

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Analýza genových interakcí mezi transkripčním faktorem SPT6L a geny regulujícími kvetení *Arabidopsis thaliana*

Adéla Uhrová
Hlavní město Praha

Praha 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Analýza genových interakcí mezi transkripčním faktorem SPT6L a geny regulujícími kvetení *Arabidopsis thaliana*

Analysis of gene interactions between the transcription factor SPT6L and the genes regulating flowering *Arabidopsis thaliana*

Autoři: Adéla Uhrová

Škola: Gymnázium, Praha 2, Botičská 1, Botičská 424, 128 01 Praha 2

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: Mgr. Vojtěch Čermák, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Vojtěcha Čermáka, Ph.D. na katedře Experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Praha 25. ledna 2022

Adéla Uhrová

Adéla Uhrová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Vlastně Čepelové za cenné rady a Ing. Evženu Markalousovi za významnou korekturu mé odborné práce. Děkuji rodině za zázemí, které mi poskytla a pár mým přátelům, kteří mi po celou dobu drželi palce.

Děkuji RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za umožnění psát odbornou práci v laboratoři Katedry experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a potažmo celému kolektivu laboratoře 210 za milé přijetí a pomoc. Této příležitosti si nesmírně vážím, předala mi mnoho zkušeností a ukázala mi, co mě baví a čemu se chci v životě věnovat.

Největší dík patří mému externímu školiteli Mgr. Vojtěchu Čermákovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, za všechny předané vědomosti, za jeho optimismus po celou dobu výzkumu, a hlavně za jeho neskonalou trpělivost při vysvětlování jak praktických, tak teoretických úloh.

Anotace

Kvetení rostlin je regulováno stovkami genů, kódující proteiny. Cílem mé odborné práce SOČ je zjistit, jak AGO vazebná doména, nacházející se v proteinu SPT6L, ovlivňuje kvetení. Pokud totiž zjistím, který květní gen *SPT6L* reguluje, můžu zjistit, jak ho reguluje – tedy jaká je funkce *SPT6L*. AGO proteiny jsou spolu s malými RNA významným regulátorem genové aktivity a širší poznání způsobů jejich funkce by mohlo vést například k lepšímu porozumění některých dědičných chorob a k dalšímu rozvoji šlechtění.

Abych zjistila, jaké regulační dráhy se *SPT6L* účastní, analyzovala jsem genetické interakce mezi mutanty 3 klíčových a dobře popsanych genů regulujících kvetení s mutantem v genu *SPT6L* ovlivňujícím transkripci.

Provedla jsem křížení mutantu v *spt6l*, mutovaného v AGO vazebné doméně, s rostlinami mutantními v genech *flc* (inhibitor kvetení) a *soc1* (integrátor signálních drah). Gen *FT* (florigen) je s genem *SPT6L* v silné genové vazbě, tudíž nelze získat dvojitého mutantu křížením., proto jsem zvolila inovativní metodu genových nůžek CRISPR/Cas9 na vystříhnutí AGO domény genu *SPT6L*. U úspěšně získaných mutovaných potomků selektovaných genotypováním, jsem provedla fenotypovou studii a učinila závěr, že působení genu *SPT6L* je nepřímé a zřejmě se účastní více regulačních drah kvetení.

Klíčová slova

Kvetení, SPT6L, AGO proteiny, CRISPR/Cas9, epigenetika

Annotation

Flowering is regulated by hundreds of genes encoding proteins. Goal of my academic work SOČ is to find out, how AGO binding domain of the SPT6L protein, affects flowering. If I find out which flower gene *SPT6L* regulates, I can find what is the function of *SPT6L*. AGO proteins, together with small RNAs, are an important regulator of gene activity and getting bigger knowledge of their function could lead, for example, to a better understanding of some inherited diseases and to further development in breeding technologies.

To find out which regulatory pathways *SPT6L* participates in, I analysed the genetic interactions between single mutants of 3 key and well-described flowering regulatory genes with a mutant in the transcriptional gene named *SPT6L*.

I crossed the mutant in *spt6l*, which is mutated in AGO binding domain with plants mutant in the *flc* (flowering inhibitor) and *soc1* (signaling pathway integrator) genes. The *FT* gene (florigen) is in a strong genetic linkage to the *SPT6L* gene, so a double mutant cannot be obtained by crossing. Because of that I chose the innovative CRISPR/Cas9 gene editing method to excise

the AGO domain of the *SPT6L* gene. In successfully obtained mutant descendants selected by genotyping, I performed a phenotypic study and concluded that the action of the *SPT6L* gene is indirect and apparently involved in more regulatory pathways.

Key words

Flowering, SPT6L, AGO proteins, CRISPR/Cas9, epigenetics

Obsah

1	Úvod	7
2	Přehled literatury	8
2.1	Odborná terminologie.....	8
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9
2.3	Genová exprese	9
2.4	Epigenetika	10
2.5	AGO vazebná doména.....	10
2.6	<i>SPT6L – SUPPRESSOR OF TY INSERTION 6-LIKE</i> gene.....	11
2.7	Geny regulující kvetení	11
2.8	<i>FLC – FLOWERING LOCUS C</i>	12
2.9	<i>FT – FLOWERING TIME LOCUS</i>	13
2.10	<i>SOC1 – SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1</i>	13
2.11	CRISPR/Cas9	13
2.12	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
2.13	Fluorescenční protein	15
2.14	PCR – polymerázová řetězová reakce.....	15
2.15	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	16
3	Metodika	18
3.1	Pěstování	18
3.2	Křížení <i>A. thaliana</i>	19
3.3	Elektroporace <i>A. tumefaciens</i>	19
3.4	Transformace <i>A. thaliana</i> pomocí <i>A. tumefaciens</i>	20
3.5	Sterilizace transformovaných semen <i>A. thaliana</i>	21
3.6	Výsev transformovaných semen <i>A. thaliana</i> in vitro	22
3.7	Izolace DNA z <i>A. thaliana</i>	22
3.8	PCR	23
3.9	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	24
3.10	Sekvence	26
3.11	Fenotypová studie a vyhodnocení výsledků.....	27
4	Výsledky	28
4.1	Křížení	28
4.2	Křížení <i>spt6l</i> × <i>soc1</i>	31
4.2.1	F2 generace	31
4.2.2	F3 generace	31
4.3	Křížení <i>spt6l</i> × <i>flc</i>	31
4.3.1	F2 generace	32

4.3.2	F3 generace	32
4.4	<i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i>	32
4.4.1	<i>A. tumefaciens</i> a T0 generace.....	32
4.4.2	T1 generace	33
4.4.3	Fluorescence.....	33
4.4.4	T2 generace	34
4.4.5	T3 generace	34
4.5	Sekvenace mutanta v <i>spt6l</i>	35
4.6	Fenotypová studie	36
5	Diskuse	40
6	Závěr	44
7	Použitá literatura	45
8	Seznam obrázků a tabulek	50
9	Přílohy 1: Obrázky a komentáře elektroforéz.....	52
9.1.1	Křížení <i>spt6l</i> × <i>soc1</i>	52
9.1.2	Křížení <i>spt6l</i> × <i>flc</i>	55
9.1.3	<i>A. tumefaciens</i>	59
9.1.4	<i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i>	59
10	Příloha 2: Použité primery	65
10.1	Pozice primerů.....	65
11	Příloha 3: Sekvence primerů.....	69
12	Příloha 4: Zásobní roztoky antibiotik	70
13	Příloha 5: Složení použitých médií.....	71
14	Příloha 6: Data fenotypové studie.....	72

1 ÚVOD

Od roku 2000, kdy byl osekvenován genom *Arabidopsis thaliana* (dále jen *A. thaliana*), jsou postupně popisovány funkce jeho genů. Jedním z nich, jehož funkce nejsou ještě zcela všechny známy, je gen *SPT6L* podílející se na přepisu DNA. Tento protein se skládá z více domén. Já se v práci zabývám AGO (Argonaute) vazebnou doménou, jejíž výzkum stále není u konce a jednou z otázek zůstává, proč přesně tuto doménu *SPT6L* (*SUPPRESSOR OF TY-INSERTION OF 6-LIKE GENE*) má. (1)

Proteiny AGO byly objeveny teprve nedávno a rozsáhlý výzkum v posledních několika letech odhalil, že proteiny AGO jsou spolu s malými RNA klíčovými hráči v regulaci aktivity (exprese) genů. (2)

Podstatou práce je sledování fenotypových změn mutantů *A. thaliana*, který má pozměněný gen *SPT6L* a již se v něm nenachází AGO vazebná doména a jeho křížení s mutovanými rostlinami (s pozměněným *SPT6L*) v genech *SOCI* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1*) a *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*). Tyto geny, s kterými naši mutovanou rostlinu křížím, regulují kvetení. Každý se účastní jiné regulační dráhy. *FLC* reaguje na zimu (zajišťuje, aby kvetly na jaře) a *SOCI* je klíčový gen, na kterém se sbíhá několik regulačních drah. (3)

Aktuálnost práce se odráží v jedné ze zvolených metod. Gen *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) je s genem *SPT6L* v silné genové vazbě, a proto by při crossing overu nedošlo k fyzickému přenosu mutace na jeden chromozom vedle sebe a nelze tedy vytvořit dvojitého homozygotního mutantů křížením, jako u ostatních genů. Metoda CRISPR/Cas9, která umožní obejít rekombinaci crossing overem a degraduje doménu AGO (která se nachází v proteinu *SPT6L*), přímo v rostlině mutantní v *ft*. *FT* je také genem regulujícím kvetení a účastní se regulační dráhy fotoperiodické.

Klíčové je pro mě následné porovnání jednoduchých a dvojitých mutantů v těchto genech.

Motivací celé mé práce je posunout znalosti o genomu rostlin obecně. Využití těchto znalostí by se dalo aplikovat ve šlechtění, vývoji GMO ale i v medicíně. Změny projevené ve fenotypové studii nastíní něco o tom, jak se do exprese zapojují Argonaute proteiny, rozšíří vědomosti o signálních drahách regulujících kvetení, a hlavně o tom, jaké z drah se *SPT6L* účastní.

Můj externí školitel Mgr. Vojtěch Čermák, Ph.D. vyzoroval, že rostlina mající gen *SPT6L* s mutovanou AGO vazebnou doménou kvete dříve než divoký typ – to je můj předpoklad pro tento výzkum (4). Mou hypotézou je, že gen *SPT6L* se účastní jedné ze známých regulačních drah kvetení. Fenotypové změny předpokládám hlavně u času kvetení.

Cílem není pouze konečný výsledek, tedy jak gen *SPT6L* interaguje s geny regulujícími kvetení, ale i získání mutovaných jedinců moderní metodou CRISPR/Cas9, která může mít v budoucnu i terapeutické využití. (5)

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Odborná terminologie

AGO – Argonaute

CO – gen *CONSTANS*

CO – protein *CONSTANS*

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

FLC – gen *FLOWERING LOCUS C*

FLC – protein *FLOWERING LOCUS C*

flc – mutant v genu *FLC*

FT – gen *FLOWERING TIME LOCUS*

FT – protein *FLOWERING TIME LOCUS*

ft – mutant v genu *FT*

gRNA – naváděcí RNA

pHEE – plazmid Hygromycin resistance, EC1 promoter, rbcS E9 terminator

pHSE – plazmid Hygromycin resistance, 35S promoter, rbcS E9 terminator

SOC1 – gen *SUPPRESSOR OF TY INSERTION 6-LIKE*

SOC1 – protein *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF GENE CO1*

soc1 – mutant v genu *SOC1*

SPT6L – gen *SUPPRESSOR OF TY INSERTION 6-LIKE*

SPT6L – protein *SUPPRESSOR OF TY INSERTION 6-LIKE*

spt6l – mutant v genu *SPT6L*

T-DNA – Transferová DNA

2.2 *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana (v překladu huseníček rolní) je krytosemenná rostlina z čeledi brukvovitých. Jedná se o dlouhodobnou rostlinu. (6)

Má pouze 5 chromozomů, přibližně 27 000 genů, 157 000 000 párů bází a jen 14 % repetitivní DNA. Díky malé velikosti byl genom osekvenován již v roce 2000. Oproti tomu hrách setý obsahuje až 70 % repeticí a velikost jeho genomu je 5 000 000 000 bp. (7) (8)

A. thaliana má několik vlastností, díky kterým se stala modelovým organismem pro molekulární biologii a tím pádem i pro můj experiment: Životní cyklus rostliny je pouze 6 až 8 týdnů, vzrůstem dosahuje maximálně 30 cm a jedná se o rostlinu plevelovitého druhu čili je velmi nenáročná na pěstování. *A. thaliana* je blízký příbuzný řepce – tedy významné zemědělské plodině. Další výhodou je schopnost autogamie, protože klesá podíl heterozygotních jedinců v následujících generacích a vzrůstá homozygotnost čili je snazší získat dvojité homozygotní mutanty při křížení. (9)

V kultivačních podmínkách roste při teplotě 22 až 24 °C. Divoký typ vykvétá zhruba po 5 týdnech od vyklíčení semen. (10)



Obrázek 1 vzorový nákres *Arabidopsis thaliana*, upraveno (11)

2.3 Genová exprese

Termín genová exprese je proces, kterým se genetická informace uložená v DNA (případně RNA) zapsaná v nukleotidech přepisuje do pořadí aminokyselin v proteinech.

Genová exprese je souhrnný název pro následující děje: transkripce je proces odehrávající se v jádře buňky, při němž se podle genetické informace zapsané v řetězci DNA vyrábí řetězec RNA. Ta obvykle představuje prostředníka mezi genetickým materiálem a bílkovinami, které se podle něj vyrábějí. mRNA (messenger RNA) s informací (genetická informace zapsaná v pořadí nukleotidů) vycestuje do cytoplazmy, aby našla ribozomy, na kterých dojde k translaci.

Ribozomy totiž genetický kód přeloží do pořadí aminokyselin, v nasyntetizovaném proteinu. Jedná se o vytvoření bílkoviny podle předlohy původně uložené v DNA. (12)

2.4 Epigenetika

DNA sice obsahuje všechny geny potřebné pro život a jeho směřování, ale epigenetika pojednává o tom, které geny jsou aktivované a které inaktivované. Epigenom obsahuje epigenetické informace – neboli instrukce, které říkají genetické informaci v buňce, jaké geny aktivuje a jaké inaktivuje, aby se vzájemně nerušili. Z doslovného překladu je epigenetika jakási informace nad DNA. Nesmíme opomenout, že je svým způsobem stálá. Funguje jako paměť, která může přetrvávat i po odeznění signálu, který ji indukoval. Ne jenom v rámci jednoho organismu, ale může se i dědit – epigenetická paměť je strategií organismů, jak se přizpůsobit potenciálním nebezpečím, kterým kdysi čelili jejich předci v předešlých generacích. (12)

Změny v prostředí jsou překládány do signálů jako jsou například stres, hlad, strach, a další, a ty se poté propíší do epigenetické informace a mohou měnit aktivitu jednotlivých genů.

Epigenetika pracuje s epigenetickými značkami. Jedná se například o značky methylových skupin, které se připojují na jednotlivé části DNA. (13)

Při metylaci DNA dochází k připojení methylového zbytku (-CH₃) k cytosinu. Tímto připojením povětšinou dojde k inaktivaci genu, což mohou indukovat například malé RNA. (14) Metylované či acetylované mohou být i histony (bazické proteiny, většina z nich tvoří komplex, kolem níž je omotaná dvoušroubovice DNA) to ale nebyl případ mé práce. (15)

2.5 AGO vazebná doména

Geny jsou kódovány v DNA uvnitř buněk. Některé geny jsou instrukcí uvnitř buňky jak tvořit proteiny. (16) Proteiny se skládají z aminokyselin a struktura některých proteinů je složena z domén. (15)

Doména je z obecného hlediska stavební jednotkou proteinu a přispívá svou funkcí či interakcí k jeho celkové úloze. (17)

Genom *A. thaliana* obsahuje 10 genů kódujících proteiny AGO, které jsou obecnými regulátory genové exprese. (1)

AGO proteiny, které tato doména váže, jsou součástí drah pomocí nichž malé RNA regulují genovou expresi ve většině eukaryotických organismů (i u člověka).

Malé RNA jsou biologicky aktivní krátké řetězce ribonukleových kyselin složené pouze z 20 až 30 nukleotidů. Malé RNA plní nejčastěji obrannou a regulační funkci a mohou fungovat v cytoplazmě i v jádře. (18)

AGO proteiny se vážou na malé RNA, které regulují genovou expresi takovým způsobem, že blokují expresi genu buď posttranskripčně, kdy AGO štěpí mRNA, takže nedojde k tvorbě proteinu, nebo transkripčně, kdy malé RNA cílí rovnou na gen, blokují nasednutí polymerázy, která tvoří mRNA a také tím pádem nedojde k tvorbě proteinu. Malé RNA blokují nasednutí polymerázy prostřednictvím DNA metylace. V rostlinách je dobře prokázáno, že AGO proteiny (například AGO4) řídí metylaci DNA vedenou malými RNA. (19)

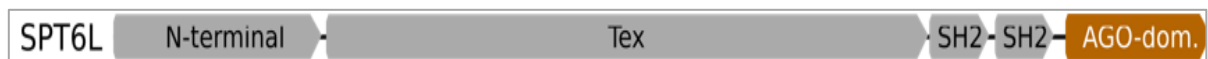
Existují předpoklady, že mutace proteinů AGO mohou přispívat ke vzniku autoimunitních chorob lidí. Už teď je známo, že se podílejí na řadě onemocnění, včetně syndromu fragilního chromozomu X, autoimunitních a onkologických chorob. (2)

2.6 *SPT6L – SUPPRESSOR OF TY INSERTION 6-LIKE gene*

U rostlin má tento gen název *SPT6 like* kvůli jeho AGO vazebné doméně, kterou gen *SPT6* nemá, přestože v principu gen *SPT6L* je odvozený od *SPT6* a zastává jeho funkce. Dalo by se tedy říct, že *SPT6L* je vylepšený *SPT6*. *SPT6* se vyskytuje u všech eukaryot a *SPT6L* jen u cévnatých rostlin. (20 s. 6)

Z minulých studií bylo nastíněno, že *SPT6L* by mohl fyzicky interagovat s proteiny AGO. (1) Já se snažím tuto predikci zkonkretizovat.

SPT6/SPT6L je široce a specificky vyžadován pro růst cévnatých rostlin a jejich rozvoj z toho důvodu, že pomáhá RNA polymeráze II přepisovat geny kódující bílkoviny. (21) (22)

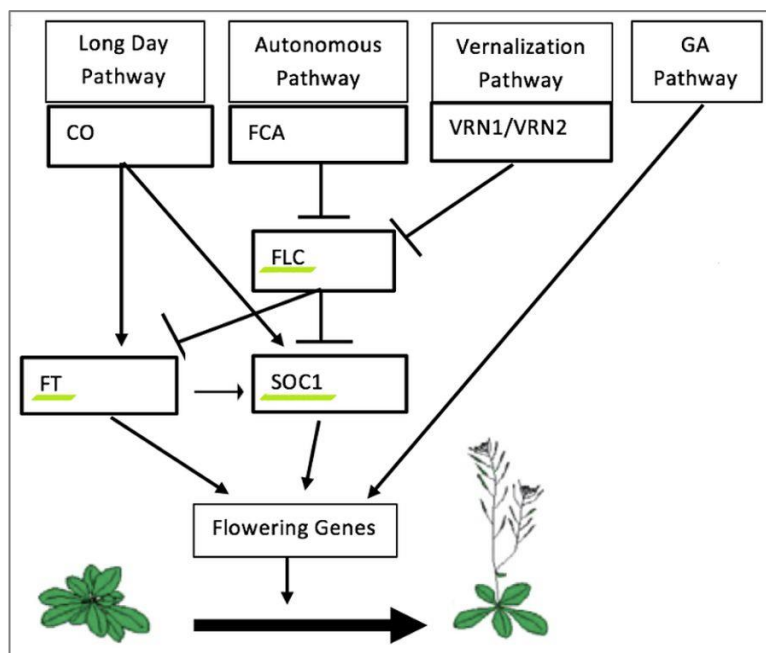


Obrázek 2 AGO vazebná doména v genu *SPT6L*, šedivé domény nejsou předmětem mého zájmu (není-li uvedeno jinak, obrázek autorka)

2.7 Geny regulující kvetení

Tyto geny fungují v kaskádách ve čtyřech propagačních drahách, které jsou odpovědí na světlo, teplotu, vnitřní stav rostliny a na fytohormony. Tyto dráhy se všechny sbíhají v genech integrotoru *SOC1* a *FT*. Protein *FT* není součástí dráhy fytohormonů, tedy u *A. thaliana* působí v samostatné regulační linii. (23)

Gen *FLC* působí jako inhibitor. Aktivuje se na konci léta a zajišťuje, že rostlina nevyklíčí na podzim, protože by v zimě uhynula. Přestává být aktivní začátkem prosince, kdy se zapíná *FT* a kontroluje délku dne. Ve chvíli, kdy začne být na jaře dlouhý den, *FT* aktivuje *SOC1* a rostlina může vykvést.



Obrázek 3 Model čtyř drah kontrolujících dobu kvetení u *A. thaliana*, upraveno (24)

Legenda:

Long Day pathway – někde uváděno jako Photoperiodic pathway = světlo

Autonomous pathway = vnitřní stav rostliny

Vernalization pathway = teplota

Gibberelli (GA) pathway = fytohormony

—| značení negativní regulace (inhibice)

→ značení podpory exprese

Nezmíněné části obrázku jsou pro mou práci nepodstatné.

Když dám do souvislosti funkce genů: *FT* posílá signál z listů, které vnímají světlo, přes gen *CO* a teplotu přes *FLC*, do vzrostlého vrcholu, kde tento signál přijme *SOC1* a rostlina může vykvést.

2.8 *FLC* – *FLOWERING LOCUS C*

Expresse genu *FLC* je ovlivněna vnitřními, ale i vnějšími faktory jako je například teplota. Konkrétně v procesu jarovizace.

Jarovizace (z anglického *vernalisation*) je evoluční adaptace na sezónní klima s obdobím nízkých teplot (zima). Představuje částečné odstranění zábrany kvetení (utlumení funkce genu *FLC*) působením nízkých teplot. (3)

Jedná se o gen, mající významnou inhibiční roli v nástupu kvetení. Působí jak v listech, tak ve vrcholovém meristému jako potlačení květních součinných genů, jako jsou *FT* a *SOC1*, čímž působí jako květní represor ke zpoždění kvetení – proto mutanti v *flc* vykvétají dříve. (25)

2.9 FT – FLOWERING TIME LOCUS

Mechanismus, kterým *CO* působí na podporu kvetení ve floému (systém pletiv cévnatých rostlin), částečně zahrnuje gen *FT*.

Protein *FT* je florigen – látka ovlivňující nástup kvetení. Konkrétně u *A. thaliana* je tvořený v listech (ve floému) a transportovaný do meristémů, kde tvoří květy. Působí tedy na dálku. (3)

2.10 SOC1 – SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1

SOC1 je především integrátor (vysvětleno níže). Jeho další význam spočívá v tom, že aktivuje geny zodpovědné za tvorbu květu.

