

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Transformace rostlin jarního ječmene kódující Cas9 nukleázu
k získání tolerance k WDV**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Michal Nakládal
Studijní program: N1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Termín odevzdání práce: 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michal Nakládal
Název práce	Transformace rostlin jarního ječmene kódující Cas9 nukleázu k získání tolerance k WDV
Typ práce	Magisterská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby	2023
Abstrakt	<p>Virus zakrslosti pšenice (WDV), je závažný virový patogen pšenice a ječmene, způsobující značné ztráty na výnosech. Jednou z možností navození tolerance proti WDV v rostlinách je využití technologie CRISPR/Cas. Diplomová práce se zabývá přípravou tří rozdílných expresních vektorů nesených plazmidem. Do expresních vektorů byly vloženy tři rozdílné protospacery vycházející ze sekvencí v genech <i>CP</i>, <i>MP</i> a <i>Rep</i> viru WDV. Expresní vektory byly, každý zvlášť, transformovány do rostlin jarního ječmene nesoucích Cas9 nukleázu pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. Transformace expresní kazety do rostlin jarního ječmene byla ověřena detekcí na úrovni DNA pomocí metody PCR.</p>
Klíčová slova	Ječmen, CRISPR/Cas9, transformace, rezistence, WDV
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Surname	Bc. Michal Nakládal
Title of thesis	Transformation of spring barley plants expressing Cas9 nuclease to induce tolerance to WDV
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of grow regulators
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutkova, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>Wheat Dwarf virus (WDV) is a serious viral pathogen of wheat and barely, causing significant yield losses. One of the options to induce tolerance against WDV in plant is the use of technology CRISPR/Cas. The diploma thesis deals with the preparation of three different expression vectors carried by a plasmid. Three different protospacers based on sequences in the <i>CP</i>, <i>MP</i> and <i>Rep</i> genes of the WDV virus were inserted into the expression vectors. The expression vectors were individually transformed into spring barely plants carrying the Cas9 nuclease using <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. The transformation of the expression cassette into spring barely plants was verified by detectio at the DNA level using the PCR method.</p>
Keywords	Barley, CRISPR/Cas9, transformation, resistance, WDV
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 24. 7. 2023

.....

Děkuji Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za její cenné rady, ochotu, trpělivost a vstřícný přístup.

Děkuji také Mgr. Tomáši Vlčkovi, Ph.D. za podporu a cenné rady a mým blízkým, kteří mi za každé situace pomáhali.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	11
2 CÍLE PRÁCE	12
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
3.1 Virus zakrslosti pšenice (WDV)	13
3.1.1 Základní charakteristika WDV	13
3.1.2 Patogenita WDV	13
3.1.3 Přenos WDV	14
3.1.4 Genom WDV	15
3.2 Obranné mechanismy rostlin proti patogenům	16
3.2.1 Obrana proti virovým patogenům	16
3.3 Ječmen	18
3.3.1 Charakteristika ječmene	18
3.3.2 Botanická charakteristika ječmene	19
3.4 Transformace rostlin	19
3.4.1 Transformace ječmene	19
3.5 Vytvoření tolerance rostlin vůči patogenům pomocí genového inženýrství	20
3.5.1 Technologie editace genů	22
3.5.2 CRISPR/Cas systémy	24
3.5.3 Využití technologie CRISPR/Cas9, jako obranný mechanismus proti virům	26
3.5.4 Využití technologie CRISPR/Cas9 u ječmene	28
3.6 Právní statut genetiky editovaných rostlin	29
4. MATERIÁL A METODY	30
4.1 Materiál	30
4.1.1 Biologický materiál	30

4.1.2 Chemikálie	30
4.1.3 Přístroje	32
4.1.4 Vektory a protospacery	33
4.2 Pracovní postup	35
4.2.1 Klonování expresního vektoru	35
4.2.2 Transformace kompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i> AGL1	39
4.2.3 Transformace jarního ječmene odrůdy Golden Promise	41
4.2.4 <i>In vitro</i> kultivace explantátů jarního ječmene	41
4.2.5 Izolace DNA z rostlin jarního ječmene	41
4.2.6 Ověření přítomnosti sgRNA pomocí PCR analýzy	42
5 VÝSLEDKY	44
5.1 Izolace linearizovaného vektoru s vyštěpeným místem pro vložení protospaceru	44
5.2 Restrikční analýza vektorů izolovaných z <i>E. coli</i> DH5 α	45
5.3 Izolace vektorů z <i>A. tumefaciens</i> AGL1	46
5.4 Restrikční analýza vektorů izolovaných z <i>A. tumefaciens</i> AGL1	48
5.5 Transformace nezralých zygotických embryí ječmene	50
5.6 Detekce transgenních rostlin	52
6 DISKUZE	57
7 ZÁVĚR	59
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
DALŠÍ ZDROJE	71

SEZNAM ZKRATEK

ACMV (*african cassava mosaic virus*) – virus africké mozaiky manioku

BaMMV (*barley mild mosaic virus*) – virus mírné žluté mozaiky ječmene

BaYMV (*barely yellow mosaic virus*) – virus žluté mozaiky ječmene

BSV (*banana streak virus*) – virus pruhovitosti banánovníku

BVDV (*bovine viral diarrhoea virus*) – virus bovinního virového průjmu

Cas (CRISPR-associated) – protein asociovaný ke CRISPRu

CMV (*cucumber mosaic virus*) – virus okurkové mozaiky

CP (coat protein) – obalový protein

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – shluk pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv

crRNA (CRISPR RNA) – CRISPR RNA

DAMPs (damage-associated molecular patterns) – molekuly uvolněné z vlastních poškozených buněk

dCas13a (dead Cas13a) – „mrtvý“ Cas13a

DSBs (double-stranded breaks) – dvouřetězcové zlomy

dsDNA (double-stranded DNA) – dvouvláknová DNA

eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4 E*) – *eukaryotický translaci iniciující faktor 4 E*

ETI (effector-triggered immunity) – imunitní odpověď spuštěná efektry

FnCas9 (*Francisella novicida* Cas9) – Cas9 pocházející z bakterie *Francisella novicida*

Gb (gigabase) – gigabáze

GE (gene editing) – editace genů

GMO (genetically modified organism) – geneticky modifikovaný organismus

gRNA (guide RNA) – naváděcí RNA

HDR (homology directed repair) – homologií řízená oprava

HEPN (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain) – nukleotid-vazebná doména vyšších eukaryot a prokaryot

Kb (kilobase) – kilobáze

LIMYB (L10-interacting myb domain-containing protein) – protein nesoucí s L10 interagující MYB doménu

LIR (long intergenic region) – dlouhá intergenní oblast

miRNA (microRNA) – mikro RNA

MP (movement protein) – pohybový protein

NBT (new breeding techniques) – nové techniky šlechtění

NHEJ (non-homologous end joining) – nehomologní spojení konců

NIK1 (NSP-interacting kinase 1) – Receptor NSP interagující kináza 1

NTD (N-terminal domain) – N-terminální doména

NUC (nuclease) – nukleázový

ORFs (open reading frames) – otevřené čtecí rámce

PAM (protospacer adjacent motif) – přílehlý protospacerový motiv

PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) – molekulové struktury patogenu

PCR (polymerase chain reaction) – polymerázová řetězová reakce

PDR (pathogen-derived resistance) – rezistence odvozená od patogenu

pgRNA (polyvalent gRNA) – polyvalentní gRNA

pre-crRNA (pre-CRISPR RNA) – primární CRISPR RNA

PRR (pattern recognition receptor) – receptor rozpoznávající molekulové struktury

PTI (pattern-triggered immunity) – imunitní odpověď spuštěná molekulovými strukturami patogenu

R (resistance) – faktor rezistence

RCas9 (RNA targeting Cas9) – RNA rozpoznávající Cas9

RCR (rolling-circle replication) – replikace otáčivé kružnice

REC (recognition) – rozpoznávací

Rep (replication associated protein) – protein asociovaný s replikací

RISC (RNA-induced silencing complex) – RNA indukovaný umlčovací komplex

RNAi (RNA interference) – RNA interference

RPL10 (ribosomal protein L10) – ribozomální protein L10

RSMV (*Rice stripe mosaic virus*) – virus pruhované mozaiky rýže

S (susceptibility) – citlivost

shRNA (short hairpin RNA) – krátká vlásenková RNA

sgRNA (single-guide RNA) – samostatná naváděcí RNA

SIR (short intergenic region) – krátká intergenní oblast

siRNA (small interfering RNA) – krátká interferující RNA

SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) – Cas9 pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*

SRBSDV (*Southern rice black-streaked dwarf virus*) – virus jižní černě pruhované zakrslosti rýže

ssDNA (single-stranded DNA) – jednovláknová DNA

ssRNA (single-stranded RNA) – jednovláknová RNA

TALEN (transcription activator like effector nuclease) – efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům

T-DNA (transfer DNA) – přenosová DNA

Ti (tumor inducing) – tumor indukující

tracrRNA (transactivating CRISPR RNA) – transaktivační CRISPR RNA

TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) – virus žluté kadeřavosti listů rajčat

WDV (wheat dwarf virus) – virus zakrslosti pšenice

WDV-B (WDV-barley) – kmen WDV ječmene

WDV-W (WDV-wheat) – kmen WDV pšenice

ZFN (zinc finger nuclease) – nukleáza zinkových prstů

1 ÚVOD

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) je hospodářsky významná obilnina patřící do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Během svého růstu je ječmen napadán různými patogeny, jedním z nich je virus zakrslosti pšenice (wheat dwarf virus – WDV). Jedná se o virus s jednovláknovou DNA (single-stranded DNA – ssDNA) zařazený do rodu *Mastrevirus* z čeledi *Geminiviridae*. Projevy napadení rostlin jsou zpomalení růstu a žloutnutí listů. Virus je přenášen prostřednictvím kříška polního (*Psammotettix alienus*).

Ochrana rostlin proti WDV je z důvodu neexistujících léčebných postupů zaměřena na preventivní agronomická opatření pro zastavení šíření viru. Každoročně způsobuje virus závažné ztráty na produkci obilovin, které ohrožují světovou potravinovou dostupnost. V současné době se rozvíjí několik biotechnologických metod pro získání tolerance rostlin k virům. Hlavními technikami jsou rezistence odvozená od patogenu (pathogen-derived resistance – PDR), RNA interference (RNA interference – RNAi) a v poslední době i technologie CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR) /Cas (CRISPR-associated – Cas). Systém CRISPR/Cas se skládá ze dvou částí CRISPR lokusu a proteinu Cas s nukleázovou aktivitou. CRISPR je tvořen úseky DNA nazývaných spacers, které jsou odděleny krátkými repeticemi. Protein Cas s nukleázovou aktivitou je prostřednictvím sekvence spaceru naváděn na komplementární sekvence virové DNA, které rozštěpí.

Aplikace nových technik genového inženýrství je realizována prostřednictvím transgenoz. K transformaci ječmene je využíván jarní ječmen odrůdy Golden Promise. V současné době jsou expresní vektory do buněk ječmene vnášeny převážně prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* je přirozeně se vyskytující půdní bakterie schopná inkorporovat část plazmidové DNA označované jako T-DNA (transfer DNA) do genomu rostlinné buňky.

V rámci diplomové práce byla na základě publikovaných prací využita technologie CRISPR/Cas9 k získání tolerance vůči WDV. Cílem práce bylo připravit tři rozdílné expresní vektory nesoucí rozdílné protospacery vycházející ze sekvencí v genech *CP*, *MP* a *Rep* viru WDV a těmito vektory transformovat rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise nesoucí protein Cas9.

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše.
 - WDV, charakteristika.
 - Technologie CRISPR/Cas9, význam a využití v genovém inženýrství rostlin.

Experimentální část:

- Transformace rostlin jarního ječmene pomocí *A. tumefaciens*, detekce samostatné naváděcí RNA (single-guide RNA – sgRNA) v regenerovaných rostlinách.
 - Příprava plazmidových vektorů obsahujících protospacery viru WDV.
 - Vložení připravených plazmidových vektorů do *A. tumefaciens*.
 - Transformace jarního ječmene odrůdy Golden Promise pomocí *A. tumefaciens*.
 - Genotypizace regenerovaných rostlin pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR).

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Virus zakrslosti pšenice (WDV)

3.1.1 Základní charakteristika WDV

WDV je rostlinný ssDNA virus z rodu *Mastrevirus* řazený do čeledi *Geminiviridae* (Brown *et al.*, 2012). Na základě vektorů, okruhu hostitelů, organizace a sekvenční podobnosti genomu je čeleď *Geminiviridae* rozdělena do 14 rodů (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* a *Turncurtovirus*) (Fiallo-Olivé *et al.*, 2021). Viry rodu *Mastrevirus* napadají převážně jednoděložné rostliny z čeledi lipnicovitých (Brown *et al.*, 2012). Virion WDV je tvořen jednou kruhovou molekulou ssDNA o velikosti 2,7 kilobází (kilobase – kb) obalenou dvojitou ikosaedrickou kapsidou. Replikace viru probíhá v jádře hostitelské buňky ve dvou fázích. Nejprve dochází ke konverzi ssDNA na dvouvláknovou DNA (double-stranded DNA – dsDNA), ze které jsou následně replikací otáčivou kružnicí (rolling-circle replication – RCR) tvořeny jednotlivé ssDNA. Replikace genomu WDV je závislá na replikačním aparátu hostitelské buňky (Gutierrez, 1999).

3.1.2 Patogenita WDV

WDV napadá široký okruh rostlin z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) (Brown *et al.*, 2012). Symptomy napadených rostlin jsou žloutnutí, zpomalení růstu a zakrslost. Přírodním rezervoárem WDV jsou divoké druhy trav a plané odrůdy kulturních obilnin (Ripl *et Kundu*, 2015). Z kulturních plodin jsou WDV napadány pšenice (*Triticum aestivum*), ječmen (*Hordeum vulgare*) a žito (*Secale cereale*). Současná klasifikace rozlišuje podle preferovaného hostitele dva kmeny WDV, a to kmen pšenice (WDV-wheat – WDV-W) a kmen ječmene (WDV-barley – WDV-B) (Lotfipour *et al.*, 2013).

3.1.3 Přenos WDV

Přenos WDV mezi rostlinami probíhá cirkulujícím způsobem, v neaktivním stavu prostřednictvím křísků z rodu *Psammotettix* (Lindsten *et* Vacke, 1991). Za hlavního přenašeče WDV je považován *Psammotettix alienus* vyskytující se na loukách a polích severní polokoule (Obrázek 1) (Greene, 1971). Schopnost přenosu WDV byla kromě *P. alienus* pozorována i u dalších druhů křísků *Psammotettix striatus* (Wang *et al.*, 2007) a *Psammotettix provincialis* (Ekzayes *et* Kumari, 2011). K nejvyšší intenzitě přenosu WDV dochází na podzim, kdy populace křísků dosahuje vrcholu (Lindblad *et* Sigvald, 2004). Pro přenos WDV prostřednictvím *P. alienus* je zásadní CP protein viru (Wang *et al.*, 2014).

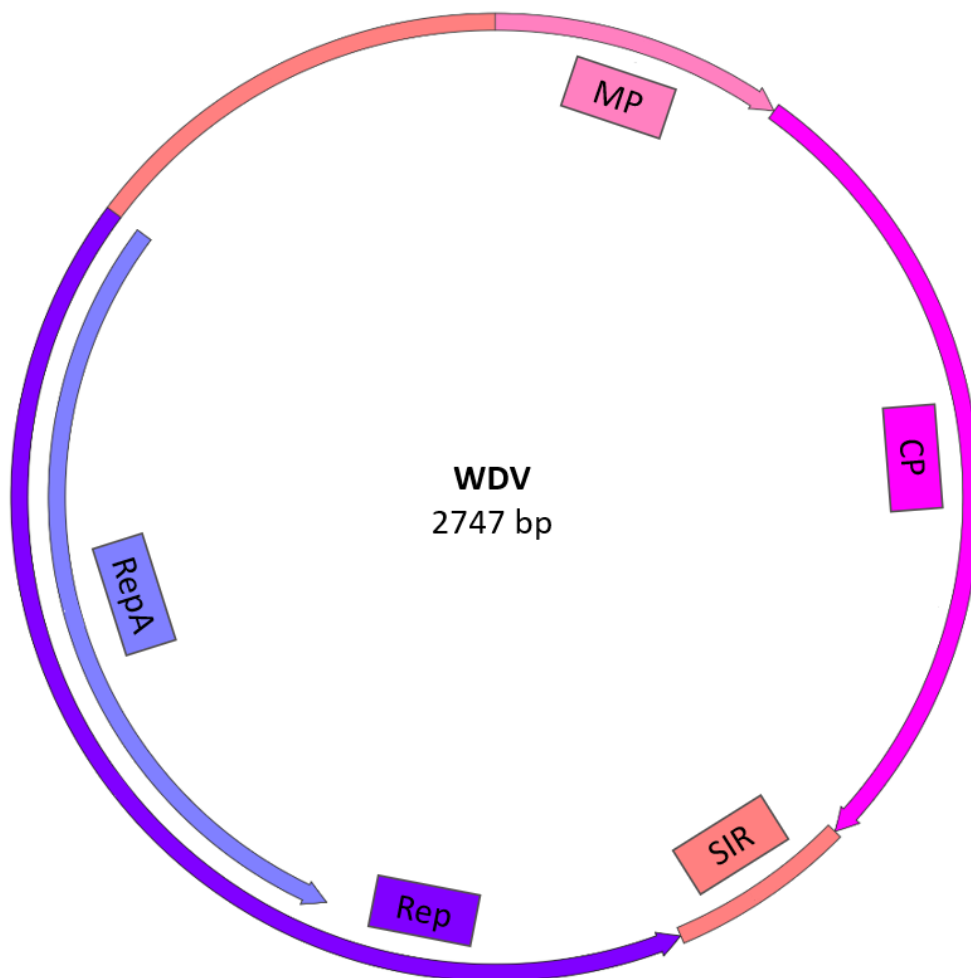


Obr. 1. Křísek polní (*Psammotettix alienus*). Převzato:

<https://www.agromanual.cz/cz/atlas/skudci/skudce/krisek-polni>.

3.1.4 Genom WDV

Genom WDV je tvořen čtyřmi geny rozdělenými do dvou částí, otevřených čtecích rámců (open reading frames – ORFs): virion-sense ORFs a complementary-sense ORFs, které jsou oddělené intergenními oblastmi (Obrázek 2). Virion-sense ORFs kódují pohybový protein (movement protein – MP) a obalový protein (coat protein – CP) (Lazarowitz *et al.*, 1992). Protein MP umožňuje interakci s plazmodezmy přenos viru mezi buňkami (Rojas *et al.*, 2001). Obalový protein CP je jediným strukturním proteinem tvořícím kapsidu (Stanley *et al.*, 1983). Protein CP má však i další funkce: zajišťuje transport virové DNA mezi jádrem a cytoplazmou (Liu *et al.*, 1999), dále je důležitý pro přenos viru hmyzím vektorem (Wang *et al.*, 2022) a společně s MP proteinem zprostředkovává přenos viru mezi buňkami (Liu *et al.*, 2001). Poznatky studia geminivirů naznačují, že se protein CP podílí i na replikaci genomu WDV (Liu *et al.*, 1997). Complementary sense ORFs kódují dva s replikací asociované proteiny (replication associated protein – Rep) RepA a Rep (Gutierrez *et al.*, 2004). Přítomnost intronu v genu Rep umožňuje WDV sestřihem exprimovat dva odlišné Rep proteiny. Proteiny RepA a Rep oligomerizují do komplexu (Castellano *et al.*, 1999), který je nezbytný pro RCR. Rep proteiny také interagují s buněčnými faktory hostitele regulujícími buněčný cyklus a replikaci (Fondong, 2013). V genomu WDV se dále nacházejí dvě nekódující oblasti označované jako dlouhá intergenní oblast (long intergenic region – LIR) a krátká intergenní oblast (short intergenic region – SIR), které jsou důležité pro replikaci viru a transkripci. LIR obsahuje počátek pro replikaci kruhové ssDNA viru formou RCR (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995). SIR obsahuje polyadenylační signály a oblast pro vazbu krátkého primeru zahajujícího syntézu druhého vlákna viru (Kammann *et al.*, 1991). Na základě porovnání sekvencí rozdílných izolátů viru jsou intergenní oblasti považovány za nejvíce variabilní oblasti genomu WDV (Stanley, 2004).



