

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Editace genu *HvABCG11* u jarního ječmene**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Hedvika Šlanhofová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Tomáš Vlčko, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Hedvika Šlanhofová
Název práce	Editace genu <i>HvABCG11</i> u jarního ječmene
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Vlčko, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Gen <i>HvABCG11</i> ječmene jarního kóduje protein řadící se mezi ABC transportéry. ABC transportéry jsou transmembránové proteiny poháněné hydrolýzou ATP. Podskupina ABCG transportérů hraje roli v odpovědi na abiotický a biotický stres, v transportu fytohormonů nebo v transportu strukturních komponent. V experimentální části byla provedena analýza genu <i>HvABCG11</i> a jeho promotorové oblasti a <i>in silico</i> navržen expresní vektor k indukci mutace genu <i>HvABCG11</i>. K vytvoření mutace bylo využito místně specifické nukleasy CRISPR/Cas9. Expresní vektor obsahující CRISPR-Cas9 systém byl transformován <i>A. tumefaciens</i> do nezralých embryí ječmene jarního odrůdy Golden Promise. Genotypizace rostlin byla provedena za použití molekulárních technik, PCR a sekvenováním. Efektivita transformace dosahovala 2,4 %. Žádná regenerující rostlina T0 generace neobsahovala mutaci. Analýza rostlin ječmene jarního T1 potvrdila přítomnost stabilního transgenu <i>Cas9</i>.</p>
Klíčová slova	ABC transportér, ječmen jarní, CRISPR/Cas9, <i>HvABCG11</i> , transformace
Počet stran	93
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Hedvika Šlanhofová
Title of thesis	<i>HvABCG11</i> gene editing in spring barley
Type of thesis	Magister
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Tomáš Vlčko, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The spring barley <i>HvABCG11</i> gene encodes a protein classified as an ABC transporter. ABC transporters are transmembrane proteins driven by ATP hydrolysis. A subset of ABCG transporters plays a role in the response to abiotic and biotic stress, transport of phytohormones or transport of structural components. In the experimental part, the <i>HvABCG11</i> gene and its promoter region were analyzed and an expression vector was designed <i>in silico</i> to create a mutation of the <i>HvABCG11</i>. The site-specific nuclease CRISPR/Cas9 was used to create the mutation. The expression vector containing the CRISPR-Cas9 system was transformed by <i>A. tumefaciens</i> into immature embryos of spring barley cv. Golden Promise. Genotyping of the plants was performed using molecular techniques, PCR and sequencing. The transformation efficiency was 2.4%. No regenerating T0 generation plant contained the mutation. Analysis of T1 spring barley plants confirmed the presence of a stable <i>Cas9</i>.</p>
Keywords	ABC transporter, spring barley, CRISPR/Cas9, <i>HvABCG11</i> , transformation
Number of pages	93
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Hedvika Šlanhofová

### **Poděkování**

„Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. Tomáši Vlčkovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování této práce. Taktéž bych chtěla poděkovat Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D., za věcné připomínky v experimentální části práce. Nakonec bych chtěla poděkovat Ing. Marii Seifertové za provedení Sangerova sekvenování.“

# Obsah

Obsah .....	6
Seznam zkratek .....	8
1 Úvod .....	10
2 Cíle práce .....	11
3 Současný stav řešené problematiky .....	12
3.1 ABC transportéry.....	12
3.1.1 Evoluce ABC transportérů.....	14
3.1.2 ABC transportéry esenciální pro růst a vývoj rostlin .....	15
3.2 Rekombinantní technologie .....	23
3.2.1 Technologie CRISPR/Cas9 .....	24
4 Materiál a metodika .....	33
4.1 Přístrojové vybavení .....	33
4.2 Software a internetové nástroje .....	33
4.3 Použité chemikálie.....	33
4.4 Média .....	35
4.5 Roztoky.....	36
4.6 Biologický materiál .....	37
4.7 Metody.....	38
4.7.1 Příprava experimentu <i>in silico</i> .....	38
4.7.2 Příprava expresního vektoru .....	38
4.7.3 Transformace <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ teplotním šokem .....	42
4.7.4 Transformace <i>A. tumefaciens</i> expresním vektorem.....	44
4.7.5 Transformace nezralých embryí ječmene jarního .....	45
4.7.6 Genotypizace rostlin T0 generace .....	47
4.7.7 Genotypizace T1 generace transgenních rostlin.....	51
5 Výsledky .....	52
5.1 Příprava experimentu <i>in silico</i> .....	52
5.1.1 Analýza sekvence genu <i>HvABCG11</i> a výběr protospaceru.....	52
5.1.2 Analýza promotorové oblasti genu <i>HvABCG11</i> .....	56
5.2 Příprava expresního vektoru .....	57
5.2.1 Klonování pYLCRISPR/Cas9P <sub>ubi</sub> -H a U6-sgRNA kazety.....	57

5.2.2	Vnesení expresního vektoru do <i>E. coli</i> .....	59
5.2.3	Vnesení expresního vektoru do <i>A. tumefaciens</i> .....	60
5.3	Transformace nezralých embryí ječmene jarního <i>A. tumefaciens</i> .....	61
5.4	Genotypizace T0 generace ječmene jarního.....	61
5.4.1	Detekce transgenů <i>Cas9</i> a <i>hyg</i> v T0 generaci.....	61
5.4.2	Optimalizace primerů pro sekvenování cílové sekvence.....	63
5.4.3	Detekce mutace genu <i>HvABCG11</i> T0 generaci.....	65
5.5	Genotypizace T1 generace ječmene jarního.....	66
6	Diskuze.....	68
7	Závěr.....	72
	Seznam použité literatury.....	73

## Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová (abscisic acid)
ABC	ATP vazebná kazeta (ATP binding cassette)
ApE	A plasmid Editor
bp	párů bází
CaMV	CaMV promotor (cauliflower mosaic virus)
Cas	CRISPR asociovaná nukleasa (CRISPR associated)
CI	kalus indukční (callus induction)
CK	cytokinin
CRISPR	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (clustered regularly interspaced palendromic repeats)
crRNA	CRISPR RNA
DBD	DNA vazebná doména (DNA binding domain)
dCas	dead Cas
DSB	dvouvláknový zlom (double-strand break)
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
gDNA	genomická DNA
gRNA	vodící RNA (guide RNA)
<i>hptII</i>	gen kódující hygromycin fosfotransferasu
<i>hyg</i>	gen kódující rezistenci na Hygromycin
HDR	Přímá homologní oprava (homologous directed repair)
<i>Iap</i>	gen zodpovědný za konverzi isoenzymu alkalické fosfatasy (isozyme conversion of alkaline phosphatase)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kb	kilobáze
<i>lacZ</i>	gen kódující enzym $\beta$ -galaktosidasu
<i>LPTG</i>	geny kódující lipopolysacharidový transport (lipopolysaccharide transport system genes)
LSD1	lysin specifická demethylasa
MS	Murashige a Skoog



NBD	nukleotid vazebná doména (nucleotide binding domain)
nCas	nick Cas
NHEJ	spojení nehomologních konců (non-homologous end joining)
<i>nptII</i>	gen kódující neomycin fosfotransferasu
PAM	motiv přiléhající k protospaceru (protospacer adjacent motif)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pDNA	plasmidová DNA
PDR	Pleiotropic drug resistance
pre-crRNA	prekurzor crRNA
PegRNA	prime editing gRNA
R	regenerační
RNP	ribonukleoprotein
RT-PCR	reverzní transkriptasová polymerázová řetězová reakce
Rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
sgRNA	single-guide RNA
T	transientní
TRV	virus kadeřavosti tabáku (tobacco rattle virus)
TALE	efektor transkripčních faktorů (transcription activator-like effector)
TALEN	endonukleasa efektorů transkripčních faktorů (transcription activator-like effector nuclease)
T-DNA	transferová DNA
TMD	transmembránová doména (transmembrane domain)
tracrRNA	transaktivující crRNA
U3	ubikvitinový promotor 3
U6	ubikvitinový promotor 6
X-GAL	5-brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktosid
ZFN	endonukleasa zinkového prstu (Zinc-finger nuclease)

# 1 Úvod

Obilniny jsou hlavní složkou lidské stravy. Každý rok je celosvětově sklizeno bezmála 2,8 miliard tun obilnin (FAO, 2022). Čtvrtou nejpěstovanější obilninou je ječmen (*Hordeum vulgare*). Ječmen je adaptibilní a lze jej pěstovat v mírném pásmu po celém světě. Ječmen je pěstován hlavně pro potravu hospodářských zvířat, dále se využívá k přípravě sladu a v lihovarnickém průmyslu.