V jednom z výzkumů došlo k pozorování, že *CO* působící ve stejné dráze jako *SOC*, je hlavní součástí molekulárního mechanismu, kterým *A. thaliana* rozlišuje mezi dlouhým a krátkým dnem. (3)

CO (z anglického *CONSTANS*) je tedy gen podílející se na fotoperiodické regulaci kvetení. Transkripce genu *CO* je stimulována světlem. Hlavní rolí *CO* při kontrole kvetení je aktivace *FT* v listu. (3) (23)

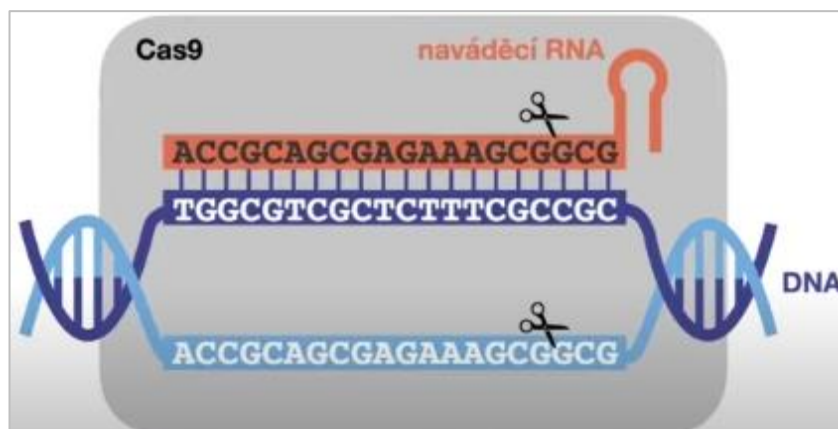
CO posílá signál způsobený reakcí na fotoperiodu přes *FT* a *SOC1*, tudíž pokud máme mutanty v *soc1*, tak i funkce genu *CO* je omezená, protože signál se nepřenese dál. *SOC1* slouží tedy jako jakýsi „integrační“ gen. (3)

2.11 CRISPR/Cas9

Jedná se o velice rychlou, přesnou a relativně levnou editační metodou využívající tzv. naváděcí molekulu gRNA (guide RNA) a Cas9 (endo)nukleasu k vytvoření zlomu ve dvouvláknové DNA na místě sekvence komplementární ke gRNA, která má být mutována. Doručení genu pro protein Cas9 a příslušné naváděcí gRNA do buňky lze genom cílového organismu rozstříhnout téměř v jakémkoli požadovaném místě, protože bílkovina Cas9 si vezme naváděcí gRNA, a když najde správné místo, správně se naváže, zareaguje jako enzym, otevře dvoušroubovici DNA a na jedno vlákno se naváže a hydrolýzou rozštěpí dvoušroubovici.

CRISPR je nadějí pro léčbu cystické fibrózy a pro mnoho dalších, genetických či dědičně podmíněných chorob. Pokud si představíme DNA jako text písmen, CRISPR můžeme brát jako textový editor. Mutace, které způsobují dědičné choroby, se dají brát jako chyby v textu genetického kódu.

Metoda využívá procesu v bakteriích. CRISPR je totiž imunitní systém bakterií proti virům (bakteriofágům). Obranný systém bakterie funguje tak, že pokud ji napadne virus, bakterie je schopná tento virus identifikovat, rozvinout a rozstříhat mu jeho DNA. Protože má virus poškozenou DNA, nemůže se dále rozmnožovat. Bakterie si viry, které je v minulosti napadly, „pamatuje“, to znamená, že si části DNA virů, které je napadly v minulosti, zapisuje do CRISPR „paměti“. (26)



Obrázek 4 Schéma guide RNA nasedající na dsDNA (26).

Buňky mají několik opravných systémů. Buňka se snaží poškozenou DNA opravovat, ale Cas9 neustále vlákna štěpí a štěpí, až jednou buňka provede opravu špatně a vznikne (požadovaná) mutace. (26)

Při metodě CRISPR/Cas9 se používají plazmidy pro transformaci cílových buněk. (27)

2.12 *Agrobacterium tumefaciens*

Jedná se o parazita. Ve volné přírodě vytváří nádory, (tedy přirozeně geneticky modifikuje organismy) ve kterých žije a množí se. Tyto nádory jsou indukované fytohormony, jejichž produkci má na starosti Ti plazmid (nádor indukující plazmid). Tato bakterie je schopna vnést část DNA (T-DNA) svého Ti plazmidu do rostliny a vložit geny v něm obsažené do rostlinného genomu. Díky této vlastnosti se využívá *A. tumefaciens* hojně v genovém inženýrství. Dochází tedy k transgenozí. Princip vzniku nádoru je založen právě na průniku části DNA bakterie, tedy T-DNA z Ti plazmidu do buňky rostliny. Ti plazmid obsahuje mimo jiné geny kódující opiny, ty slouží jako výrobní energie pro *A. tumefaciens*. Hraniční oblastí T-DNA je sekvence, nedokonalá přímá repetice asi 25 bp. Je definovaná jako LB a RB (right and left border). Proteiny podílející se na zprostředkování přenosu T-DNA nejprve rozpoznají hraniční sekvence oblasti T-DNA, a proto je možné, aby vědci použili hraniční sekvence T-DNA k ohraničení jakékoli požadované sekvence, která je předmětem zájmu – takový produkt pak může být vložen do plazmidu a zaveden do buněk *A. tumefaciens* a následně do rostlin. Díky ponechání pouze hraničních sekvencí, T-DNA upraví rostlinný genom, aniž by u rostlin způsobila nádory. T-DNA je součástí Ti plazmidu v *A. tumefaciens*. Pro aktivaci T-DNA a infekci rostlinné buňky je nutné řízení vir geny. (28) (29) (30) (31) (32)

2.13 Fluorescenční protein

Zeleně fluoreskující protein, (z anglického *green fluorescent protein*), dále jen GFP, byl poprvé popsán v roce 1962 a roku 2008 z něj byla udělena Nobelova cena. Tento fluorescenční protein byl extrahován z *Aequorea victoria*, svítící pohárovky z kmene žahavců. GFP fluoreskuje zeleně, je-li vystaven modrému světlu. Když se GFP naváže, můžeme ho tedy pak snadno lokalizovat pomocí fluorescence. (33)

2.14 PCR – polymerázová řetězová reakce

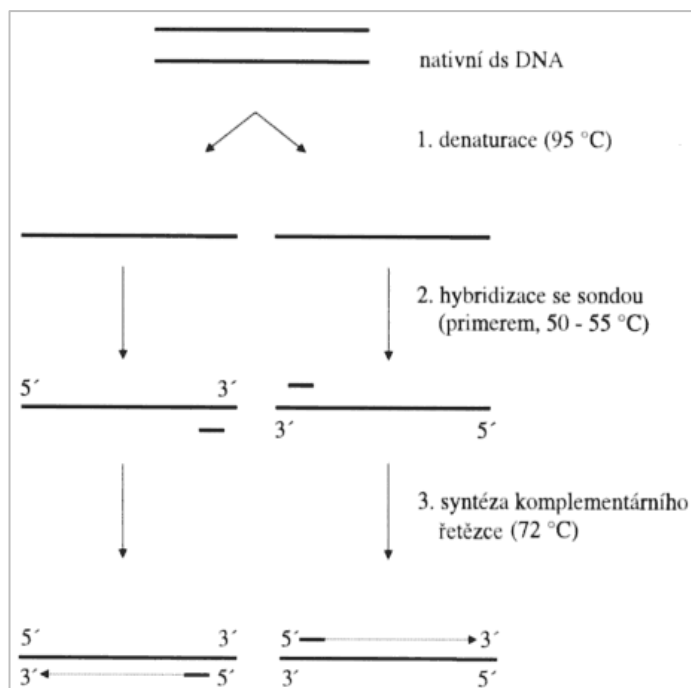
PCR je metoda polymerázové řetězové reakce. Účelem PCR je exponenciální růst kopií části nukleové kyseliny, v mém případě DNA, přítomné v reakční směsi v cyklickém procesu střídání teplot. Tento proces vede k mnohonásobnému zvýšení počtu kopií vybrané sekvence DNA, až se dosáhne množství umožňující DNA detekovat. Úseky DNA, které se mají namnožit, musí být ohraničeny na začátku a na konci primery. Primery, které jsem použila, jsou detailněji popsány na str. 65. (34)

Použitý program uvádím v metodice PCR. Každá PCR má ale stejné fáze, odchylky v teplotách či opakováních různých cyklů jsou minimální.

Při denaturaci dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a dvoušroubovice se rozdělí na dvě vlákna.

Při nasedání primerů nasednou primery na určitá místa jednovláknové DNA, která se rozvolnila při denaturaci. Jeden primer nasedne na levý konec jednoho vlákna (směrem doprava) a druhý nasedne na pravý konec (směrem doleva) druhého vlákna.

Při polymeraci probíhá zdvojení sekvence DNA a syntéza DNA. Primery započnou tvorbu nového řetězce, tvořeného nukleotidy a tím tak dotváří druhé vlákno a opět vzniká dvoušroubovice – kopie



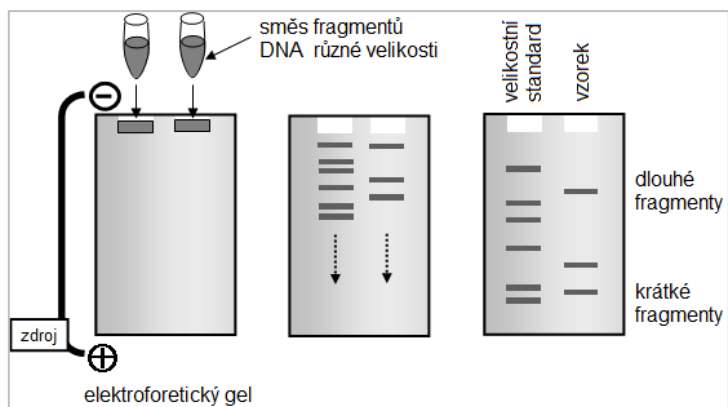
Obrázek 5 Zjednodušené schéma obecné PCR (35)

Všechny tyto fáze programu PCR se cyklicky opakují, v každém kroku se počet kopií zhruba zdvojnásobí, a to vede k exponenciálnímu růstu množství DNA.

Ve fázi, kterou mám nazvanou finální dosyntetizování, probíhá přidání adenosinu na konec. (36)

2.15 Elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforéza je metoda separace velkých molekul, v mém případě segmentů DNA. Elektroforéza využívá toho, že DNA molekuly, které nesou záporný náboj, se pohybují v elektrickém poli od záporného pólu (katody) ke kladnému pólu (anodě). DNA je kyselina, tudíž v určitém pH prostředí je záporně nabitá. Delší DNA molekuly se budou pohybovat pomaleji než kratší – kvůli odporu, který je kladen agarózou. To znamená, že čím dále je proužek od jamky, tím kratší je konkrétní DNA molekula. Migrace v agarózovém gelu je při elektroforéze kontrolována pomocí Bromfenol blue barviva přítomného v nanášecím pufu. Bromfenol blue se totiž pohybuje v agaróze podobně jako fragment DNA o délce cca 500 bp, záleží na hustotě (15)



Obrázek 6 Gelová elektroforéza (37)

Agaróza se vyrábí úpravou agaru izolovaného z mořské řasy. Na výrobu gelu jsem použila rozvařenou agarózu a stejný pufr jako do elektroforézy. Hmota se nalije do vaniček a vytvoří se do něj dírky pomocí hřebínku. Gel tuhne zhruba 30 minut.

3 METODIKA

Všechna média, která v metodice jmenuji, jsou dostupná v přílohách, v kapitole „Složení použitých médií“ na str. 71.

Materiál

- Divoký typ *Arabidopsis thaliana* – ekotyp Col-0
- Kmen *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 s GV3101

zkratka genu	kód genu	název mutanta	kód mutanta
<i>FLC</i>	AT5G10140	<i>flc-7</i>	SALK_092716
<i>FT</i>	AT1G65480	<i>ft-10</i>	GK-290E08
<i>SOCI</i>	AT2G45660	<i>soc1-6</i>	SALK_138131
<i>SPT6L</i>	AT1G65440	<i>spt6LΔAh</i>	x

3.1 Pěstování

Pokud není v metodice uvedeno jinak, pak pěstování probíhalo standardně, tedy na dlouhém dni:

Standardní pěstování rostlin zahrnuje uložení rostlin do kultivační místnosti s automatickým zavlažováním, nazývanou dlouhodobí kultivační místnost, kde je 16 hodin světlo ($120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) za teploty $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a 8h tma při teplotě $19 \text{ }^\circ\text{C}$, místnost se zalévá jednou za šest dní.

Pracovala jsem i s krátkodenní kultivační místností, jejíž podmínky jsou 8 hodin světlo ($120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) při $23 \text{ }^\circ\text{C}$, ve tmě je zde teplota $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Světlo je od 9:00 až do 17:00.

Vlhkost je v obou místnostech 60 %.

Výsev rostlin *A. thaliana*

Semínka buď zakoupená (v případě parentální generace F0 a T0) nebo sklizená, jsem aplikovala na peletky rašeliny zabalené v netkané textili. Ty se po zalití vodou nasákly a zvětšily. Semínka jsem aplikovala pipetou, na každou nasáklou peletku (někde uváděno jako jiff) optimálně tři semínka. To obnáší za dva týdny vytrhat dvě ze tří rostlin, aby na peletce zůstala jen jedna. Po aplikaci semen jsem musela peletky nechat tři dny v lednici, aby se semena stratifikovala – a tím se synchronizovalo jejich klíčení. Pak se přechází ke standardnímu pěstování.

Sklízení rostlin *A. thaliana*

Když jsem z rostlin izolovala DNA a vyhodnotila pomocí gelové elektroforézy, které rostliny použiji do další generace, vložila jsem rostliny do Ara systémů, který zabraňuje úniku

transgenních semen a usnadňuje sklizeň. Semena z jednotlivých rostlin jsem získávala mechanickým porušením jejich šešulí, ze kterých se uvolní semena, která jsem uchovávala v otevřených mikrozkuvkách, aby vyschla.

3.2 Křížení *A. thaliana*

A. thaliana je samosprašná rostlina. Proto je potřeba nejprve odstranit generativní orgány (kromě pestíku) z mateřských rostlin, aby se rostlina neopylila sama. Pak můžu použít tyčinky otcovských rostlin a těmi opylit blizny mateřských rostlin. (10) Křížila jsem rostliny mutované v *soc1* a v *ft* s rostlinou mutovanou v *spt6l*. V mém případě není podstatné, které rostliny byly mateřské a které otcovské.

1. Z rostlin, které mají sloužit jako mateřské, jsem ostříhala šešule a otevřené květy, ponechala jsem pouze poupata.
2. Z každého květenství, které bude sloužit ke křížení, jsem odstranila apikální meristém spolu s menšími poupaty – u každého květenství jsem nechala zhruba 4 největší poupata. (3)
3. Ze zbylých poupat jsem pinzetou odstranila kališní a korunní lístky a tyčinky a nechala jsem pouze pestík.
4. Z otcovských rostlin jsem odebrala jeden rozkvetlý květ – chytila jsem květ pinzetou na bázi tak, aby se více rozevřel a byly snáz dostupné tyčinky. Pro lepší dostupnost tyčinky je dobré otrhat okvětní lístky.
5. Prašníkem na tyčince v květu otcovské rostliny jsem se dotkla blizny na květu mateřské rostliny. Tím se pyl uchytil na blizně. Zdali se pyl uchytil, si mohu zkontrolovat pod binolupou.
S jedním otcovským květem se dá opylit několik mateřských květů a pro zvýšení účinnosti je dobré postup zopakovat ještě s druhým otcovským květem.
6. Rostliny jsem uložila do kultivační místnosti a pěstovala standardně.
7. Semínka dozrála zhruba po 14 dnech, jakmile šešule zhnědnou, je třeba je včas sklídit, aby semínka nevypadala. Pokud se po pár dnech od křížení šešule nezačnou prodlužovat, opylení neproběhlo nebo proběhlo s malou účinností. V takovém případě je nutné proces opakovat. K tomu ale nedošlo.

3.3 Elektroporace *A. tumefaciens*

Do rostlin je nutné vpravit gen pro nukleázu Cas9, který je součástí T-DNA, kterou mám uvnitř plazmidu pHEE. Plazmid natransformuji do *A. tumefaciens*, které poslouží jako vektor a vloží T-DNA do rostlinného genomu. Tím pádem bude možné pozměnit genom rostliny systémem CRISPR/Cas9.

Bylo zvoleno *A. tumefaciens*, kvůli své schopnosti přenášet transformační plazmid (Ti plazmid), schopnosti elektrokompetence a rychlého zotavení. (38)

Elektroporace je metoda, v jejímž rámci se intenzivním elektrickým pulsem dosáhne vzniku pórů v membráně buněk. Tedy transformace *A. tumefaciens* dosáhne elektroporací, která naruší jeho buněčné membrány a tím se do něj dostane plazmid s T-DNA. (39)

Použila jsem *A. tumefaciens* skladované v mrazáku při teplotě -80 °C. Rozmrazila jsem ho na ledu. K *A. tumefaciens* jsem přidala 1 µl plazmidu PHEE PUBQ-EGFP 4+22 z data 16. 6. 2020. Jednu minutu jsem nechala inkubovat na ledu.

Poté jsem *A. tumefaciens* s plazmidem přenesla do vychlazené kyvety. Tu jsem vložila do elektroporátoru firmy Eppendorf, s napětím 2,0 kV, odporem 200 Ω a elektrickým pulsem 4,3 ms.

Směs jsem ihned přepipetovala na 1 ml YEB RECOVERY média v kultivační zkumavce. Kultivace trvala tři hodiny, probíhala při 28 °C a při 250 otáčkách za minutu na laboratorní třepačce.

A. tumefaciens jsem po kultivaci vysela v různých množstvích na Petriho misky (50 µl suspenze a 950 µl suspenze) s LB médiem a antibiotiky Rifampicin 100 mg/l a Kanamycin 50 mg/l.

Rifampicin = působí proti jiným cizím bakteriím.

Kanamycin = vyselektuje pouze *A. tumefaciens*, které obsahuje rezistenční gen, tedy obsahuje vložený plazmid s T-DNA mající gen pro Cas9.

A. tumefaciens jsem inkubovala 3 dny při 28 °C.

Na misce s koncentrací 50 µl vyrostly dvě kolonie. Ty jsem přenesla na nové médium a podrobila PCR (program níže) a následné gelové elektroforéze.

Program thermal cycleru použité PCR:

1.	počáteční denaturace	95 °C	3:00 min
2.	denaturace	95 °C	0:30 min
3.	nasedání primerů	58 °C	0:30 min
4.	polymerace	2 °C	1:50 min → skok na krok 2
5.	finální dosyntetizování	72 °C	10:00 min
6.	skladování	12 °C	∞

3.4 Transformace *A. thaliana* pomocí *A. tumefaciens*

Mezi další mutanty, které jsem chtěla získat a pozorovat, jsou mutanti v genu *ft*, které jsem nekřížila, ale mutovala CRISPRem – využití metody CRISPR/Cas9 bylo nutné u rostlin mutovaných v *ft* právě proto, že gen *FT* leží velmi blízko genu *SPT6L*, a tudíž by při křížení (konkrétně při buněčném procesu crossing-over) nedošlo k přenosu dvou již existujících mutací (mutace v *ft* a v *spt6l*) vedle sebe na jeden chromozom. K existující mutaci v *ft* jsem tedy metodou CRISPR/Cas9 vytvořila ještě mutaci v *spt6l*. To obnášelo transformaci rostlin metodou floral-dip pomocí *A. tumefaciens*, které jsem úspěšně elektroporovala.

Pracovala jsem s *A. thaliana* na začátku kvetení, tedy s rostlinami starými přibližně 5 až 6 týdnů.

Transformace obnáší v mém případě vložení T-DNA (z *A. tumefaciens*) do rostlinné buňky (*A. thaliana*).

Nejprve jsem si přeočkovala *A. tumefaciens* na 50 ml tekutého média YEB ve 100ml baňce. Použitá antibiotika byla opět Rifampicin (250 μ l) a Kanamycin (50 μ l). Baňky jsem vložila do laboratorní třepačky, kde se při teplotě 28 °C za stálého míchání kultivovaly do dalšího dne.

Druhý den jsem přelila *A. tumefaciens* do 50ml centrifugační zkumavky neboli falkony, které jsem stáčela na centrifuze firmy Heraeus SEPATECH na 5 000 otáček za minutu, 20 minut při teplotě 4 °C.

Mezitím jsem si připravila rostliny: ostříhala jsem z nich všechny šešule a otevřené květy.

Slila jsem supernatant a sediment samotný jsem znovu rozpustila v menším objemu 10% roztoku sacharózy. Dolila jsem do směsi 0,1% smáčedla Silwett L77, aby se *A. tumefaciens* lépe uchytilo na listech, 40 μ M acetosyringonu, který zvyšuje aktivaci *A. tumefaciens* a sacharózu do objemu 50 ml. (40)

Květenství rostlin s poupaty jsem jednotlivě namáčela po dobu 5 sekund do vzniklé suspenze *A. tumefaciens*, které nese plazmid s genem mého zájmu.

Namočené rostliny jsem zabalila do PVC sáčků, abych rostlinám zajistila vysokou vzdušnou vlhkost, protože čím je vlhkost vzduchu větší, tím je intenzita transpirace menší a rostliny tím pádem méně odpařují. Průduchy jsou tak otevřené a tím se konstrukt dostane do rostliny. Uložila jsem je přes noc do tmavé místnosti, jelikož sluneční svit má také vliv na transpiraci. (30)

Po noci jsem kultivovala rostliny za standardních podmínek v kultivační místnosti.

3.5 Sterilizace transformovaných semen *A. thaliana*

Semena rostlin, která byla transformována, je nutné podrobit sterilizaci proto, že na agaru, kde jsou rostliny selektovány, rostou bakterie a plísňe mnohem rychleji než rostliny. Pokud by tedy nedošlo ke sterilizaci, rostliny by shnily.

Sterilizaci jsem prováděla v digestoři.

Do menšího exsikátoru jsem umístila porcelánové plato s otevřenými mikrozkuvkami se semeny. Dovnitř jsem vložila kádinku s 50 ml SAVA, do které jsem přidala 1,5 ml koncentrované HCl. V tu chvíli se prudce uvolnil plynný chlór a exsikátor bylo nutné ihned uzavřít. Doba sterilizace je 4 hodiny.

Po uplynutí doby sterilizace jsem mikrozkuvkavy uzavřela a vyjmula je z exsikátoru. Hned poté bylo možné semena použít pro výsev.

3.6 Výsev transformovaných semen *A. thaliana* in vitro

Rostliny vysévám in vitro, abych mohla přidat antibiotika a tím vyselektovat úspěšně transformované rostliny. Rostliny, u kterých transformace neproběhla úspěšně, nevyrostou. Až když rostliny za 2-3 týdny mají pravé listy, můžu je přesadit do hlíny a standardně pěstovat.

Složení agarových ploten:

- 1% agar 2,00 g/ 200 ml H₂O
- 1% sacharóza 2,00 g/ 200 ml H₂O
- 0,5 MS 0,44 g/ 200 ml H₂O

MS jsou Murashige & Skoog soli – směs základních živin, co rostliny potřebují k růstu. Dodavatelem je Sigma-Aldrich kat.č. M5524.

Médium jsem sterilizovala klávováním a přidala jsem antibiotika.

Hygromycin = 150 µl zásobního roztoku / 150 ml média vyselektuje pouze ty rostliny, které obsahují rezistenční gen.

Claforan = 150 µl zásobního roztoku / 150 ml média zabraňuje infekcím rostlinných tkání a hlavně zabije *A. tumefaciens*, pokud by ještě v semínech nějaké bylo.

Na každou plotnu o rozměru 12x12 cm jsem nalila zhruba 50 ml média. Když plotny ztuhly, vysela jsem na každou plotnu jednu mikrozkušavku semen, což je zhruba 50 až 100 µl semen rovnoměrně po celém povrchu. Následně jsem plotny zalepila Microporem a nechala tři dny v lednici, aby se semínka stratifikovala a tím se docílilo lepší synchronizace klíčení. Za 3 dny jsem přemístila plotny do dlouhodobní kultivační místnosti – čili pěstovala standardně.

3.7 Izolace DNA z *A. thaliana*

Abych mohla určit genotyp rostliny, musím získat její DNA, kterou pak podrobím PCR.

Protokol izolace:

Do 2ml zkumavky se zámkem jsem vložila menší list z rostliny a přidala jsem 2 ocelové kuličky, 400 µl extrakčního pufru a 400 µl chloroformu.

- Složení extrakčního pufru:
 - 250mM NaCl
 - 200mM TRIS-HCl (pH 7,5)
 - 25mM EDTA (chelatační činidlo) (41)
 - 0,5% SDS (detergent) (42)

Směs jsem zhomogenizovala na homogenizátoru značky Retch MM 301 po dobu 1,5 minuty při 30 otřepích za sekundu.