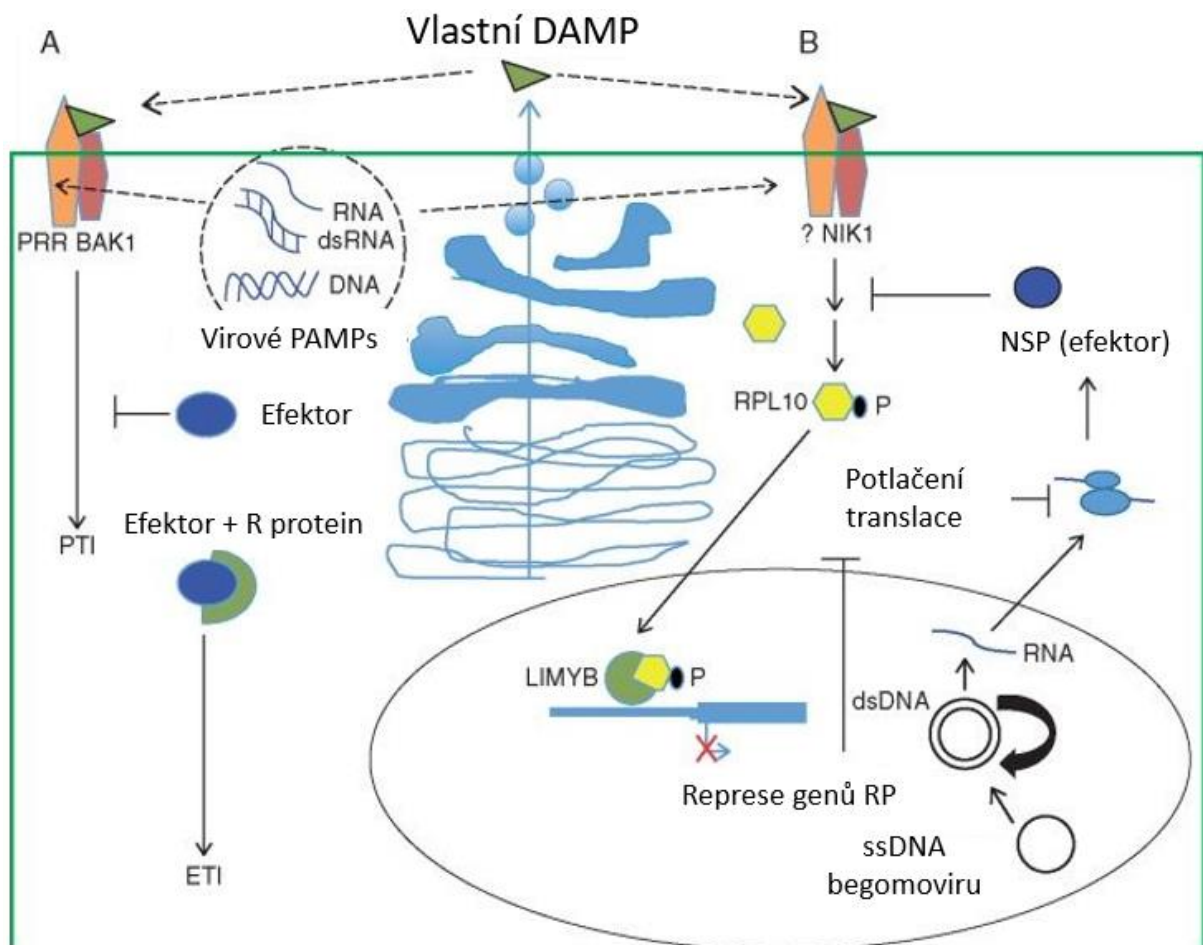
Obr. 2. Schéma genomu WDV.

3.2 Obranné mechanismy rostlin proti patogenům

3.2.1 Obrana proti virovým patogenům

Rostliny využívají více obranných mechanismů k omezení replikace a pohybu viru, jako je umlčování genů, signalizace imunitních receptorů, obrana zprostředkovaná hormony, degradace proteinů a regulace metabolismu (Incarbone *et* Dunoyer, 2013). K rozpoznání virové infekce a k vyvolání obranné odpovědi používají rostliny dvoustupňový detekční systém, který je tvořen receptory lokalizovanými na plazmatické membráně a intracelulárními receptory (Obrázek 3) (Zipfel, 2014). První úroveň obrany je imunitní odpověď spuštěná specifickými molekulovými strukturami (pattern-triggered immunity – PTI). Tato odpověď je zprostředkována receptory rozpoznávajícími molekulové struktury (pattern recognition

receptor – PRR), které rozpoznávají molekulové struktury patogenu (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) nebo molekuly uvolněné z vlastních poškozených buněk (damage-associated molecular patterns – DAMPs) (Macho *et* Zipfel, 2014). Druhou úroveň obrany tvoří imunitní odpověď spuštěná efekty (effector-triggered immunity – ETI). ETI je zprostředkována intracelulárními receptory označovanými jako proteiny rezistence (resistance – R), které přímo nebo nepřímo rozpoznávají virulentní efekty vylučované patogenem do intracelulárního prostředí hostitele (Jones *et* Dangl, 2006).



Obr. 3. Antivirová imunita u rostlin. A Imunita vyvolaná vazbou DAMP na PRR (PTI) a efektoru na receptory R (ETI), B Antivirová imunita zprostředkovaná receptorem NIK1. Převzato: Calil *et* Fontes, 2017.

Rostliny také disponují konzervativním mechanismem RNAi sloužícím jako systém obrany proti virům (Seo *et al.*, 2013) a endogenní systém pro kontrolu genové exprese (Baulcombe, 2004). Infekce virem spouští produkci virus specifických krátkých interferujících RNA (small interfering RNA – siRNA) o délce 21 nukleotidů. Tyto krátké řetězce RNA

s dalšími proteiny následně tvoří RNA indukovaný umlčovací komplex (RNA-induced silencing complex – RISC) zprostředkující degradaci specifických virových RNA na základě komplementarity bází siRNA (Pantaleo *et al.*, 2007).

NSP interagující kináza 1 (NSP-interacting kinase 1 – NIK1) je membránový receptor, který spouští imunitní odpověď vedoucí k celkovému potlačení translace v napadené buňce. Bohužel nebyl popsán přesný mechanismus aktivace imunitní odpovědi receptoru NIK1. Porovnáním se savčími modely imunitních receptorů lze předpokládat, že vazba unikátní struktury patogenu na NIK1 indukuje nebo stabilizuje dimerizaci, případně multimerizaci receptorů NIK1 a jejich autofosforylaci (Jackson *et al.*, 2010). Intracelulární doména NIK1 po aktivaci fosforyluje ribozomální protein L10 (ribosomal protein L10 – RPL10), který se následně přemístí do buněčného jádra (Carvalho *et al.*, 2008). Protein RPL10 v jádře vazbou aktivuje protein nesoucí s L10 interagující MYB doménu (L10-interacting MYB domain-containing protein – LIMYB). Aktivovaný protein LIMYB následně potlačením transkripce genů ribozomálních proteinů zastavuje syntézu proteinů v buňce (Zorzatto *et al.*, 2015).

3.3 Ječmen

3.3.1 Charakteristika ječmene

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je spolu s pšenicí jednou z nejstarších domestikovaných plodin. Za pravlast jedné z nejstarších obilovin se považuje oblast tzv. úrodného půlměsíce; nejstarší archeologický nález divokého ječmene pochází z doby 8 000 let př. n. l. (Smith, 1998). Ječmen je po kukuřici, pšenici a rýži čtvrtou ekonomicky nejvýznamnější plodinou. Ječmen je velmi adaptabilní plodina, která je schopna přizpůsobit se širšímu rozpětí přírodních podmínek než ostatní obilniny (Baik *et Ullrich*, 2008). Optimální podmínky pro růst jsou ve střední Evropě v nadmořských výškách 200 až 300 m, s průměrnými teplotami 9 °C a srážkami 500 až 600 mm. Jeho předností je nízká náročnost na podmínky pěstování, úrodnost půdy a na předplodinu. Složení a kvalita zrna jsou ovlivněny typem odrůdy a podmínkami pěstování. Kvalitu zrna ovlivňují z vnějších podmínek teplota, délka dne, množství vody a dostupnost půdních minerálů. Současně je ječmen vhodným modelovým organismem pro genetické studie a biotechnologické aplikace. Obsah tuků a olejů v ječmeni je oproti ostatním obilninám nízký. Zrno ječmene je tvořeno v závislosti na odrůdě z 60-64 % škrobem. Hlavní

složku buněčné stěny obilky tvoří polysacharidy arabinoxylany a β -glukany (Bamforth *et* Barclay, 1993), které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. 80 % produkce ječmene je využíváno pro krmné účely, přibližně 20 % je využíváno v potravinářství, převážně k výrobě sladu (Newman *et* Newman, 1991).

3.3.2 Botanická charakteristika ječmene

Genom ječmene má velikost 5,3 gigabází (gigabase – Gb) a obsahuje okolo 39 000 genů. Ve struktuře genomu ječmene se nachází velké množství opakujících se sekvencí DNA, tyto transpozomy tvoří 88,8 % sekvencí genomu. Rod ječmen *Hordeum* obsahuje 32 druhů a 45 taxonů zahrnujících diploidní ($2n=2x=14$), tetraploidní ($2n=4x=28$) a hexaploidní ($2n=6x=42$) karyotypy (Bothmer *et al.*, 1995). Kulturní ječmen setý *Hordeum vulgare ssp. vulgare* i jeho volně rostoucí předchůdce *Hordeum vulgare ssp. spontaneum* je jednoletým a diploidním druhem ($2n=2x=14$) (Asfaw *et* Bothmer, 1990). Kulturní ječmen setý se rozděluje na čtyři convariety. Ječmen setý víceřadý *H. v. convar. vulgare*, který se dělí na dva typy šestiřadý (*hexastychon*) a čtyřřadý (*tetrastychon*). Další convarietou je ječmen setý přechodný *H. v. convar. intermedium*. Convarieta ječmen setý, dvouřadý *H. v. convar. distichon* se dále dělí na variety *nutans* (ječmen háčkující), *erectum* (ječmen vzpřímený), *zeocrithon* (ječmen paví) a *nudum* (ječmen nahý). Poslední convarietou ječmene je ječmen setý, různotvarý *H. v. convar. labile* (Zimolka *et al.*, 2006).

3.4 Transformace rostlin

3.4.1 Transformace ječmene

Jednou z nejdůležitějších biotechnologických aplikací je transformace. Úspěšnost transformace je však u ječmene závislá na genotypu. V současné době je k transformaci nejvíce využívána odrůda Golden Promise. Odrůda Golden Promise, je sladovnický ječmen, pěstovaný ve Velké Británii od roku 1968, který vznikl v roce 1958 ovlivněním odrůdy Maythorpe γ -paprsky (Forster, 2001). Odrůda je náchylná k padlí travnímu, ale je tolerantní k zasolení. Nese mutaci projevující se ztrátou funkce ječmenného homologu pro gen rýže *DENSE AND ERECT PANICLE 1 (HvDEP1)*, genu kódujícím AGG3 podjednotku heterotrimerického G-proteinu, který pozitivně reguluje prodlužování stébla a velikost zrna (Wendt *et al.*, 2016). V *in vitro*

podmínkách tato odrůda vytváří embryogenní kalus s vysokou regenerační schopností a díky těmto vlastnostem je využívána v genovém inženýrství (Kapusi *et al.*, 2017). Většina hospodářsky významných odrůd vykazuje velkou míru rekalcitrance, nevytváří se embryogenní kalus a prakticky nedochází k regeneraci rostlin (Harwood *et al.*, 2009).

Existují dvě nejčastěji používané metody pro transformaci ječmene: biolistická metoda (Wan *et Lemaux*, 1994) a transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Tingay *et al.*, 1997). Transformace pomocí *A. tumefaciens* v současné době vykazuje vyšší efektivitu a nižší počet kopií transgenu. Linie vzniklé transformací pomocí *A. tumefaciens* dále vykazují stabilnější expresi transgenu v dalších generacích a nižší riziko umlčení transgenu (Travella *et al.*, 2005). Úspěšnost transformace je ovlivněna typem rostlinného pletiva, které je transformováno. Nejčastěji používaným pletivem pro transformaci ječmene je štítek embrya (skutelum), který je izolovaný z nezralých zygotických embryí. Na indukčním médiu se na povrchu štítku vytváří dostatečné množství kalusu, po jehož přenesení na regenerační médium bez regulátorů růstu regenerují rostliny. Transformace pomocí *A. tumefaciens* je limitována kultivary, které se vyznačují vysokou schopností indukce kalusu a regenerace, jako je právě odrůda Golden Promise (Dahleen *et Manoharan*, 2007).

Výzkum transformace ječmene probíhá od devadesátých let. Největší překážkou transformace ječmene není v současnosti inserce genů, ale regenerace rostlin z transformovaných pletiv (Harwood *et al.*, 2002). Vliv na regeneraci transformovaných pletiv má mnoho faktorů jako například velikost transformovaného explantátu, kultivační médium, podmínky kultivace (Chang *et al.*, 2003).

Cílem transformace ječmene je vložení genů pro zlepšení kvality zrna, zvýšení nutriční hodnoty, produkci zájmových enzymů, zvýšení tolerance k abiotickým stresům, škůdcům a patogenům (Dahleen *et Manoharan*, 2007).

3.5 Vytvoření tolerance rostlin vůči patogenům pomocí genového inženýrství

Geminiviry představují závažnou hrozbu pro zajištění výživy populace zvláště v chudých oblastech. Situaci dále zhoršují změny klimatu, které oslabují rostliny a vytvářejí vhodné podmínky pro přenašeče. Z tohoto důvodu je jedním z hlavních cílů využití biotechnologií u rostlin vytvoření tolerance proti geminivirům pomocí genového inženýrství (Moffat, 1999).

Nejúčinnějším a nejudržitelnějším přístupem dosažení tolerance proti virovým infekcím je identifikace a přenesení faktorů rezistence (rezistence – R) zodpovědných za toleranci

z planě rostoucích rostlin do kulturních odrůd. Bohužel v mnoha případech naráží přenos genů rezistence do zvoleného kultivaru rostlin na genetická omezení (Kang *et al.*, 2005). V ječmeni (*H. vulgare*) byly genotypizací odolných odrůd nově identifikovány čtyři potenciální geny tolerance proti WDV. Tři geny se nachází na chromozomu 2H (*Dihydrofolate reductase*, *NBS-LRR disease resistance protein* a *Dihydroflavonol 4-reductase*) a jeden na chromozomu 4H (*Cysteine proteinase inhibitor*) (Soleimani *et al.*, 2023).

Dalším přístupem, jak dosáhnout tolerance k virům v rostlinách, je cílená editace genů náchylnosti. Viry využívají k replikaci a dokončení svého životního cyklu endogenní faktory citlivosti (susceptibility – S) hostitelských rostlin. Modifikací genů S faktorů prostřednictvím editace genomu můžeme omezit jejich dostupnost a tím zmírnit patogenitu virů k rostlinám (Dong *et al.*, 2019). Dobře známým genem S faktoru, jehož editací lze docílit tolerance rostlin k virům, je *eukaryotický translaci iniciující faktor 4 E* (*eukaryotic translation initiation factor 4 E – eIF4E*) (Kan *et al.*, 2022).

Pro vytvoření tolerance v rostlinách lze využít i struktury pocházející z patogenu. Na tomto principu je založena metoda PDR, kdy je do hostitele vložena část genetické informace viru. Využívá se především vložení pozměněných genů viru, které jsou kritické pro patogenitu do hostitele. Proteiny pozměněných genů při napadení interferují s virovými proteiny a snižují patogenitu. Jedná se konkrétně o proteiny asociované s replikací REP, pohybové proteiny MP a obalové proteiny CP (Vanderschuren *et al.*, 2007). Tolerance zprostředkovaná REP je založena na vložení pozměněných genů pro replikační proteiny do hostitele. Exprimované mutované nebo zkrácené proteiny interagují s virovými proteiny a narušují replikaci viru. Nežádoucím efektem exprese defektního Rep proteinu je jeho interakce s proteiny hostitele, které narušují vývoj rostliny i bez napadení virem. Virový protein musí být upraven tak, aby neinteragoval s proteiny hostitele a nenarušoval jeho vývoj (Antignus *et al.*, 2004).

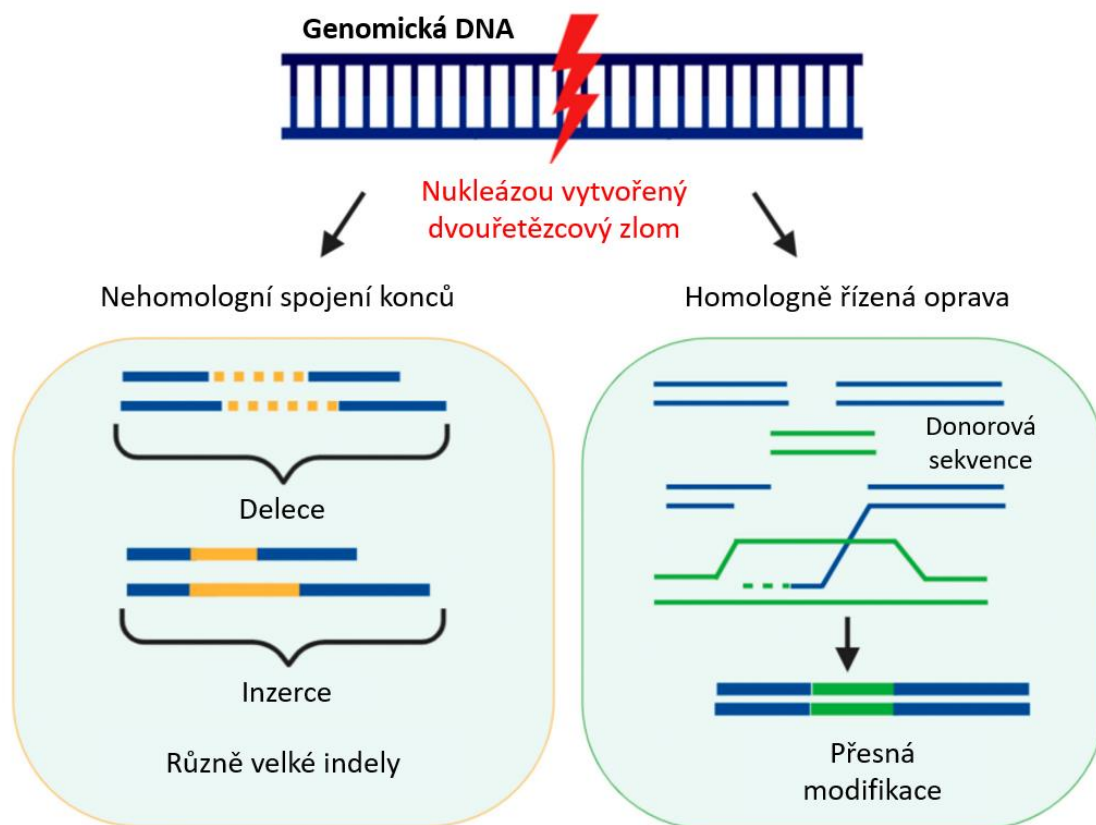
K navození tolerance proti virům je dále využívána technologie RNAi. Vložením sekvencí RNAi komplementárních k sekvencím v genomu patogenu do hostitele lze indukovat toleranci zvýšením aktivity komplexu RISC proti virovým RNA. Systém RNAi se dělí na siRNA a mikro RNA (microRNA – miRNA). Pro vytvoření tolerance proti viru WDV v rostlinách se jako vhodnější jeví miRNA. Hlavními faktory jsou obavy ze snížené aktivity siRNA při nižších teplotách (Hu *et al.*, 2011) a nespecifická aktivita proti rostlinným RNA (Xu *et al.*, 2006). Naopak u miRNA byla experimentálně prokázána aktivita i při snížené teplotě a rozdílný proces zpracování funkční miRNA snižuje možnost nespecifické aktivity (Niu *et al.*, 2006). Virus může překonat toleranci rostliny mutací v komplementární sekvenci RNAi (Lin *et al.*, 2009).