Nástroje v oblasti genomové editace, mezi které patří mimo jiné i místně specifické endonukleasy, usnadňují vývoj plodin odolných vůči herbicidům či škůdcům a umožňují vytvářet plodiny se zvýšeným výnosem. CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) je novou generací místně specifických endonukleas. Technologie CRISPR/Cas9 díky své vysoké efektivitě a jednoduchosti nahradila nukleasy zinkových prstů (Zinc-finger nuclease, ZFN) a nukleasy efektorů transkripčních aktivátorů (Transcription activator-like effector nuclease, TALEN). Systém CRISPR/Cas9 byl objeven jako součást obranného systému, který poskytuje prokaryotickým organismům odolnost vůči virům. Technologie CRISPR/Cas9 umožňuje inserci, delecii či změnu vybrané genetické informace. Systém CRISPR-Cas9 se skládá z dvou hlavních komponent: z vodící single guide RNA (sgRNA) a Cas9 DNA endonukleasy. Cas9 endonukleasa je naváděna sgRNA a na základě komplementarity systém rozpozná cílovou sekvenci a Cas9 endonukleasa provede dvouvláknový zlom.

Gen *HvABCG11* kóduje protein patřící do skupiny ABC transportérů. ABC transportéry jsou transmembránové proteiny poháněné hydrolýzou ATP nacházející se jak v prokaryotických, tak v eukaryotických organismech. Rostlinný genom vyšších rostlin kóduje výrazně větší množství ABC transportérů oproti genomu jiných eukaryot. Zatímco v genomu rýže bylo identifikováno 133 genů ABC transportérů, v lidském genomu bylo identifikováno 49. Původně byla ABC transportérům v rostlinách přiřazována pouze detoxifikační funkce. Později bylo prokázáno, že ABC proteiny hrají nezbytnou roli ve vývoji rostliny, růstu orgánů, transportu fytohormonů či reakci na abiotický stres a patogeny.

## 2 Cíle práce

- Zpracovat literární rešerši na dané téma.
- Připravit mutaci genu *HvABCG11* v jarním ječmeni odrůdy Golden Promise za použití technologie programovatelných endonukleas CRISPR/Cas9.
- Charakterizovat transgenní rostliny T0 a T1 generace jarního ječmene, u kterých je předpokládán vznik mutace v zájmovém genu *HvABCG11*.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 ABC transportéry

ABC (ATP binding cassette, ABC) transportéry jsou jednou z největších proteinových rodin, jsou zastoupeny jak v eukaryotických, tak v prokaryotických organismech a fungují jak exportéry, tak importéry. V rostlinách jsou ABC transportéry součástí řady fyziologických procesů, jako je například transport hormonů, regulace stomat, reakce na stres a komunikace mezi rostlinou a mikroorganismy. Typický ABC transportér je složen ze dvou transmembránových domén (transmembrane domain, TMD) formujících přenosný kanál a dvou nukleotid vázajících domén (nucleotide-binding domain, NBD) nacházejících se v cytoplazmě. Existují také tak zvané poloviční ABC transportéry, které obsahují jednu TMD a jednu NBD, tento typ ABC transportérů pak tvoří heterodimery či homodimery (Davidson et al., 2008). Třetí typ ABC transportéru nemá žádnou TMD, ale je tvořen dvěma NBD. NBD je hydrofilní a obsahuje několik konzervativních motivů, jako jsou Walker A a Walker B sekvence, ABC signature motiv, H smyčka, Q smyčka a D smyčka. D smyčka primárně spojuje dimery, H smyčka interaguje s TMD. Walker A a Walker B tvoří P smyčku, která se váže k ATP a Q-smyčka a H-smyčka obsahují prvky důležité pro interakci s  $\gamma$  fosfátem ATP (Davidson et al., 2008). TMD je hydrofóbní a je typicky složena z šesti transmembránových  $\alpha$  helixů. NBD zprostředkovává energii hydrolýzou ATP, naproti tomu TMD se váže na substrát a transportuje jej přes membránu (Schneider et Hunke, 1998).

V důsledku rapidního vývoje sekvenování DNA bylo zjištěno, že geny kódující ABC transportéry jsou hojně zastoupeny ve všech rostlinách. Suchozemské rostliny obsahují podstatně větší množství ABC transportérů ve srovnání s jinými zástupci eukaryot, viz tab. 1 (Hwang et al., 2016).

**Tab. 1. Počet ABC transportérů nacházejících se u vybraných zástupců eukaryotických organismů.**

Zástupce Eukaryot	Počet ABC transportérů
<i>Oryza sativa</i>	133
<i>Drosophila melanogaster</i>	56
<i>Mus musculus</i>	53
<i>Homo sapiens</i>	49
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30

Přejato z Hwang et al., 2016.

*Arabidopsis thaliana* je první vyšší rostlinou, u které byly popsány všechny geny kódující ABC transportéry. Genom *A. thaliana* obsahuje 130 genů kódujících ABC proteiny (Sánchez-Fernández et al., 2001). V genomu *Oryza sativa* bylo určeno 133 a v *Zea mays* 130 ABC genů (Baxter et al., 2001; Pang et al., 2013). Existuje několik přístupů klasifikace ABC transportérů, momentálně nejrozšířenějším způsobem klasifikace je rozdělení ABC transportérů do podskupin na základě jejich proteinové rozpustnosti, přítomnosti TMD, funkce a aminokyselinové sekvence (Verrier et al., 2008). Rostlinné ABC transportéry se třídí do osmi podskupin A, B, C, D, E, F, G a I (Kang et al., 2011). Zástupci skupiny ABCH, která je známá hlavně u hmyzu, nebyli u rostlin, kvasinek a savců identifikováni (Dean et Annilo, 2005). ABCA až ABCD se vyznačují přední orientací, to znamená, že TMD se nachází před NBD. ABCC transportéry jsou převážně lokalizovány na membráně vakuoly – tonoplastu (Tan et al., 2019). ABCD podskupina je tvořena jedním úplným ABC transportérem a jedním polovičním transportérem, oba se nachází v peroxisomech (Hayashi et al., 2002). ABCG se značí svou obrácenou orientací, v rámci uspořádání genu se NBD nachází před TMD (Rea, 2007). ABCG podskupina je u rostlin zdaleka největší podskupinou ABC transportérů, u *A. thaliana* čítá 43 zástupců, 28 z nich jsou poloviční ABC transportéry (Kang et al., 2011). V genomu *H. vulgare* bylo identifikováno 131 genů ABC transportérů. 99 HvABC proteinů bylo lokalizováno na plazmatické membráně, pouze několik HvABC proteinů bylo lokalizováno na membráně vakuol, chloroplastů a mitochondrií (Zhang et al., 2020). Zhang et al. (2020) dále zjistili, že HvABCG podskupina ABC genů je v ječmeni nejrozšířenější a je tvořena 49 geny. Naopak HvABCE podskupina je tvořena pouze třemi členy. Ve všech HvABC genech byla potvrzena přítomnost alespoň jedné NBD. NBD je tedy unikátní doménou ABC transportérů a je vysoce konzervovaná. Naopak sekvence a struktura TMD se u řady HvABC lišila (Zhang et al., 2020).