Zhomogenizované vzorky jsem centrifugovala 3 min při 13 000 otáčkách. Když byly vzorky v centrifuze, připravila a popsala jsem si nové zkumavky s 330 μ l isopropanolu, který přečistí DNA od detergentů. (43)

Odebrala jsem vzorky opatrně z centrifugy tak, aby se nesmíchala horní část s dolní a přenesla jsem zhruba 330 μ l horní fáze do nových zkumavek s isopropanolem a následně dobře promíchala.

Po centrifugaci jsem získala dvoufázovou směs, horní fáze je vodný roztok obsahující DNA, spodní roztok je organická fáze chloroformu. Při následném odebírání horní fáze tak odeberu pouze DNA bez proteinů.

Zkumavky s horní fází a isopropanolem jsem dala do centrifugy na 5 minut při 13 000 otáčkách.

Ze zcentrifugovaných vzorků jsem odsála veškerou tekutinu, zkumavky jsem dala otevřené vysušit pod větrák a počkala jsem, až budou suché a nebudou cítit isopropanolem. Důležité je vzorky nepřesušit.

Do zkumavek se sedimentem DNA jsem napipetovala 100 μ l 2mM TRIS pH 8,5. v TRISu se DNA rozpustí a je díky němu udrženo přijatelné pH pro existenci DNA. Rozpuštěnou DNA uchovávám v mrazáku. (44)

3.8 PCR

Abych z izolovaných DNA byla schopna přečíst genotyp, musím nejprve úsek DNA ve vzorku amplifikovat.

PCR jsem prováděla v Thermal Cycleru T100TM firmy BIO-RAD.

Příprava PCR reakce musí probíhat na vymrazovacím bločku či na ledu. Pracovala jsem s 20 μ l reakce v jedné Eppendorf zkumavce. Počet zkumavek se odvíjí od počtu izolovaných DNA.

Všechny rozmražené komponenty reakční směsi jsem zamíchala na laboratorní třepačce Vortex-Genie 2 (značka Scientific Industries) a napipetovala do Eppendorf zkumavky – dále jen mikrozukavka – s větším objemem. Pokud jsem měla například 15 vyizolovaných DNA, množství komponentů na 20 μ l reakce jsem vynásobila 15. Tím získám objem do reakční směsi, z které jsem pak rozpipetovala 19 μ l do jednotlivých mikrozukavek. Nakonec jsem přidala 1 μ l genomové DNA (do každé zkumavky z jiné rostliny). Mimo vzorky, ve kterých je DNA, jsem měla ještě pozitivní a negativní kontrolu. Obě kontroly obsahovaly také 19 μ l reakční směsi. Když jsem chtěla pomocí PCR detekovat například heterozygota, dala jsem do pozitivní kontroly 1 μ l DNA ze spolehlivého heterozygota. Do negativní kontroly jsem dávala vždy 1 μ l demineralizované vody. V takovém případě by se na elektroforéze měly u pozitivní kontroly

objevit dva proužky (signál heterozygota) a u negativní kontroly by neměl být žádný proužek. Kontroly říkají, zdali PCR dobře fungovala.

Mikrozkumavky se vzorky jsem vložila do Thermal Cycleru a nastavila požadovaný program.

Komplementy v reakční směsi na 20 µl reakce:

- 1 µl genomové DNA
- 10 µl DreamTaq MasterMix – výrobek zakoupen od komerční společnosti.
 - Složení DreamTaq MasterMixu:
 - Puftr zajišťuje vhodné prostředí pro optimální aktivitu DNA polymerázy.
 - Hořčnatý iont ve formě chloridu hořčnatého $MgCl_2$ zajišťuje vhodné podmínky pro aktivitu polymerázy. (45)
 - DNA polymeráza = Taq polymeráza (má své jméno podle bakterie *Thermus aquaticus*, ze které byla polymeráza izolována) přidává na 3' konec přesahující adenosin, katalyzuje syntézu nového řetězce DNA, a hlavně umožňuje opakované zahřátí na 95 °C. (46)
 - Nukleotidy jsou nezbytné pro syntézu DNA. (47)
- 0,4 µl primery – primery volíme podle toho, jakou alelu máme v plánu detekovat. Do každé reakce přijdou minimálně dva primery. Po zakoupení vysušených primerů, je potřeba primery rozpustit ve vodě podle údajů výrobce na 100µM zásobní roztok. Primery čerpám z pracovního roztoku, dám 10 µl primerů do 90 µl vody a s tím následně pracuji.
- 8,2 µl demineralizované vody, čištěna systémem Milli-Q.

Program Thermal Cycleru: 28 cyklů – čili 27 opakování kroků 2-4

1.	počáteční denaturace	95 °C	3:00 min
2.	denaturace	95 °C	30 s
3.	nasedání primerů	58 °C	30 s
4.	polymerace	72 °C	1000 bp/1:00 min → skok na krok 2
5.	finální dosyntetizování	72 °C	10:00 min
6.	skladování	12 °C	∞

3.9 Elektroforéza v agarózovém gelu

Produkt, který je vytvořen polymerací v Thermal Cycleru, obsahuje již dostatek kopií úseku DNA na detekování a tím ho lze použít na gelovou elektroforézu a zjistit tak délku produktů, podle níž lze určit genotyp rostliny.

Postup přípravy elektroforézy:

Do elektroforetické vany firmy Pharmacia, ve které je nalitý puftr 0,5 TAE, jsem vložila agarózový gel. Do každé mikrozkumavky se vzorkem, který prošel PCR reakcí, jsem napipetovala 4 µl barvy nanášecího puftru. Množství puftru ve vzorku souvisí s objemem vzorku. Barviva v nanášecím puftru obarví testovaný roztok s DNA, což umožní sledování vzorku při separaci.

Nanášecí pufr také obsahuje glycerol, který způsobí usazení vzorku na dno jamky gelu. Do jamek v elektroforéze jsem poté aplikovala 10 µl každého vzorku smíchaného s barvou. Na každý gel jsem dala do poslední jamky 1 µl GeneRuler 100bp od společnosti Thermo Scientific. Odchylka v žebříčku se týká pouze elektroforézy *A. tumefaciens*. Tento velikostní marker při vyhodnocování výsledků pomáhá určit, jak je který fragment dlouhý. Zavřela jsem víko, zapojila jsem elektrody, zapnula zdroj a pustila přibližně 80-100 V. Platí, že s rostoucím elektrickým napětím se nukleové kyseliny pohybují rychleji, zároveň ale s příliš vysokým napětím dochází k nerovnoměrné separaci jednotlivých fragmentů a deformaci proužků. (48)

Agarózový gel (1,2% na 100 ml)

- 1,2 g agarózy
- 100 ml 0,5x TAE pufr
- 10 µl GelRed

Elektroforetický pufr TAE

Pufr TAE udržuje stabilní pH a je zdrojem iontů, díky kterým teče proud.

- 50x TAE pufr
- 242 g Tris
- 57,1 ml Acetic acid
- 100 ml: 0,5 M EDTA (pH 8)
- Doplnit H₂O do 1 l

Nanášecí pufr

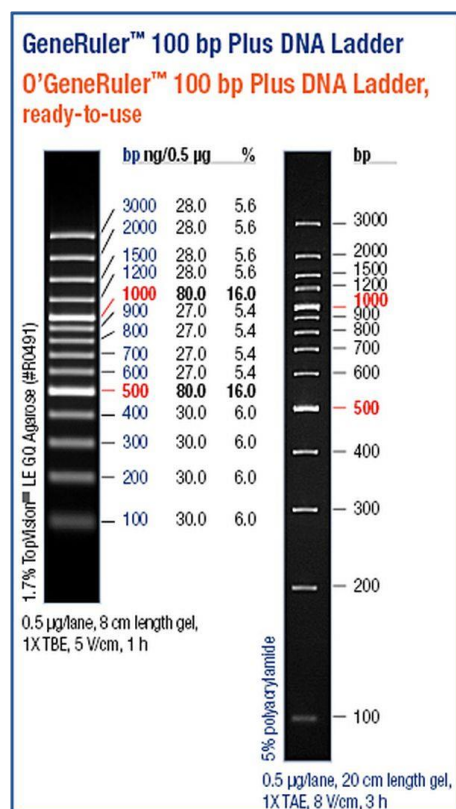
- 6x Loading Dye (Bromphenol blue, na 50 ml):
- 10 mM Tris-HCl pH 7,6 (5 ml 100 mM)
- 0,03% Bromphenol blue (15 mg) – barvivo
- 60% glycerol (30 ml)
- 60 mM EDTA (6 ml 0,5 M EDTA pH 8)
- Doplnit H₂O do 50 ml

Vyhodnocení výsledků z gelu:

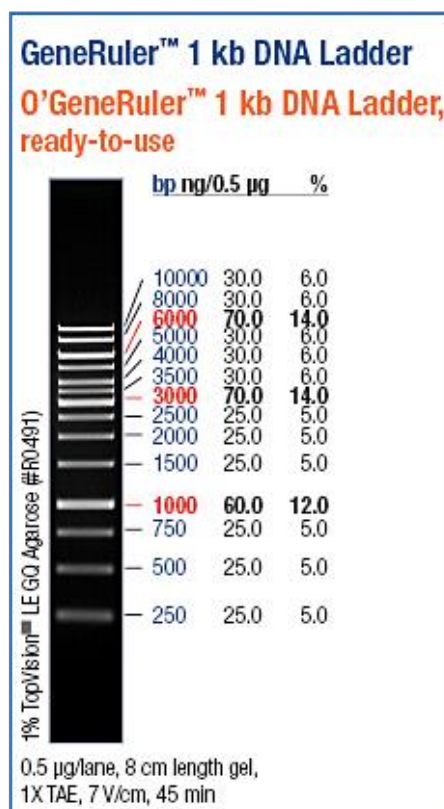
Za zhruba 30 až 40 minut Bromphenol blue viditelně sjede do spodní poloviny gelu. To znamená, že mohu vypnout zdroj a gel vložit do G-BOXu značky Syngene. V G-BOXu jsem zapnula zdroj UV záření a otevřela si na počítači program GeneSnap – díky UV záření můžu zviditelnit DNA díky přítomnosti DNA vazebné fluorescenční barvičky, GelRed. (49)

Vždy jsem nastavila délku expozice na 200 milisekund a pořídila fotku. Na fotce jsou viditelné proužky a také genový žebříček čili jsem mohla podle jejich délky vyhodnotit, o jakou alelu se jedná, zdali je mutantní, divoká nebo heterozygotní pro určité geny. Usuzuji tak na základě

vzdáleností míst nasednutí primerů, které jsem do reakce použila. Zde je žebříček, kterým jsem se řídila.



Obrázek 7 Použitý žebříček na 100 bp



Obrázek 8 Použitý žebříček na 1 000 bp

Vzdálenosti mezi primery a jejich obrázky se nachází v kapitole „Použité primery“ v přílohách na str. 65. Všechny pořízené fotky, ze kterých vyplývaly následující kroky mé práce, jsou popsány v kapitole „Obrázky a komentáře elektroforéz“ v přílohách na str. 52.

3.10 Sekvenace

Sekvenaci provádím za účelem zjištění pořadí nukleových bází v alele, která podlehla mutaci CRISPRem. Její výsledek se nachází v kapitole „Sekvenace mutanta v *spt6l*“ na str. 35.

1. PCR

PCR probíhala podle klasického protokolu pouze s jednou odchylkou – čas polymerace jsem nastavila na 1 minutu 40 sekund. Objem jako vždy 20 µl.

Použité primery: SPT6L S5 a SPT6L T6

2. Když proběhla klasická PCR, mohla jsem vzorky přečistit PCR reakcí v Thermal Cycleru, do které se přidávají enzymy.

5 µl vzorku z předchozí PCR

0,66 µl Shrimp Alkaline Phosphatase – Odstraněním fosfátů jsou nukleotidy nepoužitelné v sekvenační reakci. (50)

0,12 µl Exonuclease I – Zbaví vzorek zbylých primerů. (51)

4,22 µl Milli Q destilované H₂O

Program v Thermal Cycleru je 30 minut při 37 °C (působení fosfatázy i exonukleázy) a 10 minut při 80 °C (inaktivace fosfatázy).

3. Odběr potřebné koncentrace

Zjistila jsem potřebnou koncentraci DNA ve vzorku. Vzorky z klasické PCR jsem podrobila gelové elektroforéze. Vzhledem k odlišnému objemu vzorku (5 µl) než je běžné, vzniká odchylka od protokolu: 2 µl nanášecího pufru. Ten jsem míchala pouze s tou částí vzorku, kterou jsem dala do jamky v gelu.

Byly použity 2 µl GeneRuler 100 bp.

Gel jsem nasnímala v G: BOX a vyhodnotila pomocí programu GeneTools od SynGene. Ten na základě množství DNA v žebříčku odhadnul množství DNA ve vzorcích. Vzhledem k ředění během přípravy vzorků jsem číslo upravovala.

4. Sekvenace

Samotný proces sekvenace probíhal v servisní laboratoři PřF UK. Příprava vzorků na sekvenaci probíhala následovně.

Do 0,2 µl mikrokumavky jsem aplikovala:

5 ng/100 bp PCR přečištěného produktu

0,5 µl primeru SPT6L S5

A do objemu 8 µl doplněnou miliQ destilovanou H₂O – 2,5 µl.

3.11 Fenotypová studie a vyhodnocení výsledků

Rostliny jsem vysela 24.9.2021. Vysela jsem celkem 8 různě mutovaných variant, od každé 20 rostlin, tedy celkem 160 rostlin. Pozice rostlin jsem v platech randomizovala a zaslepila, aby měly všechny rostliny stejné podmínky a výsledky byly objektivní. Pěstování probíhalo za standardních podmínek. Protože je nutné kvetení synchronizovat (například odstranit vliv různého načasování vyklíčení), nechala jsem rostliny prvních 14 dní od vysetí naklíčit v krátkodenní kultivační místnosti. Za 12 dní jsem je přihnojila a pokapala roztokem hlístic, které pozabíjí různé parazity. Za 4 týdny od vysetí jsem zpozorovala první poupě.

Od tohoto dne jsem chodila rostliny pozorovat 3× týdně, zapisovala jsem si do tabulky datum spatření prvního poupěte a datum, kdy lodyha rostliny dosáhla přibližně 1 cm. Když rostliny vykvetly, spočítala jsem všechny listy v růžici. Do kultivační místnosti jsem docházela po dobu, než jsem i u poslední rostliny měla všechna data.

Z nashromážděných údajů jsem spočítala průměry a vytvořila grafy k jednotlivým variantám. Významnost rozdílů mezi průměry jsem otestovala pomocí dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů v Excelu s tolerancí chyby 5 %, který potvrdil či vyvrátil důležitost rozdílů. Princip t-testu vyplývá z knihy Matematická statistika na straně 92 – Jiří Anděl. Na základě těchto nástrojů jsem formulovala výsledky. (52)

4 VÝSLEDKY

V této kapitole se věnuji všem dosavadním výsledkům mé rok a půl trvající práce. Nejprve výsledkům křížení – jak teoretickým, tak skutečně získaným. Následují výsledky transformace, nejprve *A. tumefaciens* a potom samotných rostlin, tedy výsledky metody CRISPR/Cas9, včetně výsledků z úspěšné sekvenace. Kapitola „Výsledky“ je zakončena výsledky z fenotypové studie, kde jsem mutanty vyhledané elektroforézou z křížení i z transformace, podrobila pozorování.

4.1 Křížení

Na počátku experimentu bylo několik skupin rostlin. Mutanti v AGO vazebné doméně genu *spt6l*, což byly metodou CRISPR/Cas9 vytvořené mutanti z divokého typu. Tuto rostlinu jsem křížila s rostlinami mutovanými v různých květních genech (*flc*, *soc1*), které jsem zakoupila, abych zjistila, jak s nimi právě gen *SPT6L* bude interagovat a jestli se účastní stejných regulačních drah, jako již zmíněné geny.

V následujících dvou schématech je křížení, které jsem prováděla, detailně vyobrazeno. (Obrazky 9 a 10)

Mutant v *soc1* kvete později než divoký typ.

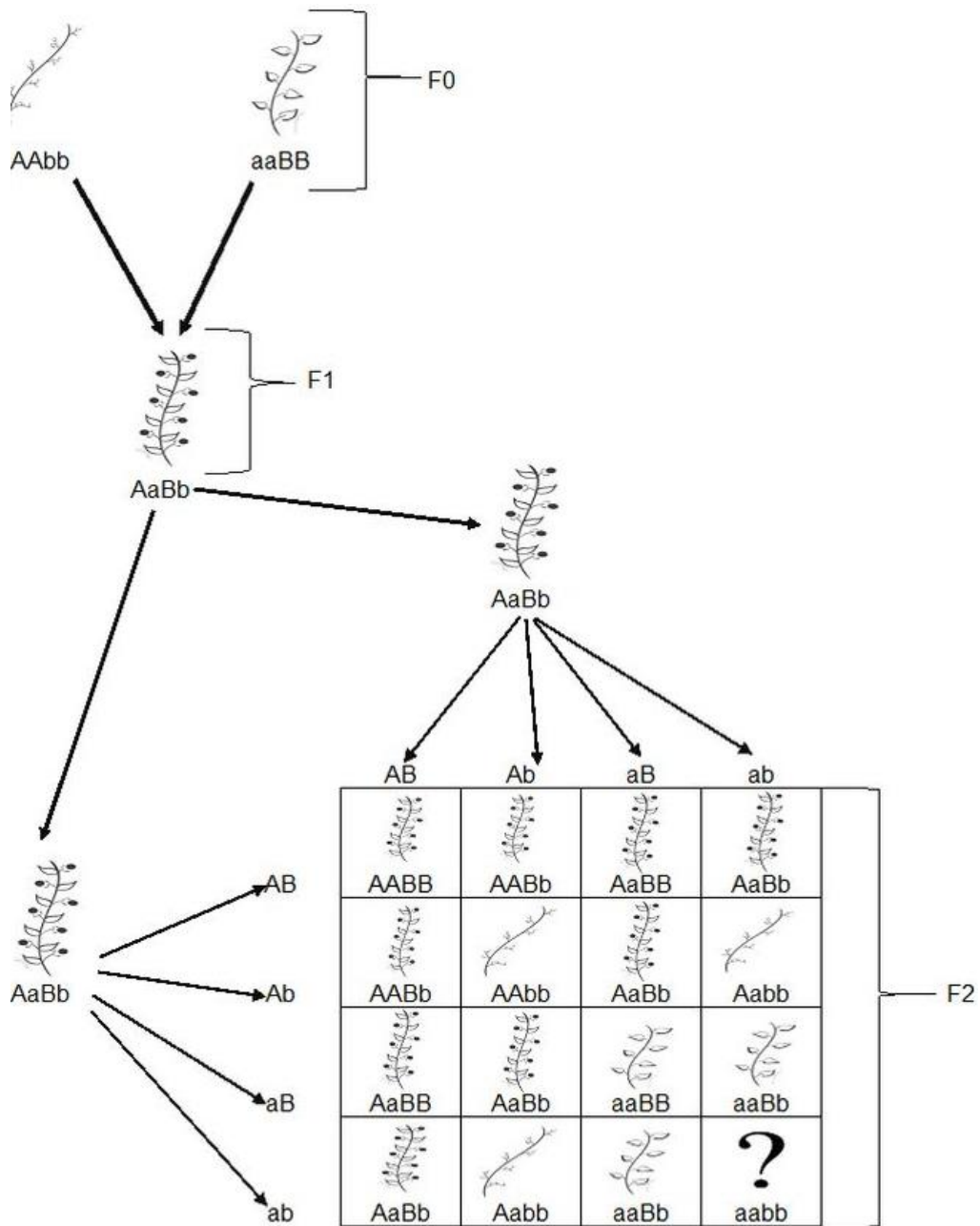
U obou křížení je štěpný poměr v F2 generaci 9:3:3:1.

První schéma: 9 divokých typů, 3 mutanti v *spt6l*, 3 mutanti v *soc1* a 1 dvojitý mutant. (neboli mutant v *soc1* i v *spt6l*).

Druhé schéma: 9 divokých typů, 3 mutanti v *spt6l*, 3 mutanti v *flc* a 1 dvojitý mutant. (neboli mutant v *flc* i v *spt6l*).

Pro homozygotní mutanty v jednom z genů z toho vyplývá zastoupení 4:12 (25 %).

Pro dvojitého mutantu 1:16 (6,25 %).



Obrázek 9 Schéma křížení *soc1* a *spt6l*

Legenda:

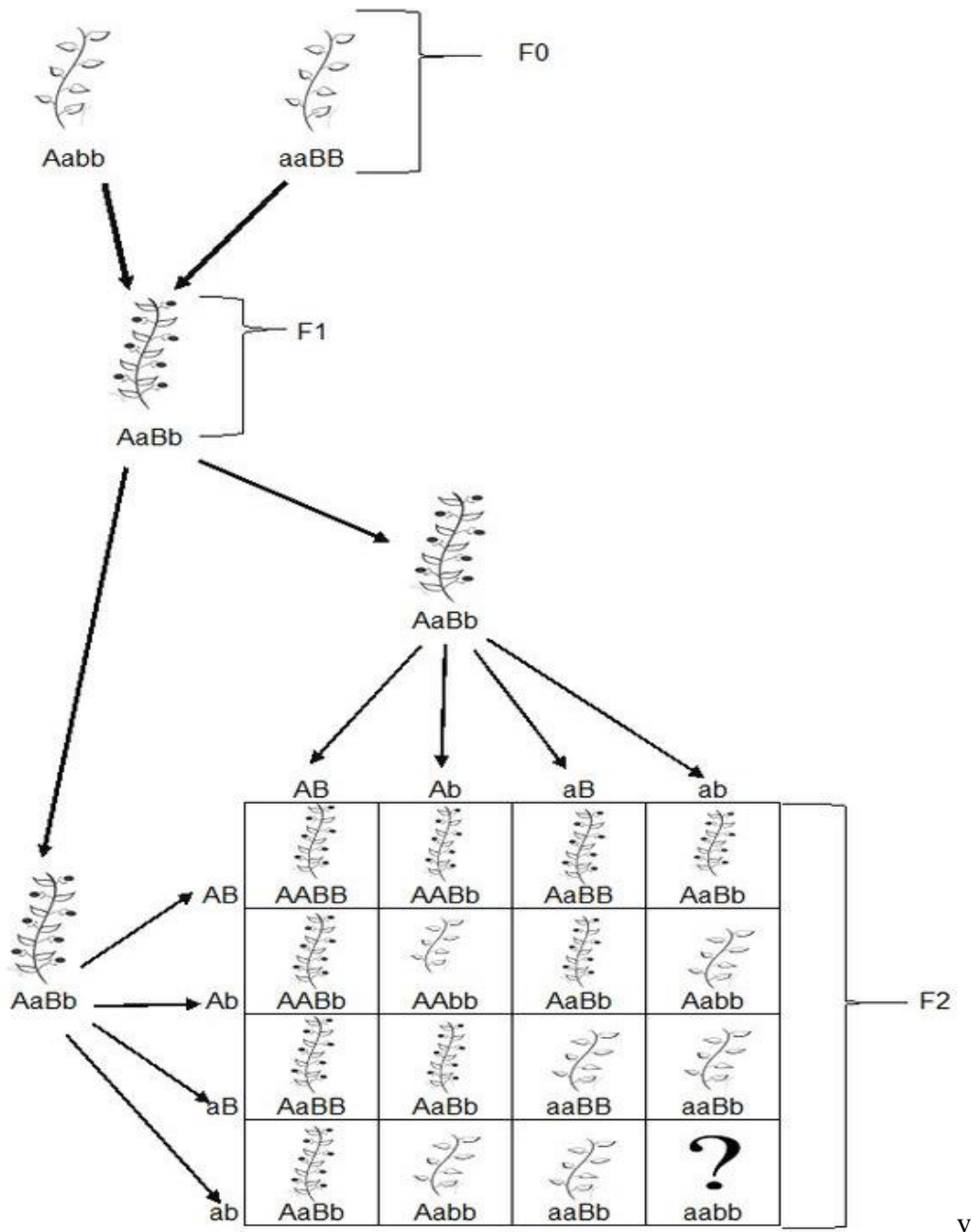
obrázek značící fenotyp divokého typu	obrázek značící fenotyp mutanta v <i>soc1</i>	obrázek značící fenotyp mutanta v <i>spt6l</i>	značící fenotyp mutanta v <i>soc1</i> i v <i>spt6l</i>

A = divoký typ v *SPT6L*

a = mutant v *spt6l*

B = divoký typ v květním genu *SOC1*

b = mutant v květním genu *soc1*



Obrázek 10 Schéma křížení *flc* a *spt6l*

Legenda

obrázek značící fenotyp divokého typu	obrázek značící fenotyp mutanta v <i>flc</i>	obrázek značící fenotyp mutanta v <i>spt6l</i>	značící fenotyp mutanta v <i>flc</i> i v <i>spt6l</i>

A = divoký typ v *SPT6L*

a = mutant v *spt6l*

B = Divoký typ v květním genu *FLC*

b = mutant v květním genu *flc*

Mutant v *flc* i mutant v *spt6l* kvetou dříve než divoký typ, nemají sice úplně identické fenotypy, ale pro jednoduchost tabulky jsem zvolila stejný obrázek.

