. Bakterie spontánně uvolňují DNA z buněk do prostředí, kde tato DNA může být přijata tzv. kompetentními buňkami a začleněna do jejich genomu (Keshavareddy a kol., 2018).

### 3.1.4 Historie transformace

Transformace byla poprvé objevena u rodu *Streptococcus pneumoniae* v roce 1928, kdy bylo pozorováno, že neškodný kmen této bakterie se může stát virulentním, pokud je vystaven virulentním kmenům, které byly usmrceny teplem (Griffith, 1928).

Samotnému procesu bylo porozuměno až o 16 let později tzv. Avery–MacLeod–McCarty experimentem. Při tomto experimentu byl lyzát z usmrcených buněk virulentního kmenu vystaven účinkům různých tříd enzymů štěpícími polysacharidy, proteiny, lipidy, RNA a DNA. K takto ošetřeným lyzátům byly přidány živé buňky nevirulentního kmenu a po inkubaci přemístěny na Petriho misky, kde byla, až na lyzát ošetřený enzymem třídy DNA-asy, pozorována přítomnost virulentního kmenu. Závěrem tohoto experimentu tedy bylo, že za transformaci nevirulentních buněk je zodpovědná DNA (McCarty, 1943).

## 3.2 Geneticky modifikované organismy

Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) definuje geneticky modifikované organismy (GMO) jako „*organismy a jejich produkty, které jsou produkovány technikami, při nichž byl genetický materiál pozměněn způsobem, který se nevyskytuje přirozenou rekombinací*“ (FAO, 2020).

V molekulární biologii jsou často využívány kompetentní bakterie *Escherichia coli*, které snadno přijímají cizorodou DNA. Při optimálních podmínkách kultivace je tak možno v krátkém časovém úseku vytvářet kopie, většinou plazmidové, cizorodé DNA v průběhu přirozené replikace transformovaných bakterií a tuto DNA izolovat pro další využití. Mezi metody transformace patří chemická transformace, elektroporace, mikroprojektilový přenos DNA, polyethylene glykol (PEG), použití ultrazvuku, mikrovlnného záření a hydrogelu (Singh a kol., 2010).

## 3.3 *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je gramnegativní aerobní bakterie patřící mezi *Peritricha*. *Agrobacterium* je rostlinný patogen napadající dvouděložné rostliny za tvorby nádorů pomocí přenosu transferové DNA (T-DNA) do jádra rostlinné buňky hostitele nesené na tumor-indukujícím neboli Ti plazmidu, (obr. 1) (Gordon, 2015). Tato DNA se integruje do genomu rostliny a je exprimována (Watson a kol., 2016).

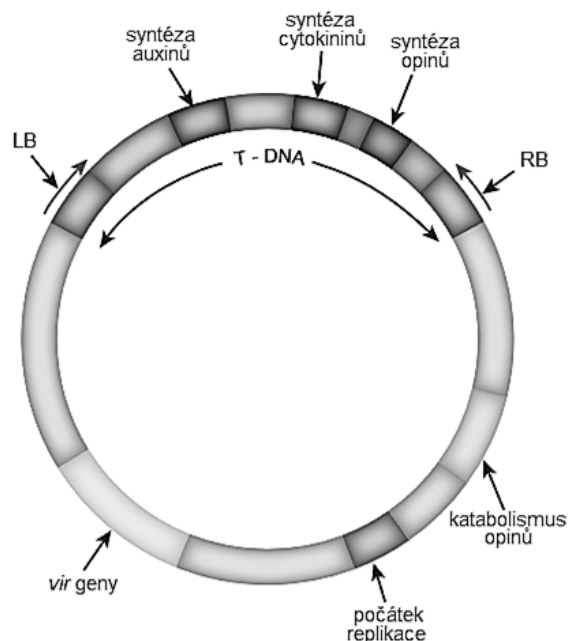
### 3.3.1 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Mechanismus napadení začíná při poranění buněčné stěny, kdy rostlina vytváří fenolické látky, které se váží na proteiny VirA, což jsou specifické receptory na membráně bakterie. Po navázání aktivuje VirA další protein VirG skrze fosforylaci. VirG působí jako aktivátor transkripce další části Ti plazmidu nazývajících se „*vir genes*“. Dva z produktů transkripce jsou endonukleázy VirD1 a VirD2 štěpící ohraničující repetitivní sekvence T-DNA o velikosti 24 bp. Vytvoří se jednovláknová molekula, která je na jednom konci připojena k proteinu VirD2, který naviguje toto vlákno do jádra hostitelské buňky, kde je T-DNA integrována do jejího genomu.

Geny v oblasti T-DNA jsou zodpovědné za vytváření rostlinných hormonů auxinu a cytokininu, jejichž zvýšené koncentrace vyvolávají proliferaci buněk vytvářející nádor – tzv. „Crown gall“. Další syntetizovanou látkou jsou deriváty argininu opiny, které bakterie využívá coby zdroj dusíku a uhlíku (Gordon, 2015).

### 3.3.2 Využití v genetickém inženýrství

Pomocí T-DNA vyskytujícím se v Ti-plazmidu lze poměrně snadno vkládat do rostliny geny zájmu. T-DNA je vložena do jiného, snadněji modifikovatelného, plazmidu a DNA mezi ohraničujícími repetitivními sekvencemi je nahrazena daným genem (Larkin, 1986). Kromě vybraného genu, který zabírá okolo 10 % Ti-plazmidu, je do něj vkládán rovněž selekční marker, který umožňuje pozdější separaci transformovaných buněk od těch, u kterých transformace neproběhla (S.B. Gelvin, 2003). Jako častý selekční marker jsou využívány geny rezistence proti antibiotikům (Yenofsky a kol., 1990).



Obr. 1: Model Ti plazmidu z *Agrobacterium tumefaciens* se znázorněnou oblastí transferové DNA obsahující geny syntézy auxinů, cytokininů a opinů, která je přenášena do jádra hostitelské buňky (upraveno podle Clark a kol., 2019).

## 4 ABA Insensitive 5 (ABI5)

ABA Insensitive 5 (ABI5) je základní transkripční faktor leucinového zipu ovlivňující proces regulace genové exprese v oblasti vývoje semen a růstu rostliny za přítomnosti kyseliny abscisové při abiotickém stresu.

Rostliny s mutovaným genem *abi5* vykazují pleiotropní defekty v odpovědi ABA, včetně snížené citlivosti na ABA inhibici klíčení a změněné exprese některých ABA regulovaných genů. ABI5 neovlivňuje pouze fáze vývoje rostliny jako je zrání a klíčení semen, ale provedené studie poukazují i na regulaci dalších procesů, jako je růst rostliny, fotosyntéza a vývoj laterálních kořenů (Skubacz a kol., 2016).

### 4.1 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová, která patří mezi nejvýznamnější stresové fytohormony, hraje důležitou roli při adaptaci rostliny na nepříznivé podmínky. U rostlin reguluje například proces biosyntézy osmolytů a „detoxikace“ reaktivních forem kyslíku. Pozorovatelnými změnami na rostlině ovlivněné ABA jsou inhibice růstu stonku a kořenů, avšak v některých případech dochází k prodloužení kořenové části do hlubších vrstev půdy s vyšším obsahem vody. Dalším opatřením před

nadbytečným úbytkem vody je zavírání průduchů a tím udržení hodnot turgoru (Nambara a kol., 2010).

## **4.2 Regulace exprese *ABI5***

Regulace exprese *ABI5* probíhá skrze komplexní mechanismus, který je zprostředkován mnoha transkripčními faktory a proteiny patřících do různých funkčních skupin. Tyto proteiny hrají při regulaci exprese buď pozitivní či negativní roli (Skubacz a kol., 2016).

### **4.2.1 Transkripční faktory**

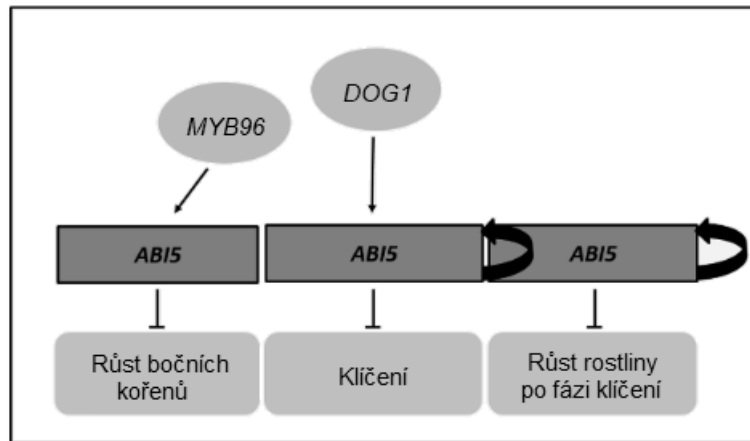
Transkripční faktory představují skupinu proteinů regulujících genovou expresi pomocí vazby na specifickou sekvenci DNA, díky čemuž usnadňují navázání dané RNA polymerázy a kofaktorů, což vede k iniciaci transkripce (Ulasov a kol., 2018).

Oblast DNA, na kterou se specificky transkripční faktory vážou, jsou často shrnuty jako motivy – modely představující sadu souvisejících krátkých sekvencí preferovaných daným transkripčním faktorem, které lze použít ke skenování delších sekvencí k identifikaci potenciálních vazebných míst (Lambert a kol., 2018).

### **4.2.2 Pozitivní regulace *ABI5***

Mezi transkripční faktory, které pozitivně ovlivňují regulaci exprese genu *ABI5* během procesu klíčení a následujícího růstu rostlin, se řadí *ABI3* a *ABI4*. Kromě těchto dvou faktorů se na pozitivní regulaci podílí sám protein *ABI5*, kdy svou vazbou na *ABI5* promotor vyvolává svoji expresi.

Dalšími významnými transkripčními faktory jsou *DOG1*, aktivující *LEA* a *HSP* proteiny, patřící do skupiny proteinů teplotního šoku a současně spolupracující s již zmíněným proteinem *ABI3* při růstu rostliny a faktor *MYB96*, který se podílí na inhibici růstu postranních kořenů, (Skubacz a kol., 2016), (obr. 2).