Strukturní základ pro substrátovou specifitu ABC proteinů je nejasný, a proto není možné předpovědět substráty ABC proteinů, které ještě nebyly funkčně studovány. Některé ABC transportéry mají slabou substrátovou specifitu, jsou schopny transportovat funkčně a strukturně odlišné sloučeniny (Lefèvre et Boutry, 2018). Jiné ABC transportéry jsou monospecifické, příkladem je transportér AtABCB1, který je schopný vázat pouze specifickou skupinu auxinů a má schopnost rozlišit strukturně blízké syntetické auxiny 1-naftalenoctovou kyselinu a 2-naftalenoctovou kyselinu (Geisler et al., 2005). Identifikace substrátu a určení funkce jednotlivých ABC transportérů obvykle vyžaduje získání odpovídajícího mutanta, u kterého poté následuje rozsáhlá funkční studie. Stanovení funkcí nově objevených ABC genů tedy vyžaduje mnoho času a úsilí.

### 3.1.1 Evoluce ABC transportérů

ABC transportéry jsou fylogeneticky stará skupina proteinů, existují ve všech studovaných prokaryotických a eukaryotických organismech a během evoluce podstoupily širokou škálu změn (Cho et al., 2021). Prokaryotické ABC transportéry jsou většinou menší a strukturně jednodušší než ABC transportéry nalezené v eukaryotech. Bylo zjištěno, že podskupina eukaryotických ABCB genů kódující poloviční proteiny má NBD spojenou s poloviční NBD pocházející z prokaryotických organismů. Protože jsou ABC transportéry lokalizovány i na mitochondriálních a vakuolárních membránách, předpokládá se, že rostlinné NBD se pravděpodobně vyvinuly endosymbiózou (Xiong et al., 2015). ABC transportéry umožnily rostlinám adaptovat se na suchozemské podmínky. Podílí se na tvorbě kutikuly, zprostředkovávají transport hormonů nebo jsou součástí odpovědi na patogeny (Hwang et al., 2016). Během evoluce z jednobuněčné zelené řasy na terestriální rostlinu došlo k významné diverzifikaci ABC transportérů. Kong et al. (2020) provedli komparativní genomickou analýzu zástupců řas, nižších a vyšších rostlin a zjistili, že genomy všech testovaných řas, mezi které patří například *Penium margaritaceum*, *Mesotaenium endlicherianum* a *Spirogloea muscicola*, obsahují pouze dílčí sady genů podílejících se na syntéze kutikuly a transportu strukturních složek kutikuly. Mezi geny kódující transportéry složek kutikuly se řadí ABCG transportéry (ABCG11 a ABCG12) a geny kódující lipopolysacharidový transport (lipopolysaccharide transport system gene, *LPTG*). Fylogenetická analýza dále identifikovala ortology všech genů známých komponent nezbytných pro syntézu kutinu a kutikulárních vosků ve všech analyzovaných suchozemských rostlinách, což naznačuje, že syntéza kutikuly vznikla

v posledním společném předkovi Embryophyta (Kong et al., 2020). Z evolučních studií vyplývá, že domény ABC transportérů byly během evoluce multiplikovány, fúzovány či modifikovány (Cho et al., 2021). Evoluční studie ABC genů jsou nezbytné i pro pochopení funkce ABC transportérů, pomáhají získat informace o substrátu řady necharakterizovaných ABC proteinů a logicky předpokládat funkci u nepopsaných ABC proteinů na základě příbuznosti ve fylogenetických stromech. ABCG transportéry jsou největší podskupina ABC proteinů ve všech suchozemských rostlinách. Výjimečná diverzifikace ABCG transportérů je přisuzována adaptaci rostlin na suchozemské podmínky (Hwang et al., 2016). Cho et al. (2021) vytvořili fylogenetické stromy ABCG genů *A. thaliana* a jejich homologů z řady organismů, aby zjistili, proč ABCG transportéry během evoluce terestriálních rostlin tak extenzivně proliferovaly. Z fylogenetických stromů vyvodili, že ABCG proteiny *A. thaliana* a jejich homology nalezené v suchozemských rostlinách jsou jasně oddělitelné od ABCG proteinů jiných organismů, což naznačuje, že se diferenciovaly až po evoluci suchozemských rostlin. Studované ABCG proteiny *A. thaliana* a jejich homology nacházející se u suchozemských rostlin se diverzifikovaly do sedmi různých skupin, každá skupina je složená z několika genů s podobnou fyziologickou funkcí. ABCG proteiny se rapidně diverzifikovaly, jak u suchozemských rostlin, tak u *Oomycetes* (Wang et al., 2015). Mnoho zástupců *Oomycetes* jsou rostlinnými patogeny, některé rostlinné ABC transportéry transportují sekundární metabolity, důležité pro obranu proti těmto patogenům. Příkladem takového transportéru je AtABCG40, který je nezbytný pro rezistenci vůči *Phytophthora*, rostlinnému patogenu patřícímu mezi *Oomycetes* (Kamoun et al., 2015; Wang et al., 2015). Význam ABCG transportérů v obraně proti patogenům naznačuje, že rostlinné ABCG transportéry a ABCG transportéry *Oomycetes* se pravděpodobně vyvíjely v evolučním závodě (Cho et al., 2021).

### **3.1.2 ABC transportéry esenciální pro růst a vývoj rostlin**

ABC transportéry se podílí na řadě buněčných procesů, jako je reakce na biotický a abiotický stres, ukládání lipidů na povrchu pletiv, dormance semen, regulace tvaru a velikosti zrn, transport fytohormonů, růst a diferenciace, příjem prospěšných živin či redoxní homeostáza. ABC transportéry hrají tedy důležitou roli ve výnosu a odolnosti plodin. ABC transportéry se u rostlin nachází na plazmatické membráně, membráně

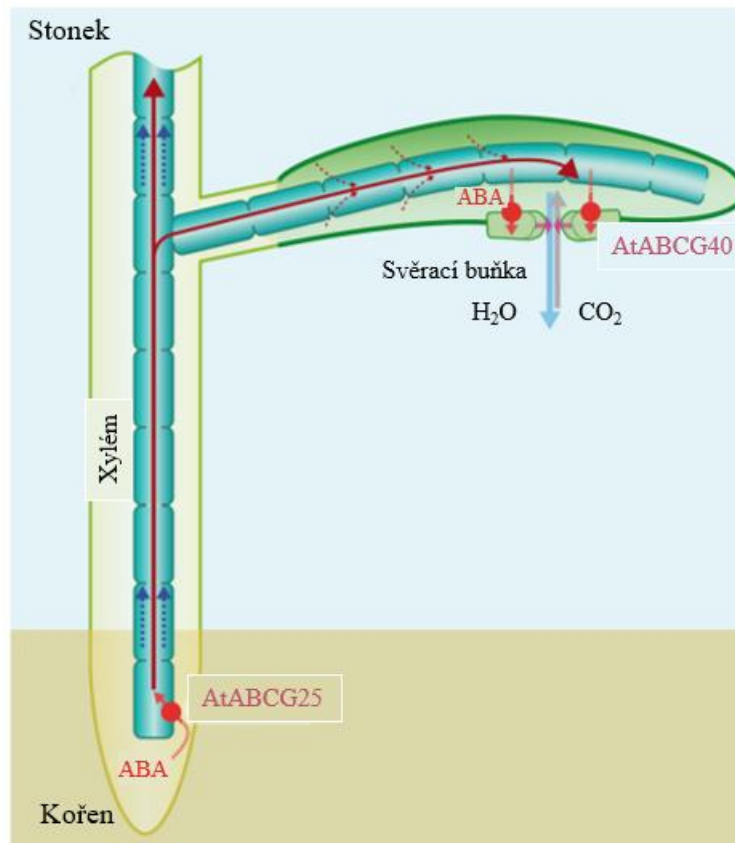
vakuol, chloroplastů, mitochondrií či peroxizomu. Mezi substráty rostlinných ABC proteinů patří hormony, pigmenty, toxické látky, sekundární metabolity potřebné pro obranu, lipidové molekuly či reaktivní kyslíkové sloučeniny (Do et al., 2021).