Homozygotní dvojití mutanti jsou ve schématu značeni otazníkem proto, že když jsem je získávala do fenotypové studie křížením, ještě jsem jejich fenotyp neznala.

To znamenalo rostliny křížit, jak je uvedeno výše či v případě dvojitého mutantu v *ft* a *spt6l* rostlinu transformovat pomocí *A. tumefaciens*, abych do rostlin dopravila gen pro Cas9 nukleázu a tím mutantu vytvořila. Vybrané mutanty jsem identifikovala díky PCR a pak vizualizovala na gelové elektroforéze, s jejíž pomocí jsem mohla vyhodnotit genotyp rostliny.

4.2 Křížení *spt6l* × *soc1*

Zde uvádím výsledky křížení rostliny homozygotní v mutantní alele pro *soc1* a *spt6l*. (F0 = parentální generace) – tyto rostliny jsou prarodiči generace F2. První generace (F1) není v genotypování zahrnuta, protože F1 generace jsou všichni jedinci heterozygoti, a tudíž v principu není nutné je genotypovat. Všechny elektroforézy, ke kterým zde uvádím výsledky, jsou jako obrázky doloženy v přílohách v kapitole „Obrázky a komentáře elektroforéz“ na str. 52.

4.2.1 F2 generace

Nejprve jsem rostliny genotypovala na *SPT6L* alely. Získala jsem 1 homozygota s divokou alelou, 2 homozygoty s mutantní alelou pro *spt6l* a 17 heterozygotů.

2 mutanty a 1 divoký typ jsem posunula do druhé fáze genotypování, kde jsem detekovala *SOC1* alelu. Získala jsem 1 homozygota s divokou alelou, 1 homozygotního mutantu a 1 dvojitého mutantu.

Snímky elektroforéz jsou na str. 52 až 53, obrázky 25 a 26.

4.2.2 F3 generace

V další generaci jsem opět začala s detekováním *SPT6L* alely z důvodu kontroly kvůli fenotypové studii. Genotypovala jsem dva potomky od každé ze tří rostlin z F2 generace. Získala jsem 2 homozygoty s divokou alelou a 4 homozygoty s mutantní alelou.

Všechny tyto rostliny jsem pak genotypovala ještě na *SOC1* alelu. Získala jsem 4 homozygotní mutanty a 2 heterozygoty.

Snímky elektroforéz jsou na str. 54, obrázky 27 a 28.

4.3 Křížení *spt6l* × *flc*

Zde uvádím výsledky křížení rostliny homozygotní v mutantní alele pro *flc* a *spt6l*. (F0 = parentální generace) – tyto rostliny jsou prarodiči generace F2. Důvod, proč zde není zahrnuta generace F1 je stejný, jako u předešlého křížení.

4.3.1 F2 generace

Nejprve jsem opět genotypovala 20 rostlin na *SPT6L* alelu. V tomto genotypování jsem získala 8 homozygotů s divokou alelou, 6 homozygotů s mutantní alelou pro *spt6l* a 6 heterozygotů.

Rostliny, které vyšly buď jako divoké typy nebo mutanti v *spt6l* jsem v druhém kole genotypování podrobila reakci detekující *FLC* alelu.

Vyšel mi 1 homozygot s divokou alelou, 6 heterozygotů a 6 homozygotů s mutantní alelou pro *flc*, z toho 4 byli dvojití.

Snímky elektroforéz jsou na str. 55 až 56, obrázky 29, 30 a 31.

4.3.2 F3 generace

V F3 generaci jsou genotypovány rostliny, které jsem následně použila do fenotypové studie, a tak jsem si znovu zkontrolovala jejich genom, abych měla takové varianty, které požadují.

Genotypovala jsem dva potomky od každé ze tří rostlin – dvě rodičovské rostliny byly obě dvojití mutanti a jedna měla mutantní pouze *flc* alelu (*SPT6L* alelu měla divokou).

Všechny vzorky rostlin byly genotypovány nejprve na *SPT6L* alelu. Získala jsem 2 homozygoty s divokou alelou a 4 homozygoty s mutantní alelou pro *spt6l*.

V druhém kole proběhlo detekování *FLC* alely. Získala jsem 6 homozygotů s mutantní alelou pro *flc*.

Snímky elektroforéz jsou na str. 57 až 58, obrázky 32 a 33.

4.4 *SPT6L* CRISPR mutageneze v *ft*

4.4.1 *A. tumefaciens* a T0 generace

Abych získala dvojitého mutanta v *ft* a *spt6l*, bylo nutné nejprve rostliny heterozygotní v *FT* transformovat roztokem s transformovaným *A. tumefaciens*. To, zdali transformace samotného *A. tumefaciens* byla úspěšná, bylo nutné ověřit PCR a vizualizovat elektroforézou kolonií *A. tumefaciens*, která se nachází v přílohách na str. 59, obrázek 34. Toto tvrzení se mi potvrdit povedlo, všechny kolonie 1 až 5 obsahovali Cas-9, která byla součástí T-DNA. Úspěšně transformovaným *A. tumefaciens* jsem mohla transformovat rostliny, ve kterých již byla existující mutace v *ft* a tímto jsem vytvořila mutaci v *spt6l*. Měla jsem i *A. tumefaciens* transformované plazmidem pHSE, ale nakonec jsem s ním nepracovala, sloužilo jen jako záloha.

Plazmid pHSE sloužil k přípravě mutanta v *spt6l*, kterého jsem křížila s mutantem v *soc1* a *flc* (s rostlinami zakoupenými). Já jsem ale při vlastní tvorbě mutanta v *spt6l* (v případě rostliny

mutantní v *ft*, kde bylo potřeba vytvořit ještě druhou mutaci) pracovala s plazmidem pHEE, který je po teoretické stránce lepší, ale nebyl ještě odzkoušen.

Pracovala jsem s heterozygoty, protože mutant v *ft* kvete delší dobu a experiment by se protáhl.

4.4.2 T1 generace

Jedná se o první generaci potomků transformovaných rostlin. Před genotypováním byly rostliny selektovány na antibiotiku. V této generaci jsou potomci rostlin, které byly transformovány jak pHEE tak pHSE plazmidem. V dalších generacích (T2 a T3) pracuji už jen s potomky od pHEE. Jaká rostlina byla od jakého plazmidu, je uvedeno u kapitoly „Obrázky a komentáře elektroforéz“ v přílohách na str. 59.

Při detekování *SPT6L* alely jsem získala 19 homozygotů s divokou alelou a 1 homozygota s mutantní alelou pro *spt6l* a 2 heterozygoty.

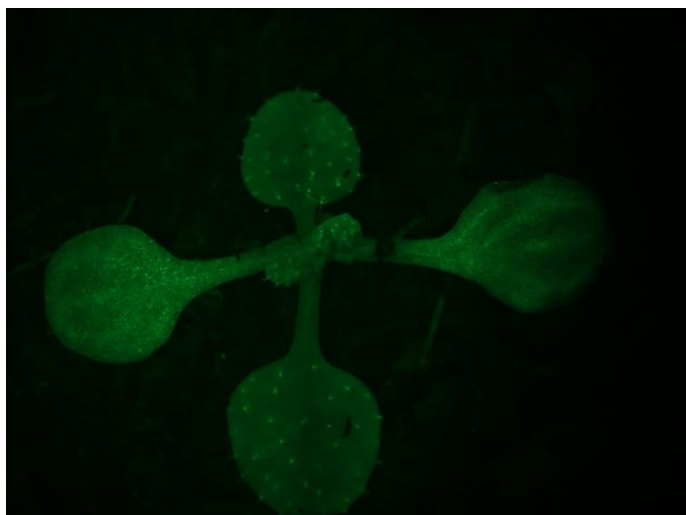
Při detekování *FT* alely jsem získala 8 homozygotů s divokou alelou, 8 homozygotů s mutantní alelou pro *ft* a 6 heterozygotů. Nezáskala jsem žádné dvojité mutanty.

Snímky elektroforéz se nachází na str. 60 až 61, obrázky 35 a 36.

4.4.3 Fluorescence

V mém případě byl gen pro GFP součástí T-DNA, kterou jsem vložila do mnou transformovaných rostlin. Následně jsem pod binolupou pozorovala, zdali rostlina fluoreskuje v modrém světle, a když tomu tak bylo, znamenalo to, že transformace byla úspěšná a rostliny obsahují T-DNA. Genotypovala jsem pak méně rostlin, protože rostliny, které nesvítily, mě nezajímaly a mohla jsem je rovnou vyřadit. Pak jsem rostlinu genotypovala na *SPT6L* a zjišťovala, jestli proběhla mutace, tedy jestli CRISPR fungoval.

Před genotypováním generace T2 jsem provedla kontrolu fluorescenčního proteinu v transformovaných rostlinách A5, A10 a A12. Peletek s rostlinami jsem měla celkem 60, ale na některých peletkách rostlo více rostlin. Vytrhala jsem ty rostliny, které pod binolupou nesvítily. Těch bylo 34. Genotypovala jsem rostliny obsahující GFP, kterých bylo 31.



Obrázek 11 Fluoreskující rostlina z generace T1

4.4.4 T2 generace

V této generaci jsem nejprve genotypovala fluoreskující svítivé rostliny (30 z nich) na *SPT6L* alelu a potom nekontrolovaných 16 také na *SPT6L* alelu, protože jsem chtěla mít pro jistotu větší vzorek.

Rodič těchto rostlin byl transformován plazmidem pHEE a vyšel jako homozygot s divokou alelou v *SPT6L* a heterozygot pro *FT*. Výsledkem bylo 32 homozygotů bez mutace, 2 homozygotní mutantní jedinci pro *spt6l* a 11 heterozygotů. Jeden vzorek nevyšel nijak čili ho neuvažují.

Do dalšího kola genotypování T2 generace – tedy do genotypování na *FT* alelu – jsem zařadila jen ty rostliny, které při reakci detekující *SPT6L* alelu vyšly jako homozygotní mutantní nebo jako heterozygoti.

Získala jsem 7 heterozygotů a 5 homozygotních mutantů.

Z toho 1 vzorek byl heterozygot v *FT* a mutant v *spt6l* a jeden vzorek byl dvojitý mutant v *ft* a v *spt6l*. Tyto dva vzorky mě budou zajímat pro budoucí sekvenaci.

Snímky elektroforéz se nachází na str. 62 až 63, obrázky 37 a 38.

4.4.5 T3 generace

V generaci T3 se nacházely vzorky rostlin, jejichž prarodič byl transformován plazmidem pHEE. V této generaci jsem vše genotypovala jen na *FT* alelu.

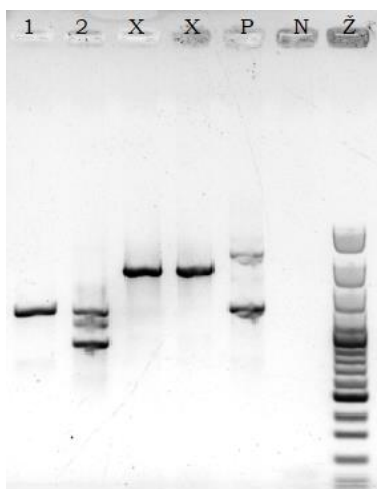
Rostliny, jejichž rodič (člen generace T2 – značený číslem 6) byl homozygotní mutant pro *spt6l* a heterozygot pro *FT*, vyšly všechny jako homozygotní mutantní pro *ft*. Toto genotypování bylo ovlivněno výběrem podle fenotypu – genotypovala jsem jen pozdě kvetoucí rostliny.

Dále jsem genotypovala ještě 4 potomky rostliny, která byla sesterská ke generaci T0, avšak nebyla transformována. Zůstala tedy pouhým heterozygotem v *FT*, já jsem ji vysela, protože jsem potřebovala na fenotypovou studii získat jednoduchého homozygotního mutantu v *ft*. To se mi povedlo a získala jsem 2 homozygotní mutanty v *ft* a 2 heterozygoty.

Snímky elektroforéz se nachází na str. 64, obrázek 39.

4.5 Sekvence mutantu v *spt6l*

V T2 generaci jsem provedla genotypování a předpokládala dvojitého mutantu v *ft* a v *spt6l*, kterého budu moci poslat na sekvenaci a zjistit, zdali mutace CRISPR/Cas9 proběhla úspěšně. Obrázek 12 je snímkem elektroforézy vybraných rostlin generace T2.



Obrázek 12 *Spt6l* × *ft*

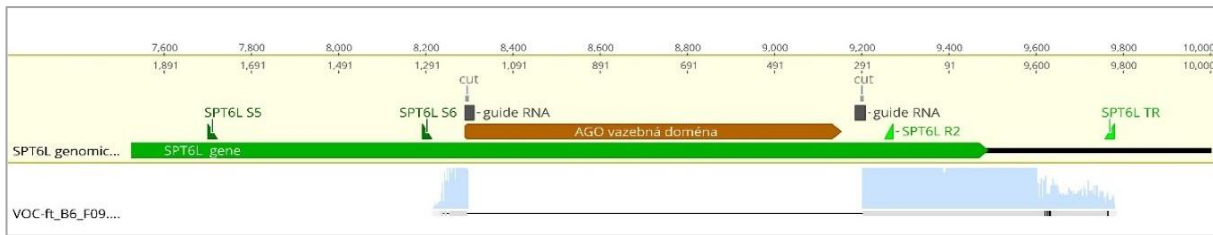
1 = vzorek rostliny, který se při genotypování T2 generace ukázal jako mutant v *spt6l* a heterozygot v *FT*. (V genotypování T2 značen jako 6)

2 = vzorek rostliny, který se při genotypování T2 generace ukázal jako mutant v *spt6l* a mutant v *ft* – použila jsem primery, které pokrývají větší oblast, a díky tomu jsem detekovala alelu, kterou jsem s předchozí sadou primerů detekovat nedokázala. Čili se ukázalo, že jde o heterozygota v *SPT6L*, který má obě alely mutantní. Protože je ale jedna z mutací jiná (větší) než měla být, není vzorek předmětem mého zájmu a na sekvenaci ho nepošlu. (V genotypování T2 značen jako 33)

X = nesouvisející vzorky

Pomocí programu GeneTools bylo množství DNA ve vzorku 1 vyhodnoceno na 27,95 ng/μl. Po přepočtení na koncentraci mám 2,8 ng/μl.

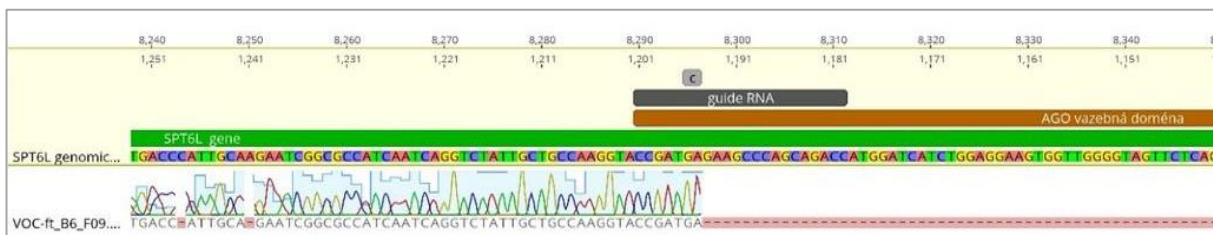
Do sekvenační laboratoře PřFUK jsem poslala množství 14 ng/μl přečištěného PCR vzorku. Což je objem 5μl.



Obrázek 13 Výsledky sekvenace mutanta v *spt6l*, celkový náhled

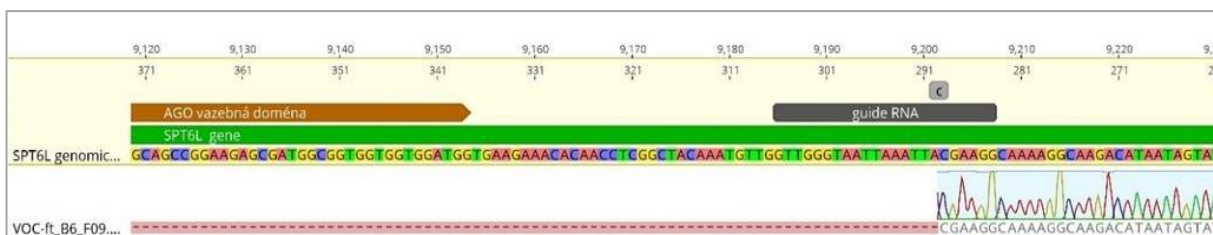
Náhled na mutaci, která proběhla úspěšně. V mém vzorku už se AGO vazebná doména nevy-skytuje, došlo k jejímu odstranění v místech „cut“. K vystřížení dané sekvence dochází vždy zhruba 3 až 4 nukleotidy od PAM sekvence gRNA. Na obrázku jsou vyznačeny i primery, které jsem použila při PCR pro sekvenaci – S6 a TR.

V horním řádku (popis SPT6L genomic sequence) je sekvence bez mutace, se kterou je porov-návána moje sekvence. Ve druhém řádku (popis VOC-ft...) je sekvence ve formě chromato-gramu mého vzorku.



Obrázek 14 Výsledky sekvenace mutanta v *spt6l*, přiblížení na levou guide RNA a na místo řezu („c“ = cut). Vidíme začínající delaci

Růžový proužek znamená, že programu Geneious prime se nepodařilo detekovat žádné báze, protože tam žádné nejsou. Doména se tedy v genomu nevyskytuje.



Obrázek 15 Výsledek sekvenace mutanta v *spt6l*, přiblížení na pravou guide RNA a na místo řezu („c“ = cut). Vidíme končící delaci

4.6 Fenotypová studie

Ve fenotypové studii jsem u rostlin pozorovala datum prvního poupěte, dále datum, kdy lodyha dosáhla výšky 1 cm a počet listů v růžici. Konkrétní čísla a data, která jsem vypořizovala a tvořila z nich průměry, jsou dostupná v přílohách „Data fenotypové studie“ na str. 72 až 73. Byly

použity rostliny získané křížením z F3 generace a rostliny transformované, z T2 generace. Obrázky 16, 17 a 18 jsou grafy naměřených dat během studie.

Od každé varianty jsem měla dvě rostliny, od každé jsem vysela 10, takže celkem jsem měla 20 rostlin na variantu. Měla jsem 8 variant čili celkem jsem ve fenotypové studii pracovala se 160 rostlinami, z čehož asi 3 nepřežily.

Genotypy rostlin, s kterými jsem pracovala, byly následující:

divoký typ (z anglického *wild type*) = WT

mutant v *spt6l* = M v SPT6L

mutant v *flc* = M v FLC

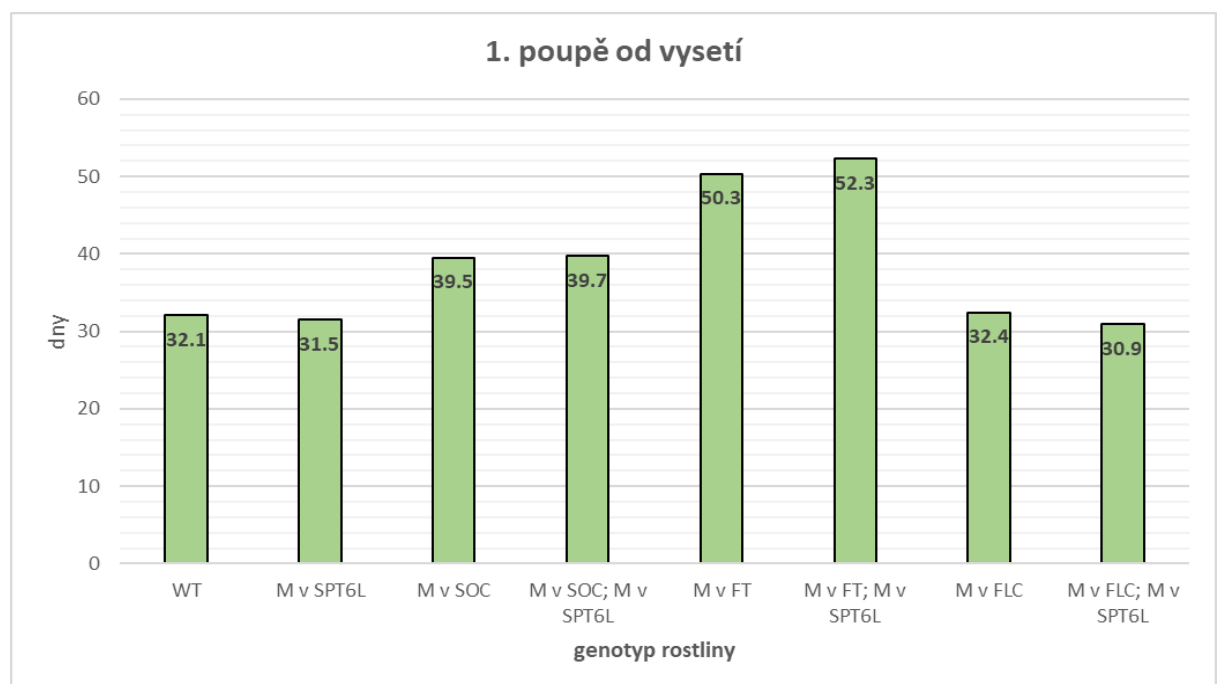
dvojitý mutant v *flc* a v *spt6l* = M v flc; M v spt6l

mutant v *soc1* = M v SOC

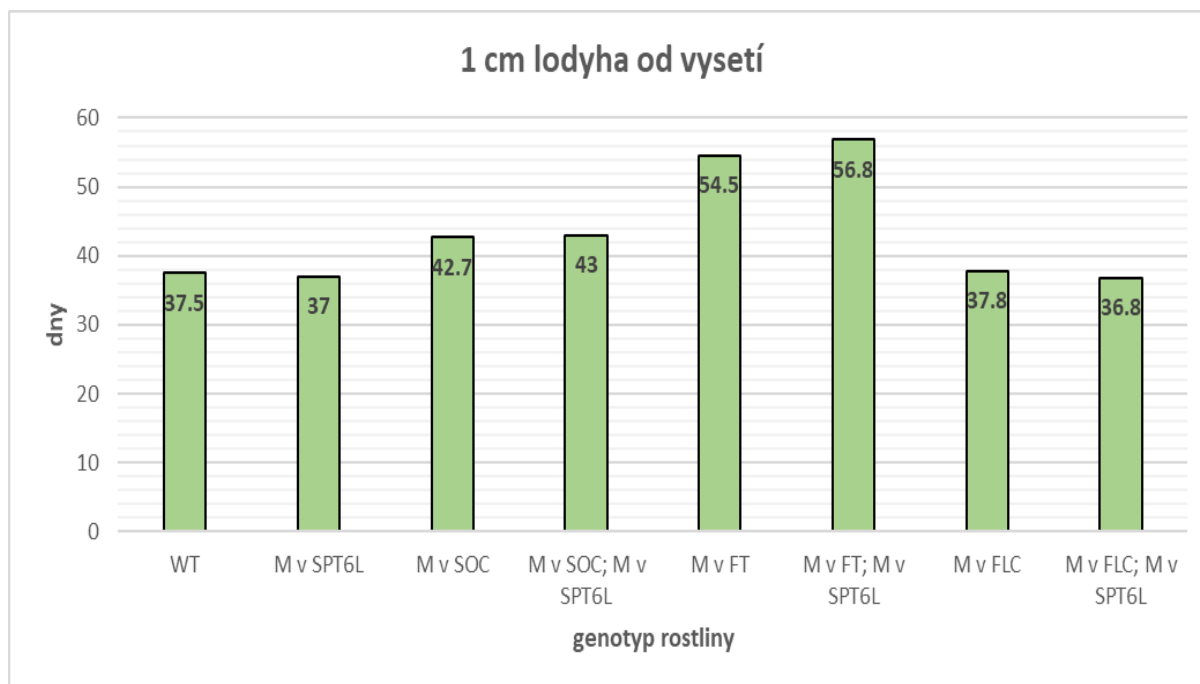
dvojitý mutant v *soc1* a v *spt6l* = M v SOC; M v SPT6L