Možným řešením je současná transformace několika sekvencí RNAi cílících na rozdílné sekvence v genomu viru (Fahim *et al.*, 2012). Další překážkou je exprese proteinů potlačujících RNAi některými viry (Noris *et al.*, 2004).

Tolerance proti virovým patogenům lze dosáhnout i pomocí systému CRISPR/Cas, který je v současnosti důležitým nástrojem pro editaci genů. (Makarova *et al.*, 2020). Systém CRISPR/Cas je přirozeně se vyskytující systém adaptivní imunity bakterií a archeí proti invazivním nukleovým kyselinám virů a plazmidů (Barrangou *et* Marraffini, 2014). Systém se skládá ze dvou částí CRISPR lokusu a Cas nukleázy. CRISPR lokus je tvořen krátkými úseky DNA-spacery, pocházejícími z invazní nukleové kyseliny, oddělenými v pravidelných intervalech repeticemi. CRISPR lokus je transkribován jako jedna primární CRISPR RNA (pre-CRISPR RNA – pre-crRNA), která je následně zpracována na jednotlivé CRISPR RNA (CRISPR RNA – crRNA), tvořené spacerem a přiléhající repeticí. crRNA s pomocí transaktivační RNA (trans-acting – tracrRNA) vytváří komplex s Cas nukleázou a navádí jej na komplementární sekvenci DNA nebo RNA, kterou Cas nukleáza rozštěpí (Makarova *et al.*, 2020).

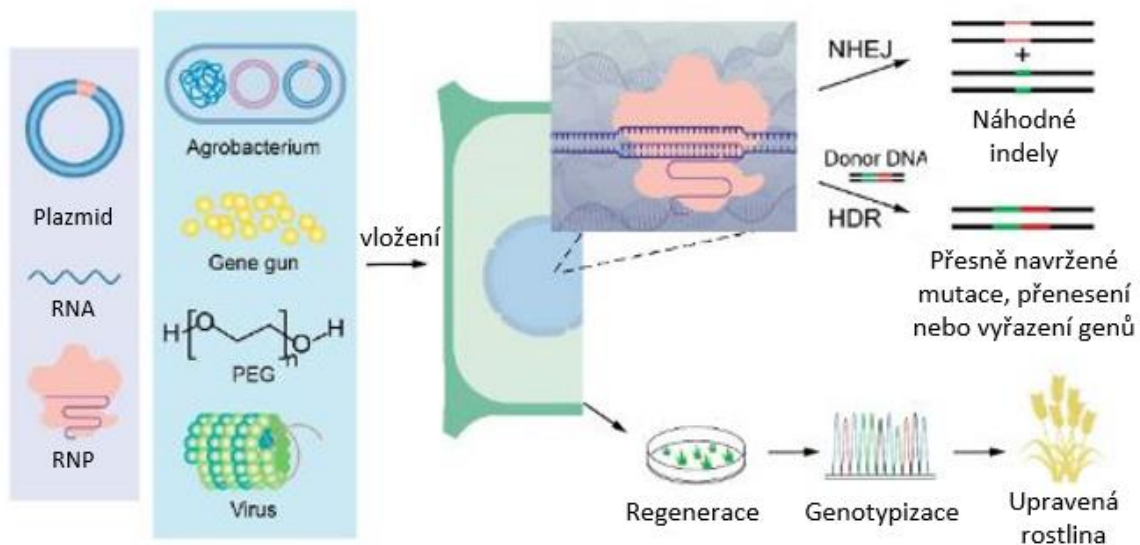
3.5.1 Technologie editace genů

Technologie editace genomu je založena na schopnosti sekvenčně specifických nukleáz vytvářet dvouřetězcové zlomy (double-stranded breaks – DSBs) DNA na konkrétních místech chromozomů (Yin *et* Qiu, 2019). Nukleázou vytvořený zlom je opraven buď nehomologním spojením konců (non-homologous end joining – NHEJ) nebo homologií řízenou opravou (homology directed repair – HDR) (Obrázek 4) (Sonoda *et al.*, 2006). Oprava DSB pomocí systému NHEJ je nepřesná a vede ke vzniku různě velkých inzercí nebo delecí v místě DSB. Tyto posunové mutace způsobují změnu čtecího rámce, která vede k inaktivaci genů (Song *et al.*, 2016). Systém HDR využívá k opravě DSB jako vzor homologní sekvenci DNA. Umožňuje tak inserce sekvencí nebo zavedení bodových mutací pomocí rekombinace lokusů (Belhaj *et al.*, 2013).



Obr. 4. Mechanismy opravy dvouřetězcových zlomů DNA. Převzato: Robertson *et al.*, 2022.

Dříve byly pro editaci genomu využívány nukleázy zinkových prstů (zinc finger nuclease – ZFN) a efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům (transcription activator like effector nuclease – TALEN) (Boch *et al.*, 2009). ZFN a TALEN vedly k velkému pokroku v možnostech genového inženýrství, byly však příliš náročné pro optimalizaci a během poslední dekády byly nahrazeny jinými technologiemi editace genů převážně nově objeveným systémem CRISPR/Cas (Obrázek 5) (Gaj *et al.*, 2013).



Obr. 5. Schématické znázornění editace genomu pomocí CRISPR/Cas. Převzato: Zhang *et al.*, 2022.

3.5.2 CRISPR/Cas systémy

Počet známých typů a subtypů systému CRISPR/Cas se neustále zvyšuje, stejně jako naše znalosti o jeho funkcích (Makarova *et al.*, 2020). Předmětem výzkumu v genomovém inženýrství jsou především systémy CRISPR/Cas druhé třídy: CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas12a a CRISPR/Cas13a (Obrázek 6) (Robertson *et al.*, 2022). První efektorovou nukleázou ze skupiny Cas proteinů, použitou pro editaci genomu byl protein Cas9 pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus pyogenes* Cas9 – SpCas9). V systému CRISPR/Cas je Cas9 řazen do druhé třídy, typu II. V přirozené podobě systému CRISPR/Cas9 je pre-crRNA rozštěpena pomocí tracrRNA a RNAázy III na jednotlivé crRNA. Vzniklá crRNA společně s tracrRNA vytváří komplex s Cas9 nukleázou. Následně crRNA navádí Cas9 nukleázu na komplementární sekvence v invazní molekule dsDNA plazmidu nebo viru, kterou Cas9 nukleáza rozštěpí (Van Der Oost *et al.*, 2014).

Aplikaci systému CRISPR/Cas9 v genomovém inženýrství umožnilo sloučení crRNA a tracrRNA do jediné sgRNA. Výsledná sgRNA se skládá z krátké vlásenkové RNA (short hairpin RNA – shRNA) zajišťující vytvoření komplexu sgRNA s Cas9 nukleázou a naváděcí RNA (guide RNA – gRNA) o velikosti 20 nukleotidů navádějící Cas9 nukleázu na komplementární cílovou sekvenci. Podmínkou pro rozpoznání cílové sekvence systémem

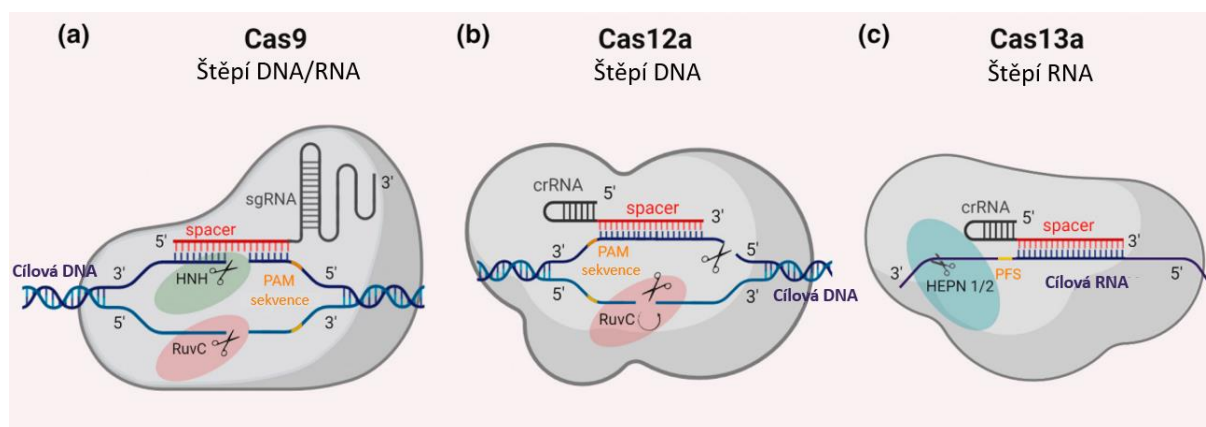
CRISPR/Cas9 je přítomnost přilehlého protospacerového motivu (protospacer adjacent motif – PAM) tvořeného nukleotidy NGG, nacházejícího se bezprostředně za cílovou sekvencí DNA. Protein Cas9 nese dvě nukleázové domény, RuvC a HNH, z nichž každá štěpí jedno z vláken dsDNA. (Molla *et al.*, 2020).

Systém CRISPR/Cas12a rozpoznává PAM tvořený nukleotidy TTN před cílovou sekvencí ssDNA nebo dsDNA a vytváří DSBs s lepivými konci až za cílovou sekvencí. Protein Cas12a obsahuje stejně jako Cas9 RuvC nukleázovou doménu, ale už neobsahuje HNH nukleázovou doménu. (Makarova *et al.*, 2015). Schopnost systému CRISPR/Cas12a přesně naprogramovat sekvenci lepivého konce by bylo možné použít pro vložení navržené sekvence DNA ve správné orientaci a na přesných pozicích pomocí komplementárních konců DNA prostřednictvím HDR. Tím by bylo možné využít Cas12a pro aktivaci genů (Zetsche *et al.*, 2015).

Oproti většině dosud známých systémů CRISPR/Cas vyznačujících se nukleázovou aktivitou proti dsDNA, cílí CRISPR/Cas13a na ssRNA. Protein Cas13a se skládá ze dvou laloků, alfa helikálního rozpoznávacího (recognition – REC) laloku a nukleázového (nuclease – NUC) laloku. Lalok REC nese N-terminální doménu (N-terminal domain – NTD) a Helical-1 doménu. Lalok NUC nese Helical-2 doménu a dvě konzervativní nukleotid-vazebné domény vyšších eukaryot a prokaryot (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain – HEPN) s nukleázovou aktivitou (Liu *et al.*, 2017). Obě domény HEPN mají rozdílnou funkci. Jedna HEPN doména zprostředkovává zpracování CRISPR lokusu, zatímco druhá štěpí cílovou RNA (East-Seletsky *et al.*, 2016). Po prvním rozštěpení cílové sekvence RNA začíná protein Cas13a nespecificky štěpit cílovou i mimo cílovou RNA (East-Seletsky *et al.*, 2017). Oproti technologii RNAi, která štěpí RNA v cytoplazmě, štěpí CRISPR/Cas13a cílovou RNA v jádře. Protein Cas13a může být rozdílnými gRNA současně naváděn na více RNA sekvencí. Aktivita CRISPR/Cas13a systému může být s využitím specifických promotorů limitována pouze pro určité pletivo (Abudayyeh *et al.*, 2017). Cílenou mutací v doméně HEPN lze u proteinu Cas13a potlačit nukleázovou aktivitu. Tento „mrtvý“ Cas13a (dead Cas13a – dCas13a) má ale stále schopnost se specificky vázat na RNA. Takto upravený protein Cas13a lze využít pro regulaci, značení nebo detekci cílové RNA (East-Seletsky *et al.*, 2017).

Využití systému CRISPR/Cas13a proti RNA virům v rostlinách bylo popsáno v posledních letech (Aman *et al.*, 2018). Předběžná studie prokázala, že systém CRISPR/Cas13a dokáže cílit a degradovat virovou RNA a zajistit toleranci proti RNA virům v jednoděložných rostlinách. V transgenních rostlinách rýže nesoucí CRISPR/Cas13a se třemi crRNA komplementárními k sekvencím v genomech viru jižní černě pruhované zakrslosti rýže (*Southern rice black-*

streaked dwarf virus – SRBSDV) a viru pruhované mozaiky rýže (*Rice stripe mosaic virus* – RSMV) byla potvrzena inhibice infekce (Zhang *et al.*, 2019).



Obr. 6. Schématické porovnání systémů CRISPR/Cas druhé třídy. Převzato: Robertson *et al.*, 2022.

3.5.3 Využití technologie CRISPR/Cas9, jako obranný mechanismus proti virům

Rostlinné viry infikují široký okruh kulturních plodin a jsou zodpovědné za značné ztráty na množství a kvalitě sklizně (Nicaise, 2014). Bylo prokázáno, že CRISPR/Cas9 zprostředkovanou editací DNA lze použít jako obranný mechanismus proti DNA virům. Systém CRISPR/Cas9 lze použít pro vytvoření tolerance v rostlinách buď editací rostlinného genomu v genech S a R nebo naváděním Cas9 nukleázy pomocí sgRNA na komplementární sekvence v genomu patogenu (Obrázek 7) (Robertson *et al.*, 2022). Genom rostlinných virů z čeledi *geminiviridae* je tvořen ssDNA, ale během replikace vytváří meziprodukty dsDNA, které jsou vhodným cílem pro systém CRISPR/Cas9 (Ali *et al.*, 2015).

V modelových rostlinách *Nicotiana benthamiana* a *Arabidopsis thaliana* byl úspěšně použit systém CRISPR/Cas9 pro vytvoření tolerance proti geminivirům. Ve virových genomech byly zvoleny cílové oblasti pro navržení sgRNA v genech pro replikační protein, přenosový protein, obalový protein nebo v intergenní oblasti (Ji *et al.*, 2015).

Bylo publikováno několik prací zabývajících se využitím CRISPR/Cas9 zprostředkované tolerance proti geminivirům v kulturních plodinách. Například v roce 2018 publikoval Tashkandi *et al.* práci zabývající se použitím systému CRISPR/Cas9 pro vytvoření tolerance

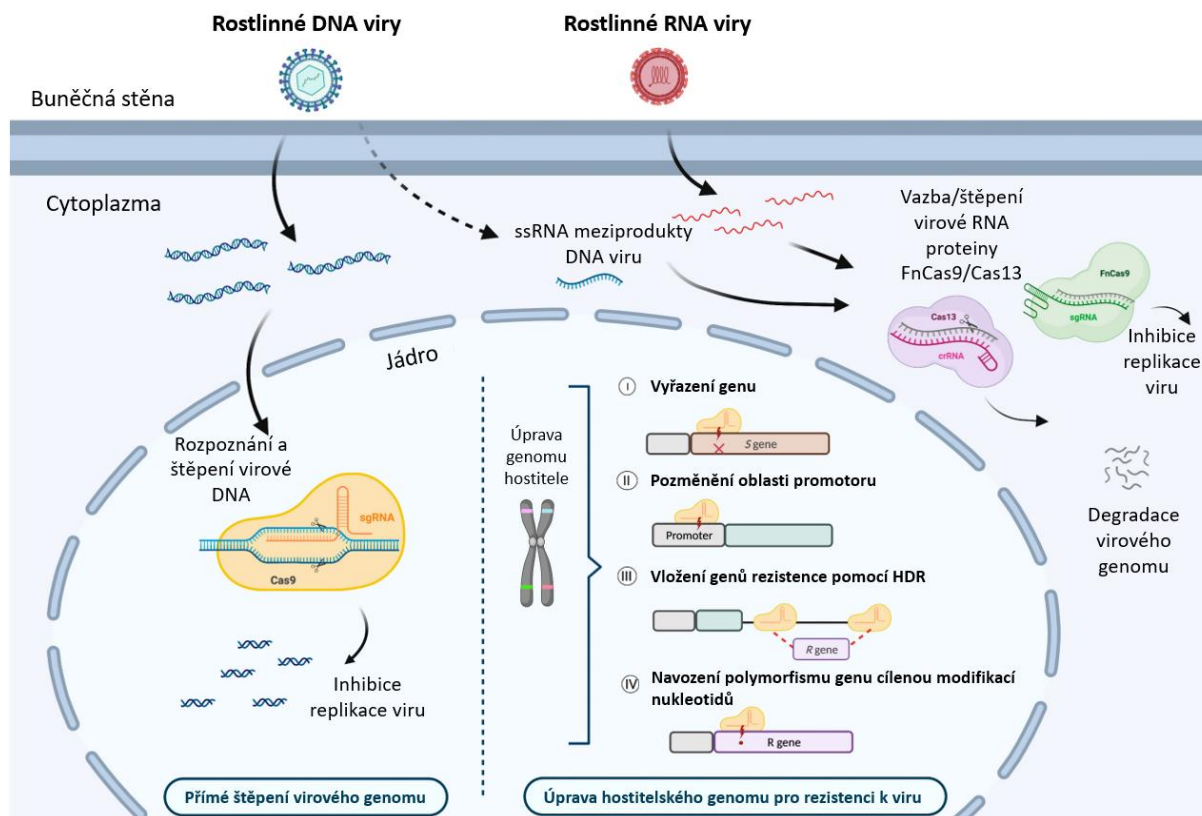
k viru žluté kadeřavosti listů rajčete (*Tomato yellow leaf curl virus* – TYLCV) v rostlinách rajčete.

Dále byla publikována práce zabývající se vytvořením tolerance v rostlinách manioku jedlého (*Manihot esculanta*) pomocí systému CRISPR/Cas9 proti viru africké mozaiky manioku (*African cassava mosaic virus* – ACMV), avšak bez vytvoření účinné tolerance. Vysvětlením nízké efektivity systému CRISPR/Cas9 může být vyšší efektivita replikace viru než nukleázová aktivita Cas9, která vede ke vzniku mutací v cílové sekvenci viru rozpoznávané sgRNA. Pozměněná sekvence již není rozpoznávána sgRNA, a tudíž ani štěpena Cas9 nukleázou (Mehta *et al.*, 2019).

Systém CRISPR/Cas9 byl použit k inaktivaci endogenního viru pruhovitosti banánovníku (*Banana streak virus* – BSV) v rostlinách banánovníku (*Musa balbisiana*). Inaktivace byla založena na indukcii mutací ve třech navržených pozicích genomu BSV pomocí systému CRISPR/Cas9. Cílem mutací v genomu viru bylo zabránit transkripci/translaci virových proteinů. Šest rostlin s mutacemi ve všech třech zvolených pozicích nevykazovalo symptomy BSV. Dvě rostliny s mutacemi ve dvou zvolených pozicích vykazovaly mírné symptomy (Tripathi *et al.*, 2019).

Většina rostlinných virů (60 %) má RNA genom, tyto viry představují vážné ohrožení pro zemědělskou produkci (Lefkowitz *et al.*, 2017). Některé varianty proteinu Cas9 vykazují RNA specifickou aktivitu a nabízí možnost regulace genové exprese na úrovni mRNA nebo toleranci proti RNA virům. Jedná se o upravenou formu proteinu SpCas9 bez nukleázové aktivity označovanou jako RNA rozpoznávající Cas9 (RNA-targeting Cas9 – RCas9), který se specificky váže na jednovláknovou RNA (single-stranded RNA – ssRNA) díky syntetické sekvenci nesoucí PAM (Nelles *et al.*, 2016). Dalším Cas9 proteinem se specifitou pro RNA bez nukleázové aktivity je Cas9 pocházející z bakterie (*Francisella novicida* Cas9 – FnCas9), který byl použit pro vytvoření tolerance proti RNA viru okurkové mozaiky (*cucumber mosaic virus* – CMV) v rostlinách tabáku a huseníčku (Zhang *et al.*, 2018).