### **Transport rostlinných hormonů.**

Fytohormony řídí růst a vývoj rostliny a jsou nezbytné v odpovědi na endogenní a exogenní podmínky. Rostlinné hormony ovlivňují fyziologické procesy již ve velmi malých koncentracích. Obdobně jako u živočichů, fytohormony musí být transportovány do cílových pletiv vzdálených od místa jejich biosyntézy (Borghini et al., 2015). S transportem fytohormonů jsou asociovány některé z řad *ABCB*, *ABCD* a *ABCG* genů.

Kyselina abscisová (abscisic acid, ABA) je hormon, jehož hlavní role je reakce na biotický a abiotický stres, jako jsou patogeny, salinita, změny teplot či sucho. Fytohormon ABA je produkován hlavně v parenchymu buněk cévních svazků kořenu a prýtu a je transportována do listů, kde je uchovávána a kde reaguje na vodní stres. ABA je tvořena také ve svěracích buňkách. Bauer et al. (2013) zjistili, že svěrací buňky stomatu obsahují enzymy potřebné pro syntézu ABA a po expozici listu suchému vzduchu mohou syntetizovat ABA *de novo*. ABA je exportována z cévních buněk do xylému a do svěracích buněk proteiny skupiny ABCG. Protein AtABCG25 je poloviční ABC transportér, který transportuje ABA z cévních buněk do apoplastu v reakci na vodní stres, viz obr. 1. Zvýšená exprese *AtABCG25* způsobila zvýšenou teplotu listů naznačující zvýšenou transpiraci a roli tohoto transportéru v regulaci stomat (Kuromori et al., 2010). AtABCG40 je plazmatický protein, který je součástí influxu ABA, mutant genu *AtABCG40* se vyznačoval nižší tolerancí na sucho z důvodu neadekvátního pohybu stomat (Kang et al., 2010).





**Obr. 1. Role transportérů AtABCG25 a AtABCG40 v influxu a efluxu ABA** (převzato a upraveno podle Kang et al., 2011).

Cytokiny (CK) jsou fytohormony hrající významnou roli v regulaci fyziologických a vývojových procesů, jako je formace apikálního meristému, růst kambia či diferenciace buněk. Cytokiny nejsou syntetizovány jen v kořenech, ale geny biosyntézy jsou exprimovány také v nadzemních částech rostliny. Přestože enzymy potřebné pro syntézu CK jsou dobře popsány, transport CK je ještě předmětem výzkumu. Předpokládá se, že ABC transportér AtABCG14 lokalizovaný v plazmatické membráně se účastní transportu CK. Ztráta exprese *AtABCG14* vedla k degenerativním změnám růstu nadzemní části. Navíc v mutantech *atabcg14* koncentrace CK v xylému byly sníženy až o 90 % (Ko et al., 2014). Zhao et al. (2019) charakterizovali rýžového ortologa transportéru AtABCG14, OsABCG18, který je součástí transportu CK z kořene do nadzemní části rostliny. Podobně jako *AtABCG14*, *OsABCG18* je primárně exprimován v kořeni a ABC transportér je lokalizován na plazmatické membráně. Transport CK byl v mutantech *osabcg18* významně potlačen (Zhao et al., 2019).

Strigolaktony jsou fytohormony odvozené z karotenoidů, hrají důležitou roli v inhibici laterálního růstu pupenů a podporují symbiózu mezi mykorhizními houbami

a kořeny rostlin. Strigolaktony jsou navíc součástí regulace tvorby laterálních a adventních kořenů (Sasse et al., 2015). Strigolaktony jsou syntetizovány v kořenech a nadzemních částech rostlin (Domagalska et Leyser, 2011). ABC transportér PhPDR1 u *Petunia hybrida* pravděpodobně transportuje strigolaktony a je nezbytný pro regulaci mykorhizy a auxiliární tvorbu větví. Mutantní rostliny v genu *PhPDR1* nedostatečně vylučovaly strigolaktony z kořenů, což mělo za následek redukci symbiotických interakcí (Kretschmar et al., 2012). Sasse et al. (2015) zjistili, že PDR1 se vyznačuje buněčně specifickou asymetrickou lokalizací v odlišných kořenových pletivech a zprostředkovává transport strigolaktonů do nadzemní části a lokalizovaný výdej strigolaktonů do půdy.

Dalšími významnými fytohormony jsou auxiny. Jedná se o skupinu látek vycházející ze struktury indolu, auxin IAA (indol-3-octová kyselina) je nejvýznamnějším auxinem u rostlin. Vývoj a růst rostliny je vysoce závislý na auxinovém gradientu. Auxinový gradient je udržován díky transportu auxinu mezi sousedními buňkami na dlouhé vzdálenosti. Některé ABCB transportéry pravděpodobně slouží jako primární aktivní auxinové pumpy, které jsou schopny transportovat proti prudkému auxinovému gradientu hydrolyzou ATP (Geisler et al., 2017). *AtABCB1* a jeho homolog *AtABCB19* jsou spojovány s transportem auxinu (Noh et al., 2001). Mutace v genech *AtABCB1*, a *AtABCB19* měly za následek malý vzrůst rostliny, redukovanou apikální dominanci a auxinové inbalance. Polární transport *atabcb1atabcb19* byl až o 70 % snížen jak ve stonku, tak v hypokotylu (Noh et al., 2003). Další transportéry z ABCB skupiny spojované s transportem auxinů jsou ABCB4 a ABCB21. *AtABCB4* je lokalizovaný v epidermis kořene. Ztráta funkce *AtABCB4* se v kořenech projevila sníženým transportem auxinu (Terasaka et al., 2005). *AtABCB21* se nachází na plazmatické membráně a je fakultativní exportér nebo importér, v závislosti na cytoplazmatické koncentraci reguluje příjem a výdej IAA (Kamimoto et al., 2012).

Ječmen, stejně jako kvasinky a lidé, má dva *ABCD1* homology, *HvABCD1* a *HvABCD2*. *HvABCD* hrají roli v metabolismu auxinů a podílí se i na biosyntéze jasmonátu a determinaci velikosti zrna (Mendiondo et al., 2014).

## Transport a detoxifikace těžkých kovů

ABC transportéry byly dlouho asociovány hlavně s transportem těžkých kovů a jejich detoxifikací. Těžké kovy hrají důležitou roli v produkci reaktivních kyslíkových radikálů, velké množství těžkých kovů v organismech způsobuje oxidativní stres. U rostlin oxidativní stres způsobený těžkými kovy vede ke změně exprese důležitých genů, a tak způsobuje rozpad buněčného metabolismu a ovlivňuje růst rostlin (Chaffai et al., 2011). Těžkými kovy jsou ovlivňovány hlavně kořeny, protože ze všech rostlinných orgánů s nimi přichází nejvíce do kontaktu. Mezi ABC transportéry podílející se na rezistenci k těžkým kovům patří *AtABCC2* a *AtABCC1*, u kterých bylo zjištěno, že přispívají v *A. thaliana* k toleranci  $Cs^{+2}$  a  $Hg^{+2}$  (Park et al., 2012). Železo je v rostlině využíváno převážně jako enzymový kofaktor hlavně v elektronovém transferu a katalýze. Nejčastějšími formami kofaktoru železa jsou Fe-S shluky lokalizované v mitochondriích, cytosolu, jádře a plastidech (Lu, 2018). *AtABCB25* lokalizovaný v mitochondrii se podílí na syntéze těchto Fe-S klastrů (Bernard et al., 2009). *AtABCG36* je dalším proteinem, který je součástí rezistence na těžké kovy. Dva týdny staré rostliny *A. thaliana* ošetřené  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  a  $Cu^{+2}$  se vyznačovaly zvýšenou expresí *AtABCG36* v kořenové oblasti (Kim et al., 2007). Již zmíněný *AtABCG40*, u kterého byl prokázán import ABA, se navíc podílí i na rezistenci vůči olovu. Mutantní rostliny v genu *AtABCG40* pěstované na médiu obohacené o  $Pb^{+2}$  se projevovaly menším vzrůstem a vyšším obsahem olova oproti kontrolní rostlině (Lee et al., 2005). Součástí tolerance vůči hliníku je ABC transportér *AtABCB27* a rýžový *OsALS1* lokalizovaný v tonoplastu (Larsen et al., 2007). Ječmen patří mezi plodiny nejvíce citlivé na hliník, což výrazně ovlivňuje jeho pěstování v kyselých půdách (Ma, 2007). Liu et al. (2021) charakterizovali ABC transportér *HvABCB25* nacházející se v tonoplastu kořenových buněk planého ječmene, který se podílí na detoxifikaci hliníku. Potlačení exprese *HvABCB25* vedlo k poklesu tolerance hliníku, což mělo za následek snížení růstu kořene a zvýšenou akumulaci hliníku v buňkách kořene planého ječmene. Liu et al. (2021) následně zvýšili expresi *HvABCB25* v ječmeni jarním kultivaru Golden Promise, což vedlo k výraznému zlepšení tolerance hliníku a snížení akumulace hliníku v cytosolu kořenových buněk.