mutant v *ft* (měla jsem jen jednu rostlinu, vysela jsem od ní tedy 20) = M v FT

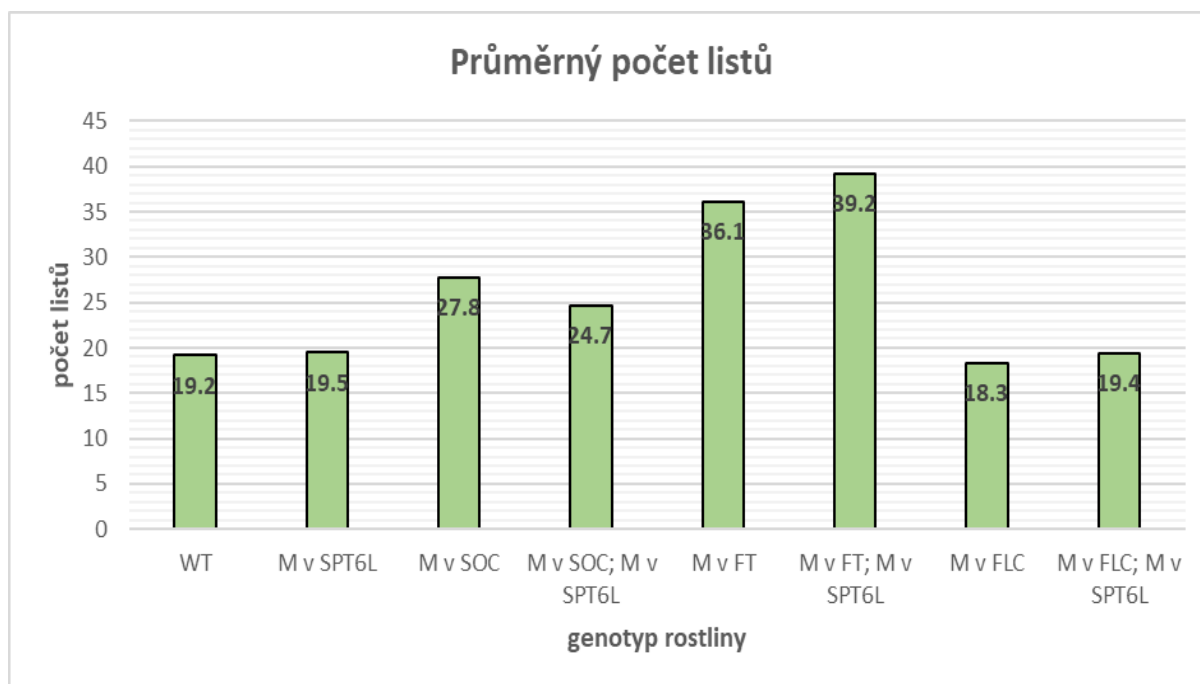
dvojitý mutant v *ft* a v *spt6l* = M v FT; M v SPT6L



Obrázek 16 Počet dní od vysetí, než rostlina získala 1. poupě – průměr



Obrázek 17 Den, kdy lodyha dosáhla 1 cm – průměr



Obrázek 18 Počet listů v růžici – průměr

Z grafů tvořených průměry dat, která se nacházejí v přílohách, jsem vyčetla a potvrdila t-testem následující:

Rozdíl mezi divokým typem (použit ekotyp Col) a mutantem v *spt6l* byl malý a nevýznamný. Můj předpoklad je tedy nepotvrzen. To mi dost komplikuje interpretaci výsledků, protože se

nemůžu o tento fakt opřít a nelze přesně vyjádřit, které geny jsou ve stejné regulační dráze *SPT6L*.

Jednoduchý mutant v *soc1* a dvojitý mutant v *soc1* a *spt6l* nejsou zásadně odlišní.

To, že má mutant v *ft* nejvíce listů, není zvláštní, protože čím déle rostlina kvete, tím více listů stihne vytvořit.

U dvojitého mutantu v *ft* a v *spt6l* je oproti jednoduchému mutantovi v *ft* rozdíl v době získání 1. poupěte signifikantní. Konkrétně dvojitý mutant vyrostl o dva dny později. Z toho plyne, že mutace v genu *spt6l* dobu růstu spíše prodloužila. To se shoduje i s lodyhou, kde t-test potvrdil, že mé ošetření mělo vliv na dobu růstu lodyhy.

U dvojitého mutantu v *flc* a v *spt6l* je oproti jednoduchému mutantovi v *flc* rozdíl v době získání 1. poupěte signifikantní. Konkrétně dvojitý mutant vyrostl o 1,5 dne dřív. Z toho plyne, že mutace v genu *spt6l* dobu růstu spíše zkrátila. Doba růstu lodyhy sedí s dobou poupěte. Avšak t-test nevyhodnotil dobu růstu lodyhy jako statisticky významnou.

5 DISKUSE

Dílčím cílem mé práce bylo vytvořit dvojité mutanty mezi mutantem v genu *spt6l* a mutanty v genech regulujících kvetení – *SOC1*, *FLC* a *FT*.

Křížení *spt6l*×*soc1* bylo v F2 generaci při získání jednoduchého homozygotního mutantu v *spt6l* úspěšné na 10 %. Při homozygotním mutantovi v *soc1* se jednalo o 66% úspěšnost. Při hledání dvojitého mutantu byla úspěšnost na celou generaci 5 %. Všechna data se v rámci statistické chyby shodují s teoretickým štěpným poměrem.

Úspěšnost křížení *spt6l*×*flc* v F2 generaci byla při hledání jednoduchého homozygotního mutantu v *spt6l* 30 %. Při homozygotním mutantovi v *flc* se jednalo o 15% úspěšnost. Při hledání dvojitého mutantu byla úspěšnost na celou generaci 20 %, to je jediné číslo, které se s teoretickým štěpným poměrem neshoduje.

Úspěšnost metody CRISPR/Cas9 byla v generaci T1 při získání jednoduchého homozygotního mutantu v *spt6l* 5 % a v generaci T2 9 %. V generaci T2 jsem u dvojitého mutantu (přesněji mutantu v *spt6l* a heterozygota v *FT*) měla úspěšnost 2,17 %. Účinnost CRISPRu je velice závislá na vybraných gRNA, čili se dá těžko porovnávat s jinými studiemi. Studie Chenga et. al. (53) byla méně úspěšná, v T1 generaci získali z 50 rostlin pouze 2 heterozygoty a žádné homozygotní mutanty.

Vytvořené homozygotní mutanty jsem vybrala do fenotypové studie, abych se dopracovala k hlavnímu cíli. Z dat získaných ve fenotypové studii lze provést závěry, jaké regulační dráhy se gen *SPT6L* účastní, zároveň mé objevy vytvářejí prostor pro další výzkumy, protože výsledky odhalují komplexnější záležitost.

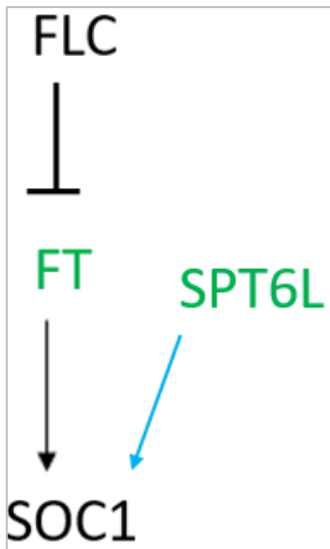
Je nutné podotknout, že v schématech se soustředím jen na geny mého zájmu, ostatní geny nekreslím pro jednoduchost schémat.

V každém schématu jsou mutované geny vyznačeny zeleně.

—| značení negativní regulace (inhibice)

→ značení podpory exprese

V případě dvojitého mutantu v *ft* a v *spt6l* lze vyvodit následovné varianty, jak může gen *SPT6L* interagovat s geny regulujícími kvetení:

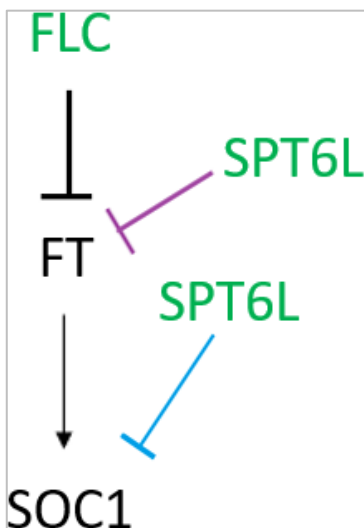


Obrázek 19 Regulační dráha SPT6L a FT

Modrá šipka značí variantu, kdy *SPT6L* působí aktivačně přímo na *SOC1*. Což vysvětluje můj výsledek, že dvojitý mutant v genu *ft* a v *spt6l* vykvetl později než jednoduchý mutant v *ft*.

Možností je více, je zde možná i varianta, že *SPT6L* nepůsobí přímo. Působí například přes nějaký další gen.

S dvojitým mutantem v *spt6l* a v *flc* už je to trochu složitější. Opět je možných více variant. Dvojitý mutant vykvetl dříve než jednoduchý. Schéma by tedy vypadalo takto:



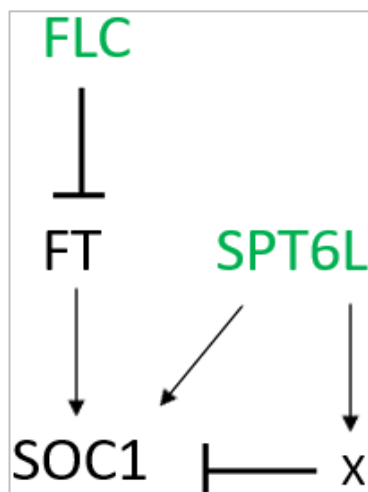
Obrázek 20 Regulační dráha SPT6L a FLC.

Modrá barva inhibiční šipky značí variantu, kde *SPT6L* působí inhibičně přímo na *SOC1*. Druhou variantu značí fialová inhibiční šipka, která cílí na *FT*. Jestli se jedná o modrou nebo o fialovou variantu, nemohu říci, protože výsledek se jeví stejně.

I zde je možnost, že *SPT6L* nepůsobí přímo.

Z výsledků je tedy patrné, že působení genu *SPT6L* je u každé z variant opačné. Nedává smysl, aby jeden gen v divokém typu působil dvěma opačnými funkcemi zároveň. Tedy *SPT6L*, nemůže působit na gen *SOC1* zároveň aktivačně i inhibičně, přestože tomu výsledky nahrávají.

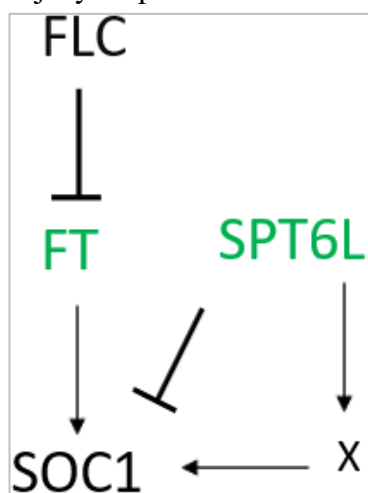
Pro vysvětlení problematiky musím zavést faktor X – tedy nějaký gen (může být již objeven nebo se jedná o doposud neznámý gen), který na základě vnějších podmínek, či podmínek způsobených mutací v genomu zasahuje do regulační dráhy. Následující dva obrázky ukazují, že funkce genu *SPT6L* je podmíněná:



Obrázek 21 Funkce genu *SPT6L* ve dvojitě mutantovi s *flc*

Toto schéma nastiňuje situaci, že *SPT6L* působí na *SOC1* inhibičně přes faktor X. Tedy gen *SPT6L* působí inhibičně na *SOC1* jen tehdy, platí-li nějaká podmínka působící na faktor X, který se možná aktivuje jen v případě, že genom obsahuje mutaci v *flc*. Jinak gen *SPT6L* působí na gen aktivačně.

Obdobně je tomu v případě dvojitě mutantu v *ft* a *spt6l*. *SPT6L* působí na gen *SOC1* aktivačně, jen v případě aktivace nějakého genu, který se možná aktivuje při mutaci v *ft*, nebo je nějakým způsobem vázán na věk rostliny. Jinak gen *SPT6L* působí na gen inhibičně:

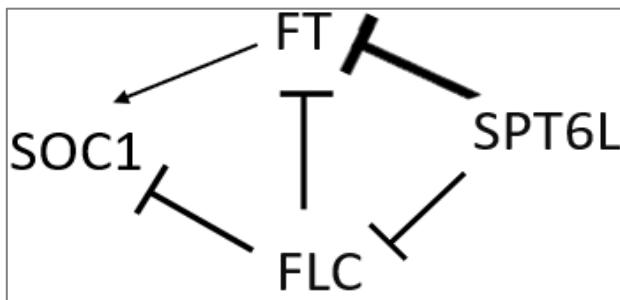


Obrázek 22 Funkce genu *SPT6L* ve dvojitě mutantovi s *ft*

Faktor X se dá nahradit různou silou interakcí – i to je stále možnost.

Podle databáze FLOR-ID (54) mutant v *flc* vykvétá dříve, mutant v *ft* později a mutant v *soc1* také později. To se během výzkumu a cesty k dvojitým mutantům potvrdilo i mně, kromě *flc*, u kterého kvetení na dlouhém dni není vždy směrodatně rychlejší. (55)

Nemůžu s určitostí říct, o kterou variantu z předešlých se jedná. Pokud bych chtěla zavést jednodušší řešení, bez nutnosti zavádění neznámých, je potřeba uvažovat komplexnější interakce, než jsem si plánovala připustit a začít pracovat s již známým faktem, že *FLC* neinhibuje jen *FT*, ale i *SOC1*. Budu-li se držet principu Occamovy břitvy (56), že nejjednodušší vysvětlení je nejsprávnější, interpretuji z výsledků toto schéma:



Obrázek 23 Regulační dráha genu *SPT6L* v divokém typu

Jedná se o variantu, ve které nehrají roli žádné neznámé. Neznámé (X), které jsou zřejmě podmíněné funkcí *FT* a *FLC*, jsem nahradila přímo geny *FT* a *FLC*, protože v mém schématu s neznámou X je neznámá podmíněná právě funkcí *FT* a *FLC*. Vyvodila jsem tedy variantu, kde jsou tímto neznámým faktorem přímo tyto geny.

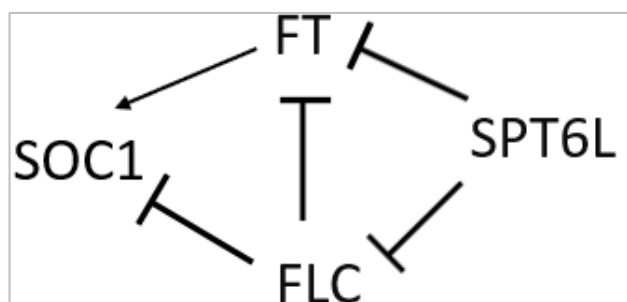
Teoreticky by inhibiční šipka vedoucí od *SPT6L* k *FT* měla být silnější než všechny ostatní ve schématu, to ale nemůžu potvrdit ani vyvrátit.

6 ZÁVĚR

Po provedeném křížení rostlin mutantních v genech regulujících kvetení (*FLC*, *SOC1* s genem *SPT6L*) jsem prováděla genotypování, díky kterému jsem mapovala cestu napříč generacemi, za účelem hledání dvojitého mutantu. Mé výsledky při křížení se úspěšně shodovaly s teoretickými štěpnými poměry.

Získání rostliny mutantní v *ft* a v *spt6l* bylo složitější a obnášelo transformaci *A. tumefaciens* plazmidem nesoucím T-DNA, která obsahovala gen pro nukleázu Cas9, umožňující metodou CRISPR cíleně mutovat gen *SPT6L*. Tímto *A. tumefaciens* jsem následně transformovala rostliny mutantní v *ft*, v T1 generaci získala mutanty v *spt6l* a již v generaci T2 jsem získala dvojitého mutantu. CRISPR se mi osvědčil a mohu potvrdit, že se jedná o velmi praktickou metodu.

Rostliny vybrané do fenotypové studie (generace F4 a T3) jsem podrobila pozorování času kvetení a dalších faktorů, viz strana 36. Na základě naměřených hodnot jsem formovala diskusi. Můj předpoklad, že mutant v *spt6l* pokvete dříve, se nepotvrdil. Má hypotéza, že *SPT6L* se účastní regulační dráhy ovlivňující kvetení, se potvrdila. Je důležité zvýraznit fakt, že působení genu *SPT6L* nemusí být přímé a nepůsobí pouze v jedné regulační dráze. Jako nejsnazším (avšak ne jediným) vysvětlením se nabízí již zobrazené schéma:



Obrázek 24 Regulační dráha genu *SPT6L* v divokém typu

SPT6L působí inhibičně na geny *FT* i *FLC*. Fakt, že *FLC* působí inhibičně na *FT*, které je aktivátorem *SOC1*, je nám známý již delší dobu a vycházím z něj. Gen *FLC* neinhibuje pouze *FT*, ale i *SOC1*. (54)

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. KARLOWSKI, Wojciech, Andrzej ZIELEZINSKI, Julie CARRÈRE, Dominique PONTIER, Thierry LAGRANGE a Richard COOKE. WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic acids research* [online]. 2010, **38**, 4231–45. [cit. 16. 11. 2021] Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq162
2. HÖCK, Julia a Gunter MEISTER. The Argonaute protein family. *Genome Biology* [online]. 2008, **9**(2), 210. ISSN 1474-760X. [cit. 16. 11. 2021] Dostupné z: doi:10.1186/gb-2008-9-2-210
3. LIBUŠE PAVLOVÁ a LUKÁŠ FISHER. *Růst a vývoj rostlin*. 1. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2011. ISBN 978-80-246-1913-2.
4. ČERMÁK, Vojtěch. osobní sdělení. In: . 2020.
5. SCHWANK, Gerald, Bon-Kyoung KOO, Valentina SASSELLI, Johanna F. DEKERS, Inha HEO, Turan DEMIRCAN, Nobuo SASAKI, Sander BOYMANS, Edwin CUPPEN, Cornelis K. VAN DER ENT, Edward E.S. NIEUWENHUIS, Jeffrey M. BEEKMAN a Hans CLEVERS. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organs of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* [online]. 2013, **13**(6), 653–658. ISSN 1934-5909. [cit. 16. 11. 2021] Dostupné z: doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002
6. FRIDETA SEIDLOVÁ. Rostliny, obdivuhodné organismy naší planety [online]. 2011, **90**(328). ISSN 1214-4029. [cit. 4.1.2021] Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-6/rostliny-obdivuhodne-organismy-nasi-planety.html>
7. ŘEPKOVÁ, Jana. *Genetika rostlin* [online]. B.m.: Masarykova univerzita, Brno. 2013. [cit. 16. 11. 2021] Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/index.html>
8. SMÝKAL PETR. Hrách v genomickém věku — 140 let od Mendelova objevu. 2006, strana 145-152.
9. MARTIN FELLNER. Modelová rostlina Arabidopsis thaliana. In: *přednáška* [online]. Laboratoř růstových regulátorů PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR. nor 2015. [cit. 16. 11. 2021] Dostupné z: <http://aix-slx.upol.cz/~fellner/doc/MBR1-2015-Fellner.pdf>
10. PAVEL LÍZAL. Arabidopsis thaliana – huseníček rolní. In: *seminář* [online]. Masarykova univerzita, Oddělení genetiky a molekulární biologie. srpen 2011. [cit. 16.11. 2021] Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js12/genetika/web/pdf/arabidopsis_thaliana.pdf
11. BioRender Templates. *BioRender* [online]. [cit. 28. 2. 2022]. Dostupné z: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5c8c7b9ed4f2ef3300632940>
12. BLANKA GOLOLOBOVÁ. *Epigenetika – chytrý průvodce pro každý den*. 1. Praha: nakladatelství Blue step spol. s.r.o., 2019. ISBN 978-80-905767-3-5.
13. JARMAR, Jiří Kryštof. Vše, co jste kdy chtěli vědět o epigenetice. *Code of life* [online]. 2020. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: <https://codeoflife.cz/telo/dlouhovekost/vse-co-jste-kdy-chteli-vedet-o-epigenetice/>
14. ŠÁRKA MOTYLOVÁ a VOJTĚCH ČERMÁK. Džungle epigenetických modifikací u rostlin [online]. 2015, Epigenetika. ISSN 1214-4029. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné

z: <https://vesmir.cz/cz/on-line-clanky/2015/02/dzungle-epigenetickych-modifikaci-rostlin.html>

15. KOČÁREK, Eduard. *Genetika – Edice Biologie pro gymnázia*. 2. Praha: Nakladatelství Scientia, 2008. 1. ISBN 978-80-86960-36-4.
16. ŠMARDA, Jan. *GENETIKA pro gymnázia*. první. Praha: Fortuna, 2003. 1. ISBN 80-7168-851-7.
17. SIGRIST, Christian J A, Lorenzo CERUTTI, Edouard DE CASTRO, Petra S LANGENDIJK-GENEVAUX, Virginie BULLIARD, Amos BAIROCH a Nicolas HULO. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* [online]. 2010, **38**(Database issue), D161-6. ISSN 0305-1048. [cit. 18. 1. 2022] Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gkp885](https://doi.org/10.1093/nar/gkp885)
18. RADEK JANKELE a PETR SVOBODA. Malé RNA: Mocní trpaslíci [online]. 2015, Epigenetika. ISSN 1214-4029. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/on-line-clanky/2015/02/male-rna-mocni-trpaslici.html>
19. VAUCHERET, Hervé. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* [online]. 2008, **13**(7), 350–358. ISSN 1360-1385. [cit. 4. 12. 2021] Dostupné z: [doi:10.1016/j.tplants.2008.04.007](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007)
20. STEPHEN M. DORIS, JAMES CHUANG, OLGA VIKTOROVSKAYA, MAGDALENA MURAWSKA, DAN SPATT, L. STIRLING HURCHMAN, a FRED WINSTON. Spt6 Is Required for the Fidelity of Promoter Selection [online]. 2018, (4), 687–699. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: [doi:10.1016/j.molcel.2018.09.005](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.005)
21. GU, Xiao-Lu, Hua WANG, Hai HUANG a Xiao-Feng CUI. SPT6L Encoding a Putative WG/GW-Repeat Protein Regulates Apical–Basal Polarity of Embryo in Arabidopsis. *Molecular Plant* [online]. 2012, **5**(1), 249–259. ISSN 1674-2052. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: [doi:10.1093/mp/ssr073](https://doi.org/10.1093/mp/ssr073)
22. CHEN, Chen, Jie SHU, Chenlong LI, Raj K THAPA, Vi NGUYEN, Kangfu YU, Ze-Chun YUAN, Susanne E KOHALMI, Jun LIU, Frédéric MARSOLAIS, Shangzhi HUANG a Yuhai CUI. RNA polymerase II-independent recruitment of SPT6L at transcription start sites in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, **47**(13), 6714–6725. ISSN 0305-1048. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gkz465](https://doi.org/10.1093/nar/gkz465)
23. CORBESIER, Laurent a George COUPLAND. The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2006, **57**(13), 3395–3403. ISSN 0022-0957. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: [doi:10.1093/jxb/erl095](https://doi.org/10.1093/jxb/erl095)
24. Question: In Reference To The Figure Above. Plants Contain Many Genetic Pathways That Overlap, Influence Each Other, And Have. *Chegg* [online]. 2003. [cit. 10. 12. 2021] Dostupné z: <https://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/reference-figure--plants-contain-many-genetic-pathways-overlap-influence-synonymous-develop-q22425707>
25. ALEXANDRE, Cristina Madeira a Lars HENNIG. FLC or not FLC: the other side of vernalization. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2008, **59**(6), 1127–1135. ISSN 0022-0957. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: [doi:10.1093/jxb/ern070](https://doi.org/10.1093/jxb/ern070)