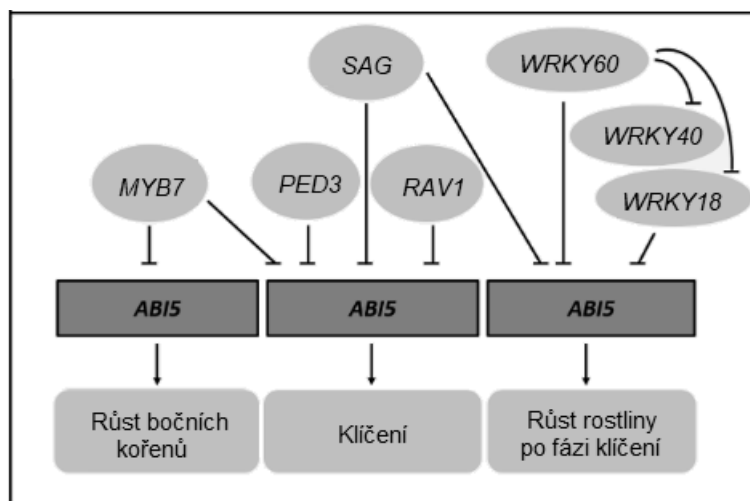


Obr. 2: Regulační geny, které řídí expresi *ABI5*. *ABI5* je pozitivně regulován proteinem *ABI5*, čímž zajišťuje pozitivní zpětnou vazbu při signalizaci ABA. *DOG1* (DELAY OF GERMINATION 1) a *MYB96* také mají pozitivní vliv na expresi *ABI5* během klíčení a tvorby bočních kořenů. Vyšší aktivita *ABI5* vede k inhibici klíčivosti, růstu rostliny po fázi klíčení a tvorbě laterálních kořenů (upraveno podle Skubacz a kol., 2016).

#### 4.2.3 Negativní regulace *ABI5*

Zpětná vazba v ABA signalizaci zajišťuje rovnováhu v *ABI5* zprostředkovaných reakcích v případě, že se rostlina ocitne v prostřední abiotického stresu. Mezi negativní regulátory zprostředkovávající nastolení této rovnováhy patří *PED3* (PEROXISOME DEFECTIVE 3), *SAG* (SENSITIVITY ABA DURING GERMINATION), *RAV1* (RELATED TOABI3 / VP1) a *MYB7* snižující expresi *ABI5* během klíčení semen. *MYB7* také negativně reguluje tvorbu laterálních kořenů. *WRKY18* (WRKY DNA-BINDING PROTEIN18) *WRKY40*, *WRKY60* a *SAG* potlačují expresi *ABI5* a umožňují růst po fázi klíčení, (Nakamura a kol., 2001; Skubacz a kol., 2016), (obr. 3).





Obr. 3: Regulační geny, které řídí expresi *ABI5*. *PED3* (PEROXISOME DEFECTIVE 3), *SAG* (SENSITIVITY ABA DURING GERMINATION), *RAV1* (RELATED ABI3 / VP1) a *MYB7* snižují expresi *ABI5* během klíčení semen. *MYB7* také negativně reguluje tvorbu bočních kořenů. *WRKY18* (WRKY DNA-BINDING PROTEIN18), *WRKY40*, *WRKY60* a *SAG* potlačují *ABI5* a umožňují růst po vyklíčení. (opraveno podle Skubacz a kol., 2016).

Stejně jako může samotný protein *ABI5* působit jako pozitivní regulátor, jeho funkce může být i opačná. *ABI5* vyvolává expresi svého vlastního inhibitoru *AHT1* (ABA-HYPERSENSITIVE BTB/POZPROTEIN1) (Skubacz a kol., 2016).

### 4.3 Exprese *ABI5* v rostlině

*ABI5* je exprimována v různých typech pletiva v průběhu životního cyklu rostliny. U vyvíjejícího se embrya se hladiny *ABI5* postupně zvyšují, přičemž nejvyšší hladiny se vyskytují u zralých semen. Zvýšení koncentrace *ABI5* byly pozorovány 1 až 2 dny po vyklíčení. Během tohoto časového období ABA podporuje akumulaci *ABI5* prostřednictvím dvou mechanismů – zvýšené transkripce a snížené proteolýzy (Skubacz a kol., 2016).

Koncentrace *ABI5* v rostlině je nejvyšší ve stadiu vyvinutého semene a po jeho vyklíčení významně klesá, stále ale může být detekována ve vegetativních orgánech dospělé rostliny (Liu & Stone, 2014).

### 4.4 Význam *ABI5* při klíčení v abiotickém stresu

Proces klíčení semen je kritickým stádiem životního cyklu rostlin. Mezi hlavní fytohormony podílející se na mechanismu klíčení patří kyselina giberelová (GA) a ABA. Zvýšená koncentrace GA v rostlině má na klíčení pozitivní vliv, zatímco

zvýšená koncentrace ABA klíčení inhibuje a vyvolává dormanci semen. Nízká hladina ABA je způsobena aktivitou cyPP707A2 (CYTOCHROME P450) kódující ABA8'-hydroxylázu a je zodpovědná za katabolismus ABA v semenech. Tento systém umožňuje klíčení semen ve vhodném okamžiku – tj. v době, kdy semeno není vystaveno abiotickému stresu.

Další dráhou inhibující expresi *ABA* vyžaduje působení transkripčních faktorů jako jsou *ABI3*, *ABI4* a *ABI5*. Mutace v těchto lokusech *ABI* vedou k necitlivosti ABA na sůl a osmotický stres během klíčení semen (Skubacz a kol., 2016).

V přítomnosti abiotického stresu dochází k fosforylaci trans-aktivační domény *ABI5* kinázami SnRK2.2, SnRK2.3 a SnRK2.6 ve vegetativních tkáních. Fosforylace *ABI5* mění konformaci proteinu a umožňuje jeho další interakce s jinými proteiny (Nakamura a kol., 2001).

#### **4.5 Ortology *ABI5* u ječmene**

Ortology *ABI5* byly identifikovány u různých rostlinných druhů. Podrobnější popis jejich funkce byl doposud proveden spíše u dvouděložných rostlin, ale v souvislosti s významností pro hospodářství a měnícím se klima jsou další studie žádoucím tématem i pro rostliny jednoděložné (Skubacz a kol., 2016).

Transkripční faktor ječmene *HvABI5* má vysokou podobnost s *AtAREB2* a *AtABI5*. Je známo, že *HvABI5* přímo v závislosti na ABA aktivuje expresi *HVA1* a *HVA22* prostřednictvím vazby na prvky ABRC (ABA RESPONSE PROMOTER COMPLEX) v jejich promotorech. Geny *HVA1* a *HVA22* kódují LEA protein 3 a protein podílející se na vezikulárním transportu. Během klíčení semen zajišťuje aktivita těchto proteinů toleranci k nedostatku vody (Casaretto & Ho, 2003).

## 5 Materiál a metodika

### 5.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy ME104E/M (METTLER TOLEDO)
- Centrifuga 5418R (Eppendorf)
- Centrifuga BR4i (Jouan)
- Elektroforetický napájecí zdroj PowrPact™ Basic (Bio-RAD)
- Laminární box (Gelaire flow general company)
- Magnetický stojan pro izolaci DNA 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack (Bio-RAD)
- pH metr 526 (Sigma-Aldrich)
- Počítačový program GeneSnap (Syngene) a ApE
- Spektrofotometr/ Fluorometr DS-11 (DeNovix)
- Suchá lázeň TDB-100 (Biosan)
- Termocycler T100™ (Bio-RAD)
- UV transiluminátor G:BOX iChemi XR UV/White Light (Syngene)

### 5.2 Použité chemikálie a roztoky

#### Chemikálie

- Agaróza Ultrapure™ Agarose (ThermoFischer, kat. č. 16500500)
- Deionizovaná voda pro PCR (Water PCR reagent, Sigma-Aldrich)
- 40 mM EGTA, sterilní
- Ethidium bromid 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, kat. č. E1510)
- Gel Loading Dye Purple (6x) (New England Biolabs, kat. č. 50-591-186)
- 1N Kyselina chlorovodíková
- Marker molekulové hmotnosti HyperLadder™ 1 kb (BioLine, kat. č. BIO-33053)

- Marker molekulové hmotnosti HyperLadder™ 50–2000 bp (BioLine, kat. č. BIO-33054)
- 3M Octan sodný
- Primery (Generi Biotech)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFischer, kat. č. K1681)
- Paramagnetické částice (Backman Coulter, kat. č. A63880)
- PCR Master Mix REDTaq® ReadyMix™ PCR (Sigma-Aldrich, kat. č. R2523)
- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich™, kat. č. 93289)
- TURBO™ DNase (2U/2μL) (Invitrogen™, kat. č. AM2238)

## **Roztoky**

Edwardsovo extrakční činidlo (100 ml)

- 20 ml 200mM Tris HCl (pH 7,5)
- 5 ml 250mM NaCl
- 5 ml 25mM EDTA
- 1 ml 0,5% SDS
- 70 ml destilované vody

Lyzační pufr 12,5 ml

- 62,5 mg hydrogensířičitanu sodného
- 12,5 mg kyseliny askorbové
- 12,5 μl merkptoetanolu
- 12,5 μl Rnázy
- 12,5 ml destilované vody

Základní lyzační pufr 100 ml

- 10 ml 5M NaCl

- 10 ml 1M Tris-HCl
- 10 ml 0,5M EDTA
- 70 ml destilované vody

### 5.3 Rostlinný materiál

Použitým rostlinným materiálem byl kultivar jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) Golden Promise, jež je využíván coby „referenční“ genotyp pro transformaci ječmene díky svým vysokým regeneračním schopnostem *in vitro*.

V roce 2017 byly připraveny transgenní rostliny, které byly transformovány expresním vektorem 188:pYLCRISPR/Cas9-H a obsahovaly gen *Cas9*. Tento vytvořený rostlinný materiál byl vybrán pro transformaci vektorem pBRACT214AS\_sgRNA (obr. 4), který obsahoval protospacery pro vyvolání mutace genu *abi5*.

Byly vybrány 4 regenerované rostliny T0 generace, které byly pěstovány ve skleníku v režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma při teplotě 16 °C. Ze všech odnoží jednotlivých rostlin byla izolována DNA a u 9 z nich byla potvrzena přítomnost genu *U6\_sgRNA*. Po dozrání klasů z 9 pozitivních odnoží byla vyseto 6 semen vyseta do sadbovačů o velikosti 4x4 cm. Celkem bylo vyseto 52 obilek T1 generace. Následně byla provedena izolace DNA z mladých listů. 38 pozitivních transgenních rostlin bylo přesazeno do květináčů o rozměrech 20x20 cm. Z 38 pozitivních rostlin T1 generace byly náhodně vybrány 4 rostliny, ze kterých bylo vyseto 26 semen T2 generace. Všechny rostliny byly pěstovány ve skleníku v zahradním substrátu.