## **Transportéry podílející se na přenosu strukturních komponent**

Nadzemní části rostlin jsou pokryty kutikulou, ochrannou hydrofobní bariérou tvořenou z kutinového polyesteru a vosků. Kutikula kryje vnější vrstvu epidermálních buněk a slouží jako obrana proti vlivům prostředí, biotickému stresu, brání ztrátám vody, omezuje transpiraci, umožňuje transport plynů a rozpuštěných látek. Hlavní složkou kutikuly je kutin složený z glycerolu a C16 a C18 mastných kyselin (Franke et al., 2005). Kompozice a struktura kutinu je druhově specifická a může se lišit i mezi orgány. ABCG transportéry AtABCG11, AtABCG12, AtABCG13 a AtABCG32 jsou nedílnou součástí transportu stavebních složek kutikuly. Homo či hetero dimery polovičního transportéru AtABCG11 se podílí na formaci kutinu v listech a stonku (McFarlane et al., 2010). Mutant genu *AtABCG11* se projevil zakrslostí, samčí gametofyt byl sterilní a došlo k fúzi orgánů (Bird et al., 2007). AtABCG13 je poloviční transportér nezbytný pro transport kutinu v okvětních lístcích (Panikashvili et al., 2011). AtABCG32 je typ Pleiotropic drug resistance (PDR) transportéru. PDR skupina ABC transportérů je složena u *A. thaliana* z 15 genů a z 23 genů u *O. sativa*. Tyto PDR geny tvoří samostatnou větev v rodině ABC transportérů. Všechny PDR transportéry se vyvinuly ze společného předka vzniklého z jedné duplikační události ABC transportéru majícího obrácenou strukturu domén (NBD-TMD) (Martinoia et al., 2002). AtABCG32 přispívá k transportu prekurzorů kutinu. Mutant *AtABCG32 pec1* se vyznačoval sníženým množstvím typických kutinových monomerů, jako jsou  $\omega$ -hydroxylované mastné kyseliny a 10, 16-dihydroxypalmitát až o 40 % v kutikulární vrstvě, což vedlo ke zvýšené permeabilitě kutikuly hlavně na okvětních lístcích (Bessire et al., 2011). Proteiny kódované homology AtABCG32 byly identifikovány i u *O. sativa* (OsABCG31) a u *H. vulgare* (HvABCG31). HvABCG31 hraje významnou roli v tvorbě kutikuly v rostoucích listech, *hvabcg31* se projevil zakrslostí, sníženou schopností zadržovat vodu a tenkou kutikulou. Inaktivace genu *OsABCG31* měla za následek defekty ve vývoji epidermálního povrchu stonku a kutikuly listů (Chen et al., 2011). Rýžový transportér OsABCG9 hraje důležitou roli v transportu kutikulárních vosků a je nezbytný pro normální vývoj rostliny během vegetativního období. Mutant genu *OsABCG9* se vyznačoval nízkým vzrůstem a citlivostí na sucho. Celkové množství kutikulárních vosků v listech mutanta *osabcg9* bylo sníženo o 53 % (Nguyen et al., 2018). Gen ječmene jarního *HvABCG11*, který je předmětem této práce se pravděpodobně podílí na tvorbě kutikuly.

Suberin je apoplastický biopolymer sloužící k ochraně před vodou, plyny či patogeny, nachází se uložený ve vrstvách mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Hlavními složkami suberinu jsou karboxylové kyseliny, mastné kyseliny a primární alkoholy. Některé ABCG proteiny byly identifikovány jako transportéry komponent suberinu. AtABCG2, AtABCG6, AtABCG20 přispívají k tvorbě suberinové lamely v endodermis kořenu. Trojitý mutant v genech *AtABCG2*, *AtABCG6* a *AtABCG20* se projevoval vysokou permeabilitou kořene a sníženým obsahem suberinu v plášti semen (Yadav et al., 2014). OsABCG5 je rýžový protein nezbytný pro depozici suberinu v hypodermální vrstvě kořenu. Rostlina s mutací v *OsABCG5* postrádala suberinovou lamelu (Shiono et al., 2014).

Monolignoly jsou fenolické sloučeniny a prekurzory pro syntézu ligninu, hlavní komponentu dřeva. Monolignoly jsou syntetizovány v cytosolu, a tak musí být transportovány přes buněčné membrány do buněčné stěny, kde jsou oxidovány a polymerizovány. V *A. thaliana* byl identifikován ABC protein plazmatické membrány AtABCG29 transportující monolignoly. Ztráta funkce AtABCG29 proteinu, způsobila, že mutantní rostliny vykazovaly defekty lignifikace (Alejandro et al., 2012).

Pylová zrna jsou vybavena komplexní stěnou, která chrání gamety před vnějšími vlivy. Stěna pylového zrna je složena z několika ochranných vrstev, jako je plášť zrna, vnější stěna složená převážně ze sporopoleninu a vnitřní stěna obsahující celulózoové sloučeniny (Zhang et Li, 2014). Na přenosu monomeru potřebného k tvorbě sporopoleninu z tapetum do archesporia se v *A. thaliana* podílí transportér AtABCG26. Ztráta funkce tohoto genu vedla k formaci defektní vnější vrstvy pylového zrna (Choi et al., 2011). Rýžový ortolog genu *AtABCG26*, *OsABCG15*, je exprimován v tyčince a transportuje kutikulární monomery z tapetum na vnější povrch tyčinek. Mutant genu *OsABCG15* se vyznačoval významně redukováným množstvím kutinu. Dvojitý mutant *osabcg15osabcg26* vykazoval skoro kompletní absenci kutikuly na tyčince (Zhao et al., 2015). U *A. thaliana* byly identifikovány další transportéry podskupiny G podílející se na formaci ochranného pláště zrna, mezi ně patří AtABCG1, AtABCG9, AtABCG16 a AtABCG31 (Choi et al., 2014; Yim et al., 2016).

### **Transportéry účastníci se reakce na patogeny**

Rostliny produkují sekundární metabolity, jako jsou deriváty terpenů, alkaloidy, glykosidy, které slouží k primární obraně organismu proti útoku patogenů (Osbourn, 1996). Analýza transkriptomu *O. sativa* odhalila, že až polovina ABCG proteinů je součástí reakce na biotický stres. V přítomnosti kyseliny jasmonátové a kyseliny salicylové došlo totiž ke zvýšení exprese genů kódujících tyto transportéry (Moons, 2008). Roli v obraně proti biotickému stresu hrají pravděpodobně transportéry AtABCG30 a AtABCG34. U Mutanta v genu *AtABCG30/AtPDR2* byla pozorována změna mikroflóry v oblasti kořene naznačující sníženou obranyschopnost rostliny (Badri et al., 2009). Khare et al. (2017) zjistili, že protein AtABCG34 je zapojen do obrany proti nekrofilním houbám transportem antimikrobiální látky camalexinu, hlavního fytoalexinu *A. thaliana* na povrch listu. Nejstudovanějším transportérem podílejícím se na obraně proti patogenům je AtABCG36. Mutanti genu *AtABCG36* byli náchylnější k padlí. Mutanti se dále vyznačovali oslabenou rezistencí proti nehostitelským biotrofům a nektrotrofům (Stein et al., 2006). Podobně v pšenici (*Triticum aestivum*) gen Lr24 kódující ABCG transportér typu PDR podmiňuje rezistenci na několik houbových patogenů (Krattinger et al., 2009).