26. SCIENCE GAFÉ. *Prof. Martin Jínek: Genetické nůžky CRISPR* [online]. Zoom. duben 2021. česky ze světa. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=RKAUMocYfaY>
27. BRDLIČKA. CRISPR technologie. *BIOGEN – molekulární biologie a genetika* [online]. 2022. [cit. 2. 1. 2022] Dostupné z: <https://biogen.cz/crispr-technologie>
28. PĀCURAR, Daniel I., Hans THORDAL-CHRISTENSEN, Monica L. PĀCURAR, Doru PAMFIL, Constantin BOTEZ a Catherine BELLINI. Agrobacterium tumefaciens: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online]. 2011, **76**(2), 76–81. ISSN 0885-5765. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: doi: 10.1016/j.pmpp.2011.06.004
29. OTTEN LÉON. Evolution of Agrobacteria and Their Ti Plasmids - a review [online]. 1992, **5**(4), 279–287. ISSN 0894-0282. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: doi:10.1094/mpmi-5-279
30. JAN VELÍNEK a VLADIMÍR ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia*. 11. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2014. ISBN 978-80-7182-338-4.
31. VAN HAAREN, M. J. J., J. T. PRONK, R. A. SCHILPEROORT a P. J. J. HOOY-KAAS. Functional analysis of the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti-plasmid left and right T-region border fragments. *Plant Molecular Biology* [online]. 1987, **8**(1), 95–104. ISSN 1573-5028. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: doi:10.1007/BF00016438
32. KAROLÍNA KUBIASOVÁ. *Lokalizace cytokininových receptorů Arabidopsis thaliana pomocí fluorescenčního značení* [online]. Olomouc, 2014. diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. [cit. 27. 11. 2021] Dostupné z: <https://theses.cz/id/zmq8/11624488>
33. KAROLÍNA KUBIASOVÁ. *Příprava a charakterizace fluorescenčně značených cytokininových derivátů* [online]. Olomouc, 2012. Bakalářská práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: https://theses.cz/id/au3net/BP_Karolina_Kubiasova_zkracena_verze.pdf
34. LUCIE LYSKOVÁ. *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice* [online]. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně – Lékařská fakulta. [cit. 20. 11. 2021] Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/o7w3e/Bakalarka.pdf>
35. PRŮŠA, Richard, Jan VEJVALKA, Jan LÁNY, Václav KARGER a Karel KOTAŠKA. amplifikační metody. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online]. 1998. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: <https://kolweb.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-DNA/newlook/defa6.htm>
36. MINIPCR BIO. *How does PCR work? The polymerase chain reaction explained* [online]. You Tube video. prosinec 2015. [cit. 20. 11. 2021] Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=3XPAP6dgl14>
37. BÁRTOVÁ, Eva a Ivan LITERÁK. Gelová elektroforéza. *molekulární biologie* [online]. 2011. [cit. 17. 1. 2022] Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
38. NONAKA, Satoko a Hiroshi EZURA. Plant-Agrobacterium interaction mediated by ethylene and super-Agrobacterium conferring efficient gene transfer. *Frontiers in plant science* [online]. 2014, **5**, 681–681. ISSN 1664-462X. [cit. 17. 11. 2021] Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2014.00681

39. MARTIN MOZOLÍK. *Příprava a validace buněčných systémů pro testování účinků protinádorových léčiv* [online]. Olomouc, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. [cit. 1. 1. 2022] Dostupné z: https://theses.cz/id/uulbeq/Bakalsk_prce.pdf
40. JITKA BLAŽIČKOVÁ. *OPTIMALIZACE SYSTÉMU PRO STUDIUM PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ* [online]. Brno, 2010. diplomová práce. b.n. [cit. 21. 11. 2021] Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/zgtro/diplomka2.doc>
41. EDTA Buffer Powder. *Takara* [online]. 2021. [cit. 1. 1. 2022] Dostupné z: <https://www.takarabio.com/products/protein-research/sds-page-and-western-blotting/buffers-and-powders/edta-powder>
42. What is the role/function of SDS in SDS-PAGE? *AAT Bioguest* [online]. [cit. 1. 1. 2022] Dostupné z: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-the-role-function-of-SDS-in-SDS-PAGE>
43. Izolace genomové DNA pomocí fenol-chloroformu. *LabGuide – průvodce laboratoří* [online]. 2014. [cit. 20. 11. 2021] Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-genomove-dna-pomoci-fenol-chloroformu/>
44. ALEX, Tan. What Is the Function of a Tris Buffer in DNA Extraction? *SCIENCING* [online]. 2018. [cit. 1. 1. 2022] Dostupné z: <https://sciencing.com/characteristics-good-buffers-6246173.html>
45. ELIŠKA RŮŽIČKOVÁ. *Real-time PCR a jeho využití pro subtypizaci difúzního velkobuněčného lymfomu* [online]. Olomouc, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. [cit. 20. 11. 2021] Dostupné z: https://theses.cz/id/go0fw3/Bakalarska_praceE-liska_Ruzickova.pdf
46. What is Taq Polymerase? Definition & Functions. *EXCEDR* [online]. 2021. [cit. 1. 1. 2022] Dostupné z: <https://www.excedr.com/blog/taq-polymerase/>
47. JARMILA PAZLAROVÁ. Úvodní přednáška k PCR. In: [online]. přednáška. Praha. květen 2010. [cit. 20. 11. 2021] Dostupné z: <http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/pm/DNA-PCR.pdf>
48. Elektroforetická separace nukleových kyselin. *Lab Guide – průvodce laboratoří* [online]. 2014. [cit. 20. 11. 2021] Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
49. BRUCE ALBERTS, DENNIS BRAY, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS a PETER WALTER. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. 1. B.m.: Espero, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
50. *Fosfatáza* [online]. 2021. [cit. 21. 11. 2021] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fosfat%C3%A1za>
51. Nukleázy. *LabGuide – průvodce laboratoří* [online]. 2014. [cit. 21. 11. 2021] Dostupné z: <https://labguide.cz/reagencie/enzymy/nukleazy/>
52. JIŘÍ ANDĚL. *Matematická statistika*. 1. Bratislava: SNITL/ALFA, vydavatelstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1978.
53. CHENG, Yuxin, Na ZHANG, Saddam HUSSAIN, Sajjad AHMED, Wenting YANG a Shucai WANG. Integration of a FT expression cassette into CRISPR/Cas9 construct enables fast generation and easy identification of transgene-free mutants in Arabidopsis. *PLOS ONE*

[online]. 2019, **14**(9), e0218583. [cit. 9. 3. 2022] Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0218583

54. BOUCHÉ, Frederic, Guillaume LOBET, Pierre TOCQUIN a Claire PÉRILLEUX. FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Oxford University Press*. 2016, **Database issue**(44), D1167–D1171. ISSN 0305-1048.

55. FENG, Wei a Scott D. MICHAELS. Dual roles for FY in the regulation of FLC. *Plant Signaling & Behavior* [online]. 2011, **6**(5), 703–705. ISSN null. [cit. 11. 1. 2022] Dostupné z: doi:10.4161/psb.6.5.15052

56. FIALA, Jiří. Occamova břitva [online]. 1998, **77**(464), Occamova břitva. ISSN 1214-4029. [cit. 22. 1. 2022] Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1998/cislo-8/occamova-britva.html>

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 vzorový nákres <i>Arabidopsis thaliana</i> , upraveno (11)	9
Obrázek 2 AGO vazebná doména v genu SPT6L, šedivé domény nejsou předmětem mého zájmu (není-li uvedeno jinak, obrázek autorka)	11
Obrázek 3 Model čtyř drah kontrolujících dobu kvetení u <i>A. thaliana</i> , upraveno (24)	12
Obrázek 4 Schéma guide RNA nasedající na dsDNA (26)	14
Obrázek 5 Zjednodušené schéma obecné PCR (35).....	16
Obrázek 6 Gelová elektroforéza (37).....	17
Obrázek 7 Použitý žebříček na 100 bp	26
Obrázek 8 Použitý žebříček na 1 000 bp	26
Obrázek 9 Schéma křížení <i>soc1</i> a <i>spt6l</i>	29
Obrázek 10 Schéma křížení <i>flc</i> a <i>spt6l</i>	30
Obrázek 11 Fluoreskující rostlina z generace T1	34
Obrázek 12 <i>Spt6l</i> × <i>ft</i>	35
Obrázek 13 Výsledky sekvenace mutantu v <i>spt6l</i> , celkový náhled	36
Obrázek 14 Výsledky sekvenace mutantu v <i>spt6l</i> , přiblížení na levou guide RNA a na místo řezu („c“ = cut). Vidíme začínající delaci	36
Obrázek 15 Výsledek sekvenace mutantu v <i>spt6l</i> , přiblížení na pravou guide RNA a na místo řezu („c“ = cut). Vidíme končící delaci	36
Obrázek 16 Počet dní od vysetí, než rostlina získala 1. poupě – průměr	37
Obrázek 17 Den, kdy lodyha dosáhla 1 cm – průměr.....	38
Obrázek 18 Počet listů v růžici – průměr	38
Obrázek 19 Regulační dráha SPT6L a FT	41
Obrázek 20 Regulační dráha SPT6L a FLC.	41
Obrázek 21 Funkce genu <i>SPT6L</i> ve dvojitě mutantovi s <i>flc</i>	42
Obrázek 22 Funkce genu <i>SPT6L</i> ve dvojitě mutantovi s <i>ft</i>	42
Obrázek 23 Regulační dráha genu <i>SPT6L</i> v divokém typu	43
Obrázek 24 Regulační dráha genu <i>SPT6L</i> v divokém typu.....	44
Obrázek 25 <i>Spt6l</i> × <i>soc1</i> – genotypování <i>SPT6L</i> alel.....	52
Obrázek 26 <i>Spt6l</i> × <i>soc1</i> – genotypování <i>SOC1</i> alel.....	53
Obrázek 27 <i>Spt6l</i> × <i>soc1</i> – genotypování <i>SPT6L</i> alel.....	53
Obrázek 28 <i>Spt6l</i> × <i>soc1</i> – genotypování <i>SOC1</i> alel.....	54
Obrázek 29 <i>Spt6l</i> × <i>flc</i> – genotypování <i>SPT6L</i> alel.....	55
Obrázek 30 <i>Spt6l</i> × <i>flc</i> – genotypování <i>FLC</i> alel.....	56
Obrázek 31 <i>Spt6l</i> × <i>flc</i> – genotypování <i>FLC</i> alel	56
Obrázek 32 <i>Spt6l</i> × <i>flc</i> – detekování <i>SPT6L</i> alel	57
Obrázek 33 <i>Spt6l</i> × <i>flc</i> – genotypování <i>FLC</i> alel	58
Obrázek 34 <i>A. tumefaciens</i> – genotypování na Cas9.....	59
Obrázek 35 <i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i> – genotypování <i>SPT6L</i> i <i>FT</i> alel; první várka vzorků.....	59

Obrázek 36 <i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i> – genotypování <i>SPT6L</i> i <i>FT</i> alel; druhá várka vzorků.....	61
Obrázek 37 <i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i> – genotypování <i>SPT6L</i> alel	62
Obrázek 38 <i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i> – genotypování <i>FT</i> alel.....	63
Obrázek 39 <i>SPT6L</i> CRISPR mutageneze v <i>ft</i> – genotypování <i>FT</i> alel.....	64
Obrázek 40 FT-10_LP a FT-10_RP detekující <i>FT</i> divokou alelu	65
Obrázek 41 FT-10_RP a LB-SAIL_C/418 detekující <i>ft</i> mutantní alelu	65
Obrázek 42 SOC1-6_LP a SOC1_6RP detekující <i>SOC1</i> divokou alelu	65
Obrázek 43 SOC1-6_RP a pROK2_R_022062 detekující <i>soc1</i> mutantní alelu	65
Obrázek 44 FLC-7_LP a FLC-7_RP detekující <i>FLC</i> divokou alelu	66
Obrázek 45 FLC-7_RP a pROK2_R_022062 detekující <i>flc</i> mutantní alelu.....	66
Obrázek 46 <i>SPT6L</i> S6 a <i>STP6L</i> R2c detekující <i>SPT6L</i> divokou alelu	66
Obrázek 47 <i>SPT6L</i> S6 a <i>STP6L</i> R2c detekující <i>spt6l</i> mutantní alelu.	66
Obrázek 48 Primer 35S_Inter 3F použitý na detekci plazmidu pHSE, který byl použit na transformaci <i>A. tumefaciens</i> , délka mezi tímto a mezi primerem HPTgen_F(R) je 580 bp	67
Obrázek 49 Primer HPTgen_F(R) použitý na detekci plazmidu pHSE, který byl použit na transformaci <i>A. tumefaciens</i> , délka mezi tímto primerem a mezi 35S_Inter 3F je 580 bp.....	67
Obrázek 50 Pozice primerů <i>SPT6L</i> S6 a <i>STP6L</i> R2 detekující <i>SPT6L</i> divokou alelu a primery <i>SPT6L</i> S5 a <i>SPT6L</i> TR detekující téže alelu, ale pokrývají větší rozptyl.....	68
Tabulka 1 YEB-recovery médium	71
Tabulka 2 LB médium	71
Tabulka 3 YEB médium	71

9 PŘÍLOHY 1: OBRÁZKY A KOMENTÁŘE ELEKTROFORÉZ

V této kapitole se nachází obrázky všech elektroforéz, které sloužily jako výstupní materiál k výsledkům. Délka produktů byla vyhodnocována dle žebříčku, který se nachází v metodice, v kapitole „Elektroforéza v agarózovém gelu“ na str. 24. Pozice T-DNA není přesně určena, takže odchylky od žebříčku se dají očekávat.

Legenda k elektroforézám:

P = pozitivní kontrola

N = negativní kontrola

Ž = DNA žebříček

PM= pozitivní kontrola mutantní alely

NM = negativní kontrola mutantní alely

PW = pozitivní kontrola divoké alely

NW = negativní kontrola divoké alely

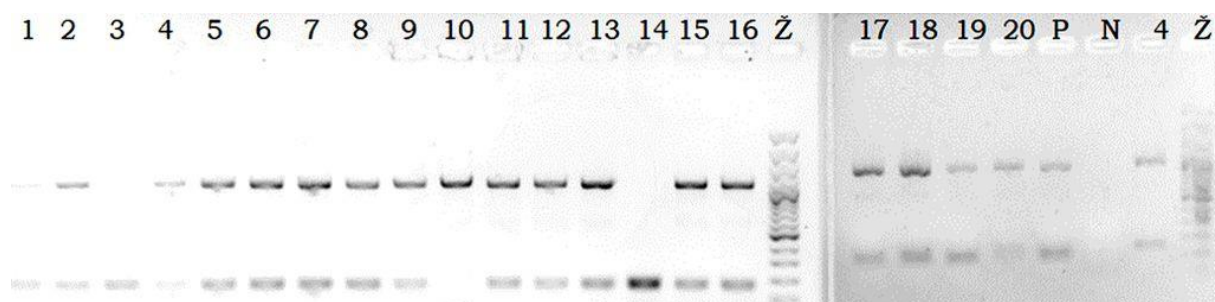
Ž = DNA žebříček

M = značí detekování mutantní alely

W = značí detekování divoké alely

9.1.1 Křížení *spt6l* × *soc1*

9.1.1.1 F2 generace



Obrázek 25 *Spt6l* × *soc1* – genotypování *SPT6L* alel

Rostliny, jejichž prarodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *soc1* a *spt6l*) byli kříženi a jejichž rodiče (F1) vyšli jako heterozygoti v *SPT6L*.

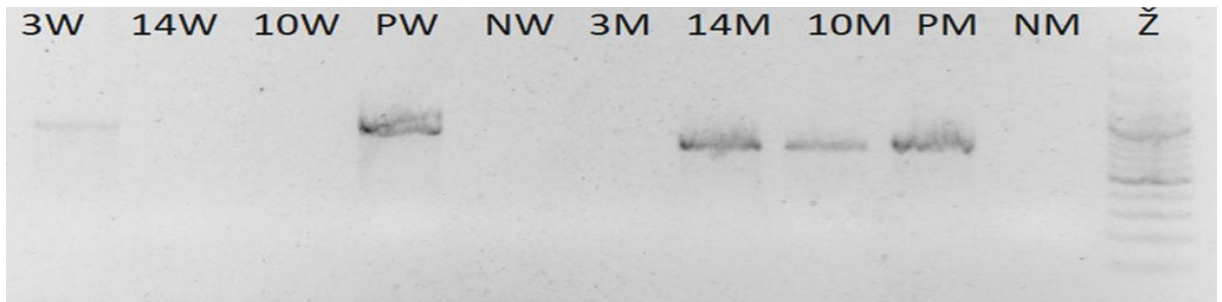
Všechny vzorky na obou gelech se účastnily reakce detekující *SPT6L* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorek 10 je homozygot s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 100 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

Vzorky 3 a 14 jsou homozygoti s mutantní alelou pro *spt6l*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 200 bp, což odpovídá délce mezi primery (170 bp), které jsem použila.

Ostatní vzorky jsou heterozygoti.

9.1.1.2 F2 generace



Obrázek 26 *Spt6l* × *soc1* – genotypování *SOC1* alel

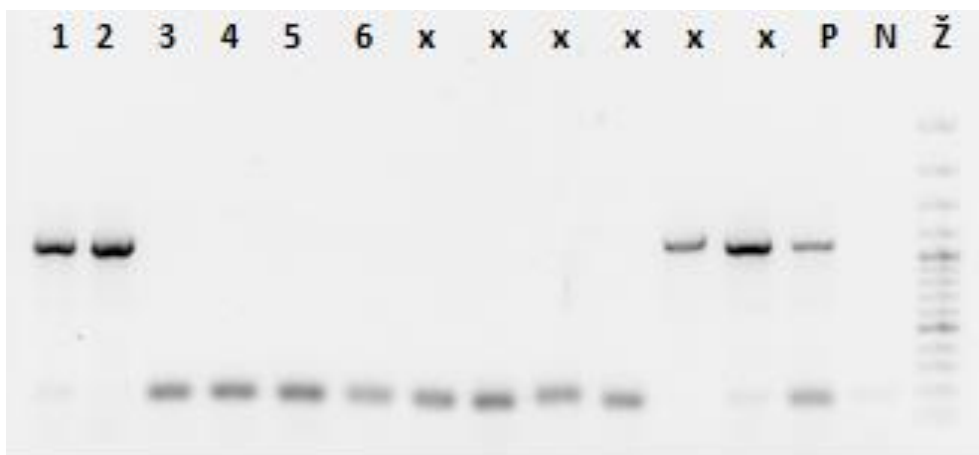
Rostliny, jejichž prarodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *soc1* a *spt6l*) byli kříženi a v minulém genotypování vyšly jako homozygoti s mutací v *spt6l* (vzorky 3 a 14) nebo jako homozygoti s divokou alelou (vzorek 10).

Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *SOC1* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorek 3 je homozygot s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (860 bp), které jsem použila.

Vzorek 14 a 10 je homozygot s mutantní alelou pro *soc1*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 700 bp, což přibližně odpovídá délce mezi primery (590 bp), které jsem použila.

9.1.1.3 F3 generace



Obrázek 27 *Spt6l* × *soc1* – genotypování *SPT6L* alel

Vzorky rostlin 1 až 6, jejichž praparodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *soc1* a *spt6l*) byli kříženi. Vzorky 1 a 2 jsou potomci od rostliny 10. Vzorky 3 a 4 jsou potomci od rostliny 14. Vzorky 5 a 6 jsou potomci od rostliny 3.

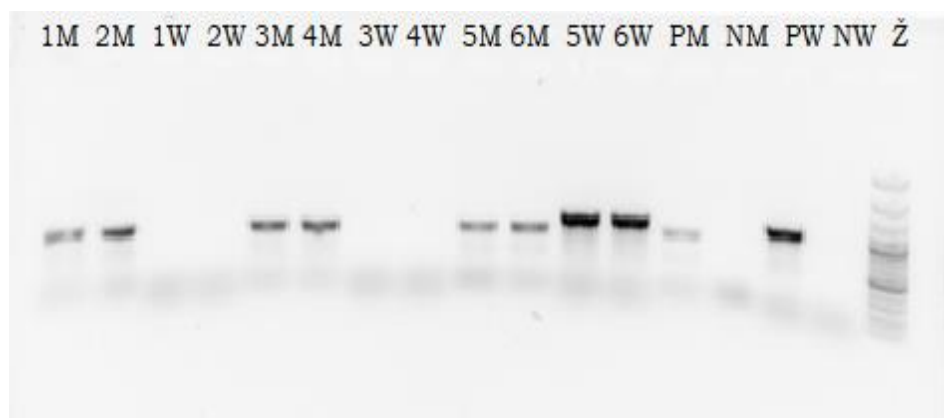
Tato elektroforéza se vyskytuje i v kapitole elektroforézy *flc* × *spt6l*, kde jsou očíslovány vzorky zde značené jako X, protože mají jiné rodiče.

Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *SPT6L* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorky 1 a 2 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 100 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

Vzorky 3, 4, 5 a 6 jsou homozygoti s mutantní alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 200 bp, což odpovídá délce mezi primery (170 bp), které jsem použila.

9.1.1.4 F3 generace



Obrázek 28 *Spt6l* × *soc1* – genotypování *SOC1* alel

Rostliny, jejichž praparodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *soc1* a *spt6l*) byly kříženy a jejich rodiče (F2) vyšly jako homozygoti s mutací v *spt6l* (rodič 10 nebo 14) anebo jako homozygoti s divokou alelou (rodič 3).

Vždy dvě rostliny za sebou jsou rostliny sesterské. To znamená: rostlina 1 a 2 jsou sesterské; 3 a 4 jsou sesterské a tak dále. Vždy jsou sestry genotypovány na mutantní a poté na divokou alelu a pak začíná další dvojice rostlin. Číslování je tedy stejné jako u *SPT6L* gelu.

Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *SOC1* alelu. Na vzorky s příponou M jsem použila takové primery, aby detekovaly mutantní alelu. Na vzorky s příponou W jsem použila takové primery, aby detekovaly divokou alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

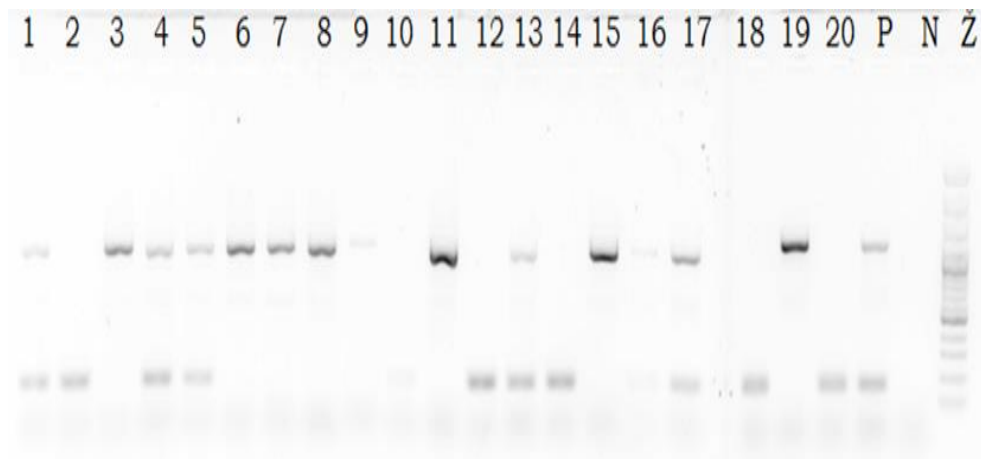
Vzorek 1M, 2M, 3M a 4M, jsou homozygoti s mutantní alelou pro *soc1*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 585 bp, což odpovídá délce mezi primery (590 bp), které jsem použila.