Obr. 4: Schéma plazmidu pBract214AS sgRNA.

## 5.4 Metody

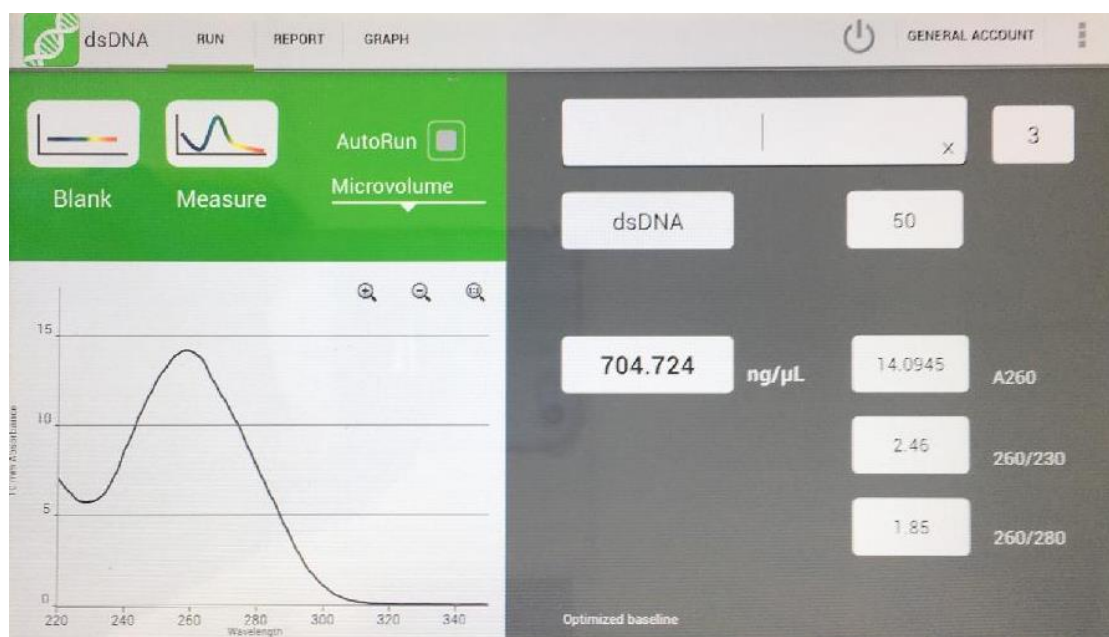
### 5.4.1 Izolace genomické DNA Edwardsovou metodou (1991)

DNA izolovaná Edwardsovou metodou byla dále využívána k amplifikaci genů u rostlin T0, T1 a T2 generace a detekci cílových úseků pomocí PCR.

1. Z rostliny byl do 1,5 ml mikrozkuřavky odebrán vzorek listu o délce 3–4 cm a mikrozkuřavka byla umístěna do nádoby s tekutým dusíkem.
2. Vzorek byl homogenizován sterilní plastovou homogenizační tyčinkou za průběžného chlazení v tekutém dusíku.
3. Ke zhomogenizovanému vzorku bylo přidáno 400  $\mu$ l Edwardsova extrakčního pufru a směs byla krátce promíchána na vortexu.
4. Směs byla po 30 min centrifugována (13 000 rpm / 2 min).
5. Po centrifugaci bylo automatickou pipetou přeneseno 300  $\mu$ l supernatantu, ke kterému bylo přidáno stejné množství vychlazeného isopropanolu a tato směs

byla promíchána pomalým převrácením zkumavky a umístěna na 30 min do lednice.

6. Směs byla po centrifugování na chlazené centrifuze při 4 °C (13 000 rpm / 5 min).
7. Supernatant byl odsán pipetou a k peletu bylo přidáno 300 µl 75 % etanolu.
8. Směs byla centrifugována (5000 rpm / 5 min).
9. Supernatant byl odsán pipetou a pelet vysušen ve flowboxu.
10. Po vysušení (cca 30 min) bylo k DNA přidáno 30 µl sterilní vody a zkumavky byly umístěny do lednice.
11. Další den byla rozpuštěná DNA přenesena pipetou do nových mikrozkušavek, byla spektrofotometricky změřena její kvalita a kvantita, (obr. 5). Vzorky s vyšší koncentrací DNA byly ředěny tak, aby se výsledná koncentrace pohybovala v rozmezí 200–300 ng/µl. U vzorků s nízkou koncentrací DNA byla provedena precipitace s využitím octanu sodného.
12. Vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C.



Obr. 5: Záznam z měření koncentrace a čistoty genomické DNA rostliny T1 generace 48-13 na spektrofotometru DS-11 (DeNovix).

### 5.4.2 Precipitace DNA s využitím octanu sodného

Vzorky s koncentrací nižší než 100 ng/ $\mu$ l byly precipitovány octanem sodným.

1. Ke 30  $\mu$ l izolované genomické DNA byl přidáno 3,5  $\mu$ l 3 M roztoku octanu sodného.
2. Bylo přidáno 65  $\mu$ l vychlazeného 100% etanolu a obsahy zkumavek byly promíchány pipetováním.
3. Vzorky byly umístěny do -20 °C po dobu 1 hod.
4. Vzorky byly centrifugovány při teplotě 4 °C (14 000 rpm / 30 min).
5. Byl odstraněn supernatant a pelet byl vysušen v laminárním boxu.
6. K peletu bylo přidáno 30  $\mu$ l sterilní vody a vzorky byly umístěny do lednice.
7. Další den byla rozpuštěná DNA přenesena pipetou do nových mikrozkušavek a byla spektrofotometricky změřena její kvalita a kvantita.

### 5.4.3 Detekce T-DNA *sgRNA* s U6 promotorem u rostlin T0 a T1 generace pomocí PCR

1. Do 0,2 ml mikrozkušavek byla v laminárním boxu připravena PCR reakční směs, (tab. 1) za využití primerů:
  - Forward GACCAAGCCCGTTATTCTGA
  - Reverse TGTGGAATTGTGAGCGGATA
2. K této směsi byla přidána templátová DNA. Jako pozitivní kontrola byla využita genomická DNA z rostliny s potvrzenou přítomností genu *U6\_sgRNA* a jako negativní kontrola genomická DNA z rostliny netransformované.

Tab. 1: PCR reakční směs pro amplifikaci úseku T-DNA.

složka	objem [ $\mu$ l]
ddH <sub>2</sub> O	2,50
primer PROTO CK2_F	0,25
primer PROTO CK2_R	0,25
REDTaq ReadyMix	5,00
templátová DNA	2,00
<b>celkem</b>	<b>10,0</b>



- Mikrozkumavky byly krátce centrifugovány a umístěny do termocykléru s přednastaveným programem PROTO\_CK2, (tab. 2).

Tab. 2: Parametry programu PROTO\_CK2, amplifikace úseku T-DNA.

krok	fáze	teplota	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95 °C	3 min	1 x
2.	denaturace	95 °C	20 s	
3.	annealing	59 °C	30 s	38 x
4.	elongace	72 °C	55 s	
5.	finální elongace	72 °C	5 min	1 x

- Bylo připraveno 80 ml 1% agarózového gelu, do kterého byly přidány 2  $\mu$ l ethidium bromidu.
- Po jeho zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany a do jamek v gelu byly nanášeny PCR produkty a marker molekulové hmotnosti Ladder II o velikosti 2000 bp. Vzorky byly separovány při napětí 90 V.
- Po dokončení separace byl pořízen obrazový záznam gelu v UV transiluminátoru pomocí programu GeneSnap.
- Byly vybrány pozitivní odnože T0 rostlin a z těchto odnoží byla vyseta semena T1 generace.

#### 5.4.4 Izolace genomické DNA paramagnetickými částicemi z rostlin T1 generace

U rostlin T1 generace byla provedena izolace DNA Edwardsovou metodou a detekce přítomnosti genu *U6\_sgRNA*. K izolaci paramagnetickými částicemi byly vybrány rostliny, u kterých byla potvrzena přítomnost T-DNA obsahující sgRNA kazetu. DNA izolovaná paramagnetickými částicemi byla dále využívána k amplifikaci genu *ABI5* u rostlin T1 generace a jeho detekci pomocí Sangerovy metody sekvenování.

- Bylo připraveno 100 ml základního lyzačního pufru a jeho pH upravena pomocí 1N roztoku HCl na 7,2.
- Z rostliny byl do 1,5 ml mikrozkumavky odebrán vzorek listu o délce 3–4 cm a mikrozkumavka byla umístěna do nádoby s tekutým dusíkem.

3. Vzorek byl homogenizován sterilní plastovou homogenizační tyčinkou za průběžného chlazení v tekutém dusíku.
4. Ke vzorku bylo přidáno 250  $\mu$ l lyzačního pufru a vzorek byl inkubován v topném hnízdě (45 min, 65 °C).
5. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (2 min / 10 000 rpm).
6. Do nové 1,5 ml mikrozkušavky bylo přeneseno 11  $\mu$ l paramagnetických částic, 80  $\mu$ l isopropanolu a 100  $\mu$ l supernatantu a zkumavky byly umístěny do magnetického stojanu po dobu 5 minut.
7. Byl odpipetován supernatant, odstraněn magnetický blok a k peletu bylo přidáno 100  $\mu$ l 70 % etanolu.
8. Zkumavky byly umístěny do magnetického stojanu po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován, byl odstraněn magnetický blok a k peletu bylo přidáno 100  $\mu$ l 70 % etanolu.
9. Předcházející bod byl opakován.
10. Supernatant byl odpipetován, pelet vysušen v laminárním boxu a po jeho vysušení bylo do zkumavek přidáno 20  $\mu$ l sterilní vody a zkumavky byly umístěny do magnetického stojanu po dobu 5 minut.
11. Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkušavek a kvalita a kvantita izolované DNA byla změřena spektrofotometricky.
12. Vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

#### **5.4.5 Amplifikace genu *ABI5* a detekce mutací Sangerovou metodou sekvenování**

Transgenické rostliny, které obsahovaly *U6\_sgRNA* byly vybrány k amplifikaci genu *ABI5*. Rostliny, u kterých byla zjištěna přítomnost genu *ABI5* byly poslány na Ústav experimentální botaniky, kde byla provedena sekvenace Sangerovou metodou.