Posledním trendem ve vývoji CRISPR/Cas systémů proti RNA virům je použití jedné polyvalentní gRNA (polyvalent gRNA – pgRNA) navržené tak, aby jeden spacer mohl cílit na více sekvencí v genomu viru nebo na sekvenci v genomech rozdílných virů. Tento princip využití CRISPR/Cas systému by zabránil šíření a expresi RNA virů v rostlinách efektivněji než monovalentní gRNA (Bagchi *et al.*, 2022).



Obr. 7. Schéma strategií pro vytvoření tolerance proti virům pomocí systému CRISPR/Cas. Převzato: Robertson *et al.*, 2022.

3.5.4 Využití technologie CRISPR/Cas9 u ječmene

V poslední době je pro výzkum ječmene využívána technologie CRISPR/Cas9. Prostřednictvím této technologie lze získávat mutanty a provádět studie funkce jednotlivých genů. Například v rostlinách jarního ječmene odrůdy Golden Promise byla pomocí technologie CRISPR/Cas9 provedena inaktivace genu *NUD*. Gen *NUD* ovlivňuje tvorbu pluchatých obilek, jeho umlčením cílenou mutagenézou systémem CRISPR/Cas9 lze oproti tradičním technikám šlechtění získat nové odrůdy s nahými obilkami, a to rychleji bez přenesení nežádoucích vlastností (Gerasimova *et al.*, 2020).

V roce 2019 byla publikována práce o vytvoření tolerance proti WDV v rostlinách ječmene pomocí systému CRISPR/Cas9. Pro vytvoření tolerance byly navrženy čtyři rozdílné sgRNA, které naváděly Cas9 nukleázu na konzervativní sekvence v klíčových oblastech genomu WDV. Nukleázová aktivita Cas9 byla potvrzena pouze u jedné ze čtyř sekvencí komplementárních k sgRNA (Kis *et al.*, 2019).

3.6 Právní statut geneticky editovaných rostlin

Jedná se o nové inovativní metody šlechtění (New Breeding Techniques – NBT), kdy jsou rostliny s novými vlastnostmi získávány pomocí editace genů (Gene Editing – GE). Za editované rostliny jsou považovány takové, které byly získány jednou ze čtyř různých technik cílené mutagenese: CRISPR/Cas, TALEN, mutagenézí řízenou meganukleázami a pomocí oligonukleotidů.

Cílem GE je stejně jako v případě geneticky modifikovaných organismů (genetically modified organism – GMO) získání požadovaných vlastností v plodinách. Těmito vlastnostmi mohou být zvýšení výnosů, vytvoření tolerance k pesticidům, vytvoření rezistence proti škůdcům, získání větší odolnosti proti suchu nebo zaplavení a změna nutričního složení plodiny. Techniky GE umožňují přesnější a rychlejší modifikaci genů než klasické techniky šlechtění (<https://www.biotrin.cz/database-nbt-plodin/>).

Na základě rozhodnutí Evropského soudního dvora v roce 2018 byly organismy získané technikami NBT zařazeny v EU do kategorie GMO. Jsou proto považovány za GMO a podléhají stejné legislativě (New plant-breeding techniques (europa.eu)).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Pro transformaci tří různých sgRNA (sgRNA_CP, sgRNA_MP a sgRNA_Rep) byly v rámci diplomové práce použity transgenní rostliny „polotovary“ jarního ječmene (*H. vulgare*), odrůdy Golden Promise nesoucí Cas9 nukleázu. Transformace Cas9 byla provedena v roce 2018 dle metodiky Harwood *et al.*, 2009.

Ke klonování expresního vektoru byly použity chemickokompetentní bakterie *E. coli*, kmen DH5 α . Bakterie mají schopnost přijmout plazmidovou DNA z vnějšího prostředí po krátkodobém vystavení teplotě 42 °C. Těto vlastnosti se využívá v genovém inženýrství.

Pro transformaci rostlin jarního ječmene byly použity elektrokompetentní bakterie *A. tumefaciens*, kmen AGL1, který dokáže přijmout plazmidovou DNA z vnějšího prostředí po vystavení elektrickému pulzu. *A. tumefaciens* je přirozeně se vyskytující patogenní bakterie rostlin, která je schopná inkorporovat T-DNA z tumor indukujícího (tumor inducing – Ti) plazmidu do genomu rostliny. V genovém inženýrství jsou bakteriální geny T-DNA nahrazeny zájmovými geny.

4.1.2 Chemikálie

EDTA, SIGMA-ALDRICH, 129 K0015

Ethidium bromid, SIGMA-ALDRICH, 1.11608

Chlornan sodný (NaClO), SIGMA-ALDRICH, 71696-2,5L

Isopropanol, SERVA, 45629.01

Marker molekulové hmotnosti 1, Bioline, BIO-33025

Marker molekulové hmotnosti 2, Bioline, BIO-33039

T4 DNA ligáza, NEB, M0202

T4 ligázový pufr (10X), NEB, M0202

Restrikční nukleáza BsaI-HF, NEB, R3535

Restrikční nukleáza EcoRI-HF, NEB, R3101

Restrikční nukleáza BamHI-HF, NEB, R3136S
rCutSmart™ Buffer, NEB
Gel Loading Dye, Purple (6X). NEB, B7024S
MS médium, Duchefa, M0222.0050
MS médium, Duchefa, M0221
MS médium, Duchefa, M0238
Phytigel, P8169-500G
Maltóza monohydrát, MERCK, 6363-53-7
Casein hydrolysate, SIGMA-ALDRICH, 91079-40-2
Myo-inositol, Duchefa, 010214.03
Prolin, Duchefa, 015545.02
Glutamin, Duchefa, 014300.04
Thiamin HCl
Kyselina 3,6-dichlor-3-methoxybenzoová (Dicamba)
Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D)
6-Benzylaminopurin (BAP)
Timentin, Duchefa, 016559.03
Kanamycin, Duchefa, 011216.25
Rifampicin, SLBH2676V
Tetracyklin, Duchefa, T0150
NaCl, SIGMA-ALDRICH, 31658 1202
Phyto agar, Duchefa, P1003.1000
Primer F Generi Biotech
Primer R Generi Biotech
ReadyMix, SIGMA-ALDRICH, R2523-100RXN
Sacharosa, Lachner, 40135-APO
SDS, SIGMA-ALDRICH, 306040897
TRIS HCl, SIGMA-ALDRICH, 93362
UltraPure Agarose, Invitrogen, 16500-500
Voda (DNA/RNA free), SIGMA-ALDRICH, W5402

4.1.3 Přístroje

Analytické váhy M124Ai, BELengineering, Itálie

Binokulární lupa, VWR, USA

Centrifuga D1008, DLAB, Čína

Centrifuga Jouan BR4i, DJB, UK

Centrifuga 5418, Eppendorf, Německo

Centrifuga 5804Rs, Eppendorf, Německo

Dokumentační zařízení pro fluorescenci/luminiscenci G:BOX, SYNGENE, UK

Elektroporátor, CELL JECT, Thermo Scientific

Inkubátor INCUCELL 55, BMT,

Inkubátor INCU-Line, WVR, USA

Kultivační komora Adaptis A1000, Conviron, Kanada

Laminární flowbox, GELAIRE, Austrálie

Laminární flowbox, MERCI, ČR

Magnetická míchačka vícemístná bez topení POLY 15, Thermo Scientific

Orbitální třepačka-Inkubátor, ES-20, Biosan

pH metr, WTW, USA

Sestava PC ibronze II 1702, HAL 3000, CZ

Spektrofotometr/Fluorometr DS-11 FX, DeNovix, USA

Technické váhy, BOECO GERMANY, Německo

Termocycler T100™, Bio-Rad, USA

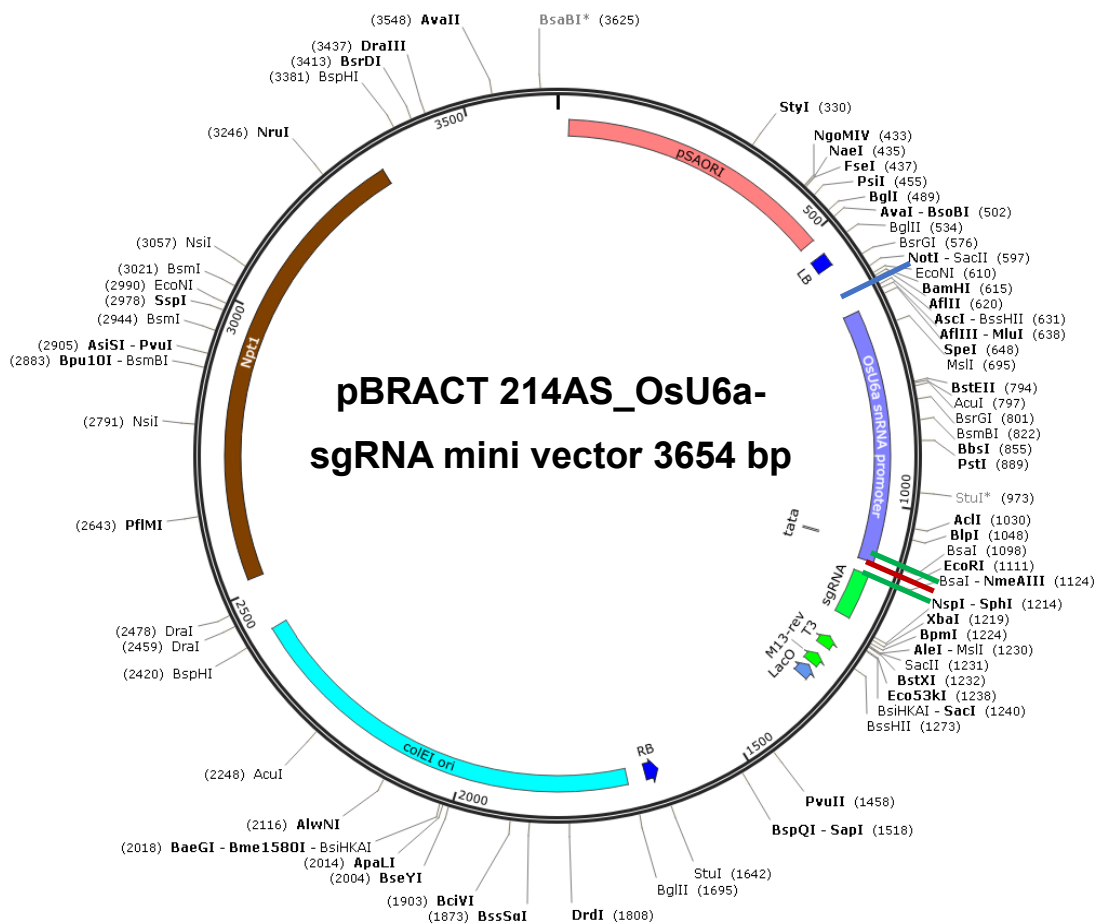
WARIOMAG, USA

Zdroj napětí pro elektroforézu PowerPac™, BioRad, USA

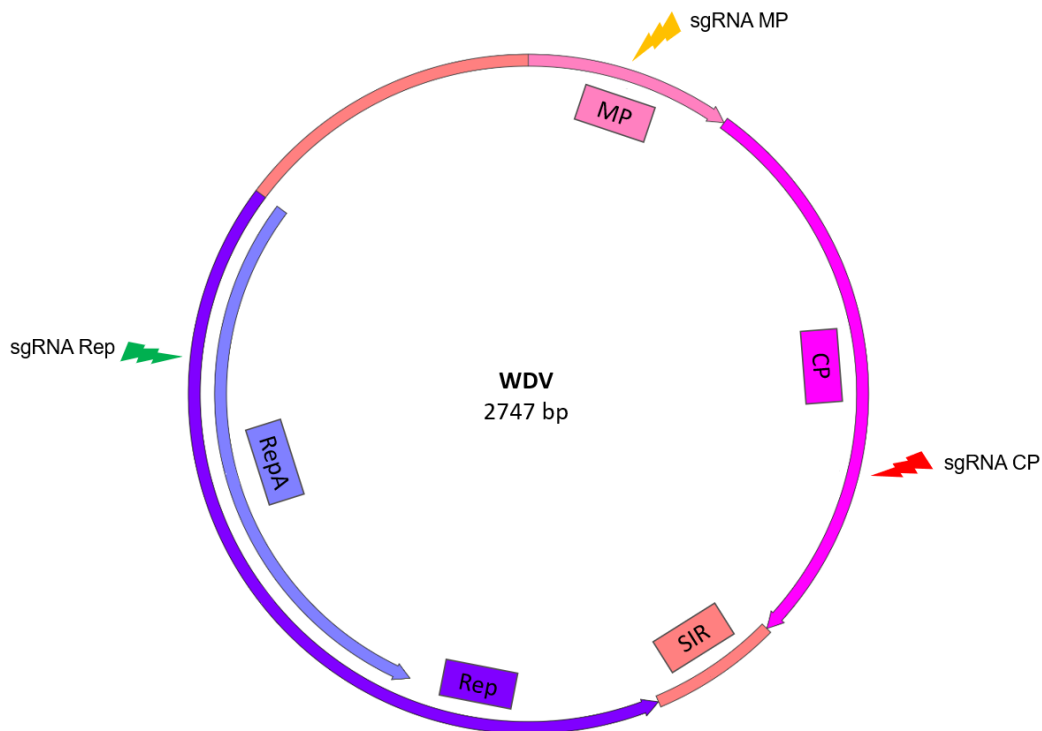
4.1.4 Vektory a protospacery

Pro vložení tří různých sgRNA (sgRNA_CP, sgRNA_MP a sgRNA_Rep) byl použit vektor pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA mini vector, o velikosti 3654 bp (Obrázek 8). Vektor byl označen číslem 318/10-5. Součástí vektoru je OsU6a sgRNA promotor pocházející z rýže. Mezi promotor a sgRNA (restrikční místo BsaI) byly vkládány sekvence protospacerů pro geny viru (CP, MP a Rep), každý samostatně (Obrázek 9). Cílem bylo vytvořit tři vektory obsahující protospacery WDV_CP, WDV_MP a WDV_Rep:

1. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, expresní vektor označen číslem 341
2. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP, expresní vektor označen číslem 342
3. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep, expresní vektor označen číslem 343

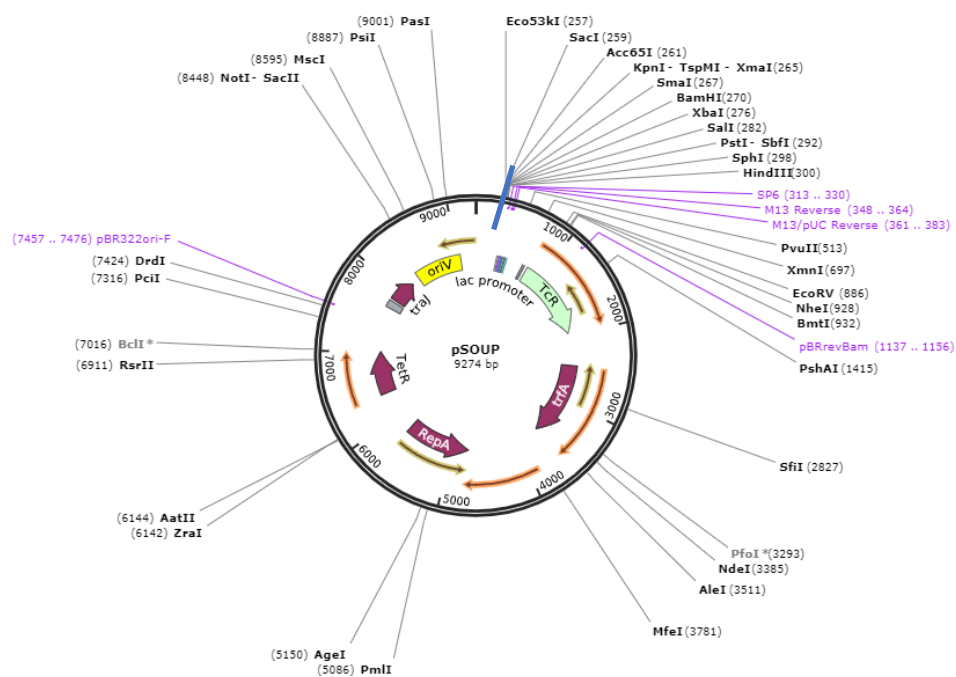


Obr. 8. Schéma pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA mini vector. Restrikční místa: BsaI vyznačeno zeleně, EcoRI vyznačeno červeně, BamHI vyznačeno modře. Připraveno v programu SnapGene.



Obr. 9. Schéma genomu WDV s návrhy pozic protospacerů.

Pro replikaci vektoru pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA v *A. tumefaciens* AGL1 byl použit pomocný plazmid pSOUP (Obrázek 10) (www addgene: pSOUP).



Obr. 10. Schéma plazmidu pSOUP. Restriční místa: BamHI vyznačeno modře, Převzato: Addgene: pSOUP.

Sekvence protospacerů v genech WDV CP, MP a Rep byly navrženy pracovníkem LRR, Laboratoře růstových regulátorů Mgr. Tomášem Vlčkem, Ph.D. (Tabulka 1).

Jednotlivé sekvence protospacerů (F a R) s přesahy genů byly syntetizovány GENERI BIOTECH s. r. o. (www.generi-biotech.com).

Tabulka 1. Sekvence protospacerů WDV_CP, WDV_MP a WDV_Rep s přesahy, (označeny velkými písmeny).

Cílený gen	Název sekvence protospaceru	Sekvence s přesahy pro klonování
WDV CP	PROTO_F_1st_WDV-CP	GCCGgccactaccagttgtagcgt
	PROTO_R_1st_WDV-CP	AAACacgctacaactgggtagtggc
WDV MP	PROTO_F_1st_WDV-MP	GCCGgagcaagccaagcaacgccta
	PROTO_R_1st_WDV-MP	AAACtaggcgttgcttgcttgctc
WDV Rep	PROTO_F_1st_WDV-Rep	GCCGgcaatgccttaaacctccgta
	PROTO_R_1st_WDV-Rep	AAACtacggaggtttaaggcattgc

Pro restrikční štěpení vektoru a pomocného plazmidu byly použity restrikční enzymy BsaI-HF, EcoRI-HF a BamHI-HF (Tabulka 2).

Tabulka 2. Sekvence použitých restrikčních míst.