Přežití patogena nebo symbionta v hostiteli závisí na schopnosti hostitele produkovat esenciální živiny. V mikroorganismech dochází také k expresi ABC transportérů během importu a exportu substrátů (Tanaka et al., 2018). Patogenní bakterie hledají živiny tvořené hostitelem a řada těchto bakterií využívá právě ABC transportéry, aby akumulovala esenciální makromolekuly. Podle Tanaka et al. (2018) je zásadní porozumět těmto systémům, protože jejich funkce jsou nepřímo spojeny s virulentními vlastnostmi patogenů a jejich poznání může pomoci k vytvoření vysoce efektivních terapeutických strategií. Charakterizace ABC transportérů je také objektem výzkumu vědců zkoumající lidské nemoci, jejich vývoji a kontrole, hlavně v době, kdy dochází k nárůstu rezistence bakterií na antibiotika (Hellmich, 2018).

### 3.2 Rekombinantní technologie

Rekombinantní technologie je společné označení biotechnologických postupů, které umožňují pozměnit genetický materiál vybraného organismu inaktivací genů nebo vložením cizí sekvence, a tak získat živý organismus s vylepšenou vlastností, která se přirozeně u daného druhu organismu nevyskytuje. Tato technologie využívá vhodné vektory k inzerci fragmentů DNA z vybraných zdrojů obsahujících požadovanou genetickou sekvenci. Manipulace s genomem organismu se provádí zavedením jednoho nebo několika nových genů a regulačních prvků či inaktivací endogenních genů (Khan et al., 2016). Rekombinantní technologie se účinně používají k produkci řady lidských proteinů v mikroorganismech, jako je inzulin a somatotropin (Flodh, 1986; Johnson, 1983). Rekombinantní technologie významně přispěla i zemědělství zlepšením, jak vlastností plodin jako je tolerance na herbicidy, rezistence rostlin vůči patogenům a výnos, tak například zlepšením nutričních vlastností. Ve srovnání s konvenčním křížením rostlin, při kterém dochází k přenosu jak cílových genů, tak i velkého množství nespecifických genů, genové inženýrství umožňuje přenos pouze zájmových genů (Kumar et Kumar 2015).

Mezi rekombinantní technologie lze zařadit techniky editace genomu. Genomová editace je pojem zahrnující celou škálu technik schopných místně specificky modifikovat DNA v živých buňkách. Dříve hlavním přístupem funkční genomiky byla přímá genetika založená na náhodné mutagenезi celého genomu. K náhodné mutagenезi genomu byla využívána například radiace nebo chemické mutageny, použití těchto metod vedlo k tvorbě vysokého počtu mutací. Dnes je využíván především druhý přístup, tak zvaná reverzní genetika. Reverzní genetika vychází z provedení cílené mutace zájmového genu za použití místně specifických endonukleas a na základě fenotypového projevu mutace je popisována funkce genu. Hlavním nástrojem k editaci genomu jsou programovatelné endonukleasy. Mezi programovatelné endonukleasy patří ZFN, TALEN a systém CRISPR/Cas9 (Boch et al., 2009; Jinek et al., 2012; Kim et al., 1996). ZFN jsou chimérické proteiny složené ze syntetických vazebných domén zinkových prstů a z DNA štěpící domény. DNA vazebnou doménu ZFN lze pak modifikovat tak, aby specificky zacílila vybranou sekvenci DNA (Cathomen et Joung, 2008; Kim et al., 1996). TALEN je systém složený z efektoru transkripčního aktivátoru (transcription activator-like effector, TALE) a k tomu připojené štěpící domény *FokI*. *FokI* štěpí jako dimer, proto TALEN fungují v páru, každá TALEN

se váže na jedno vlákno sekvence (Boch et al., 2009; Christian et al., 2010). Návrh a klonování ZFN a TALEN nukleas je časově a technicky náročný proces ve srovnání s nedávno objeveným systémem CRISPR/Cas9.

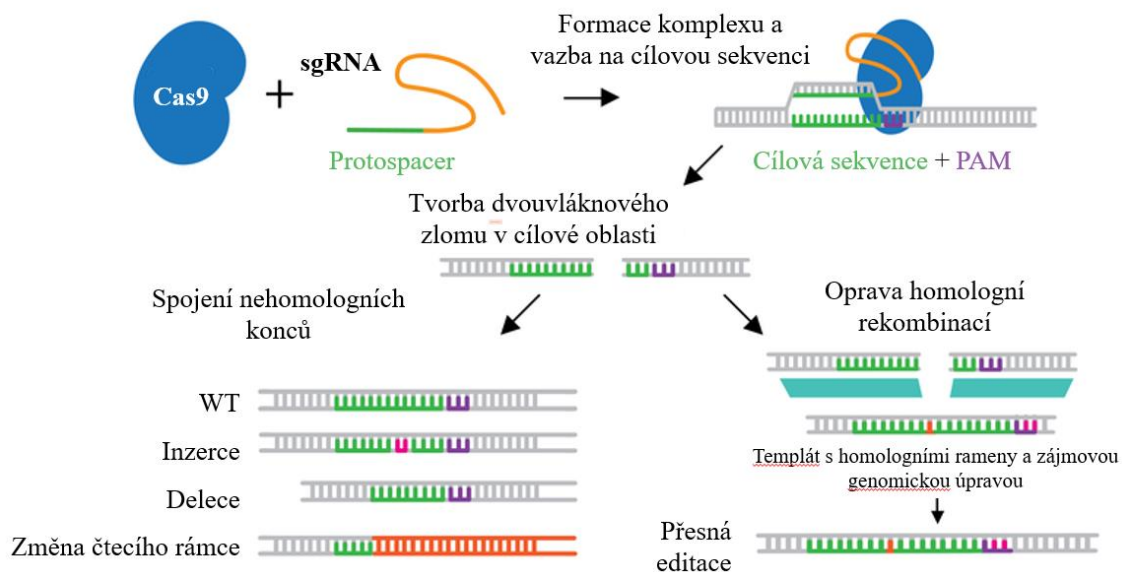
### 3.2.1 Technologie CRISPR/Cas9

CRISPR byl objeven jako část obranného mechanismu prokaryotických organismů zprostředkovávající virovou rezistenci. Ishino et al. objevili CRISPR už v roce 1987 v genomu *Escherichia coli* při zkoumání genu zodpovědného za konverzi isoenzymu alkalické fosfatasy (*iap*). Jedná se o palindromické opakující se sekvence oddělené krátkými (32-38 bp) sekvencemi odvozenými z DNA virů, které dříve infikovaly buňku. Krátké sekvence nukleových kyselin těchto virů jsou integrovány do hostitelského bakteriálního genomu a poskytují paměťový systém dřívějších virových infekcí. Takto integrované sekvence virů v bakteriálním genomu jsou při opětovné nákaze transkribovány a tvoří krátkou vodící RNA (guide RNA, gRNA). gRNA je navázána na Cas9 endonukleasu, komplex gRNA-Cas9 rozpozná sekvenci viru napadajícího buňku na základě komplementarity s gRNA a Cas9 nukleasa provede dvouvláknový zlom (Jinek et al., 2012). Cas endonukleasy typicky rozeznávají krátké motivy přiléhající k protospaceru (protospacer adjacent motif, PAM) o velikosti 3-6 bp. PAM jsou druhově odlišné a jsou zřídka kdy prezentovány ve vlastní DNA hostitele, aby nedošlo k vlastnímu štěpení (Gleditsch et al., 2019). Dále po směru vlákna se nachází protospacer velký 20 bp. Protospacer je kopírovaný úsek DNA patogena vložený do CRISPR lokusu. Protospacery jsou odděleny repetitivními sekvencemi. Při opětovném napadení prokaryotického organismu virem dochází k transkripci CRISPR sestavy za vzniku prekurzoru CRISPR RNA (pre-crRNA) a následuje enzymatické štěpení, kdy z pre-crRNA vzniká CRISPR RNA (crRNA) (Jinek et al., 2012). crRNA se poté spojí s trans aktivující crRNA (tracrRNA) a dochází k tvorbě gRNA. gRNA tvoří sekundární strukturu obsahující R smyčku. R smyčka aktivuje HNH a RuvC-like domény endonukleasy, které specificky štěpí cizí DNA a vzniká tak dvouvláknový zlom (double stranded break, DSB) (Jinek et al., 2012). CRISPR/Cas systémy byly objeveny u řady prokaryotických organismů. Bylo zjištěno, že Cas endonukleasy se u jednotlivých druhů liší strukturou a velikostí. CRISPR/Cas systémy byly rozděleny do 2 tříd, 6 typů a 33 podtypů. První třída je složena ze systémů obsahujících několik Cas enzymů, které spolu spolupracují tak, aby zacílily DNA. Druhá třída systémů obvykle využívá jen jeden multifunkční Cas enzym. Druhá