Vzorek 1W, 2W, 3W a 4W neměl světelný signál, což potvrzuje, že tyto rostliny (1, 2, 3, 4) jsou homozygotním mutantem, protože byla detekována jen mutantní alela.

Vzorek 5M a 6M sice vyšly jako mutanti, ale ne jako homozygotní, protože vzorky 5W a 6W vyšly jako divoké typy. Délka produktu je asi 800 bp, což odpovídá délce primerů (860 bp), které jsem použila. Z toho vyvozují závěr, že rostliny 5 a 6 jsou heterozygoti.

9.1.2 Křížení *spt6l* × *flc*

9.1.2.1 F2 generace



Obrázek 29 *Spt6l* × *flc* – genotypování *SPT6L* alel

Rostliny, jejichž prarodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *flc* a *spt6l*) byli kříženi a jejich rodiče (F1) byli heterozygoti.

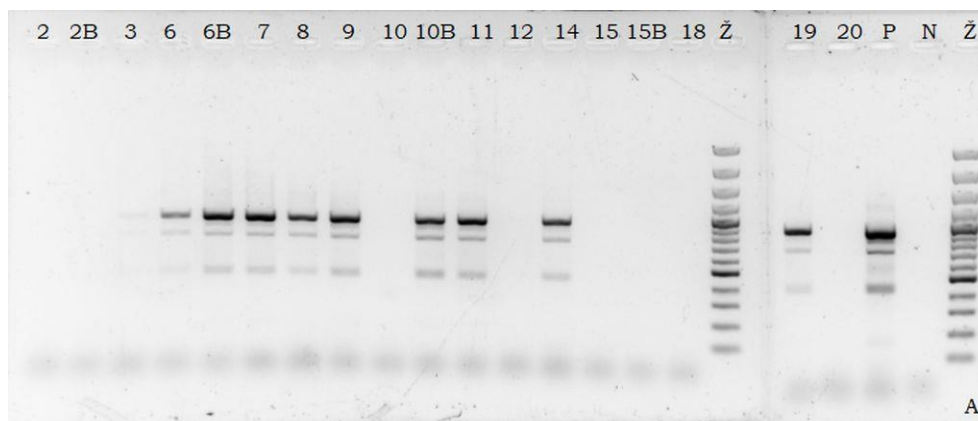
Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *SPT6L* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorky 3, 6, 7, 8, 9, 11, 15 a 19 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 100 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

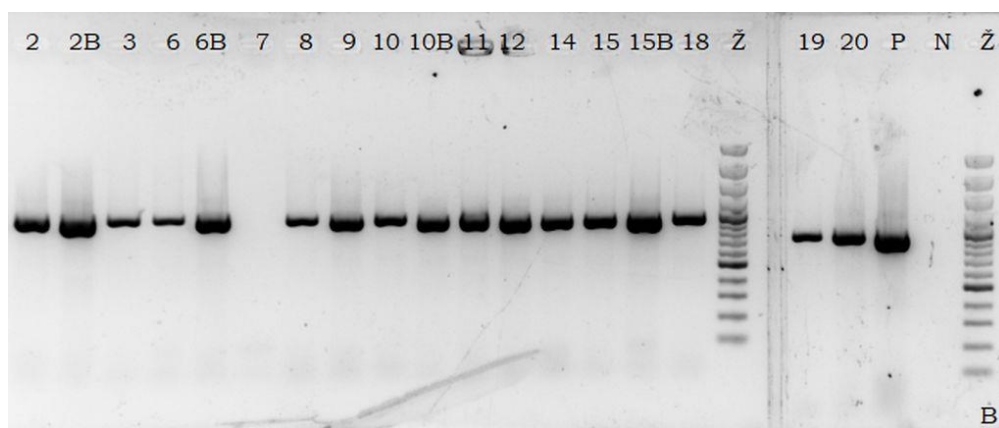
Vzorky 2, 10, 12, 14, 18 a 20 jsou homozygoti s mutantní alelou pro *spt6l*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 200 bp, což odpovídá délce mezi primery (170 bp), které jsem použila.

Vzorky 1, 4, 5, 13, 16 a 17, jsou heterozygoti.

9.1.2.2 F2 generace



Obrázek 30 *Spt6l* × *flc* – genotypování *FLC* alel



Obrázek 31 *Spt6l* × *flc* – genotypování *FLC* alel

Jedná se o vzorky rostlin, jejichž prarodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *flc* a *spt6l*) byli kříženi a jejich rodiče (F1) byli heterozygoti. Tyto rostliny vyšly v předchozím genotypování buď jako divoké typy nebo mutanti v *spt6l*.

Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *FLC* alelu.

Gel A – vzorky, na které byly použity takové primery, aby detekovaly mutantní alelu.

Gel B – vzorky, na které byly použity takové primery, aby detekovaly divokou alelu.

Vzorky s příponou „B“ = jedná se o vzorky, které mají podruhé izolovanou DNA, z důvodů nepřesností v minulých genotypováních, které zde nejsou zahrnuty, jelikož nemají vliv na následující kroky.

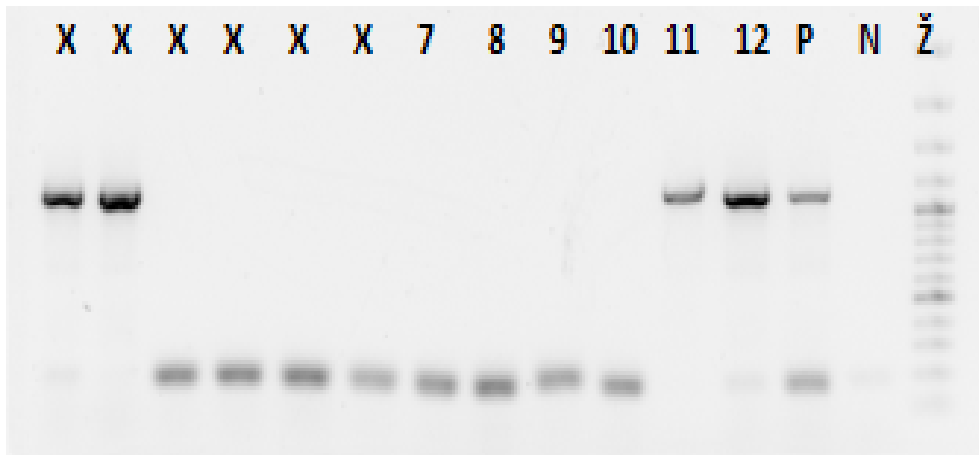
Vzorek 7 je homozygot s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (880 bp), které jsem použila.

Vzorky 2, 2B, 3, 12, 15, 15B, 18 a 20 jsou homozygotní mutanti v *flc*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (890 bp), které jsem použila.

Vzorky 6, 6B, 8, 9, 11, 14 a 19 jsou heterozygoti.

Vzorky 10 a 10B nebudu uvažovat, jelikož došlo k chybám při izolaci DNA a vzorek tak není relevantní.

9.1.2.3 F3 generace



Obrázek 32 *Spt6l* × *flc* – detekování *SPT6L* alel

7-12 = vzorky rostlin, jejichž praparodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *flc* a *spt6l*) byli kříženi. Vzorky 7 a 8 jsou potomci rostliny 2, vzorky 9 a 10 jsou potomci rostliny 18, vzorky 11 a 12 jsou potomci rostliny 15 (rodiče jsou z generace F2).

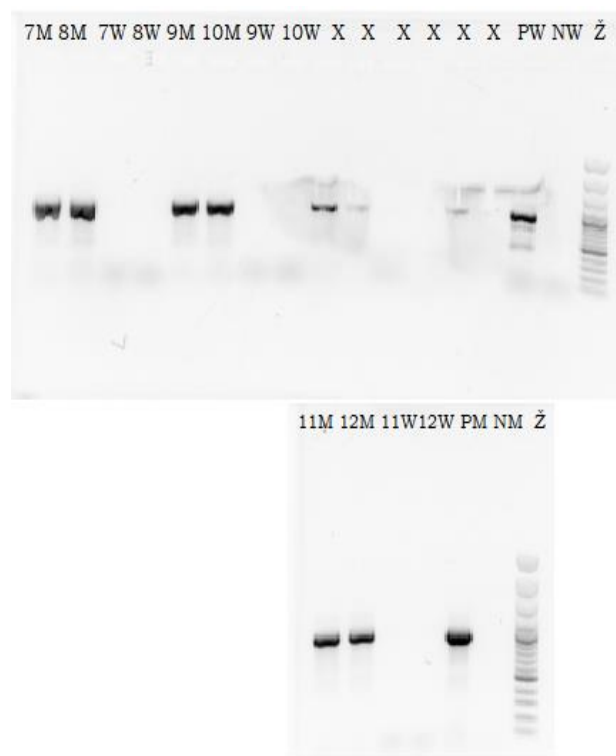
Tato elektroforéza se vyskytuje i v kapitole elektroforézy *soc1* × *spt6l*, kde jsou očíslovány vzorky zde značené jako X, protože mají jiné rodiče.

Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *SPT6L* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorky 11 a 12 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 100 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

Vzorky 7, 8, 9 a 10 jsou homozygoti s mutantní alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 200 bp, což odpovídá délce mezi primery (170 bp), které jsem použila.

9.1.2.4 F3 generace



Obrázek 33 *Spt6l* × *flc* – genotypování *FLC* alel

Rostliny, jejichž praparodiče (F0 – rostliny homozygotní v mutantní alele pro *flc* a *spt6l*) byli kříženi. Vzorky 7 a 8 jsou potomci rostliny 2, vzorky 9 a 10 jsou potomci rostliny 18, vzorky 11 a 12 jsou potomci rostliny 15 (rodiče jsou z generace F2).

„X“ = vzorky jsou zopakovány na menším, spodním, gelu, protože na velkém gelu z důvodu porušených jamek protekly.

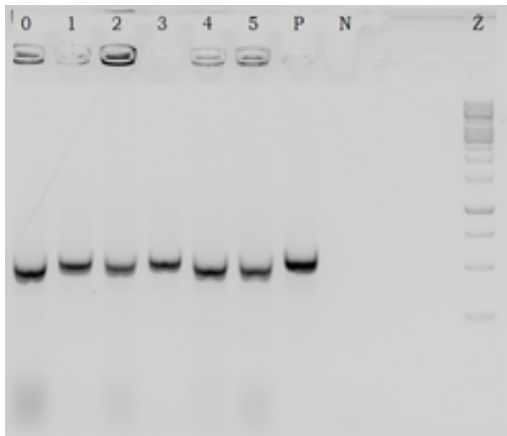
Vždy dvě rostliny za sebou jsou rostliny sesterské. To znamená: rostlina 7 a 8 jsou sesterské; 9 a 10 jsou sesterské a tak dále. Vždy jsou sestry genotypovány na mutantní a poté na divokou alelu a pak začíná další dvojice rostlin.

Všechny vzorky se účastnily reakce detekující *FLC* alelu. Díky délce produktů na obou gelech lze provést takovýto závěr:

Vzorky 7M, 8M, 9M, 10M, 11M a 12M jsou homozygoti s mutantní alelou pro *flc*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 900 bp, což odpovídá délce mezi primery (890 bp), které jsem použila.

Vzorky 7W, 8W, 9W, 10W, 11W a 12W nevyšly, což potvrzuje že tyto rostliny (7, 8, 9, 10, 11 a 12) jsou homozygotním mutantem, protože byla detekována jen mutantní alela.

9.1.3 *A. tumefaciens*



Obrázek 34 *A. tumefaciens* – genotypování na Cas9

Vzorek 0 značí vektor pHSE, jedná se také o kolonii bakterií – kontrolní plazmid, který jsem dostala jako už hotové bakterie.

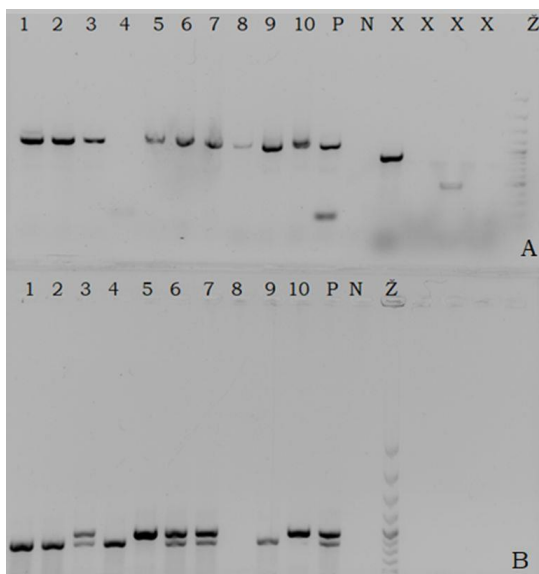
Vzorky 1 až 5 jsou kolonie bakterií z transformace.

Byl výjimečně použit žebříček 1kbp.

Délka produktů je přibližně 520 bp, což odpovídá délce mezi primery (580 bp), které jsem použila. To znamená, že všechny kolonie obsahují Cas-9. V koloniích 1-5 se vyskytuje plazmid pHEE.

9.1.4 *SPT6L* CRISPR mutagenese v *ft*

9.1.4.1 T1 generace



Obrázek 35 *SPT6L* CRISPR mutagenese v *ft* – genotypování *SPT6L* i *FT* alel; první várka vzorků

Gel A – vzorky účastníci se reakce detekující *SPT6L* alelu.

1-8 = rostliny transformované plazmidem pHEE

9-10 = rostliny transformované plazmidem pHSE

X = vzorky mého kolegy z laboratoře, k mé práci se nevztahují.

Gel B – Vzorky účastníci se reakce detekující *FT* alelu.

1-8 = rostliny transformované plazmidem pHEE

9-10 = rostliny transformované plazmidem pHSE

Na gelu A lze provést dle délky produktů takovýto závěr:

Vzorky 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

Vzorek 4 je homozygot s mutantní alelou pro *spt6l*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 100 bp, což odpovídá délce mezi primery (170 bp), které jsem použila.

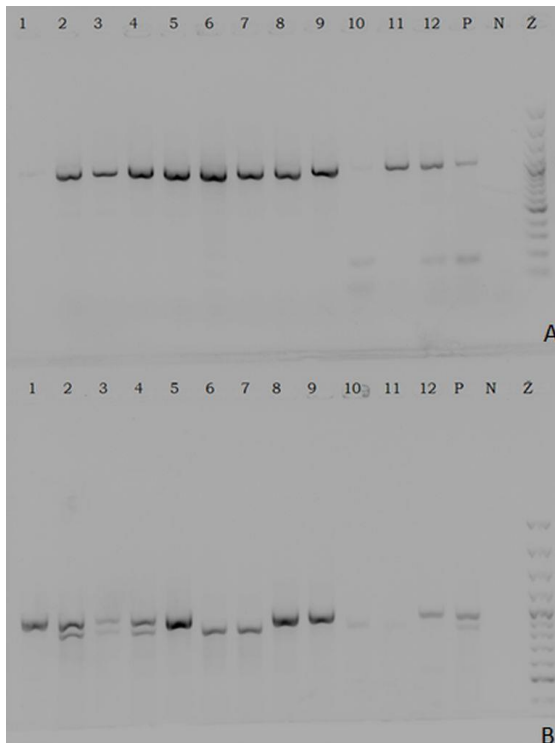
Na gelu B lze provést dle délky produktů takovýto závěr:

Vzorky 1,2,4 a 9 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 900 bp, což odpovídá délce mezi primery (890 bp), které jsem použila.

Vzorky 5 a 10 jsou homozygoti s mutantní alelou pro *ft*. Vzorek 8 nejspíš také. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (980 bp), které jsem použila.

Vzorky 3, 6 a 7 jsou heterozygoti.

9.1.4.2 T1 generace



Obrázek 36 *SPT6L* CRISPR mutagenese v *ft* – genotypování *SPT6L* i *FT* alel; druhá várka vzorků

Gel A – Vzorky účastníci se reakce detekující *SPT6L* alelu.

1-8 = rostliny transformované plazmidem pHEE

9-12 = rostliny transformované plazmidem pHSE

Gel B – Vzorky účastníci se reakce detekující *FT* alelu.

1-8 = rostliny transformované plazmidem pHEE

9-12 = rostliny transformované plazmidem pHSE

Na gelu A lze provést dle délky produktů takovýto závěr:

Vzorky 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 11 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 100 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

Vzorky 10 a 12 jsou heterozygoti.

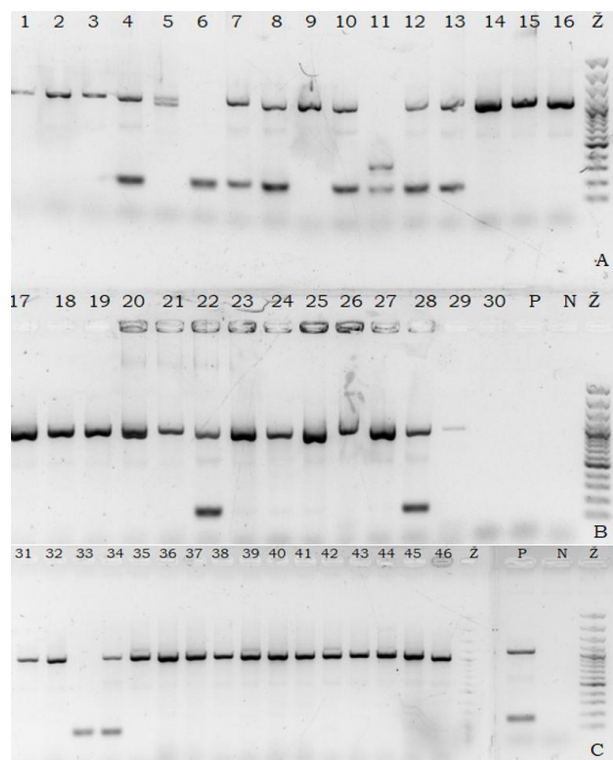
Na gelu B lze provést dle délky produktů takovýto závěr:

Vzorky 6, 7, 10 a 11 jsou homozygoti s divokou alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 800 bp, což odpovídá délce mezi primery (890 bp), které jsem použila.

Vzorky 1, 5, 8, 9 a 12 jsou homozygoti s mutantní alelou pro *ft*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 990 bp, což odpovídá délce mezi primery (980 bp), které jsem použila.

Vzorky 2, 3 a 4 jsou heterozygoti.

9.1.4.3 T2 generace



Obrázek 37 *SPT6L* CRISPR mutagenéze v *ft* – genotypování *SPT6L* alel

Rostliny, jejichž rodič byl transformován plazmidem pHEE a vyšel jako homozygot s divokou alelou v *spt6l* a heterozygot pro *FT*. Pracovala jsem s heterozygoty, protože mutant v *ft* kvete delší dobu a experiment by se protáhl.

Pozitivní kontrola z neznámého důvodu neměla na gelu B viditelný světelný signál, ale já z výsledků vím, že chyba v PCR nenastala.

Na všech gelech jsou vzorky, které se účastnily reakce detekující *SPT6L* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorky 1, 2, 3, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 a 46 jsou homozygoti bez mutace. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (1 080 bp), které jsem použila.

Vzorek 6 a 33 je homozygot s mutantní alelou pro *spt6l*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 185 bp, což odpovídá délce mezi primery (170 bp), které jsem použila.

Vzorky 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 22, 28 a 34 jsou heterozygoti.

Vzorek 30 nemá viditelný světelný signál.

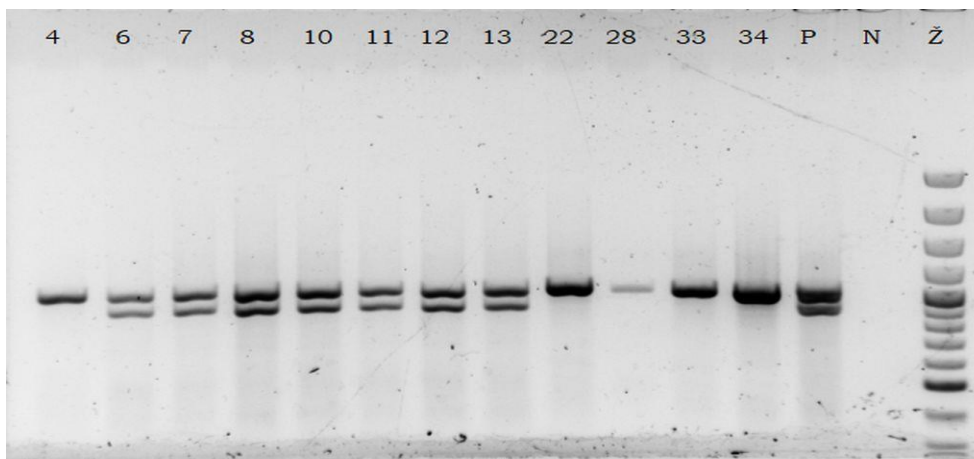
Vzorky 7-8 jsou heterozygoti.

Rostliny 1-10 a 31-39 jsou potomci od rostliny 3 z první T1 elektroforézy

Rostliny 11-24 a 40-46 jsou potomci od rostliny 6 z první T1 elektroforézy

Rostliny 25-30 jsou potomci od rostliny 7 z první T1 elektroforézy

9.1.4.4 T2 generace



Obrázek 38 *SPT6L* CRISPR mutagenéze v *ft* – genotypování *FT* alel

Rostliny, jejichž rodič byl transformován plazmidem pHEE a vyšel jako homozygot s mutovanou alelou v *spt6l* a heterozygot pro *FT*. Zároveň tyto rostliny vyšly při reakci detekující *SPT6L* alelu jako homozygotní mutanti nebo jako heterozygoti (viz předchozí elektroforéza T2 generace).

Na gelu jsou vzorky, které se účastnily reakce detekující *FT* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

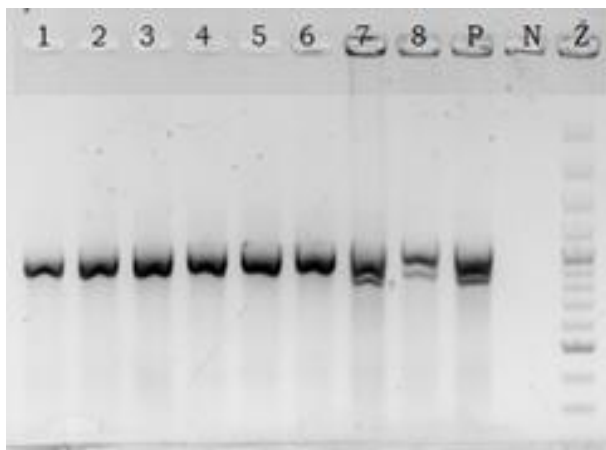
Vzorky 4, 22, 28, 33 a 34 jsou homozygoti s mutantní alelou. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 1 000 bp, což odpovídá délce mezi primery (980 bp), které jsem použila.

Vzorky 6, 7, 8, 10, 11, 12 a 13 jsou heterozygoti.

Vzorek 6 je podle genotypování generace T2 heterozygot v *FT* a mutant v *spt6l*.

Vzorek 33 je podle genotypování generace T2 mutant v *ft* a mutant v *spt6l*.