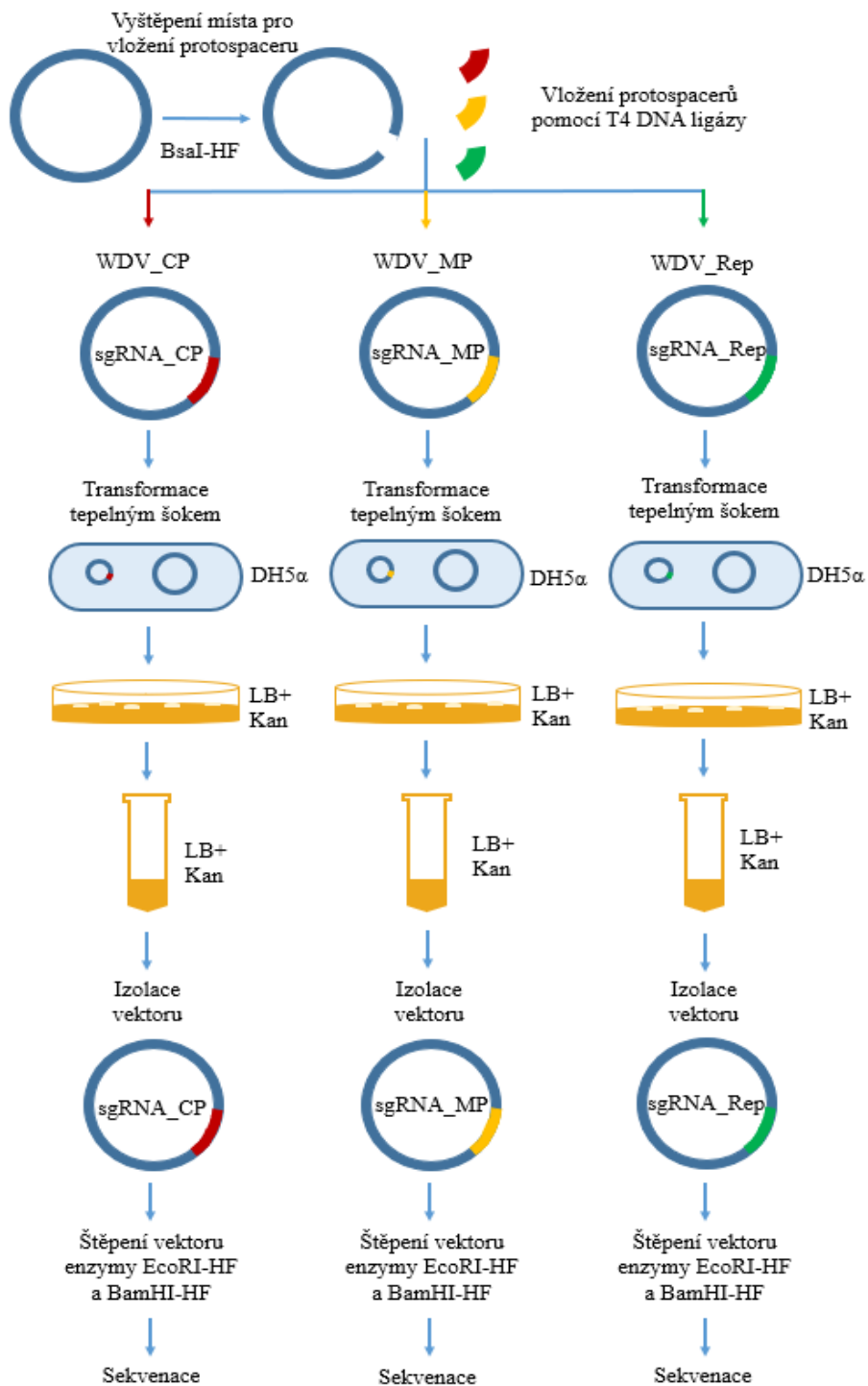
Restrikční nukleáza	Restrikční sekvence
BsaI-HF	5'-GGTCTCN ∇ -3'
	3'-CCAGAGN(N) \wedge -5'
EcoRI-HF	5'-G ∇ AATTC-3'
	3'-CTTAA \wedge G-5'
BamHI-HF	5'-G ∇ VGATCC-3'
	3'-CCTAG \wedge G-5'

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Klonování expresního vektoru

4.2.1.1 Vyštěpení restriční místa z expresního vektoru

Z vektoru pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA mini vector bylo pomocí restričního enzymu BsaI vyštěpeno místo pro vložení protospacerů WDV_CP, WDV_MP a WDV_Rep (Obrázek 11).



Obr.11. Schéma klonování protospaceru WDV_CP, WDV_MP nebo WDV_Rep ve vektoru pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA mini vector.

Vektor pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA mini vector byl označen číslem 318/10-5

1. Na základě koncentrace pDNA bylo stanoveno složení směsi pro restriční štěpení (Tabulka 3).
2. Štěpení vektoru restriční endonukleázou BsaI-HF probíhalo 24 hodin při 37 °C.
3. Vektor byl separován v 1% agarózovém gelu a izolován pomocí kitu QIAEX II Gel Extraction Kit.
4. Čistota izolované pDNA byla stanovena pomocí spektrofotometru (DeNovix).
5. Velikost linearizovaného vektoru byla ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu.

Tabulka 3. Složení směsi pro restriční štěpení pDNA.

Složka	Objem [μ l]
BsaI-HF	4
p318/10-5	8
10X NEBuffer	8
H ₂ O	60
Celkem	80

4.2.1.2 Ligace protospacerů do expresního vektoru

Do vyštěpeného restričního místa vektoru 318/10-5 byl pomocí T4 ligázy vložen jeden ze tří rozdílných protospacerů (WDV_CP, WDV_MP, WDV_Rep). Ligace byla provedena dle protokolu: Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202) | NEB (Tabulka 4).

Tabulka 4. Složení reakce pro ligaci protospacerů.

Složka	Objem [μ l]
Ligáza T4	1
Buffer	2
Protospacer	1
p318/10-5	5
H ₂ O	11
Celkem	20

4.2.1.3 Transformace kompetentních buněk *E. coli* DH5 α

Do chemickokompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α byl pomocí tepelného šoku transformován vektor 318/10-5 s vloženým protospacerem dle protokolu: Addgene: Protocol - Bacterial Transformation.

4.2.1.4 Izolace plazmidové DNA z kompetentních buněk *E. coli* DH5 α

Izolace pDNA z buněk *E. coli* kmene DH5 α byla provedena podle protokolu uvedeného v kitu QIAprep Spin Miniprep Kit-QIAGEN (kat. č. 27104). Přítomnost vektorů byla ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu.

4.2.1.5 Ověření vložení protospaceru do expresního vektoru

Vložení protospaceru do expresního vektoru bylo ověřeno pomocí štěpení plazmidů restriktivními nukleázami EcoRI-HF a BamHI-HF.

1. Na základě koncentrace pDNA bylo stanoveno složení směsi pro restriktivní štěpení vektoru.
2. Štěpení vektoru restriktivními nukleázami probíhalo 24 hodin při 37 °C.
3. Vložení protospacerů bylo ověřeno porovnáním velikosti linearizovaných vektorů s markerem molekulové hmotnosti a linearizovaným vektorem 318/10-5 po elektroforetické separaci v 1% agarózovém gelu.

Vložení protospaceru do expresního vektoru bylo ověřeno sekvenací na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

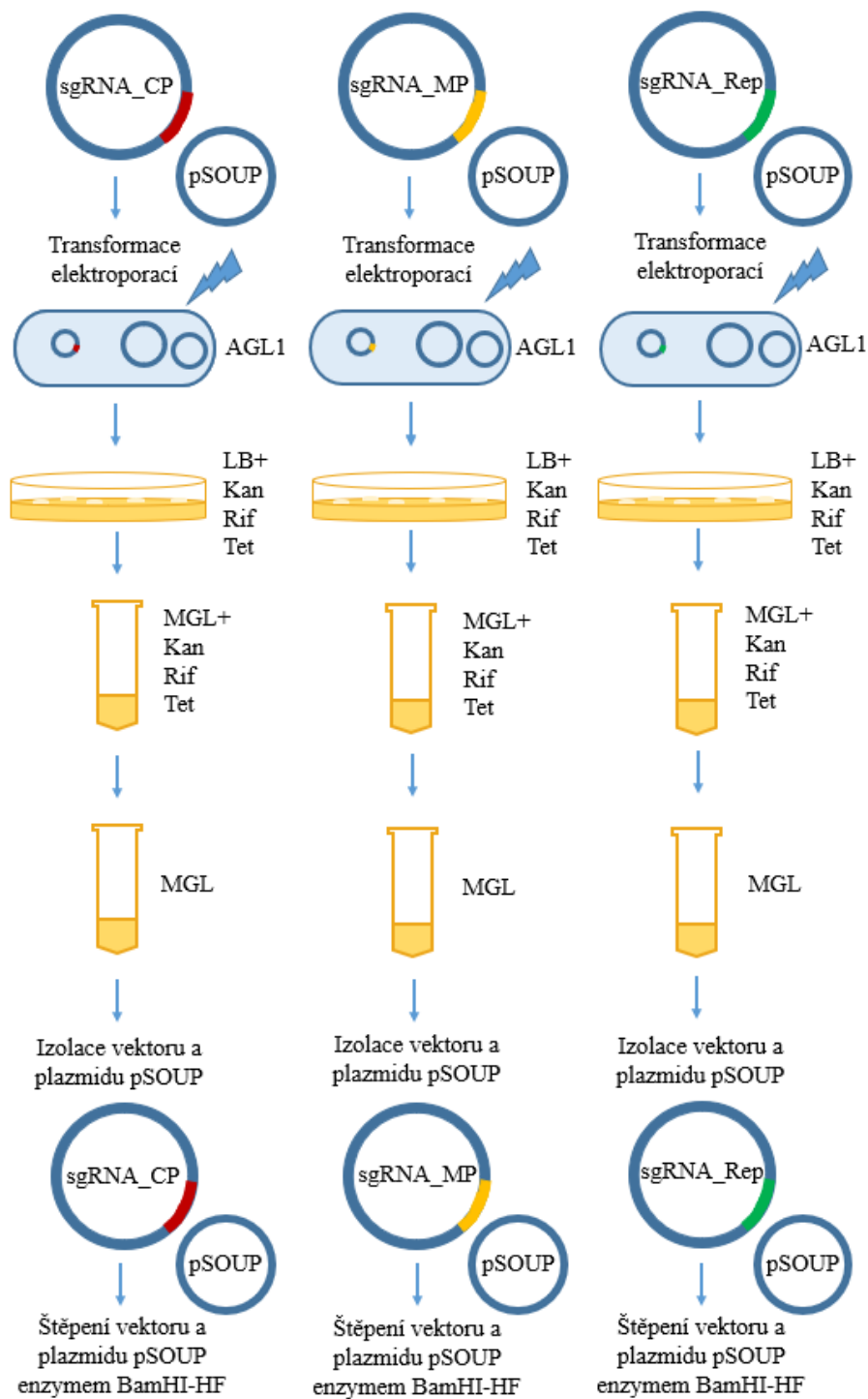
Vektory s vloženým protospacerem:

1. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, vektor označen číslem **340**
2. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, vektor označen číslem **341**
3. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP, vektor označen číslem **342**
4. pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep, vektor označen číslem **343**

4.2.2 Transformace kompetentních buněk *A. tumefaciens* AGL1

Vektory byly společně s pSOUP, každý samostatně transformovány do kompetentních buněk *A. tumefaciens* kmene AGL pomocí elektroporace (Obrázek 12). Transformace byla provedena dle protokolu: An Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation Protocol for Hexaploid and Tetraploid Wheat - Hayta - 2021 - Current Protocols - Wiley Online Library.

Z. A. tumefaciens byly izolovány vektory a jejich přítomnost byla ověřena pomocí elektroforézy. Přítomnost protospacerů ve vektorech byla ověřena pomocí restriktivní analýzy enzymem BamHI-HF.



Obr.12. Schéma postupu přípravy expresních vektorů nesoucích protospacer WDV_CP, WDV_MP a WDV_Rep. Transformace vektoru společně s pomocným plazmidem pSOUP do *A. tumefaciens* kmene AGL1.

Expresní vektory určené pro transformaci jarního ječmene:

349/2 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, vektor 341

346/1 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP, vektor 342

359/1, 359/2 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep, vektor 343

4.2.3 Transformace jarního ječmene odrůdy Golden Promise

Transformace nezralých zygotických embryí jarního ječmene odrůdy Golden Promise byla provedena dle protokolu Harwood *et al.*, 2009. Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques.

4.2.4 *In vitro* kultivace explantátů jarního ječmene

Explantáty jarního ječmene odrůdy Golden Promise transformované pomocí *A. tumefaciens* kmene AGL1 byly kultivovány *in vitro* dle protokolu Harwood *et al.*, 2009 bez hygromycinové selekce. Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques.

Média pro transformaci jarního ječmene odrůdy Golden Promise bez hygromycinu byla připravena dle protokolu Harwood *et al.*, 2009. Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques.

4.2.5 Izolace DNA z rostlin jarního ječmene

Z regenerovaných rostlin jarního ječmene byla izolována DNA dle protokolu Edwards *et al.*, 1991.

4.2.6 Ověření přítomnosti sgRNA pomocí PCR analýzy

Ve vzorcích izolované genomické DNA byla pomocí PCR ověřena přítomnost jednotlivých sgRNA. Amplifikované úseky DNA nesoucí OsU6a promotor a jednu ze tří rozdílných sgRNA (sgRNA_CP, sgRNA_MP a sgRNA_Rep) byly separovány v 1% agarózovém gelu.

1. Z jednotlivých komponent byla připravena reakční směs pro PCR (Tabulka 5).
2. Byla provedena PCR s použitím přístroje termocycler (Bio-Rad 100), program PROTO CK OS (Tabulka 6).
3. Pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu byly separovány produkty PCR, k detekci byl použit UV transiluminátor (G:BOX, SYNGENE).

Tabulka 5. Složení reakční směsi PCR, pro jeden vzorek.

Složka reakční směsi	Objem [μ l]
PCR voda	2,5
RedyMix	5
Primer F	0,25
Primer R	0,25
Templát DNA	2
Celkem	10

Tabulka 6. Amplifikace úseku expresní kazety kódující OsU6a promotor a sgRNA proběhla podle programu PROTO CK OS.

Děj	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
Aktivační denaturace	95	3:00	1 x
Denaturace	95	0:20	
Nasedání primerů	59	0:30	38 x
Extenze	72	0:50	
Závěrečná amplifikace	72	5:00	1 x

Primery PROTO CK Os byly navrženy tak, aby amplifikovaly úsek expresní kazety kódující (Tabulka 7):

- 1) OsU6a promotor a sgRNA_CP
- 2) OsU6a promotor a sgRNA_MP
- 3) OsU6a promotor a sgRNA_Rep

Tabulka 7. Sekvence primerů pro amplifikaci úseku expresní kazety tvořeného OsU6a promotorem a sgRNA.

Název primeru	Sekvence	Velikost amplikonu
PROTO CK Os F	5'-CTGAACTAGCCGGTCACCTG-3'	560 bp
PROTO CK Os R	5'-TGTGTGGAATTGTGAGCGGA-3'	

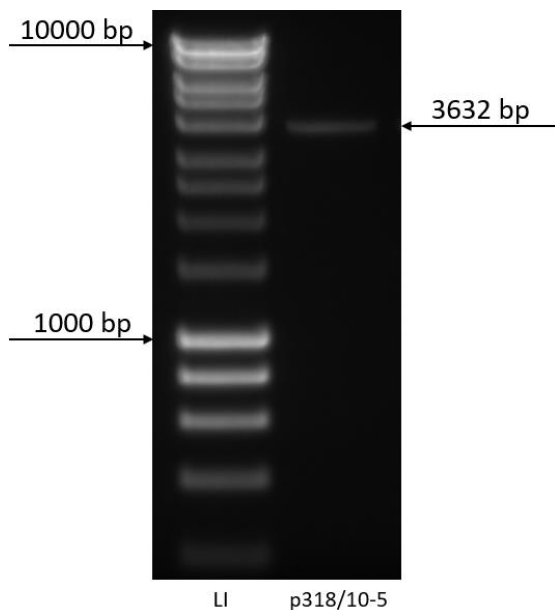
5 VÝSLEDKY

Byly připraveny tři rozdílné expresní vektory vložením tří rozdílných protospacerů komplementárních k úsekům v klíčových genech *CP*, *MP* a *Rep* viru WDV do vektoru pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA. Expresní vektory byly amplifikovány v kompetentních buňkách *E. coli* kmene DH5 α . Z buněk *E. coli* byly izolovány expresní vektory 340 a 341 nesoucí sgRNA_CP, expresní vektor 342 nesoucí sgRNA_MP a expresní vektor 343 nesoucí sgRNA_Rep. Expresní vektory 341, 342 a 343 byly, každý zvlášť, transformovány do kompetentních buněk *A. tumefaciens* kmene AGL1. Expresní vektor 341 nesoucí sgRNA_CP v *A. tumefaciens* byl označen číslem 349. Expresní vektor 342 nesoucí sgRNA_MP v *A. tumefaciens* byl označen číslem 346. Expresní vektor 343 nesoucí sgRNA_Rep v *A. tumefaciens* byl označen číslem 359. Připravené expresní vektory byly každý zvlášť transformovány do buněk jarního ječmene odrůdy Golden Promise. Přítomnost transgenu v regenerovaných rostlinách byla ověřena pomocí PCR analýzy.

5.1 Izolace linearizovaného vektoru s vyštěpeným místem pro vložení protospaceru

Izolace linearizovaného vektoru pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA s vyštěpeným místem pro vložení protospaceru byla ověřena pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu (Obrázek 13).

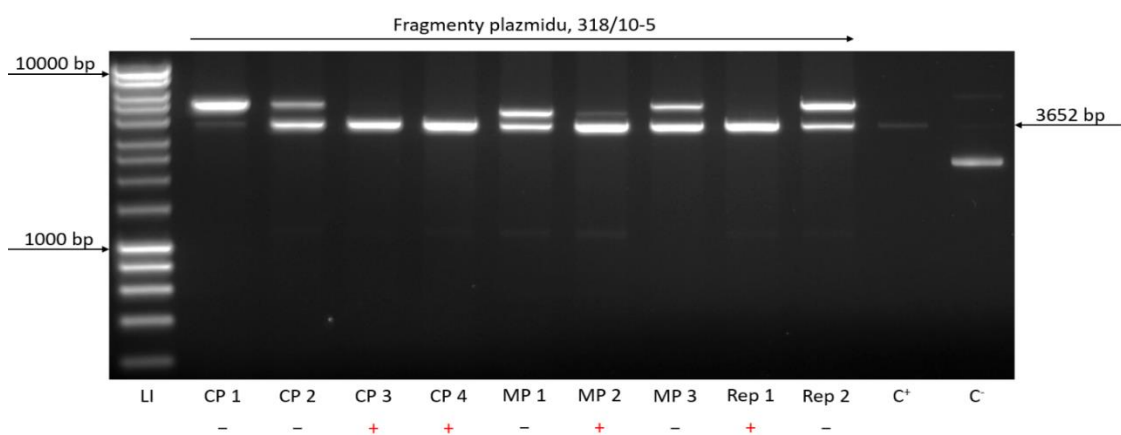
Vektor pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA, bez protospaceru byl označen číslem 318/10-5.



Obr. 13. Detekce linearizovaného vektoru 318/10-5 s vyštěpeným místem pro vložení protospaceru, v 1% agarózovém gelu. LI – Ladder I, p318/10-5 – linearizovaný vektor. Předpokládaná velikost plazmidového fragmentu je 3632 bp.

5.2 Restrikční analýza vektorů izolovaných z *E. coli* DH5α

Vložení sekvence protospaceru (WDV_CP, WDV_MP, WDV_Rep) do expresního vektoru bylo ověřeno restrikčním štěpením vektoru 318/10-5 izolovaného z buněk *E. coli* DH5α pomocí restrikčních nukleáz EcoRI-HF a BamHI-HF (Obrázek 14).



Obr. 14. Elektroforetické ověření přítomnosti protospaceru ve vektoru 318/10-5, restrikční enzymy BamI-HF a EcoRI-HF; LI – Ladder I, 1–9 – linearizovaný vektor 318/10-5, C⁺ – linearizovaný vektor 318/10_5 bez vloženého protospaceru, C⁻ – neštěpený vektor 318/10-5. Předpokládaná velikost linearizovaného vektoru je 3652 bp.