třída je zatím nejlépe prozkoumána, obsahuje Cas9 endonukleasu, která je běžně využívána ke genomové editaci (Makarova et al., 2020). Pausch et al. (2020) objevili CRISPR/Cas $\Phi$  v bakteriofágu, kde velikost Cas $\Phi$  enzymu je poloviční oproti Cas9, a tak představuje potencionální výhody v přenosu molekuly do buňky.

Když byl CRISPR/Cas9 systém adaptován jako molekulární nástroj, tracrRNA a crRNA byly nahrazeny chimérou těchto dvou RNA molekul nazvanou single guide RNA (sgRNA). Sekvenci sgRNA lze navrhnout tak, aby Cas9 enzym zacílil jakýkoliv vybraný gen. Editační nástroj CRISPR/Cas9 má dvě hlavní komponenty: sgRNA, která navádí endonukleasu na základě komplementarity bazí k vybrané sekvenci a Cas9 endonukleasu, která katalyzuje štěpení fosfodiesterové vazby na obou vláknech DNA a vytváří tak DSB (Jinek et al., 2012). Přítomnost DSB spustí v buňce mechanismy opravy DNA buď způsobem přímé homologně řízené opravy (homologous directed repair, HDR), nebo opravy spojením nehomologních konců (non-homologous end joining, NHEJ), viz obr. 2 (Puchta, 2005). Pokud DSB způsobí HDR, dochází k syntéze homologní sekvence pomocí sesterské chromatidy, která je použita jako templát pro opravu nukleové kyseliny. Během opravy DNA mechanismem HDR nedochází k tvorbě chyb. Jestliže probíhá oprava DSB prostřednictvím NHEJ, dochází k přímé ligaci konců nukleové kyseliny enzymem DNA ligasou. Během NHEJ opravy vznikají nukleotidové inserce, substituce či delece v místě zlomu. Inserce, či delece mohou zapříčinit změnu čtecího rámce, tvorbu stop kodonu nebo vznik kodonu nekódujícího žádnou aminokyselinu (Hefferin et Tomkinson, 2005). NHEJ oprava DNA probíhá během G1, S a G2 fáze. K HDR dochází jen v pozdní S nebo G2 fázi buněčného cyklu, kdy jsou dostupné sesterské chromatidy, které slouží jako templáty k opravě. HDR závisí na typu buňky, koncentraci donorové DNA, na vybraném přenosu a přítomnosti homologní DNA uvnitř jádra (Heyer et al., 2010). HDR mechanismus je v genomové editaci využíván k vložení celých sekvencí genů s rameny homologními k okolním sekvencím DSB.



**Obr. 2. Indukce dvouvláknového zlomu (DSB) komplexem Cas9-sgRNA a následná oprava DSB.** (převzato 10. 7. 2022 a upraveno podle <https://www.addgene.org/crispr/cut/>).

Cas9 endonukleasu lze modifikovat tak, aby byla zvýšena její specifita a efektivita. Mezi upravené Cas9 enzymy patří nick Cas9 (nCas9), u kterého je jedna štěpící doména inaktivována (Trevino et Zhang et al., 2014). Další modifikací Cas9 je deaktivovaný enzym, tak zvaný dead Cas9 (dCas9), kdy obě štěpící domény endonukleasy ztrácí funkci, avšak vazebná funkce Cas9 není ovlivněna. nCas9 a dCas9 mohou být dále fúzovány s jinými funkčními proteiny, a tak dát vzniku novým typům CRISPR/Cas9 genomových editorů. dCas9 protein lze spojit s enzymem konvertujícím báze za vzniku tak zvaného báze editoru schopného tvořit specifické změny bází. Cytosin báze editor tvořený dCas9, cytidin deaminasou a glykolasa inhibitorovou doménou katalyzuje konverzi cytosinu na thymin, což vede ke změně C/G na T/A (Li et al., 2018). Pokud je provedena fúze dCas9 s upravenou RNA adenosin deaminasou, dochází ke vzniku adeninového báze editoru. Adeninový báze editor konvertuje adenin na guanin, a tak se A/T mění na G/C (Kang et al., 2018). Alternativně lze dCas9 nukleasu fúzovat s reverzní transkriptasou. Anzalone et al. (2019) tak připravili genom editující systém zvaný Prime editor. Prime editor přímo vkládá DNA sekvenci na vybrané místo v genomu bez přítomnosti templátu. Prime editor má schopnost provést inserce, delece a 12 typů báze konverzí bez provedení DSB. Hlavní komponentou Prime editor systému je programovatelná prime editing gRNA (pegRNA), která produkuje sgRNA a templát reverzní transkriptasy. Editace genomu pomocí Prime editoru byla úspěšně provedena jak

v živočišných, tak v rostlinných buňkách. Efektivita této technologie se u lidských buněk pohybuje okolo 50 %, ale u rostlin je mnohem nižší (Anzalone et al., 2019).

Epigenetické mechanismy, mezi které patří například DNA methylace, modifikace histonu nebo nekódující RNA, ovlivňují genetickou expresi v živočišných i rostlinných buňkách. Spojením dCas9 a demethylačního enzymu vzniká CRISPR/dCas9 systém schopný odstranit methylové skupiny z vybrané sekvence DNA, a tak spustit či zvýšit expresi daného genu (Lau et Suh, 2018). Liu et al. (2018) využili CRISPR/dCas9 schopný zacílit CGG expanzní mutaci v 5'-UTR oblasti genu fragilního X mentální retardace 1. Syndrom fragilního X je nejčastější typ mentální poruchy u mužů. Genetická exprese je ovlivněna také histony, proteiny, kolem kterých je omotána molekula DNA. Enzym lysin specifická demethylasa 1 (LSD1) selektivně odstraní až dvě methylové skupiny z histonu, a tak reguluje expresi vybraného genu. Spojením LSD1 s dCas9 vzniká proteinový komplex schopný pozměnit expresi vybraných genů (Kearns et al., 2015). Dalším důležitým epigenetickým regulátorem jsou nekódující RNA, kam patří například microRNA či siRNA. Huo et al. (2017) za použití CRISPR/Cas9 inaktivovali microRNA 21 v rakovině děložního čípku, což signifikantně inhibovalo proliferaci, migraci a invazi nádorových buněk.