1. Do 0,2 ml mikrozkušavek byla v laminárním boxu připravena PCR reakční směs, (tab. 3) za využití primerů:
  - Forward ABI\_SEQ GAGCTGCAAACTCGGTGTG
  - Reverse ABI\_SEQ AACTGCTCCAGCGTCATCTC

Tab. 3: PCR reakční směs pro amplifikaci úseku obsahujícím gen *ABI5*.

složka	objem [μl]
ddH <sub>2</sub> O	5,0
primer ABI_SEQ_F	0,5
primer ABI_SEQ_R	0,5
REDTaq ReadyMix	10,0
templátová DNA	4,0
<b>celkem</b>	<b>20,0</b>

- Zkumavky byly krátce centrifugovány a umístěny do termocykléru s nastaveným programem SEQ-HLA, (tab. 4) kde proběhla amplifikace úseku obsahujícím gen *ABI5*.

Tab. 4: Parametry programu SEQ-HLA.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95 °C	4 min	1 x
2.	denaturace	95 °C	20 s	
3.	annealing	60 °C	30 s	39 x
4.	elongace	72 °C	110 s	
5.	finální elongace	72 °C	5 min	1 x

- Po dokončení amplifikace genu pomocí termocykléru byla provedena elektroforéza a přítomnost PCR produktu ověřena v pomoci transiluminátoru v programu GeneSnap.
- V Ústavu experimentální botaniky byla provedena Sangerova metoda sekvenování a získaná data byla vyhodnocena v programu ApE.

#### 5.4.6 Detekce genu *Cas9*, *Hyg* a *U6\_sgRNA* v rostlinách T2 generace

- Bylo vyseto 25 obilek T2 generace společně se 2 obilkami netransformované rostliny odrůdy Francin sloužícími coby negativní kontrola.
- Z mladých rostlin T2 generace, byla izolována DNA pomocí Edwardsovy metody a po spektrofotometrickém přeměření byly hodnoty koncentrace upraveny do rozmezí 200–300 ng/μl.

3. Byla provedeno PCR pro detekci genů *Cas9*, *Hyg* a *U6\_sgRNA* za následujících parametrů programů v termocykléru, (tab. 5, 6, 7).

Tab. 5: Parametry programu CAS9, amplifikace genu *Cas9*.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95	4 min	1 x
2.	denaturace	95	20 s	
3.	annealing	58	30 s	37 x
4.	elongace	72	60 s	
5.	finální elongace	72	5 min	1 x

Tab. 6: Parametry programu HYG\_204, amplifikace genu *Hyg*.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	96	4 min	1 x
2.	denaturace	96	20 s	
3.	annealing	60	30 s	37 x
4.	elongace	72	45 s	
5.	finální elongace	72	5 min	1 x

Tab. 7: Parametry programu PROTO\_CK, amplifikace *U6\_sgRNA*.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95	3 min	1 x
2.	denaturace	95	20 s	
3.	annealing	58	30 s	38 x
4.	elongace	72	55 s	
5.	finální elongace	72	5 min	1 x

4. Byla provedena elektroforéza a přítomnost PCR produktu ověřena pomocí transiluminátoru v programu GeneSnap.

5. Byly vybrány rostliny s ověřenou přítomností T-DNA obsahující gen *U6\_sgRNA* a u těchto rostlin byla provedena izolace RNA (obr. 6).



Obr. 6: Vybraná transgenní rostlina jarního ječmene kultivaru Golden Promise 48-13-5.4 T2 generace.

#### 5.4.7 Izolace RNA z rostlin T2 generace

K izolaci RNA byly vybrány 5 rostlin obsahujících gen *U6\_sgRNA*.

1. Ve sterilní třecí misce s tloučkem, které byly vychlazené tekutým dusíkem, byl homogénizován 10–15 cm dlouhý úsek listu.
2. Zhomogenizovaný list byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky a umístěn do nádoby s dusíkem.
3. Po homogenizaci všech vzorků byl do každé z mikrozkušavek přidán 1 ml TRI Reagentu a vzorky byly krátce promíchány na vortexu.
4. Vzorky byly umístěny do vodní lázně (60 °C / 1 hod).
5. Mikrozkušavky byly centrifugovány na chlazené centrifuze při 4 °C (12 000 rpm / 10 min).

6. Do nových 1,5 ml mikrozkušavek byla pipetou přenesena svrchní bezbarvá fáze vzorku o objemu 400  $\mu$ l, k ní bylo přidáno 400  $\mu$ l vychlazeného 70% isopropanolu a obsah zkumavky byl jejím pomalým obracením promíchán.
7. Mikrozkušavky byly centrifugovány na chlazené centrifuze při 4 °C (14 000 rpm / 30 min).
8. Byl odpipetován supernatant a k peletu byl přidán 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.
9. Mikrozkušavky byly centrifugovány na chlazené centrifuze při 4 °C (14 000 rpm / 10 min).
10. Byl odpipetován supernatant a pelet byl vysušen v laminárním boxu.
11. K peletu bylo přidáno 40  $\mu$ l sterilní vody a vzorky byly umístěny do 4 °C do dalšího dne.
12. Následující den byly vzorky přepipetovány do nových mikrozkušavek.

#### **5.4.8 Degradace DNA a inaktivace DNázy**

1. Ke 40  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 9  $\mu$ l pufru a 2  $\mu$ l TURBO™ DNázy.
2. Vzorky byly inkubovány ve vodní lázni (37 °C / 30 min).
3. Ke vzorkům byly přidány 4  $\mu$ l sterilní 40mM EGTA.
4. Vzorky byly inkubovány v topném hnízdě (65 °C / 10 min) a následně umístěny do -4 °C.

#### **5.4.9 Přepis izolované RNA do cDNA**

1. Byly změřeny koncentrace izolované RNA a vzorky byly naředěny na finální objem 12  $\mu$ l o koncentraci 90 ng/ $\mu$ l.
2. Ke zředěnému roztoku byl přidán 1  $\mu$ l Oligo(dT)18 primeru a vzorky byly inkubovány v topném hnízdě (65 °C / 5 min).
3. Po ukončení inkubace byly zkumavky zchlazeny na ledu a ke vzorkům byly přidány 2  $\mu$ l dNTP Mixu nukleotidů, 5  $\mu$ l reakčního pufru a 1  $\mu$ l Thermo Scientific RevertAid H Minus reverzní transkriptázy.
4. Zkumavky byly inkubovány ve vodní lázni (42 °C / 1 hod).

5. Inkubace vzorků byla následně zastavena jejich přemístěním do topného hnízda (70 °C / 10 min).

#### 5.4.10 Detekce transkripce housekeeping genu elongačního faktoru (EF) a genu Cas9

1. Do 0,2 ml mikrozkušavek byla v laminárním boxu připravena PCR reakční směs, (tab. 8) za využití následujících primerů:
  - a) pro amplifikaci úseku genu elongačního faktoru:
    - Forward Hv\_EF1: GAAGATGATTCCCACCAAGC
    - Reverse Hv\_EF1: TGACACCAACAGCCACAGTT
  - b) pro amplifikaci genu Cas9:
    - Forward RT\_Cas9: TTC GCT ACT GTT CGC AAG GT
    - Reverse RT\_Cas9: GGT GGA TGA GAG TAG CGT CG
2. K této směsi byla přidána templátová cDNA, jejíž koncentrace byla naředěna v poměru 1:10 na finální objem 50 µl. Jako pozitivní kontrola byla využita cDNA z rostliny s potvrzenou přítomností těchto genů a jako negativní kontrola pro gen Cas9 cDNA z rostliny netransformované.

Tab. 8: PCR reakční směs pro amplifikaci genu EF a Cas9

složka	objem [µl]
ddH <sub>2</sub> O	2,50
primer F	0,25
primer R	0,25
REDTaq ReadyMix	5,00
templátová DNA	2,00
<b>celkem</b>	<b>10,0</b>

3. Vzorky byly vloženy do termocykléru a byl spuštěn program Cas9\_RT, (tab. 9).

Tab. 9: Parametry programu Cas9\_RT, amplifikace Cas9 a genu EF.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95	4 min	1 x

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
2.	denaturace	95	20 s	
3.	annealing	58	30 s	37 x
4.	elongace	72	1 min	
5.	finální elongace	72	5 min	1 x

- Byly připraveny dva 1,5% agaróзовé gely s 1 µl ethidium bromidu.
- Byla provedena elektroforéza při napětí 80 V a přítomnost PCR produktu ověřena v pomoci transiluminátoru v programu GeneSnap.

#### 5.4.11 Vytvoření teplotního gradientu RT-PCR s plazmidem s potvrzenou přítomností genu *ABI5*

- Do 0,2 ml mikrozkušavek byla v laminárním boxu připravena PCR reakční směs, (tab.10) za využití následujících primerů:
  - Foward *ABI5* GAGCTGCAAAACTCGGTGTG
  - Reverse *ABI5* AACTGCTCCAGCGTCATCTC
- K této směsi byl přidán 1 µl vzorku plazmidové DNA, u které byla potvrzena přítomnost genu *ABI5*.

Tab. 10: PCR reakční směs pro amplifikaci *ABI5* genu v plazmidu.

složka	objem [µl]
ddH <sub>2</sub> O	3,50
primer F	0,25
primer R	0,25
REDTaq ReadyMix	5,00
templátová DNA	1,00
<b>celkem</b>	<b>10,0</b>

- Vzorky byly vloženy do termocykléru a byl spuštěn program ABISGGRA, (tab. 11)



Tab. 11: Parametry programu ABISGGRA, amplifikace genu *ABI5*.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95	3 min	1 x
2.	denaturace	95	15 s	
3.	annealing	56–62	20 s	36 x
4.	elongace	72	30 s	
5.	finální elongace	72	3 min	1 x

- Byl připraven 1,5% agarózový gel s 1  $\mu$ l ethidium bromidu.
- Byla provedena elektroforéza při napětí 80 V a přítomnost PCR produktu ověřena v pomoci transiluminátoru v programu GeneSnap.
- Na základě intenzity signálů byla vyhodnocena optimální teplota pro RT-PCR vzorků cDNA pro detekci transkripce transgenů *ABI5*.

#### 5.4.12 Detekce transkripce transgenů *sgRNA* v rostlinách T2 generace

- Do 0,2 ml mikrozkušavek byla v laminárním boxu připravena PCR reakční směs, (tab. 12) za využití následujících primerů:
  - Foward *ABI5*: GAGCTGCAAACTCGGTGTG
  - Reverse *ABI5*: AACTGCTCCAGCGTCATCTC
- K této směsi byly přidán 2  $\mu$ l vzorku cDNA vzorků 48-13-5.4, 48-13-5.6, 48-13-5.7, 48-13-5.11, 48-13-3.12, jako pozitivní kontrola byla využívána výše uvedená plazmidová DNA a jako negativní kontrola cDNA z netransformované rostliny ječmene.