Vektory pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA s vloženým protospacerem byly označeny:

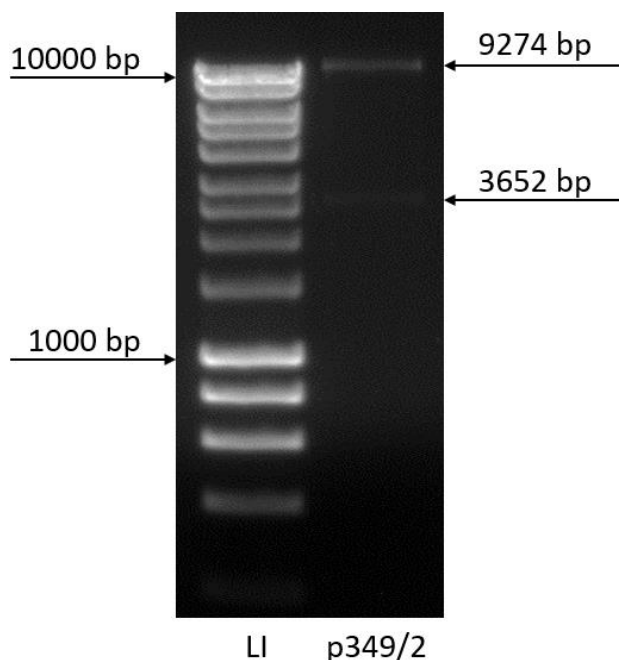
- 340 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, vektor CP3
- 341 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, vektor CP4
- 342 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP, vektor MP2
- 343 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep, vektor Rep1

5.3 Izolace vektorů z *A. tumefaciens* AGL1

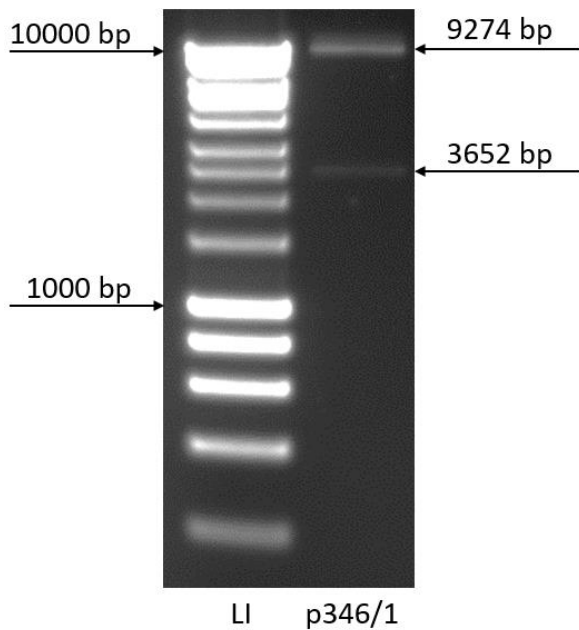
Izolace vektoru pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA a pomocného plazmidu pSoup z buněk *A. tumefaciens* byla ověřena pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu (Obrázek 15, Obrázek 16 a Obrázek 17).

Detekce vektorů izolovaných z *A. tumefaciens*

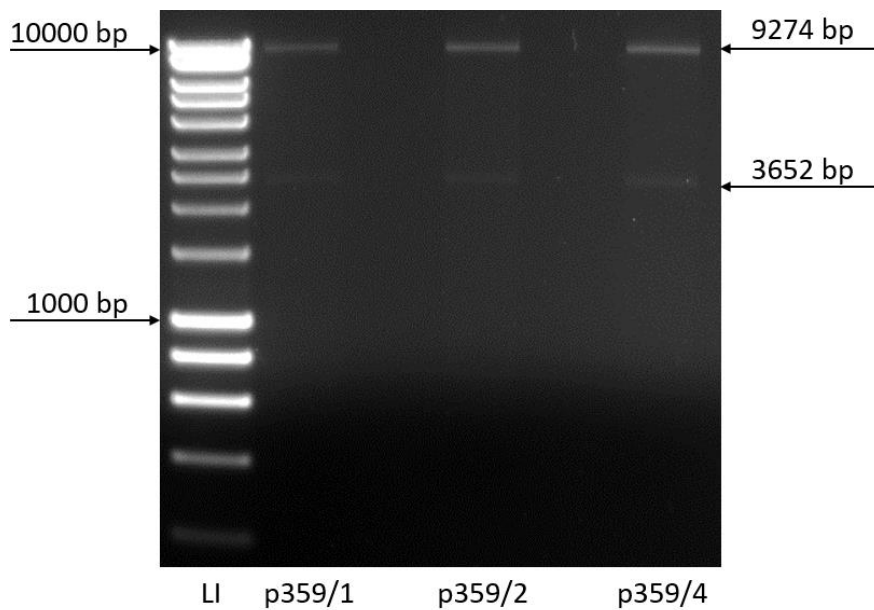
- 349/2 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP
- 346/1 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP
- 359/1, 359/2, 359/4 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep



Obr. 15. Detekce vektoru 349/2 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP) a plazmidu pSOUP, které byly izolovány z *A. tumefaciens*. LI – Ladder I; p349/2 – vektor 349/2 a pSOUP. Předpokládaná velikost vektoru 349/2 je 3652 bp, velikost pSOUP 9274 bp.



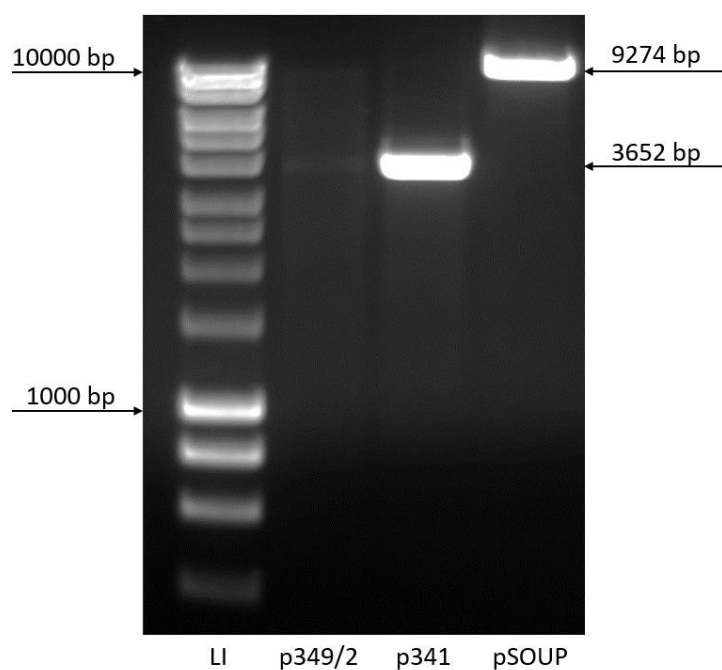
Obr. 16. Detekce vektoru 346/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP) a plazmidu pSOUP, které byly izolovány z *A. tumefaciens*. LI – Ladder I; p346/1 – vektor 346/1 a pSOUP. Předpokládaná velikost vektoru 346/1 je 3652 bp, velikost pSOUP 9274 bp.



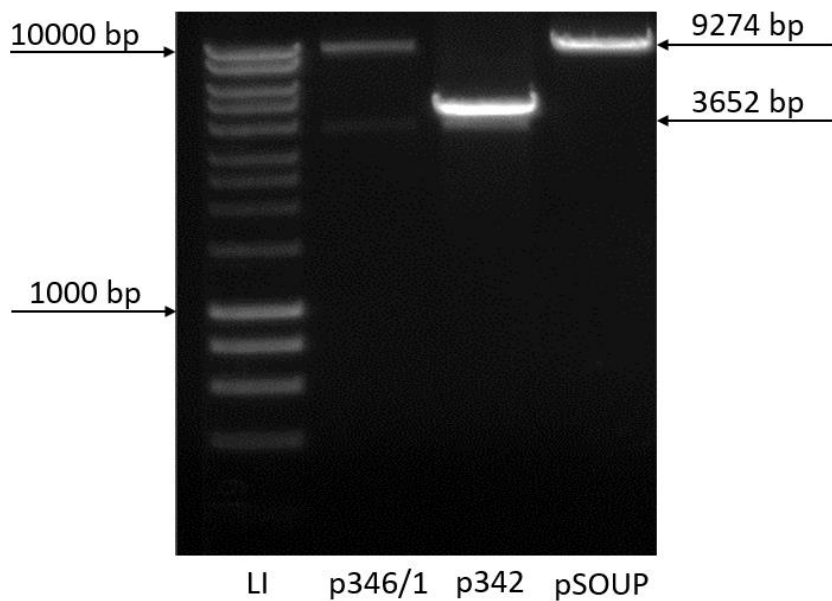
Obr. 17. Detekce vektorů 359/1, 359/2 a 359/4 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep) a plazmidu pSOUP, které byly izolovány z *A. tumefaciens*. LI – Ladder I; p359/1 – vektor 359/1 a pSOUP; p359/2 – vektor 359/2 a pSOUP; p359/4 – vektor 359/4 a pSOUP. Předpokládaná velikost vektorů 359/1, 359/2 a 359/4 je 3652 bp, velikost pSOUP 9274 bp.

5.4 Restrikční analýza vektorů izolovaných z *A. tumefaciens* AGL1

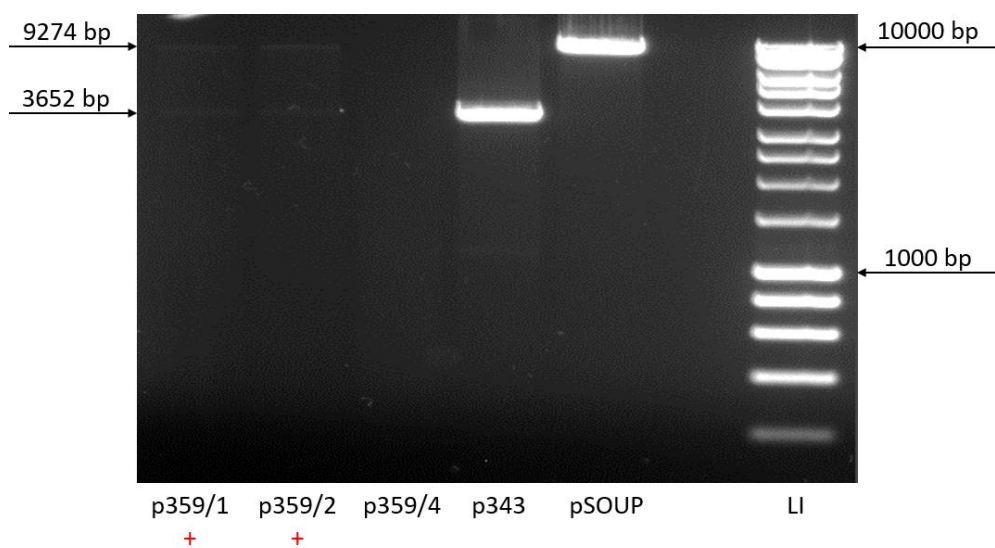
Přítomnost protospacerů WDV_CP, WDV_MP, WDV_Rep v expresních vektorech pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA izolovaných z *A. tumefaciens* byla ověřena restrikčním štěpením pomocí enzymu BamHI-HF (Obrázek 18, Obrázek 19 a Obrázek 20).



Obr. 18. Štěpení vektoru 349/2 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP) enzymem BamI-HF izolovaného z *A. tumefaciens*, vektoru 341 izolovaného z *E. coli* a plazmidu pSoup. Předpokládaná velikost linearizovaného vektoru 349/2 a 341 je 3652 bp, velikost linearizovaného plazmidu pSOUP je 9274 bp.



Obr. 19. Štěpení vektoru 346/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP) enzymem BamI-HF izolovaného z *A. tumefaciens*, vektoru 342 izolovaného z *E. coli* a plazmidu pSoup. Předpokládaná velikost linearizovaného vektoru 346/1 a 342 je 3652 bp, velikost linearizovaného plazmidu pSOUP je 9274 bp.



Obr. 20. Štěpení vektoru 359/1, 359/2 a 359/4 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep) enzymem BamI-HF izolovaného z *A. tumefaciens*, vektoru 343 izolovaného z *E. coli* a plazmidu pSoup. Předpokládaná velikost linearizovaných vektorů 359/1, 359/2, 359/4 a 343 je 3652 bp, velikost linearizovaného plazmidu pSOUP je 9274 bp.

5.5 Transformace nezralých zygotických embryí ječmene

Expresní vektory připravené pro transformaci jarního ječmene odrůdy Golden Promise:

349/2 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP

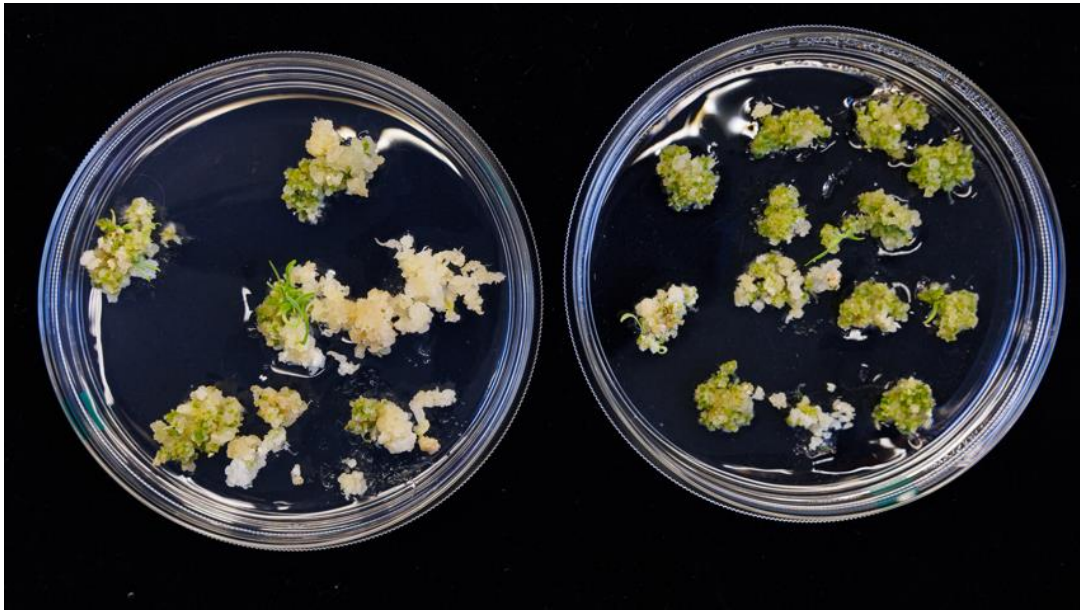
346/1 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP

359/1, 359/2 : pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep

K transformaci byla použita nezralá zygotická embrya jarního ječmene odrůdy Golden Promise o průměru 1,5 až 2 mm. Celkem bylo transformováno 332 nezralých zygotických embryí jarního ječmene odrůdy Golden Promise (Obrázek 21). Expresním vektorem 349/2 nesoucím sgRNA_CP bylo transformováno 68 embryí, expresním vektorem 346/1 nesoucím sgRNA_MP bylo transformováno 94 embryí a expresním vektorem 359/1, 359/2 nesoucím sgRNA_Rep bylo transformováno 170 embryí. Celkem regenerovalo 245 rostlin, z toho 81 rostlin transformovaných vektorem 349/2, 76 rostlin transformovaných vektorem 346/1 a 88 rostlin transformovaných vektorem 359/1, 359/2 (Obrázek 22, Obrázek 23 a Obrázek 24). Všechny regenerované rostliny byly genotypizovány.



Obr. 21. Indukované kalusy jarního ječmene odrůdy Golden Promise transformované expresním vektorem 346/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP) po 28 dnech kultivace na kalus indukčním médiu – CI, bez selekce.



Obr. 22. Regenerující rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise transformované expresním vektorem 346/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP) po 49 dnech kultivace na tranzientním médiu – T, bez selekce.



Obr. 23. Regenerované rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise transformované expresním vektorem 359/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep) po 61 dnech kultivace na regeneračním médiu – R, bez selekce.

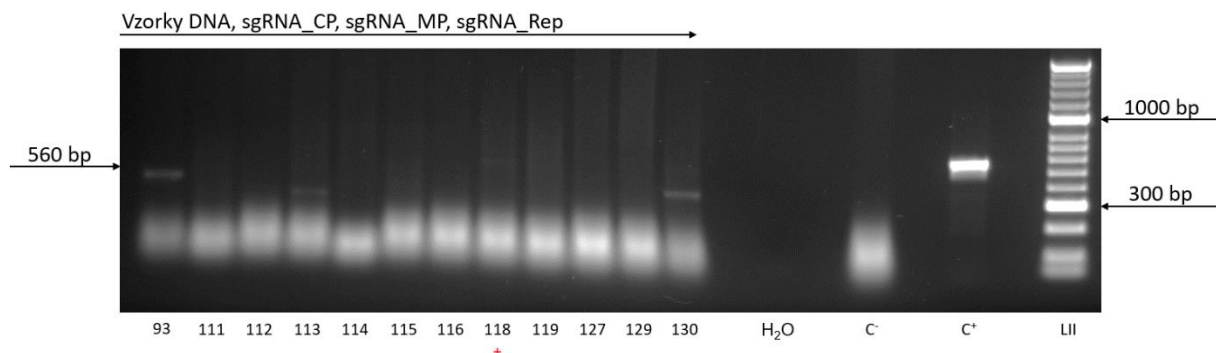


Obr. 24. Regenerované rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise transformované vektorem 359/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep) po přesazení do sadbovacích tabletů (Jiffů).

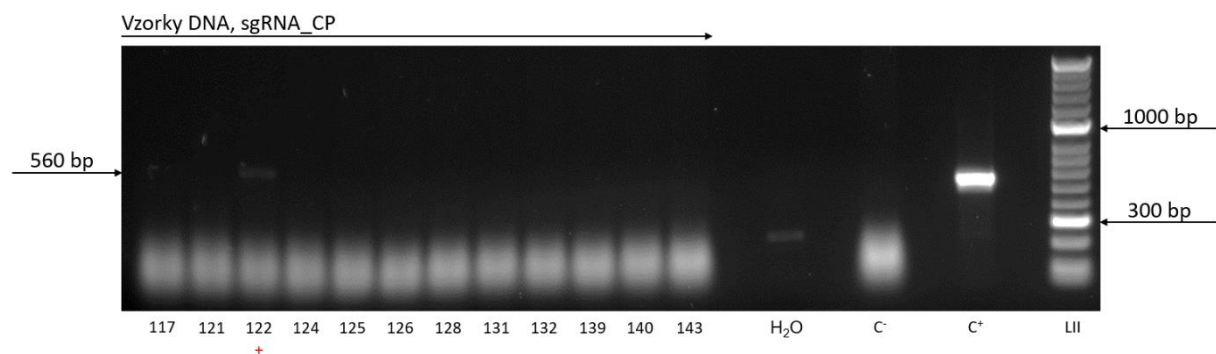
5.6 Detekce transgenních rostlin

Pomocí metody PCR byl amplifikován úsek expresní kazety nesoucí OsU6a promotor a sgRNA o velikosti 560 bp. Přítomnost úseku expresního vektoru v testované rostlině byla určena na základě elektroforetické separace produktů PCR analýzy v 1% agarózovém gelu.

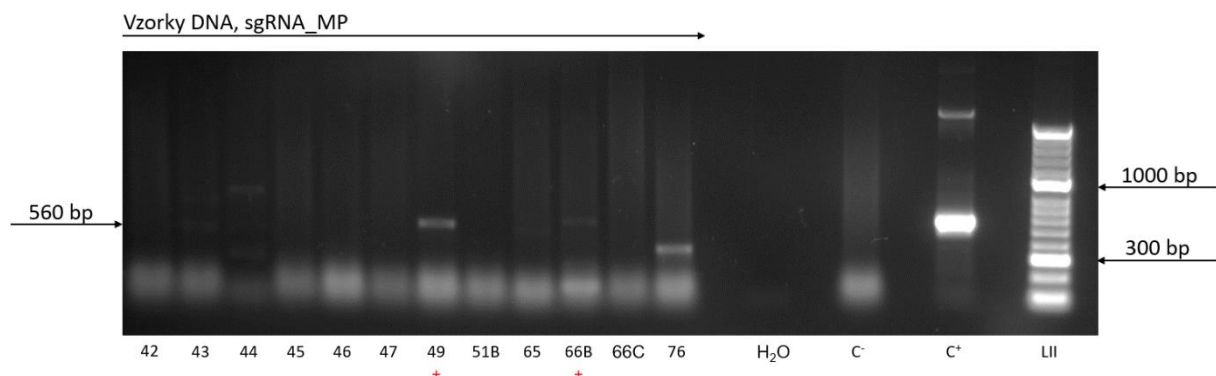
Podářilo se získat 21 transgenních rostlin, z toho 3 transgenní rostliny nesoucí sgRNA_CP (Obrázek 25 a Obrázek 26), 7 transgenních rostlin nesoucích sgRNA_MP (Obrázek 27, Obrázek 28 a Obrázek 29) a 11 transgenních rostlin nesoucích sgRNA_Rep (Obrázek 30, Obrázek 31, Obrázek 32, Obrázek 33 a Obrázek 34).