9.1.4.5 T3 generace



Obrázek 39 *SPT6L* CRISPR mutageneze v *ft* – genotypování *FT* alel

Rodič 1-4 byl homozygotní mutant pro *spt6l* a heterozygot pro *FT* (rostlina číslo 6 z genotypování *FT* alel T2 generace)

Rodič 5-8 byl heterozygot v *FT* (sesterská rostlina z T0, nebyla transformována → sloužila k získání jednoduchých mutantů)

Na gelu jsou vzorky, které se účastnily reakce detekující *FT* alelu. Dle délky produktů lze provést takovýto závěr:

Vzorky 1-6 jsou homozygotní mutanti pro *ft*. Délka produktů je podle žebříčku přibližně 985 bp, což odpovídá délce mezi primery (980 bp), které jsem použila.

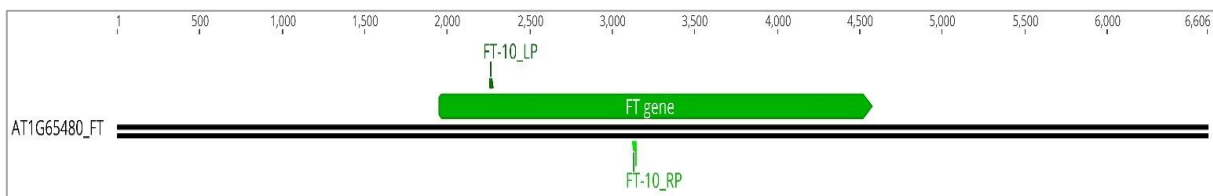
Vzorky 7-8 jsou heterozygoti.

10 PŘÍLOHA 2: POUŽITÉ PRIMERY

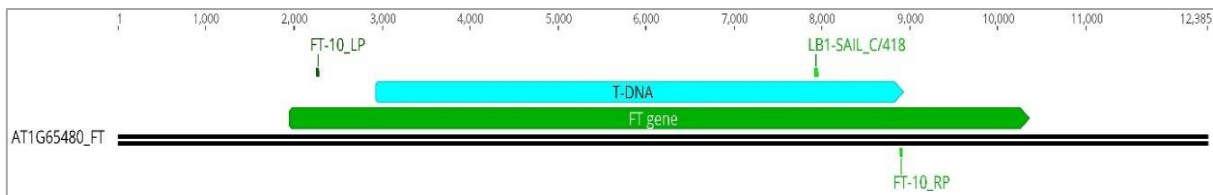
Zkratka genu	divoká alela	mutantní alela
FT	LP \rightarrow RP \doteq 890 bp	LB1 \rightarrow RP \doteq 980 bp
SOC1	LP \rightarrow RP \doteq 860 bp	RP \rightarrow ROK \doteq 590 bp
FLC	LP \rightarrow RP \doteq 880 bp	RP \rightarrow ROK \doteq 890 bp
SPT6L	S6 \rightarrow R2 \doteq 1 080 bp	S6 \rightarrow R2 \doteq 170 bp

10.1 Pozice primerů

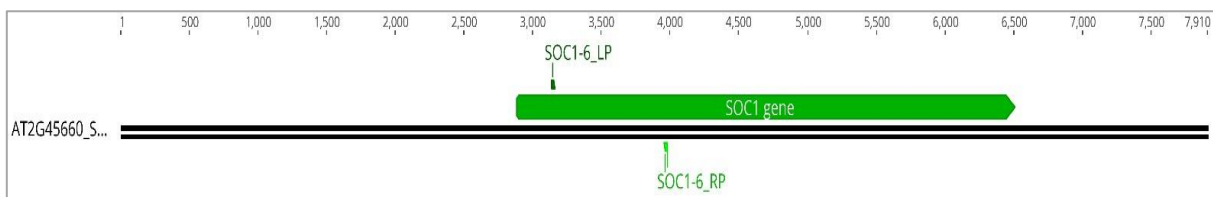
Na obrázcích jsou uvedeny vzdálenosti mezi jednotlivými primery, které jsem používala při genotypování. Obrázky byly vytvořeny v programu Geneious Prime.



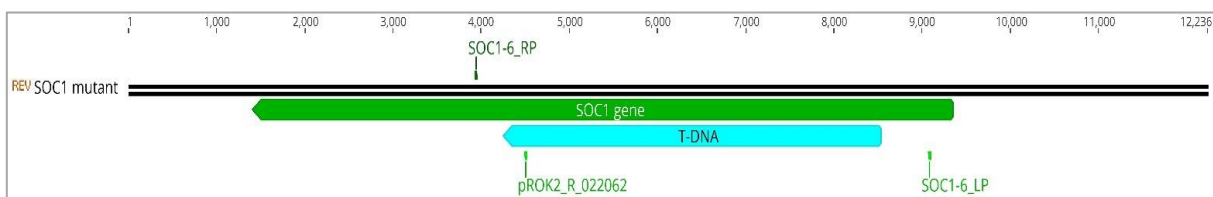
Obrázek 40 FT-10_LP a FT-10_RP detekující *FT* divokou alelu



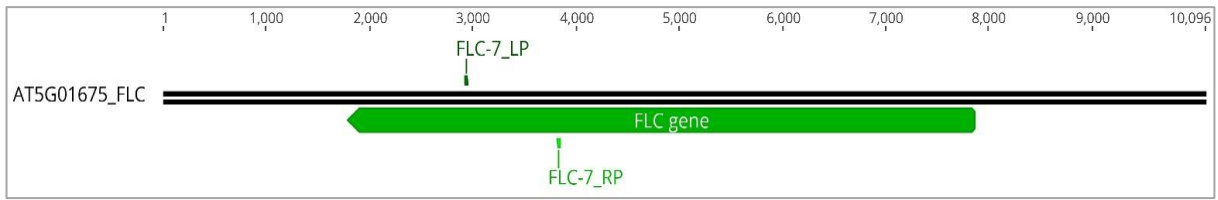
Obrázek 41 FT-10_RP a LB-SAIL_C/418 detekující *ft* mutantní alelu



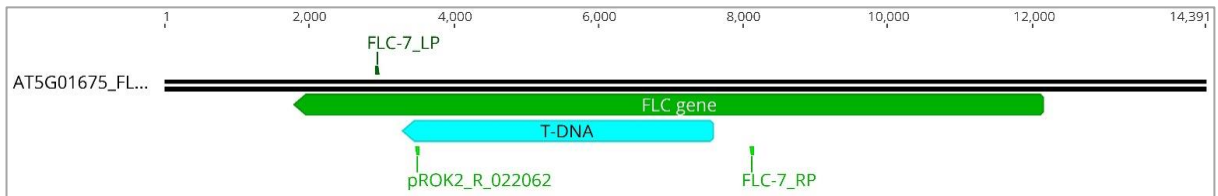
Obrázek 42 SOC1-6_LP a SOC1_6RP detekující *SOC1* divokou alelu



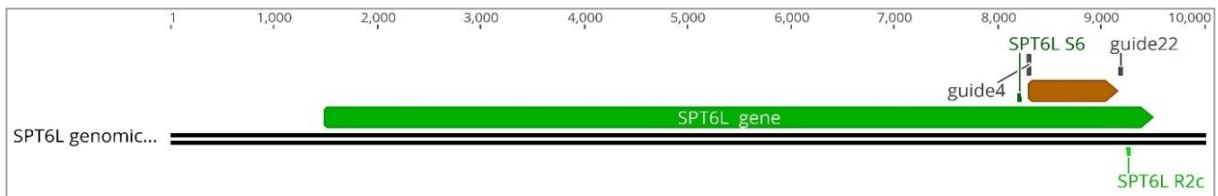
Obrázek 43 SOC1-6_RP a pROK2_R_022062 detekující *soc1* mutantní alelu



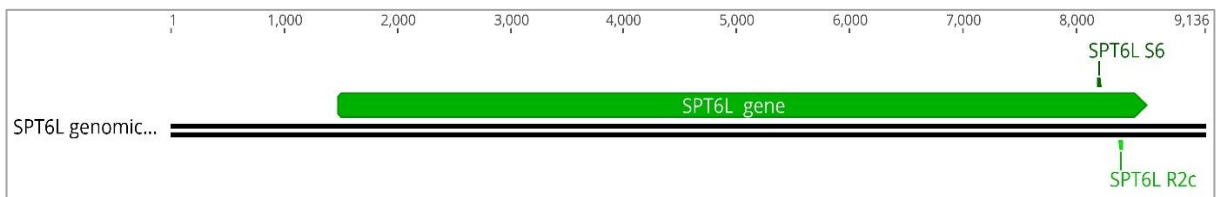
Obrázek 44 FLC-7_LP a FLC-7_RP detekující *FLC* divokou alelu



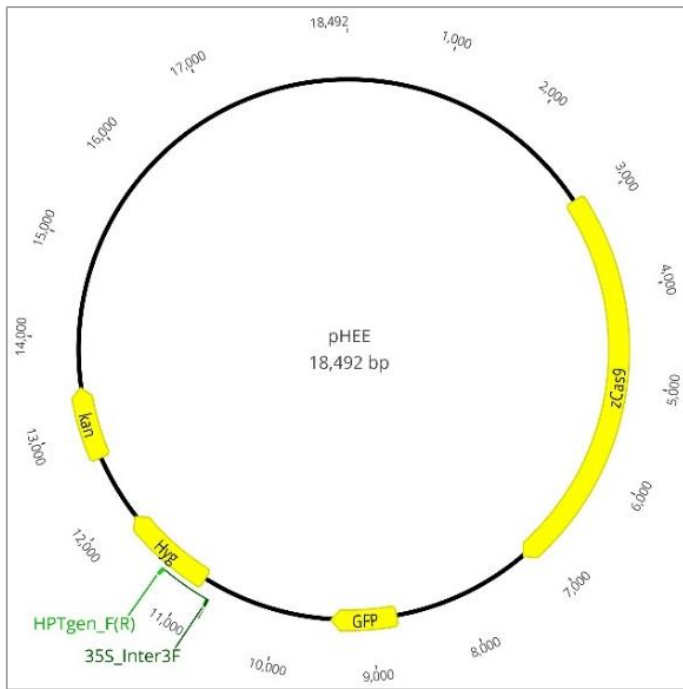
Obrázek 45 FLC-7_RP a pROK2_R_022062 detekující *flc* mutantní alelu.



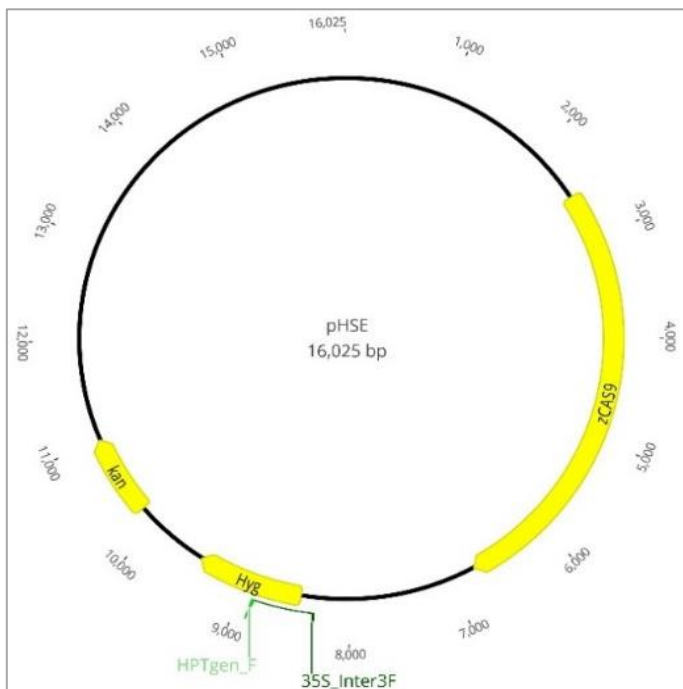
Obrázek 46 SPT6L S6 a SPT6L R2c detekující *SPT6L* divokou alelu



Obrázek 47 SPT6L S6 a SPT6L R2c detekující *spt6l* mutantní alelu.



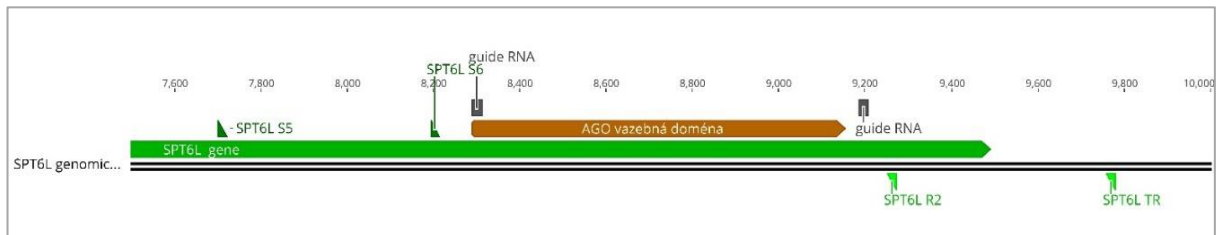
Obrázek 48 Primer 35S_Inter 3F použitý na detekci plazmidu pHEE, který byl použit na transformaci *A. tumefaciens*, délka mezi tímto a mezi primerem HPTgen_F(R) je 580 bp



Obrázek 49 Primer HPTgen_F(R) použitý na detekci plazmidu pHSE, který byl použit na transformaci *A. tumefaciens*, délka mezi tímto primerem a mezi 35S_Inter 3F je 580 bp.

Zkratka genu **sekvenční primery**

SPT6L S5 \rightarrow TR \doteq 2 083 bp



Obrázek 50 Pozice primerů SPT6L S6 a SPT6L R2 detekující SPT6L divokou alelu a primery SPT6L S5 a SPT6L TR detekující téže alelu, ale pokrývají větší rozptyl

11 PŘÍLOHA 3: SEKVENCE PRIMERŮ

>FLC-7_LP

TAACTCTAACCAGCCGTTATCA

>FLC-7_RP

GCAGGATCATCAGTCAAAAGC

>FT-10_LP

TGGAGAAGACCTCAGGAACT

>FT-10_RP

GGTTGCTAGGACTTGGAACA

>LB1-SAIL_C/418

GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC

>pROK2_R_022062

ACAACACTCAACCCTATCTCG

>SOC1-6_LP

CGAGGAAAGCTACTTCTTTTGC

>SOC1-6_RP

TTGCCTTTAGGAGAGAAGATGA

>SPT6L_R2

AAAGGCATTTAGGGAGAAAG

>SPT6L_S5

GGACATTACAAGCCTACAGTG

>SPT6L_S6

GAGGACATTGATCGGCTTGT

>SPT6L_TR

CAATTTTATCCCAAGGCACGA

12 PŘÍLOHA 4: ZÁSOBNÍ ROZTOKY ANTIBIOTIK

Kanamycin: 50 mg/ml H₂O

skladuje se v lednici při 4 °C. Sterilní.

Rifampicin: 10 mg/ml H₂O

skladuje se v mrazáku při -20 °C. Sterilní.

Hygromycin: 50 mg/ml H₂O

skladuje se v lednici při 4 °C. Sterilní.

Claforan (Cefotaxime): 100 mg/ml H₂O

skladuje se v mrazáku při -20 °C. Sterilní.

13 PŘÍLOHA 5: SLOŽENÍ POUŽITÝCH MÉDIÍ

Tabulka 1 YEB-recovery médium

YEB-recovery	pepton (trypton)	1%
	yeast extract	0,1%
	sacharosa	200 mM
	NaCl	100 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	100 mM
	MgSO ₄	100 mM
sterilizováno filtrací		

Tabulka 2 LB médium

LB 1 000 ml	Pepton (trypton)	1%	10 g
	Yeast extract	0,5%	5 g
	NaCl	1%	10 g
	(agar)	1,75%	17,5 g

Tabulka 3 YEB médium

YEB 450 ml	pepton (trypton)	1%	5 g
	yeast extract	0,1%	0,5 g
	sacharosa	0,5%	2,5 g
+ 50 ml MgSO ₄ 200 ml	MgSO ₄	0,05%	1 g
Sterilizováno odděleně			

14 PŘÍLOHA 6: DATA FENOTYPOVÉ STUDIE

Číslo ve sloupci „*linie rostlin*“ jsou pracovní čísla, která byla přidělena rostlinám při genotypování. Ve sloupcích „*poupě*“ a „*lodyha*“ je datum, kdy bylo zaznamenáno první poupě a datum, kdy lodyha dosáhla výšky 1 cm. Ve sloupci „*listy*“, se nachází počet listů v růžici při vykvetení rostliny. Písmeno „x“ znamená, že rostlina zemřela.

<i>linie rostlin</i>	<i>poupě</i>	<i>lodyha</i>	<i>listy</i>
COL8			
11	27.10.2021	01.11.2021	21
11	27.10.2021	01.11.2021	20
11	27.10.2021	01.11.2021	19
11	x	x	x
11	25.10.2021	30.10.2021	15
11	25.10.2021	30.10.2021	19
11	27.10.2021	01.11.2021	18
11	25.10.2021	30.10.2021	21
11	25.10.2021	01.11.2021	18
11	25.10.2021	30.10.2021	20
12	25.10.2021	01.11.2021	18
12	25.10.2021	30.10.2021	18
12	29.10.2021	05.11.2021	28
12	25.10.2021	01.11.2021	20
12	27.10.2021	30.10.2021	14
12	27.10.2021	01.11.2021	18
12	22.10.2021	30.10.2021	20
12	25.10.2021	30.10.2021	19
12	25.10.2021	30.10.2021	20
12	01.11.2021	05.11.2021	18

<i>linie rostlin</i>	<i>poupě</i>	<i>lodyha</i>	<i>listy</i>
M v SPT6L			
6	25.10.2021	30.10.2021	22
6	27.10.2021	01.11.2021	17
6	25.10.2021	30.10.2021	16
6	25.10.2021	30.10.2021	19
6	27.10.2021	01.11.2021	23
6	27.10.2021	01.11.2021	18
6	27.10.2021	01.11.2021	15
6	27.10.2021	01.11.2021	22
6	25.10.2021	01.11.2021	15
6	27.10.2021	03.11.2021	29
5	27.10.2021	01.11.2021	22
5	22.10.2021	29.10.2021	18
5	25.10.2021	01.11.2021	24
5	27.10.2021	01.11.2021	23
5	25.10.2021	30.10.2021	13
5	25.10.2021	30.10.2021	18
5	25.10.2021	30.10.2021	17
5	22.10.2021	29.10.2021	18
5	25.10.2021	30.10.2021	21
5	25.10.2021	30.10.2021	20

<i>linie rostlin</i>	<i>poupě</i>	<i>lodyha</i>	<i>listy</i>
M v SOC; W v SPT6L			
4	01.11.2021	05.11.2021	29
4	05.11.2021	08.11.2021	27
4	05.11.2021	08.11.2021	28
4	01.11.2021	05.11.2021	24
4	01.11.2021	05.11.2021	29
4	01.11.2021	04.11.2021	30
4	03.11.2021	06.11.2021	25
4	03.11.2021	07.11.2021	34
4	03.11.2021	07.11.2021	28
4	01.11.2021	04.11.2021	23
3	01.11.2021	05.11.2021	26
3	03.11.2021	05.11.2021	26
3	01.11.2021	03.11.2021	29
3	01.11.2021	04.11.2021	25
3	x	x	x
3	03.11.2021	06.11.2021	26
3	03.11.2021	06.11.2021	24
3	03.11.2021	06.11.2021	29
3	03.11.2021	07.11.2021	40
3	05.11.2021	07.11.2021	27

<i>linie rostlin</i>	<i>poupě</i>	<i>lodyha</i>	<i>listy</i>
M v FT; M v SPT6L			
A2	18.11.2021	22.11.2021	38
A2	19.11.2021	24.11.2021	38
A2	18.11.2021	22.11.2021	40
A2	18.11.2021	29.11.2021	39
A2	18.11.2021	21.11.2021	39
A2	15.11.2021	18.11.2021	32
A2	15.11.2021	20.11.2021	33
A2	12.11.2021	18.11.2021	33
A2	12.11.2021	16.11.2021	40
A2	15.11.2021	20.11.2021	38
A6	15.11.2021	18.11.2021	33
A6	15.11.2021	20.11.2021	38
A6	15.11.2021	18.11.2021	40
A6	15.11.2021	18.11.2021	45
A6	16.11.2021	19.11.2021	43
A6	12.11.2021	18.11.2021	47
A6	12.11.2021	18.11.2021	49
A6	15.11.2021	18.11.2021	39
A6	15.11.2021	19.11.2021	40
A6	15.11.2021	19.11.2021	40

linie rostlin poupě lodyha listy

M v FLC; W v SPT6L

20	25.10.2021	01.11.2021	23
20	25.10.2021	30.10.2021	15
20	27.10.2021	01.11.2021	20
20	27.10.2021	03.11.2021	20
20	25.10.2021	01.11.2021	20
20	29.10.2021	03.11.2021	25
20	25.10.2021	01.11.2021	22
20	27.10.2021	01.11.2021	13
20	27.10.2021	01.11.2021	16
20	27.10.2021	01.11.2021	16
19	27.10.2021	01.11.2021	21
19	25.10.2021	03.11.2021	22
19	01.11.2021	05.11.2021	12
19	25.10.2021	30.10.2021	13
19	25.10.2021	29.10.2021	18
19	25.10.2021	30.10.2021	18
19	25.10.2021	30.10.2021	15
19	25.10.2021	30.10.2021	16
19	25.10.2021	30.10.2021	18
19	29.10.2021	01.11.2021	22

linie rostlin poupě lodyha listy

M v FLC; M v SPT6L

16	25.10.2021	30.10.2021	20
16	25.10.2021	30.10.2021	15
16	x	x	x
16	25.10.2021	30.10.2021	23
16	25.10.2021	30.10.2021	28
16	25.10.2021	30.10.2021	12
16	25.10.2021	01.11.2021	21
16	27.10.2021	30.10.2021	17
16	25.10.2021	30.10.2021	15
16	25.10.2021	01.11.2021	19
15	25.10.2021	30.10.2021	19
15	27.10.2021	03.11.2021	23
15	25.10.2021	30.10.2021	20
15	25.10.2021	01.11.2021	23
15	25.10.2021	30.10.2021	18
15	27.10.2021	01.11.2021	17
15	25.10.2021	30.10.2021	12
15	15.10.2021	30.10.2021	16
15	27.10.2021	01.11.2021	24
15	25.10.2021	01.11.2021	27

M v FT

B3	15.11.2021	20.11.2021	38
B3	01.11.2021	07.11.2021	22
B3	19.11.2021	22.11.2021	40
B3	18.11.2021	20.11.2021	35
B3	12.11.2021	15.11.2021	44
B3	15.11.2021	18.11.2021	43
B3	12.11.2021	18.11.2021	36
B3	22.11.2021	28.11.2021	32
B3	12.11.2021	15.11.2021	34
B3	15.11.2021	18.11.2021	37
B3	10.11.2021	14.11.2021	38
B3	15.11.2021	19.11.2021	38
B3	15.11.2021	19.11.2021	39
B3	12.11.2021	18.11.2021	35
B3	15.11.2021	19.11.2021	43
B3	10.11.2021	15.11.2021	35
B3	12.11.2021	15.11.2021	35
B3	12.11.2021	19.11.2021	31
B3	12.11.2021	16.11.2021	38
B3	12.11.2021	15.11.2021	28

M v SOC; M v SPT6L

7	01.11.2021	05.11.2021	29
7	08.11.2021	10.11.2021	30
7	05.11.2021	08.11.2021	24
7	01.11.2021	06.11.2021	27
7	03.11.2021	06.11.2021	21
7	01.11.2021	05.11.2021	23
7	01.11.2021	05.11.2021	23
7	01.11.2021	05.11.2021	18
7	01.11.2021	05.11.2021	15
7	01.11.2021	05.11.2021	28
8	08.11.2021	10.11.2021	30
8	01.11.2021	03.11.2021	30
8	01.11.2021	05.11.2021	26
8	01.11.2021	05.11.2021	26
8	29.10.2021	03.11.2021	21
8	08.11.2021	10.11.2021	23
8	08.11.2021	10.11.2021	23
8	01.11.2021	04.11.2021	29
8	03.11.2021	05.11.2021	24
8	01.11.2021	05.11.2021	24