Tab. 12: PCR reakční směs pro amplifikaci transgenů *ABI5* v rostlinách T1 generace.

složka	objem [ $\mu$ l]
ddH <sub>2</sub> O	2,50
primer F_ <i>ABI5</i>	0,25
primer R_ <i>ABI5</i>	0,25
REDTaq ReadyMix	5,00
templátová DNA	2,00

složka	objem [μl]
celkem	10,0

3. Vzorky byly vloženy do termocykléru a byl spuštěn program ABISGRNA, (tab. 13).

Tab. 13: Parametry programu ABISGRNA, amplifikace genu *ABI5*.

krok	fáze	teplota [°C]	čas	počet opakování
1.	iniciační denaturace	95	3 min	1 x
2.	denaturace	95	15 s	
3.	annealing	59	20 s	36 x
4.	elongace	72	30 s	
5.	finální elongace	72	3 min	1 x

4. Byl připraven 1,5% agarózový gel s 1 μl ethidium bromidu.
5. Byla provedena elektroforéza při napětí 80 V a přítomnost PCR produktu ověřena v pomoci transiluminátoru v programu GeneSnap.

## 6 Výsledky

Cílem bakalářské práce bylo detekovat přítomnost genů *U6\_sgRNA*, *Cas9* a selekčního genu hygromycinu, u transformovaných rostlin T0, T1 a T2 generace a ověřit vyvolanou mutaci genu *abi5* molekulárními metodami.

### 6.1 Detekce *sgRNA* s U6 promotorem u rostlin T0 a T1 generace

#### 6.1.1 Detekce u rostlin T0 generace

Byla izolována DNA z 38 odnoží 4 vybraných rostlin jarního ječmene kultivaru Golden Promise T0 generace, které byly transformovány vektorem pBRAC214AS\_sgRNA. DNA byla izolována Edwardsovou metodou, u každého vzorku byla spektrofotometricky přeměřena koncentrace DNA a stanovena čistota. Po úpravě koncentrace byla provedena PCR a produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu na elektroforéze při napětí 90 V. Separované produkty byly vizualizovány v UV transiluminátoru pomocí programu GeneSnap. Při všech

elektroforetických separacích byly do gelu mimo vzorky nanášeny také pozitivní kontroly v podobě genomické DNA izolované z transgenních rostlin obsahujících T-DNA s *U6\_sgRNA* kazetou a vzorky negativních kontrol v podobě genomické DNA z netransformovaných rostlin. Jako marker molekulové hmotnosti byl využíván Ladder II (BioLine) o velikosti 2000 bp. Z celkového počtu 38 odnoží byl detekován gen *U6\_sgRNA* u 9 z nich, (tab. 14).

Tab. 14: Přítomnost *U6\_sgRNA* u rostlin T0 generace.

označení rostliny T0	odnože [počet]	pozitivní odnože [počet]	negativní odnože [počet]	úspěšnost [%]
12	11	2	9	18,2
17	7	3	4	48,9
25	6	2	4	33,3
48	14	2	12	14,3
<b>celkem</b>	38	9	29	23,7

### 6.1.1 Detekce u rostlin T1 generace

Semena z pozitivních odnoží rostlin T0 generace byla po dozrání vyseta a u mladých T1 rostlin byla stejným způsobem detekována přítomnost genu *U6\_sgRNA*. Jeho přítomnost byla detekována u 38 rostlin z celkových 52, (tab. 15).

Tab. 15: Přítomnost *U6\_sgRNA* u rostlin T1 generace.

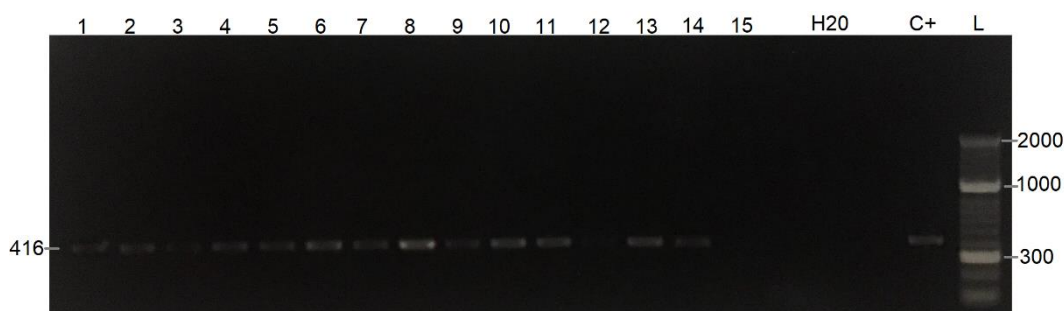
označení odnože rostliny T0	rostlina T1 [počet]	pozitivní rostliny [počet]	negativní rostliny [počet]	úspěšnost [%]
12-3	6	2	4	33,3
12-11	6	3	3	50,0
17-3	6	4	2	66,7
17-5	6	5	1	83,3
17-6	6	6	0	100
25-3	6	5	1	83,3
25-4	5	4	1	80,0
48-13	6	6	0	100
48-15	5	3	2	60,0
<b>celkem</b>	52	38	14	73,1

## 6.2 Amplifikace genu *ABI5* a detekce mutací Sangerovou metodou sekvenování

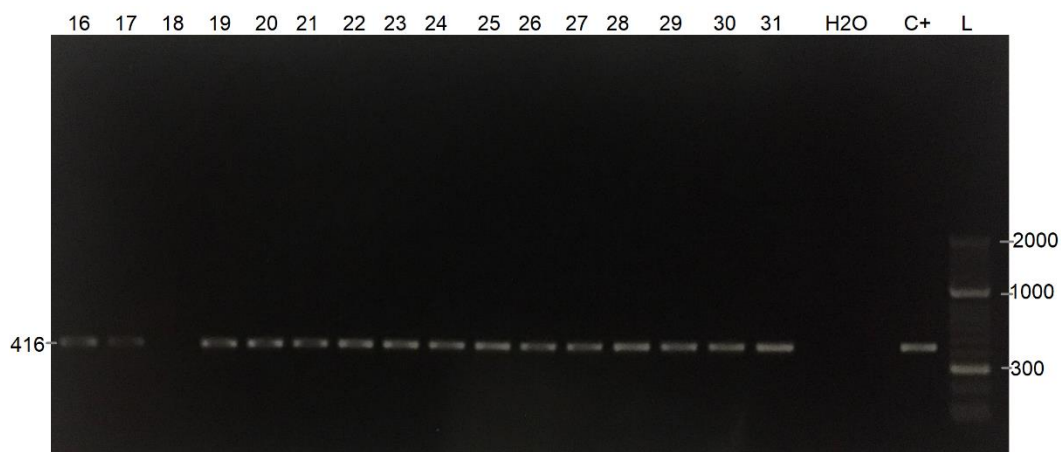
Z 38 rostlin T1 generace, u kterých byla prokázána přítomnost genu *U6\_sgRNA*, byla paramagnetickými částicemi izolována DNA. Metodou PCR byl amplifikován úsek obsahující gen *ABI5* a elektroforetickou separací byla jeho přítomnost potvrzena u 35 vzorků z 38, (obr. 7, 8, 9). Pozitivní vzorky, byly na Ústavu experimentální botaniky sekvenovány pomocí Sangerovy metody, (obr. 10).

Tab. 15: Přítomnost transgenu *ABI5* u rostlin T1 generace po izolaci DNA paramagnetickými částicemi.

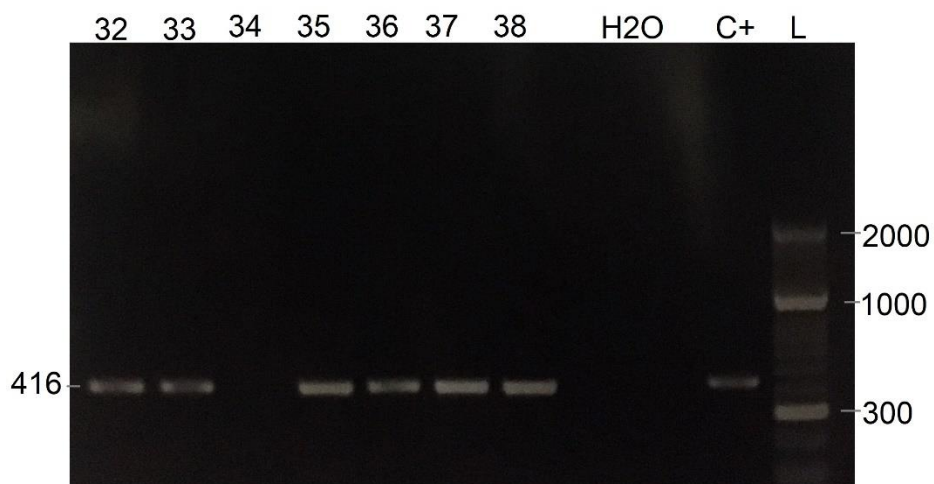
označení odnože rostliny T0	rostliny T1 [počet]	pozitivní rostliny [počet]	negativní rostliny [počet]	úspěšnost [%]
12-3	2	2	0	100
12-11	3	3	0	100
17-3	4	4	0	100
17-5	5	5	0	100
17-6	6	6	0	100
25-3	5	5	0	100
25-4	4	3	1	75,0
48-13	6	5	1	83,3
48-15	3	2	1	66,7
<b>celkem</b>	<b>38</b>	<b>35</b>	<b>3</b>	<b>92,1</b>



Obr. 7: Vizualizace amplikonu obsahujícím gen *ABI5* o velikosti 416 bp. Dráhy 1–15 označují vzorky DNA T1 generace jarního ječmene, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA) L ladder o velikosti 2000 bp.