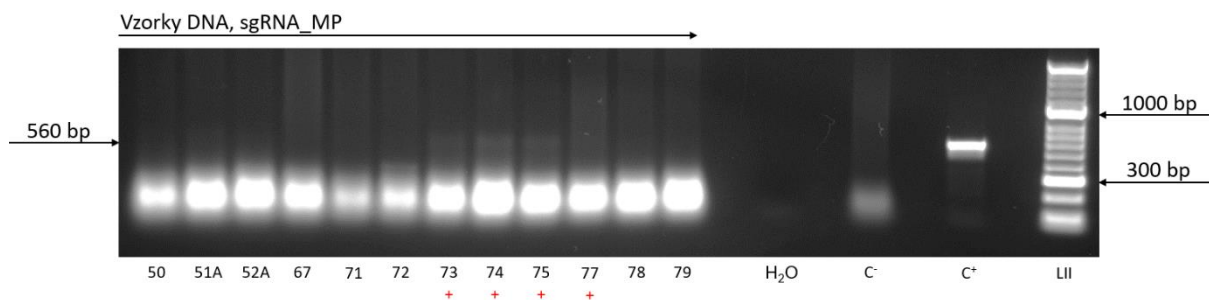
Obr. 25. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_CP, sgRNA_MP, v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1 – vzorek DNA sgRNA_Rep; 2 – vzorek DNA sgRNA_MP; 3-12 – vzorek DNA sgRNA_CP; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



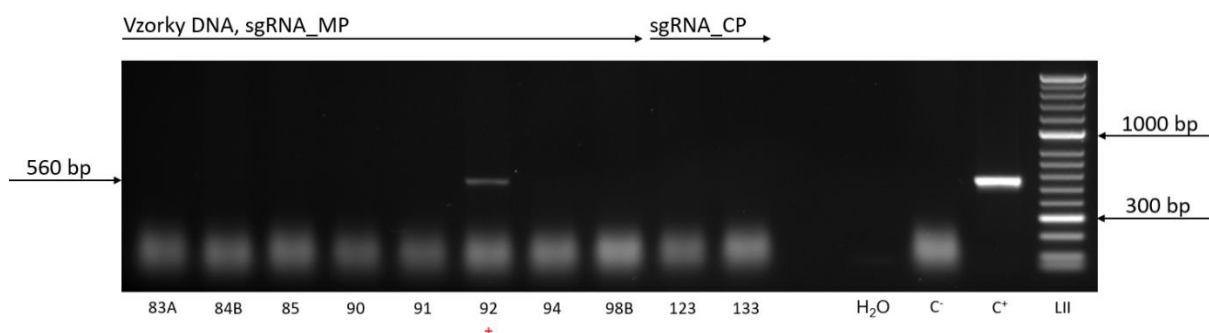
Obr. 26. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_CP v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-12 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



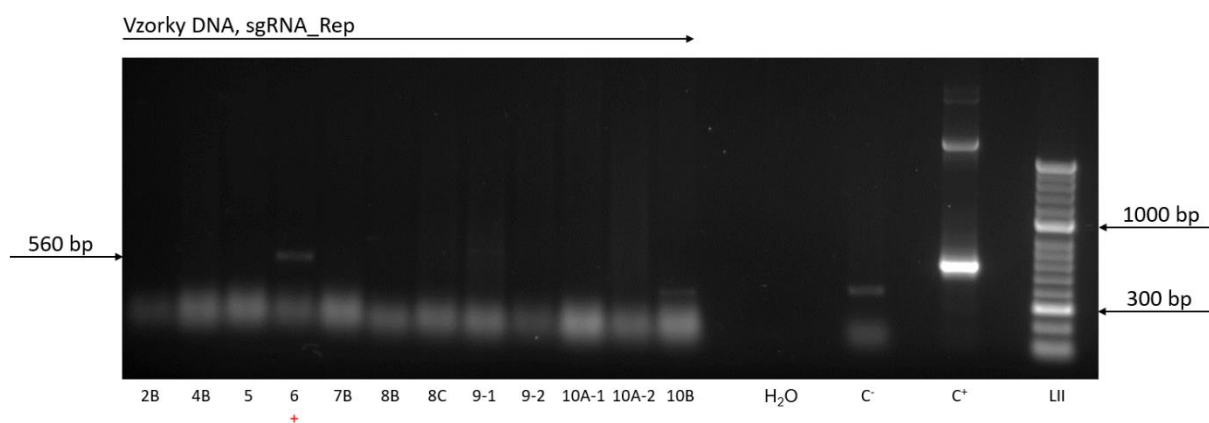
Obr. 27. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_MP v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-12 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



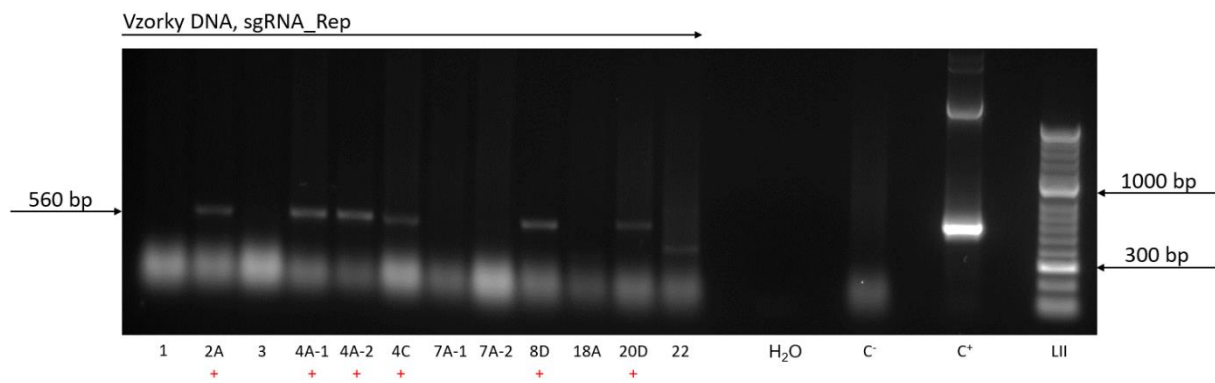
Obr. 28. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_MP v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-12 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



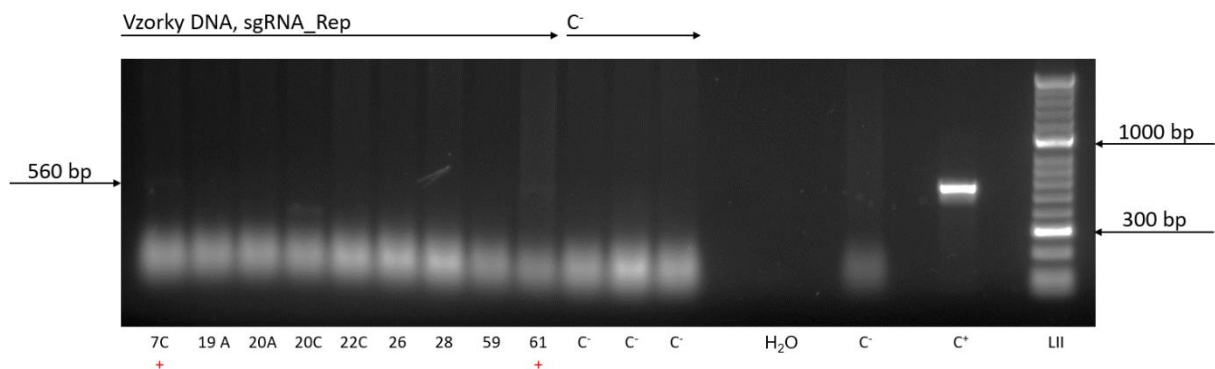
Obr. 29. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_MP, sgRNA_CP v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-10 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



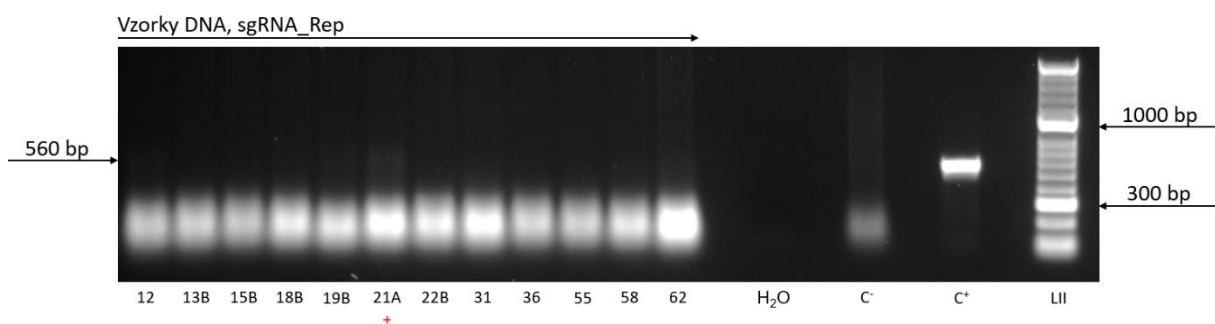
Obr. 30. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_Rep v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-12, vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



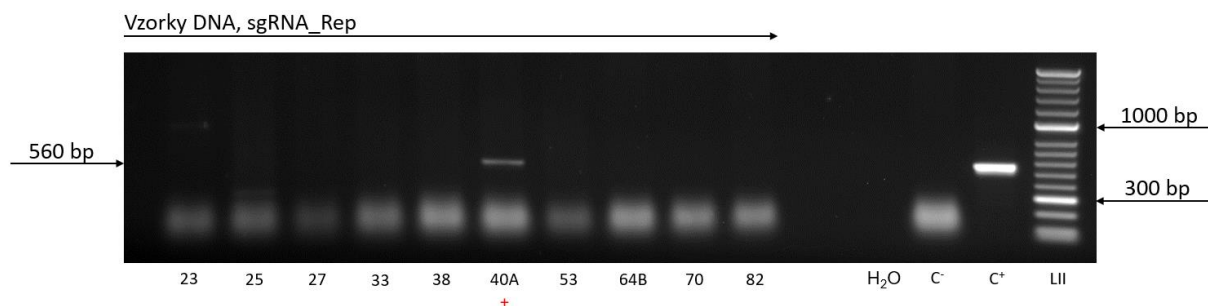
Obr. 31. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_Rep v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-12 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



Obr. 32. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_Rep v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-9 – vzorky DNA; C⁻ – negativní kontrola; H₂O – voda; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



Obr. 33. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_Rep v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-12 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.



Obr. 34. Elektroforetické vyhodnocení přítomnosti transgenu sgRNA_Rep v regenerovaných rostlinách, primer PROTOCKOs; 1-10 – vzorky DNA; H₂O – voda; C⁻ – negativní kontrola; C⁺ – pDNA 343; LII – Ladder II. Předpokládaná velikost ampliconu 560 bp.

Celková efektivita transformace všech tří vektorů byla 8,6 % (Tabulka 8). Efektivita transformace rostlin vektorem 349/2 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP) byla 3,7 %. Efektivita transformace rostlin vektorem 346/1 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP) byla 9,2 %. Efektivita transformace rostlin vektorem 359/1, 359/2 (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep) byla 12,5 %. Příčinou nízké efektivity transformace může být skutečnost, že během indukce kalusů i během regenerace nebyl do médií přidáván Hygromycin. Během kultivace nedocházelo k selekci transgenních pletiv ani regenerujících rostlin a vitální netransgenní rostliny často přerůstaly transgenní rostliny.

Tabulka 8. Efektivita transformace.

	sgRNA			Celkem
	CP Vektor	MP Vektor	Rep Vektor	
	p349/2	p346/1	p359/1 p359/2	
Transformace embryí	68	94	170	332
Přesazeno	81	76	88	245
Izolace DNA	81	76	88	245
PCR pozitivní	3	7	11	21
Efektivita transformace (%)	3,7	9,2	12,5	8,6

6 DISKUZE

Biotechnologických postupů lze využít k vytvoření tolerance k virovým chorobám. U rostlin se využívají technologie PDR, RNAi a CRISPR/Cas9.

Například cílenou mutagenezí v S genu *PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 (PDIL5-1)* pomocí systému CRISPR/Cas9 byla vytvořena tolerance k viru mírné žluté mozaiky ječmene (*barley mild mosaic virus* – BaMMV) a viru žluté mozaiky ječmene (*barely yellow mosaic virus* – BaYMV) v ozimém ječmeni odrůdy Igri a jarním ječmeni odrůdy Golden Promise. Mutace v S genu *PDIL5-1* poskytujícím toleranci byla původně objevena ve dvou odrůdách ječmene HOR1363 a Russia 57. Získání mutanti nesoucí nové alely *PDIL5-1* byly mechanicky infikovány BaMMV. Bylo prokázáno, že všechny posunové mutace a některé substituční mutace poskytovaly odolnost vůči BaMMV. Testování mutanti nevykazovaly fenotypové rozdíly, ani rozdíly ve výnosu. Přenesení mutace z původních odrůd klasickými technikami šlechtění by bylo časově náročné s možným přenesením nežádoucích genů (Hoffie *et al.*, 2023).

Patogen může uniknout systému CRISPR/Cas9 mutací v cílových sekvencích sgRNA. Oprava DSBs vytvořených nukleázovou aktivitou proteinu Cas9 v genomu patogenu může způsobit substituce nebo delece/inzerce v cílových sekvencích sgRNA. Možným řešením je současné použití více sgRNA s rozdílnými cílovými sekvencemi nebo navržení jedné pgRNA, která je komplementární k rozdílným sekvencím v genomu patogenu. Tuto strategii lze současně použít k vytvoření tolerance proti rozdílným druhům virových patogenů v jedné rostlině (Robertson *et al.*, 2022).

Pro vytvoření tolerance k WDV v rostlinách jarního ječmene odrůdy Golden Promise byla v rámci diplomové práce použita technologie CRISPR/Cas9. Do buněk nesoucích Cas9 byl pomocí *A. tumefaciens* transformován jeden ze tří rozdílných expresních vektorů nesoucí sgRNA pod kontrolou rýžového OsU6a promotoru. Sekvence protospacerů v sgRNA navádí Cas9 nukleázu na komplementární sekvenci v jednom z genů *CP*, *MP* a *Rep* v genomu WDV. Protein Cas9 následně rozštěpí DNA viru v jednom z těchto genů a zabrání tím dokončení jeho replikačního cyklu. Protein Cas9 má nukleázovou aktivitu proti dsDNA. Genom WDV je ssDNA, při replikaci v jádře virus vytváří dsDNA meziprodukt, který je štěpen Cas9.

Do této doby byla publikována jediná práce zabývající se vytvořením tolerance proti WDV pomocí systému CRISPR/Cas v rostlinách ječmene (Kis *et al.*, 2019). Do rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise byl pomocí *A. tumefaciens* transformován binární konstrukt

WDVGuide4Guard nesoucí čtyři rozdílné sgRNA pod kontrolou tří rozdílných promotorů (OsU3p, TaU3p a U6-26p) a Cas9 nukleázu pod kontrolou kukuřičného Ubi1 promotoru. Sekvence pro sgRNA byly zvoleny v konzervativních oblastech genomu WDV, které *in silico* nevykazovaly mimocílovou aktivitu. Pomocí RT-PCR byla v transgenních rostlinách potvrzena exprese tří ze čtyř navržených sgRNA. Sekvenací PCR produktů byla zjištěna inserce tří nukleotidů pouze v jedné ze čtyř cílových sekvencí v genomu WDV. Na základě těchto poznatků autoři došli k závěru, že za toleranci rostlin je zodpovědná pouze jediná sgRNA s potvrzenou mutací v cílové sekvenci genomu WDV. Transgenní rostliny T0 generace nevykazovaly po infekci symptomy napadení WDV, avšak v T1 generaci rostliny vykazovaly symptomy napadení WDV. V těchto rostlinách byly detekovány rekombinantní kmeny WDV se substitucí nukleotidů v cílové sekvenci sgRNA, virus tak unikl toleranci zprostředkované systémem CRISPR/Cas9.

Oproti práci Kis *et al.*, (2019) byly v diplomové práci rostlinné buňky již nesoucí Cas9 nukleázu transformovány expresním vektorem pBRAC214AS_OsU6a-sgRNA nesoucím vždy jednu ze tří rozdílných sgRNA pod kontrolou OsU6a rýžového promotoru. Pro vyšší pravděpodobnost úspěchu transformace byly na rozdíl od práce Kis *et al.*, (2019) sgRNA a Cas9 nukleáza transformovány do rostlinných buněk postupně, každý pomocí jiného expresního vektoru. Do každé rostliny byla pro snazší ověření účinnosti tolerance sgRNA vložena pouze jedna ze tří rozdílných sgRNA (sgRNA_CP, sgRNA_MP a sgRNA_Rep). V regenerovaných rostlinách jarního ječmene odrůdy Golden Promise byly pomocí PCR potvrzeny vložené expresní kazety nesoucí jednu ze tří rozdílných sgRNA (sgRNA_CP, sgRNA_MP a sgRNA_Rep).

Pro zajímavost v roce 2023 byla publikována první práce o genetické editaci telete poskytující toleranci k viru bovinního virového průjmu (bovine viral diarrhoea virus – BVDV). Editace buněčného receptoru CD46, který je klíčový pro infekci BVDV byla provedena řízenou homologní opravou zprostředkovanou CRISPR/Cas9 systémem. V buněčném receptoru CD46 došlo k substituci šesti aminokyselin ve vazebné doméně pro BVDV. Geneticky upravené tele bylo několik měsíců ustájeno s teletem infikovaným BVDV, aniž by došlo k jeho infekci BVDV (Workman *et al.*, 2023).

7 ZÁVĚR

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je hospodářsky významná obilnina pěstovaná již od počátku zemědělství. Virus zakrslosti pšenice (WDV) je závažný patogen pšenice a ječmene, způsobující ztráty výnosů napadených rostlin.

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma diplomové práce zabývající se možností vytvoření tolerance proti WDV pomocí technologie CRISPR/Cas9. Součástí literární rešerše je biologická charakteristika a hospodářské využití ječmene a možnosti transformace pomocí *A. tumefaciens*.

V praktické části diplomové práce byly připraveny tři expresní vektory: (pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_CP, pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_MP a pBRACT214AS_OsU6a-sgRNA_Rep) nesoucí komplementární sekvence k úsekům v genomu WDV (WDV_CP, WDV_MP a WDV_Rep). Rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise nesoucí Cas9 nukleázu byly transformovány vždy jedním ze tří expresních vektorů nesoucích rozdílné sgRNA (sgRNA_CP, sgRNA_MP a sgRNA_Rep). Pomocí *A. tumefaciens* bylo celkem transformováno 332 embryí. Celkem regenerovalo 245 rostlin.

U všech regenerovaných rostlin byla provedena PCR analýza. Byly detekovány 3 transgenní rostliny nesoucí sgRNA_CP, 7 rostlin nesoucích sgRNA_MP a 11 rostlin nesoucích sgRNA_Rep.