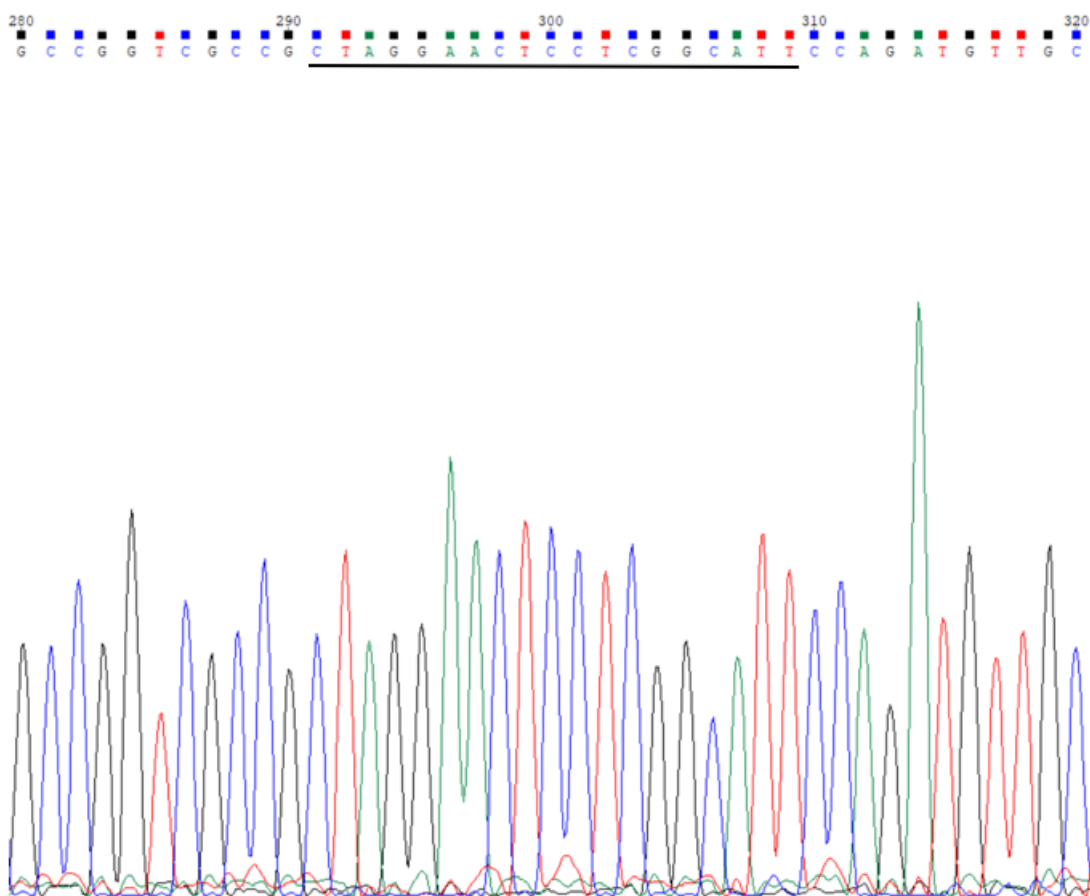


Obr. 8: Vizualizace ampliconu obsahujícím gen *ABI5* o velikosti 416 bp. Dráhy 16–31 označují vzorky DNA T1 generace jarního ječmene, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA) L ladder o velikosti 2000 bp.



Obr. 9: Vizualizace ampliconu obsahujícím gen *ABI5* o velikosti 416 bp. Dráhy 32–38 označují vzorky DNA T1 generace jarního ječmene, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA) L ladder o velikosti 2000 bp.

GCCGGTCGCCGCTAGGA~~ACTCCTCGGCATTCCAGATGTTGC~~



Obr. 10: Sekvenování cílového úseku transgenní rostliny označení 25-3-2 T2 generace jarního ječmene, u něhož byl předpokládán vznik mutace.

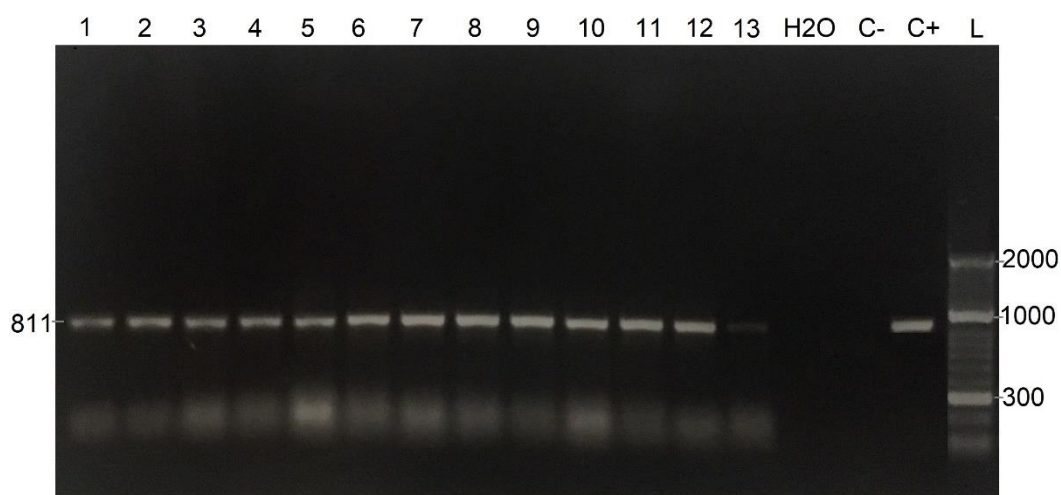
U žádné rostliny T2 generace nebyla detekována mutace v genu *abi5*.

### 6.3 Detekce genu *Cas9*, *Hyg* a *U6\_sgRNA* v rostlinách T2 generace

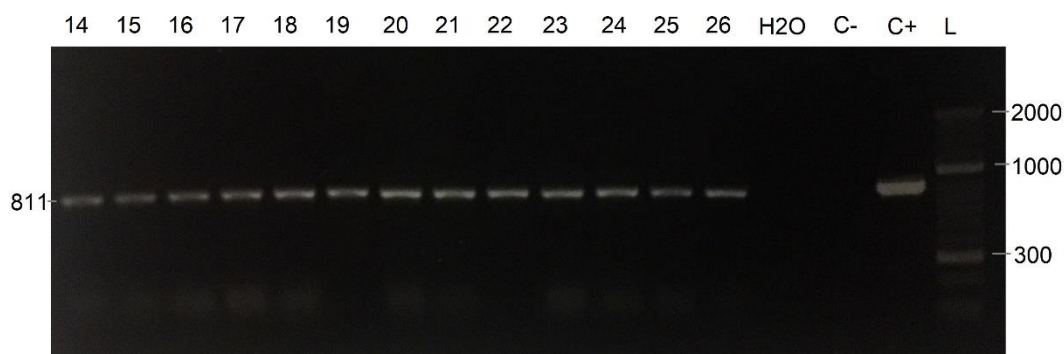
Náhodně byly vybrány 2 pozitivní rostliny generace T1, u kterých byla potvrzena přítomnost genu *U6\_sgRNA*. Z mladých rostlin T2 generace byla izolována DNA Edwardsovou metodou. Po změření koncentrace byla provedena PCR. Separované produkty byly vizualizovány v UV transiluminátoru pomocí programu GeneSnap. Při všech elektroforetických separacích byly do gelu mimo vzorky nanášeny také pozitivní kontroly v podobě plazmidové DNA nebo DNA izolovaná z ověřených transgenních rostlin, u kterých byla potvrzena přítomnost genu *Cas9*, *Hyg* a *sgRNA*. Vzorky negativních kontrol byly izolovány z netransformovaných rostlin jarního ječmene odrůdy Francin. Jako marker molekulové hmotnosti byl využíván Ladder II o velikosti 2000 bp.

### 6.3.1 Detekce genu *Cas9*

Detekce byla provedena u 26 rostlin T2 generace. U všech rostlin byla potvrzena přítomnost genu *Cas9*, (obr. 11, 12).



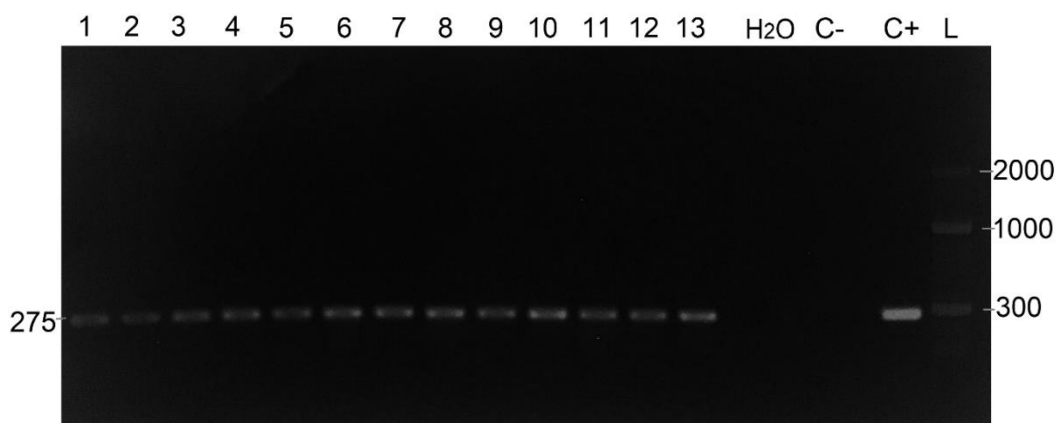
Obr. 11: Vizualizace amplikonu (811 bp) obsahujícím gen *Cas9*. Dráhy 1–13 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontrolu, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA z ověřené transgenní rostliny), L ladder o velikosti 2000 bp.



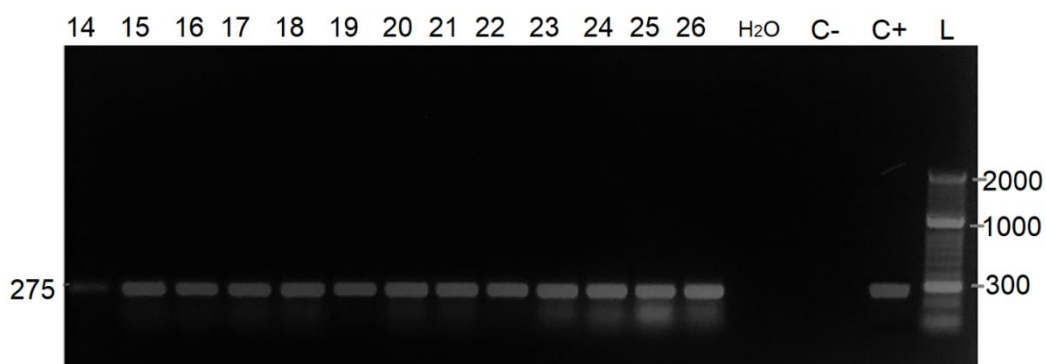
Obr. 12: Vizualizace amplikonu (811 bp) obsahujícím gen *Cas9*. Dráhy 14–26 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontrolu, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA z ověřené transgenní rostliny), L ladder o velikosti 2000 bp.

### 6.3.2 Detekce genu *Hyg*

Detekce byla provedena u 26 rostlin T2 generace. U všech rostlin byla potvrzena přítomnost genu *Hyg*, (obr. 13, 14).



Obr. 13: Vizualizace amplikonu (275 bp) obsahujícím gen *Hyg*. Dráhy 1–13 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontrolu, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA z ověřené transgenní rostliny), L ladder o velikosti 2000 bp.

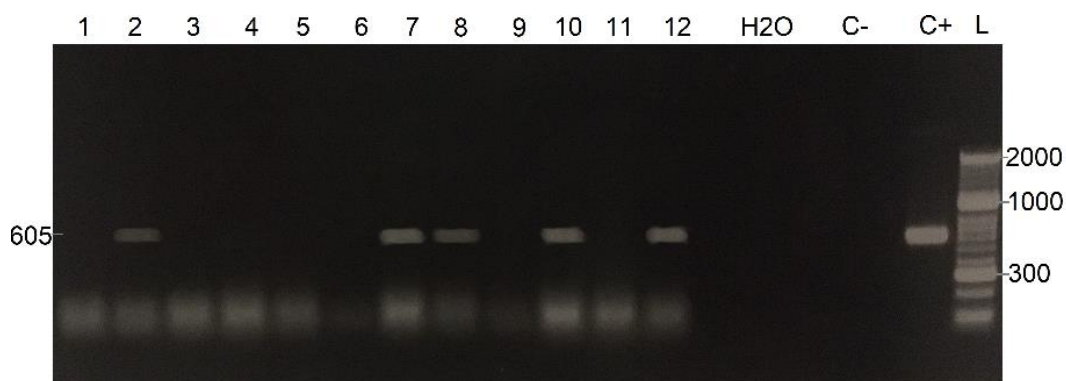


Obr. 14: Vizualizace amplikonu (275 bp) obsahujícím gen *Hyg*. Dráhy 14–26 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontrolu, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA z ověřené transgenní rostliny), L ladder o velikosti 2000 bp.

### 6.3.2 Detekce genu *U6\_sgRNA*

Detekce byla provedena u 26 rostlin T2 generace. Přítomnost *U6\_sgRNA* byla detekována u 5 rostlin, (obr. 15).





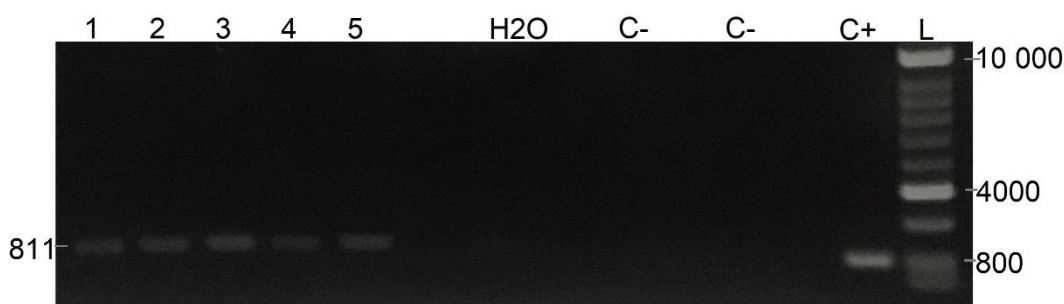
Obr. 15: Vizualizace amplikonu (605 bp) obsahujícím *sgRNA*. Dráhy 1–12 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontrolu, C+ pozitivní kontrolu (genomická DNA z ověřené transgenní rostliny), L ladder o velikosti 2000 bp.

## 6.4 Detekce transkripce housekeeping genu elongačního faktoru a genu *Cas9*

Z pěti rostlin T2 generace jarního ječmene, u kterých byla potvrzena přítomnost *U6sgRNA*, byla izolována RNA, ze které byla pomocí enzymu reverzní transkriptázy přepsána na cDNA. Pomocí PCR proběhla amplifikace housekeeping genu elongačního faktoru a genu *Cas9*. Produkty PCR byly separovány na elektroforéze a pomocí transiluminátoru a programu GeneSnap byly vizualizovány.

### 6.4.1 Detekce transkripce genu *Cas9*

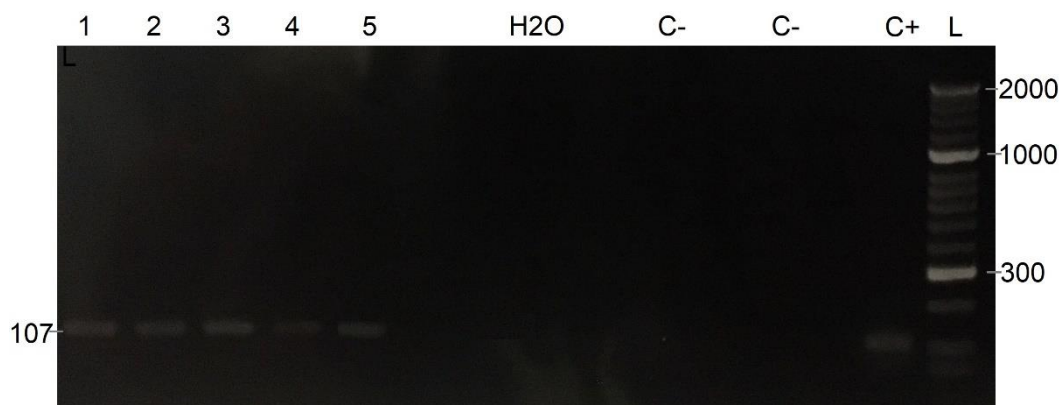
Detekce byla provedena u 5 rostlin T2 generace. U všech rostlin byla potvrzena přítomnost genu *Cas9*, (obr. 16).



Obr. 16: Vizualizace amplikonu obsahujícím gen *Cas9* (811 bp). Dráhy 1–5 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontroly (netransformovaný jarní ječmen odrůdy Francin), C+ pozitivní kontrolu, L ladder o velikosti 10 000 bp.

### 6.4.1 Detekce transkripce genu elongačního faktoru (*EF*)

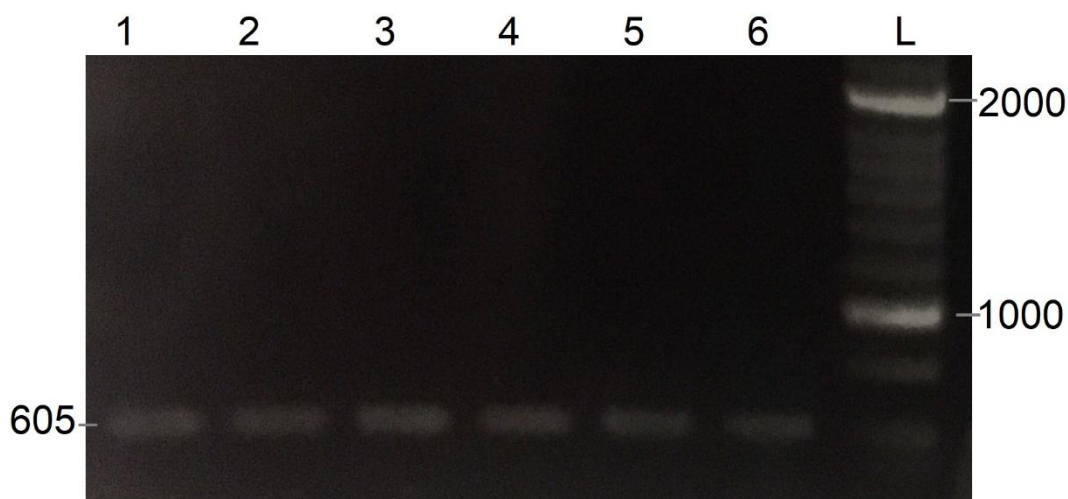
Detekce byla provedena u 5 rostlin T2 generace. U všech rostlin byla potvrzena přítomnost genu *EF*, (obr. 17).



Obr. 17: Vizualizace ampliconu obsahujícím gen *EF* (107 bp). Dráhy 1–5 označují vzorky DNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontroly (netransformovaný jarní ječmen odrůdy Francin), C+ pozitivní kontrolu, L ladder o velikosti 2000 bp.

### 6.5 Teplotní gradient RT-PCR s plazmidy s potvrzenou přítomností transgenu *sgRNA*

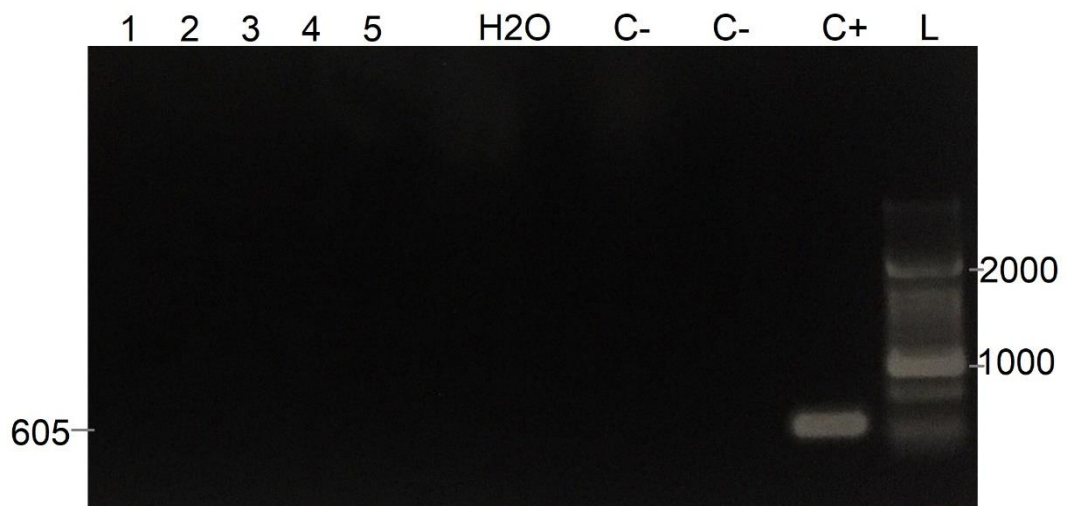
Pro optimalizaci RT-PCR byl vytvořen teplotní gradient annealing fáze. Namísto cDNA z rostlin byl použit plazmid pBRACT214AS\_*sgRNA*, u kterého byla potvrzena přítomnost genu *U6-sgRNA*. Teploty annealingu se pohybovaly v rozpětí 56–62 °C. Vizualizace pomocí transiluminátoru zobrazila přibližně stejnou intenzitu signálů u všech testovaných teplot, (obr. 18).