V návaznosti na diplomovou práci bude provedeno sekvenování, ověření přenosu expresní kazety do rostlin T1 generace a potvrzení exprese jednotlivých sgRNA. Následně bude nutné získat homozygotní linie rostlin nesoucí jednotlivé sgRNA. Tolerance rostlin proti WDV bude testována na pracovišti VÚRV v. v. i. Praha.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto J. J., Verdine V., Cox D.B.T., Kellner M.J., Regev A., Lander E.S., Voytas D.F., Ting A.Y., Zhang, F. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature*. 2017, **550**(7675), 280-284. doi: 10.1038/nature24049
- Ali Z., Abulfaraj A., Idris A., Ali S., Tashkandi M., Mahfouz M. M. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology*. 2015, **16**, 1-11. doi: 10.1186/s13059-015-0799-6
- Aman R., Ali Z., Butt H., Mahas A., Aljedaani F., Khan M. Z., Ding S., Mahfouz M. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome biology*. 2018, **19**(1), 1-9. doi: 10.1186/s13059-017-1381-1
- Antignus Y., Vunsh R., Lachman O., Pearlsman M., Maslenin L., Hananya U., Rosner A. Truncated Rep gene originated from *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel [Mild] confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Ann. Appl. Biol.* 2004, **144**(1), 39–44. doi: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00314.x
- Asfaw Z., Bothmer R. V. Hybridization between landrace varieties of Ethiopian barley (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*) and the progenitor of barley (*H. vulgare ssp. spontaneum*). *Hereditas*. 1990, **112**(1), 57-64. doi: 10.1111/j.1601-5223.1990.tb00137.x
- Bagchi R., Tinker-Kulberg R., Salehin M., Supakar T., Chamberlain S., Ligaba-Osena A., Josephs E.A. Polyvalent guide RNAs for CRISPR antivirals. *Iscience*. 2022, **25**(11). doi: 10.1016/j.isci.2022.105333
- Baik B.K., Ullrich S. E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of cereal science*. 2008, **48**(2), 233-242. doi: 10.1016/j.jcs.2008.02.002
- Bamforth C.W., Barclay, A.H.P. Malting technology and the uses of malt. *Barley: Chemistry and Technology*. 1993, 297-354.
- Barrangou R., Marraffini, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*. 2014, **54**(2), 234-244. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*. 2004, **431**(7006), 356-363. doi: 10.1038/nature02874

- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*. 2013, **9**(1), 1-10. doi: 10.1186/1746-4811-9-39
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 2009, **326**(5959), 1509-1512. doi: 10.1126/science.1178811
- Bothmer R. V., Jacobsen N., Baden C., Jorgensen R. B., Linde-Laursen I. *An ecogeographical study of the genus Hordeum*. 1995.
- Brown J. K., Fauquet C. M., Bridton R. W., Zerhibi M., Moriones E., Navas-Castillo J. *Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, 2012, Waltham, USA.
- Calil I. P., Fontes E. P. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*. 2017, **119**(5), 711-723. doi: 10.1093/aob/mcw200
- Carvalho C. M., Santos A. A., Pires S. R., Rocha C. S., Saraiva D. I., Machado J. P. B., Mattos E. C., Fietto L. G., Fontes E. P. B. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS pathogens*. 2008, **4**(12), e1000247. doi: 10.1371/journal.ppat.1000247
- Castellano M. M., Sanz-Burgos A. P., Gutiérrez C. Initiation of DNA replication in a eukaryotic rolling-circle replicon: identification of multiple DNA–protein complexes at the geminivirus origin. *J. Mol. Biol.* 1999, **290**(3), 639-652. doi: 10.1006/jmbi.1999.2916
- Dahleen L. S., Manoharan M. Recent advances in barley transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2007, **43**, 493-506. doi: 10.1007/s11627-007-9068-z
- Dong O. X., Ronald P. C. Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Physiol*. 2019, **180**(1), 26-38. doi: 10.1104/pp.18.01224
- East-Seletsky A., O’Connell M. R., Burstein D., Knott G. J., Doudna J. A. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes. *Molecular cell*. 2017, **66**(3), 373-383. doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.008

- East-Seletsky A., O'Connell M. R., Knight S. C., Burstein D., Cate J. H. D., Tjian R. Doudna J. A. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*. 2016, **538**(7624), 270-273. doi: 10.1038/nature19802
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. 1991, **19**(6), 1349. doi: 10.1093/nar/19.6.1349
- Ekzayez A. M., Kumari S. G. First report of Wheat dwarf virus and its vector (*Psammotettix provincialis*) affecting wheat and barley crops in Syria. *Plant Disease*. 2011, **95**(1), 76-76. doi: 10.1094/PDIS-09-10-0628
- Fahim M., Millar A. A., Wood C. C., Larkin P. J. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnol. J*. 2012, **10**(2), 150-163. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00647.x
- Fiallo-Olivé E., Lett J. M., Martin D. P., Roumagnac P., Varsani A., Zerbini F. M., Navas-Castillo J. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021, *Journal of General Virology*. 2021. 102:001696.
- Fondong V. N. Geminivirus protein structure and function. *Molecular plant pathology*. 2013, **14**(6), 635-649. doi: 10.1111/mpp.12032
- Forster B. P. Mutation genetics of salt tolerance in barley: an assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica*. 2001, **120**, 317-328. doi: 10.1023/A:1017592618298
- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013, **31**(7), 397-405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Gerasimova S. V., Hertig C., Korotkova A. M., Kolosovskaya E. V., Otto I., Hiekel S., Kochetov A. V., Khlestkina E. K., Kumlehn J. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene. *BMC plant biology*. 2020, **20**(1), 1-12. doi: 10.1186/s12870-020-02454-9
- Greene J. F. A revision of the nearctic species of the genus *Psammotettix* (Homoptera: *Cicadellidae*). *Smithsonian contributions to zoology* 1971, **74**.
- Gutierrez C. Geminivirus DNA replication. *CLMS, Cell. Mol. Life Sci*. 1999, **56**, 313-329. doi:10.1007/s000180050433

- Gutierrez C., Ramirez-Parra E., Mar Castellano M., Sanz-Burgos A. P., Luque, A., Missich R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* 2004, **98**(2), 111-119. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.012
- Harwood W. A., Bartlett J. G., Alves S. C., Perry M., Smedley M. A., Leyl N., Snape J. W. Barley transformation using Agrobacterium-mediated techniques. *Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization protocols.* 2009, 137-147. ISBN: 978-1-58829-961-1
- Harwood W. A., Ross S., Bulley S., Travella S., Busch B., Harden J., Snape J. Use of the firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. *Plant cell reports.* 2002, **21**, 320-326. doi: 10.1007/s00299-002-0515-3
- Heyraud-Nitschke F., Schumacher S., Laufs J., Schaefer S., Schell J., Gronenborn B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res.* 1995, **23**(6), 910-916. doi: 10.1093/nar/23.6.910
- Hoffie R. E., Perovic D., Habekuß A., Ordon F., Kumlehn J. Novel resistance to the Bymovirus BaMMV established by targeted mutagenesis of the PDIL5-1 susceptibility gene in barley. *Plant Biotechnology Journal.* 2023, **21**(2), 331-341. doi: 10.1111/pbi.13948
- Hu Q., Niu Y., Zhang K., Liu Y., Zhou X. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Virol. J.* 2011, **8**, 41. doi: 10.1186/1743-422X-8-41
- Chang Y., Von Zitzewitz J., Hayes P. M., Chen T.H.H. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex). *Plant cell reports.* 2003, **21**, 733-738. doi: 10.1007/s00299-003-0607-8
- Incarbone M., Dunoyer P. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in plant science.* 2013, **18**(7), 382-392. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.001
- Jackson R. J., Hellen C. U., Pestova T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2010, **11**(2), 113-127.
- Ji X., Zhang H., Zhang Y., Wang Y., Gao C. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants.* 2015, **1**(10), 1-4. doi: 10.1038/nplants.2015.144

- Jones J. D., Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*. 2006, **444**(7117), 323-329. doi: 10.1038/nature05286
- Kammann M., Schalk H. J., Matzeit V., Schaefer S., Schell J., Gronenborn B. DNA replication of wheat dwarf virus, a geminivirus, requires two cis-acting signals. *Virology*. 1991, **184**(2), 786-790. doi: 10.1016/0042-6822(91)90453-I
- Kan J., Cai Y., Cheng C., Jiang C., Jin Y., Yang P. Simultaneous editing of host factor gene *TaPDIL5-1* homoeoalleles confers wheat yellow mosaic virus resistance in hexaploid wheat. *New Phytologist*. 2022, **234**(2), 340-344. doi: 10.1111/nph.18002
- Kang B.C., Yeam I., Jahn, M. M. Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005, **43**, 581-621. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.011205.141140
- Kapusi E., Corcuera-Gómez M., Melnik S., Stoger E. Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Frontiers in plant science*. 2017, **8**, 540. doi: 10.3389/fpls.2017.00540
- Kis A., Hamar É., Tholt G., Bán R., Havelda Z. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal*. 2019, **17**(6), 1004. doi: 10.1111/pbi.13077
- Lazarowitz S. G., Shepherd R. J. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1992, **11**(4), 327-349. doi: 10.1080/07352689209382350
- Lefkowitz E. J., Dempsey D. M., Hendrickson R. C., Orton R. J., Siddell S. G. Smith D. B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*. 2017, **46**(D1), D708–D717. doi: 10.1093/nar/gkx932
- Lin S. S., Wu H. W., Elena S. F., Chen K. C., Niu Q. W., Yeh S. D. Chen C. C., Chua N. H. Molecular evolution of a viral non-coding sequence under the selective pressure of amiRNA-mediated silencing. *PLoS Pathog.* 2009, **5**(2), e1000312. doi: 10.1371/journal.ppat.1000312
- Lindblad M., Sigvald R. Temporal spread of wheat dwarf virus and mature plant resistance in winter wheat. *Crop protection*. 2004, **23**(3), 229-234. doi: 10.1016/j.cropro.2003.08.011
- Lindsten K., Vacke J. A possible barley adapted strain of Wheat dwarf virus (WDV). *Acta Phytopath. Entomol. Hung.* 1991, **26**(1-2), 175-180.

Liu H., Boulton M. I., Davies J. W. *Maize streak virus* coat protein binds single- and double-stranded DNA in vitro. *J. Gen. Virol.* 1997, **78**(6), 1265-1270. doi: 10.1099/0022-1317-78-6-1265

Liu H., Lucy A. P., Davies J., Boulton M. I. A single amino acid change in the coat protein of *Maize streak virus* abolishes systemic infection, but not interaction with viral DNA or movement protein. *Mol. Plant Pathol.* 2001, **2**, 223–228. doi: 10.1046/j.1464-6722.2001.00068.x

Liu L., Li X., Ma J., Li Z., You L., Wang J., Wang M., Zhang X., Wang Y. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell.* 2017, **170**(4), 714–726.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.050

Liu L., Saunders K., Thomas C. L., Davies J. W., Stanley J. *Bean yellow dwarf virus* RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology.* 1999, **256**(2), 270-279. doi: 10.1006/viro.1999.9616

Lotfipour M., Behjatnia S. A. A., Afsharifar A., Izadpanah K. distribution and partial biological characterization of wheat and barely strains of Wheat dwarf virus in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology.* 2013, **49**(1), 7-9.

Macho A. P., Zipfel C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell.* 2014, **54**(2), 263-272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028

Makarova K. S., Wolf Y. I., Iranzo J., Shmakov S. A., Alkhnbashi O. S., Brouns S. J. J., Charpentier E., Cheng D., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Scott D., Shah S. A., Siksnys V., Terns M. P., Venclovas Č., White M. F., Yakunin A. F., Yan W., Zhang F., Garrett R. A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., Koonin E. V. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology.* 2020, **18**(2), 67-83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x

Makarova K. S., Wolf Y. I., Alkhnbashi O. S., Costa F., Shah S. A., Saunders S. J., Barrangou R., Brouns S. J. J., Charpentier E., Haft D., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Terns R. M., Terns M. P., White M. F., Yakunin A. F., Garrett R. A., Van Der Oost J., Backofen R., Koonin E. V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology.* 2015, **13**(11), 722-736. doi: 10.1038/nrmicro3569

- Mehta D., Stürchler A., Anjanappa R. B., Zaidi S. S. E. A., Hirsch-Hoffmann M., Grissem W., Vanderschuren H. Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome biology*. 2019, **20**(1), 1-10. doi: 10.1186/s13059-019-1678-3
- Moffat A.S. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*. 1999, **286**(5446), 1835-1835. doi: 10.1126/science.286.5446.1835
- Molla K. A., Yang, Y. Predicting CRISPR/Cas9-induced mutations for precise genome editing. *Trends in Biotechnology*. 2020, **38**(2), 136-141. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.08.002
- Nelles D. A., Fang M. Y., O'Connell M. R., Xu J. L., Markmiller S. J., Doudna J. A., Yeo G. W. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9. *Cell*. 2016, **165**(2), 488-496. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.054
- Newman R. K., Newman C. W. Barley as a food grain. *Cereal Foods World*. 1991, **36**(9) 800–805.
- Nicaise V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Frontiers in plant science*. 2014, **5**, 660. doi: 10.3389/fpls.2014.00660
- Niu Q. W., Lin S. S., Reyes J. L., Chen K. C., Wu H. W., Yeh S. D., Chua N. H. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat. Biotechnol*. 2006, **24**(11), 1420-1428. doi: 10.1038/nbt1255
- Noris E., Lucioli A., Tavazza R., Caciagli P., Accotto G. P., Tavazza M. Tomato yellow leaf curl Sardinia virus can overcome transgene-mediated RNA silencing of two essential viral genes. *J. Gen. Virol*. 2004, **85**(6), 1745–1749. doi: 10.1099/vir.0.79944-0
- Pantaleo V., Szittyá G., Burgyán J. Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *Journal of Virology*. 2007, **81**(8), 3797-3806. doi: 10.1128/jvi.02383-06
- Ripl J., Kundu J. K. *Cynosurus cristatus*, a new host of Wheat dwarf virus in the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology*. 2015, **97**(3), 547.
- Robertson G., Burger J., Campa M. CRISPR/Cas-based tools for the targeted control of plant viruses. *Molecular Plant Pathology*. 2022, **23**(11), 1701-1718. doi: 10.1111/mpp.13252

- Rojas M. R., Jiang H., Salati R., Xoconostle-Cazares B., Sudarshana M. R., Lucas W. J., Gilbertson R. L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus. *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*. 2001, **291**(1), 110-125. doi: 10.1006/viro.2001.1194
- Seo J.K., Wu J., Lii Y., Li Y., Jin H. Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2013, **26**(6), 617-625. doi: 10.1094/MPMI-10-12-0255-IA
- Smith, B. D. The Emergence of Agriculture. Scientific American Library, HPHLP, New York, 1998. 231 pp.
- Soleimani B., Lehnert H., Trebing S., Habekuß A., Ordon F., Stahl A., Will, T. Identification of Markers Associated with *Wheat Dwarf Virus* (WDV) Tolerance/Resistance in Barley (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*) Using Genome Wide Association Studies. 2023. doi: 10.20944/preprints202305.0943.v1
- Song J., Yang D., Xu J., Zhu T., Chen Y. E., Zhang J. RS-1 enhances CRISPR/Cas9-and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nature communications*. 2016, **7**(1), 10548. doi: 10.1038/ncomms10548
- Sonoda E., Hochegger H., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA repair*. 2006, **5**(9-10), 1021-1029. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.022
- Stanley J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Vet. Microbiol*. 2004, **98**(2), 121-129. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.005
- Stanley J., Gay M. R. Nucleotide sequence of *Cassava latent virus* DNA. *Nature*. 1983, **301**(5897), 260-262. doi: 10.1038/301260a0
- Tashkandi M., Ali Z., Aljedaani F., Shami A., Mahfouz M. M. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant signaling & behavior*. 2018, **13**(10), e1525996. doi: 10.1080/15592324.2018.1525996
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. *The Plant Journal*. 1997, **11**(6), 1369-1376. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061369.x

- Travella S., Ross S. M., Harden J., Everett C., Snape J. W., Harwood W. A. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques. *Plant cell reports*. 2005, **23**, 780-789. doi: 10.1007/s00299-004-0892-x
- Tripathi J. N., Ntui V. O., Ron M., Muiruri S. K., Britt A., Tripathi L. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Communications Biology*. 2019, **2**(1), 46. doi: 10.1038/s42003-019-0288-7
- Van Der Oost J., Westra E. R., Jackson R. N., Wiedenheft, B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2014, **12**(7), 479-492. doi: 10.1038/nrmicro3279
- Vanderschuren H., Stupak M., Fütterer J., Gruissem W., Zhang P. Engineering resistance to geminiviruses—review and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*. 2007, **5**(2), 207-220. doi: 10.1111/j.1467-7652.2006.00217.x
- Wan Y., Lemaux P. G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*. 1994, **104**(1) 37–48. doi: 10.1104/pp.104.1.37
- Wang H., Liu Y., Liu W., Wu K., Wang X. F-actin dynamics in midgut cells enables virus persistence in vector insects. *Molecular Plant Pathology*. 2022, **23**(11), 1671-1685. doi: 10.1111/mpp.13260
- Wang X., Wu B., Guanghe, Z. Occurrence and epidemics of *Psammotettix striatus* of Wheat dwarf virus in China. In *Plant viruses: Exploiting Agricultural and Natural Ecosystems. 11th International Plant Virus Epidemiology Symposium and 3rd Workshop of the Plant Virus Ecology Network. Poster# Ep3*. 2007.
- Wang Y., Mao Q., Liu W., Mar T. T., Wei T., Liu Y., Wang X. *Localization and distribution of wheat dwarf virus in its vector leafhopper, Psammotettix alienus*. *Phytopatology*. 2014, **104**(8), 897-904. doi: 10.1094/PHYTO-09-13-0251-R
- Wendt T., Holme I., Dockter C., Preuß A., Thomas W., Druka A., Waugh R., Hansson M., Braumann I. HvDep1 is a positive regulator of culm elongation and grain size in barley and impacts yield in an environment-dependent manner. *PLoS One*. 2016, **11**(12), e0168924. doi: 10.1371/journal.pone.0168924

Workman, A. M., Heaton, M. P., Vander Ley, B. L., Webster, D. A., Sherry, L., Bostrom, J. R., Larson S., Kalbfleisch, Harhay G. P., Jobman E. E., Carlson D. F., Sonstegard, T. S. (). First gene-edited calf with reduced susceptibility to a major viral pathogen. *PNAS nexus*. 2023, **2**(5), pgad125. doi: 10.1093/pnasnexus/pgad125

Xu P., Zhang Y., Kang L., Roossinck M. J., Mysore K. S. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol*. 2006, **142**(2), 429-440. doi: 10.1104/pp.106.083295

Yin K., Qiu J. L. Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2019, **374**(1767), 20180322. doi: 10.1098/rstb.2018.0322

Zetsche B., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Slaymaker I. M., Makarova K. S., Essletzbichler, P., Volz S. E., Joung J., Van Der Oost J., Regev A., Koonin E. V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015, **163**(3), 759-771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038

Zhang C., Liu S., Li X., Zhang R., Li J. Virus-induced gene editing and its applications in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(18), 10202. doi: 10.3390/ijms231810202

Zhang T., Zhao Y., Ye J., Cao X., Xu C., Chen B., An H., Jiao Y., Zhang F., Yang X., Zhou G. Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants. *Plant biotechnology journal*. 2019, **17**(7), 1185. doi: 10.1111/pbi.13095

Zhang T., Zheng Q., Yi X., An H., Zhao Y., Ma S., Zhou G. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant biotechnology journal*. 2018, **16**(8), 1415-1423. doi: 10.1111/pbi.12881

Zimolka J., Cerkal R., Dvořák J., Edler S., Ehrenbergerová J., Hřivna L., Kamler J., Klem K., Milotová J., Míša P., Procházková B., Psota V., Richter R., Ryant P., Tichý F., Vaculová K., Váňová M., Vejražka K. *Ječmen – formy a užitkové směry v České republice*. Praha: Profi Press, 2006. ISBN 80-86726-18-5.

Zipfel C. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in immunology*. 2014, **35**(7), 345-351. doi: 10.1016/j.it.2014.05.004

Zorzatto C., Machado J. P. B., Lopes K. V. G., Nascimento, K. J. T., Pereira, W. A., Brustolini, O. J. B., Reis P. A. B., Calil I. P., Deguchi M., Sachetto-Martins G., Gouveia B. C., Loriato V. A. P., Silva M. A. C., Silva F. F., Santos A. A., Chory J., Fontes, E. P. B. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature*. 2015, **520**(7549), 679-682. doi: 10.1038/nature14171

DALŠÍ ZDROJE

Addgene: Protocol - Bacterial Transformation

Addgene: pSOUP

An Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation Protocol for Hexaploid and Tetraploid Wheat - Hayta - 2021 - Current Protocols - Wiley Online Library

<https://www.agromanual.cz/cz/atlas/skudci/skudce/krisek-polni>

<https://www.biotrin.cz/databaze-nbt-plodin/>

Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202) | NEB

New plant-breeding techniques (europa.eu)

www addgene: pSOUP

www.generi-biotech.com