Obr. 18: Vizualizace amplikonu obsahujícím transgen *U6\_sgRNA* (605 bp). V drahách 1–6 plazmid pBRACT214AS\_sgRNA, u kterého byla potvrzena přítomnost genu *U6-sgRNA*. Teplota annealingu stoupá směrem doprava od 56 °C po 62 °C. Vpravo ladder o velikosti 2000 bp.

## 6.6 Detekce transkripce transgenů *U6\_sgRNA* v rostlinách T2 generace

Detekce transkripce transgenů *sgRNA* byla provedena u 5 rostlin T2 generace poté, co u nich byla potvrzena genu *Cas9*. Program pro PCR byl vybrán na základě výsledků testu teplotního gradientu a teplota annealingu byla nastavena na 59 °C. Pozitivní kontrolou byl plazmid pBRACT214AS\_sgRNA jako negativní kontrola cDNA z netransformované rostliny jarního ječmene. Na základě dosažených výsledků bylo zjištěno, že u žádné z rostliny nedošlo k transkripci transgenů *U6\_sgRNA*, (obr. 19).



Obr. 19: Vizualizace amplikonu obsahujícím transgen *U6\_sgRNA*. Dráhy 1–5 označují vzorky cDNA T2 generace jarního ječmene, C- negativní kontrolu, C+ pozitivní kontrolu, L ladder o velikosti 2000 bp.

## 7 Diskuze

Zkoumání genů ovlivňujících odezvy rostlin na abiotický stres má kvůli měnícímu se klimatu velký význam pro hospodářství. Tyto odezvy jsou řízeny mnoha regulátory, jejichž aktivita se v závislosti na stavu vody v prostředí mění. ABI5 je signalizační regulátor ABA, který integruje mnoho různých signálů a ovlivňuje expresi genů reagujících na stres.

Mezi procesy, které tento gen ovlivňuje, se řadí klíčení semen, růst, fotosyntéza a vývoj laterálních kořenů. Způsob regulace genu *ABI5* a regulace proteinu ABI5 je složitý a vyžaduje mnoho transkripčních faktorů, enzymů a proteinových regulátorů. Exprese *ABI5* je výsledkem působení mnoha transkripčních faktorů a epigenetických událostí. Navíc proteinové interakce a posttranslační modifikace, jako je například fosforylace a ubikvitinace, moduluje aktivitu *ABI5* na proteinové úrovni. Další studie *ABI5* a zkoumání vlivu tohoto genu v přítomnosti abiotického stresu, mohou být velmi užitečné při získávání kultivarů, které mají lepší odolnost vůči stresu (Skubacz a kol., 2016).

V rámci bakalářské práce byla provedena identifikace transgenních rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise T0, T1 a T2 generace u 116 rostlinných vzorků. vektorem pBRAC214AS\_sgRNA. Předpokládá se, že systémem CRISPR/Cas9 bude vyvolána mutace genu *abi5*.

V T0 generaci byla Edwardsovou metodou izolována DNA z 38 odnoží 4 transgenních rostlin jarního ječmene. Pomocí PCR byla amplifikován gen *U6\_sgRNA*. Tento amplikon byl detekován u 9 odnoží. Z těchto odnoží byla vyseta semena rostlin T1 generace.

V T1 generaci byla Edwardsovou metodou izolována DNA z 52 rostlin. Pomocí PCR byl amplifikován gen *U6\_sgRNA*. Tento amplikon byl detekován u 38 rostlin, u kterých byla následně provedena izolace DNA paramagnetickými částicemi. Pomocí PCR byla amplifikován úsek obsahující gen *ABI5*, který byl detekován u 35 rostlin. Tyto vzorky byly předány do Ústavu experimentální botaniky, kde byla metodou Sangerova sekvenování provedena sekvenace cílové sekvence. Žádná z rostlin neobsahovala mutaci genu *abi5*.

V T2 generaci byla izolována DNA z 26 rostlin pomocí Edwardsovy metody. Pomocí PCR byly amplifikovány geny *U6\_sgRNA*, *Hyg* a *Cas9*. Amplikony genu *Hyg* a *Cas9* byly detekovány u všech 26 rostlin, amplikony *U6\_sgRNA* byly detekovány u 5 rostlin. Z pěti rostlin obsahujících gen *U6-sgRNA* byla izolována

RNA, která byla přepsána do cDNA. Pomocí RT-PCR byl amplifikován transkript genu *Cas9*. Transkripce tohoto genu byla detekována u všech rostlin. U žádné rostliny nebyl detekován transkript genu *U6\_sgRNA*.

Pomocí molekulární technologie CRISPR/Cas9 proběhla indukce mutací rostlin T0 generace. Úspěšnost indukce mutací touto metodou je u jednoděložných rostlin, jako je ječmen či pšenice, i dvouděložných jako je sója, technicky velmi náročná. Počet mutací se pohybuje do 10% (Zhang *et al.*, 2016). U metody CRISPR/Cas9 je úspěšnost mutageneze závislá na dvou hlavních systémech – *sgRNA* a *Cas9*. Exprese obou genů je kontrolována promotory. V budoucnu by zvýšení úspěšnosti vyvolání mutace mohlo být dosaženo například výběrem jiného typu promotoru (Ma a kol., 2015).

Rozdíly v úspěšnosti vyvolávání mutací mohou být způsobeny mnoha faktory. Mezi tyto faktory se řadí odlišné způsoby reparace DNA u různých druhů rostlin nebo typ cílového genu, na který je mutace zaměřena. Pouze mutace určitých cílů jsou organismem tolerovány. Mutace poškozující funkci genů nezbytných pro život buňky, mohou být pro rostlinu fatální. (Zhang a kol., 2014).

## 8 Závěr

V rámci bakalářské práce byla vypracována rešerše na téma transkripčního faktoru kyseliny abscisové ABI5 se zaměřením na jeho funkci při vystavení rostlin abiotickému stresu. Rostliny *Arabidopsis*, u kterých proběhla mutace genu *abi5*, vykazují pleiotropní defekty v odpovědi ABA, včetně snížené citlivosti na inhibici klíčení způsobené ABA a také vykazují změněné exprese některých ABA-regulovaných proteinů.

Byly vybrány 4 transgenní rostliny T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise, které byly transformovány vektorem pBRACKT214AS\_sgRNA obsahující protospacery pro vyvolání mutace genu *abi5*. U 9 z 38 odnoží rostlin T0 generace byla prokázána přítomnost T-DNA s *U6\_sgRNA* kazetou. Z pozitivních odnoží bylo po jejich dozrání zasazeno 52 semen T1 generace a u 38 byla potvrzena přítomnost genu *U6\_sgRNA*. Metodou PCR byl amplifikován úsek obsahující gen *ABI5* a elektroforetickou separací byla jeho přítomnost potvrzena u 35 vzorků z 38. Pozitivní vzorky byly na Ústavu experimentální botaniky sekvenovány pomocí Sangerovy metody, ale mutace nebyla prokázána. Při analýze transkripce u rostlin T2 generace byla detekována přítomnost transkriptů transgenů Cas9, ale přítomnost *sgRNA* detekována nebyla.

## REFERENCE

- Casaretto, J., & Ho, T. H. D. (2003). The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *Plant Cell*, *15*(1), 271–284.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.007096>
- Clark, DP, Pazdernik, NJ y McGehee, M. . (2019). *Plasmidos Biologia molecular*.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9>
- Dickson, A. D., Harlan, J. R., Kilngman, D. L., Moseman, J. G., Olien, C. R., Price, P. B., Reid, D. A., Shands, R. G., Suneson, C. A., & Wiebe, G. A. (1979). *BARLEY: Origin, Botany, Culture, Winter Hardiness, Genetics, Utilization, Pests*. 162.  
<http://naldc.nal.usda.gov/download/CAT79716376/PDF#page=17>
- Gordon, J. E. (2015). *NIH Public Access*. *2*(6).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013.The>
- Griffith, F. (1928). The significance of penumococcal types. *Journal of Hygiene*, *64*(2), 129–175. <https://doi.org/10.1017/S0022172400040420>
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & S. Ramu, V. (2018). Methods of Plant Transformation- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(07), 2656–2668.  
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, *172*(4), 650–665.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
- Larkin, P. J. (1986). Genetic engineering of plants — agricultural research opportunities and policy concerns. In *Agriculture, Ecosystems & Environment* (Roč. 16, Číslo 2). [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(86\)90104-0](https://doi.org/10.1016/0167-8809(86)90104-0)
- Liu, H., & Stone, S. L. (2014). Regulation of ABI5 turnover by reversible post-translational modifications. *Plant Signaling and Behavior*, *9*(JAN), 1–5.  
<https://doi.org/10.4161/psb.27577>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H.,



- Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., & Liu, Y. G. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274–1284.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S. O., 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., ... Stein, N. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 544(7651), 427–433.  
<https://doi.org/10.1038/nature22043>
- Mccarty, M. (1943). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research*, 6, 137-158.
- Nakamura, S., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant Journal*, 26(6), 627–635.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01069.x>
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., & Kamiya, Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20(2), 55–67.  
<https://doi.org/10.1017/S0960258510000012>
- Paul, J. W., & Qi, Y. (2016). CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Reports*, 35(7), 1417–1427. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1985-z>
- S.B. Gelvin. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation : the Biology behind the “ Gene-Jockeying ” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16>
- Singh, M., Yadav, A., & Amoah, E. (2010). *Plasmid DNA Transformation in*. 6(4), 561–568.
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2016). The role and regulation of ABI5 (ABA-insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01884>

Taner, A., Muzaffer, A., & Fazil, D. (2004). Barley: Post-harvest Operations. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1–64.

<http://www.fao.org/3/a-au997e.pdf>

Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., & Sobolev, A. S. (2018). Transcription factors: Time to deliver. *Journal of Controlled Release*, 269(September 2017), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.004>

Watson, M. R., Lin, Y. F., Hollwey, E., Dodds, R. E., Meyer, P., & McDowall, K. J. (2016). An improved binary vector and escherichia coli strain for agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(7), 2195–2201.

<https://doi.org/10.1534/g3.116.029405>

Yenofsky, R. L., Fine, M., & Pellow, J. W. (1990). A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), 3435–3439.

<https://doi.org/10.1073/pnas.87.9.3435>

Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N., & Zhu, J. K. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 797–807.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12200>

Webové stránky:

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020 [online]. FAO. [cit. 5. 4. 2020]. Dostupné z: <http://www.fao.org/home/en/>