### **Proces editace rostlinného genomu použitím CRISPR/Cas9**

CRISPR/Cas9 lze využít také k editaci rostlinného genomu. Zásah do rostlinného genomu tak umožňuje vytvářet cílené mutace v genomu hospodářských plodin s cílem zvýšit výnos plodin, jejich kvalitu či toleranci vůči enviromentálním stresům. Abiotický a biotický stres jsou dva hlavní limitující faktory v růstu a vývoji plodin, v jejich výnosu a kvalitě. Technologie CRISPR/Cas9 poskytuje prostředek k výzkumu rostlinných genů kritických pro zlepšení zemědělských vlastností rostlin. Inaktivací zájmových genů lze pak dosáhnout mimo jiné rezistence vůči rostlinným patogenům, zlepšení adaptace na různé abiotické stresy či zvýšení výnosu (Razzaq et al., 2019).

Prvním krokem procesu editace rostlinného genomu je identifikace zájmového genu. Poté je *in silico* navržena expresní sgRNA kazeta složená z 98-nukleotidové sekvence a 20-nukleotidového protospaceru tak, aby specificky navedla Cas9 protein, který způsobí DSB ve vybraném genu. Ke genetické editaci rostlin metodou CRISPR/Cas9 je poté nutné připravit expresní vektor kódující *Cas9* a sgRNA. V rostlinách dochází k transkripci sgRNA RNA polymerasou III, exprese sgRNA kazety je obvykle řízena

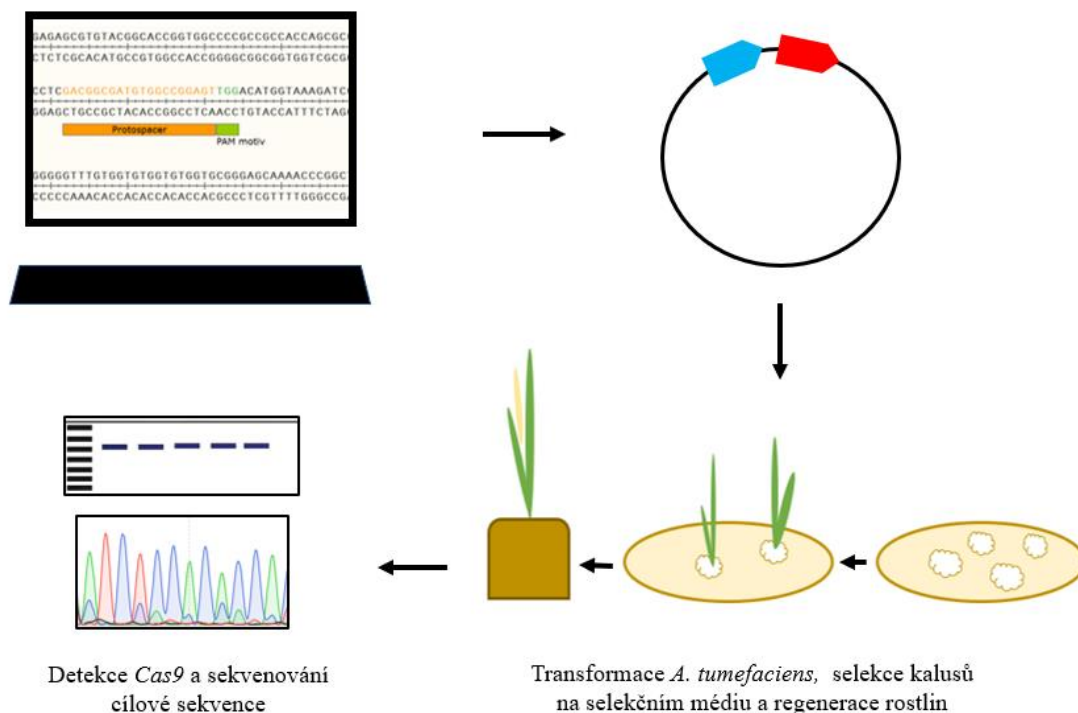
ubikvitinovým U3 nebo U6 promotorem. K expresi Cas9 expresní kazety se obecně využívá promotor 35S Cauliflower mosaic virus (CaMV35) či ubikvitinový promotor. Expresní vektor obsahuje mimo expresní kazetu s příslušným promotorem i další funkční elementy, jako je transkripční terminátor a marker rezistence k antibiotiku nebo herbicidu nutný pro selekci. Výzkum pleiotropních genů či některých genů esenciálních pro vývoj a reprodukci rostlin metodou CRISPR/Cas9 je obtížný, protože jejich inaktivace je neslučitelná se životem rostliny. V takovém případě lze využít buněčně specifické promotory, například pSMP promotor pro expresi v kořenové čepičce či pTMM promotor k expresi ve svěracích buňkách. Tyto promotory zajistí, že exprese CRISPR-Cas9 systému je buněčně specifická a genomová editace proběhne jen v určité skupině buněk (Ali et al., 2020).

### **Metody transformace rostlin**

Nejpoužívanější metodou genetické transformace rostlin je přenos konstruktů kódujícího Cas9 nukleasu zprostředkovaný *Agrobacterium tumefaciens*, viz obr. 3. Kultivací na selekčním médiu jsou získány transgenní rostliny obsahující CRISPR-Cas9 transgen. K potvrzení přítomnosti mutace je nebytné provést sekvenaci cílové sekvence. V případě nalezení zájmové mutace, lze transgen *Cas9* eliminovat Mendelovou segregací, a tak získat geneticky editovanou rostlinu bez transgenů (Pyott et al., 2016). Alternativně lze k transformaci rostlin využít gram negativní půdní bakterii *Rhizobium rhizogenes*, která způsobuje tvorbu vláskových kořenů. Transformace *R. rhizogenes* je zprostředkována Ri plazmidem přeneseným do kořenů (Kiryushkin et al., 2021). Další hojně využívanou metodou transformace rostlin je mikroprojektilový přenos založený na vysokorychlostním přenosu mikroprojektilů, jimiž lze vnést do cílových buněk jak CRISPR/Cas9 DNA, tak RNA komplex nebo ribonukleoproteiny (RNP). Zhang et al. (2016) mikroprojektilovým přenosem CRISPR-Cas9 systému do nezralých embryí *T. aestivum* připravili homozygotní mutantní rostliny. K indukci mutace genu *TaGASR7* použili CRISPR-Cas9 systém ve formátu CRISPR/Cas9 DNA a k tvorbě mutace genu *TaGW2* využili CRISPR-Cas9 RNA.

Analýza sekvence cílového genu a výběr protospaceru

Klonování expresního vektoru obsahující *sgRNA* a *Cas9*



**Obr. 3.** Schéma postupu editace vybraného rostlinného genu metodou CRISPR/Cas9. Rostlinný materiál je transformován expresním vektorem obsahující *sgRNA* a *Cas9*.

Transformaci a editaci genomu jednoděložných rostlin lze zefektivnit použitím růstových regulátorů BABY BOOM a Wuschel (Lowe et al., 2016). Che et al. (2022) srovnali efektivitu transformace *Sorghum bicolor* prostřednictvím *A. tumefaciens* za použití růstového regulátoru Wuschel-2 (*Wus2*) s konvenční transformací. Efektivita transformace za použití *Wus2* se zvýšila z 20 % na 38,8 %. Che et al. (2022) následně sledovali vliv *Wus2* na genomovou editaci metodou CRISPR/Cas9. Četnost mutací u rostlin transformovaných CRISPR expresním vektorem kódujícím *Wus2* činila 74,2 % oproti editaci CRISPR expresním vektorem bez *Wus2*, kdy úspěšnost editace se pohybovala okolo 27 %.

Editace genomu rostlin použitím technologie CRISPR/Cas9 je obecně méně efektivní než u živočichů, hlavně z důvodu obtížnějšího přenosu CRISPR-Cas9 systému do rostlinných buněk (Bortesi et al., 2016). Jedním z hlavních úskalí rostlinné genomové editace je přenos systému CRISPR-Cas9 přes buněčnou stěnu. Protoplasty, stejně jako živočišné buňky, neobsahují buněčnou stěnu. Transformace protoplastu umožňuje provést genomovou editaci využitím RNP komplexu či mRNA, a tak získat mutované rostliny

bez přítomnosti exogenní DNA. RNP komplexy mohou být vneseny do protoplastu pomocí polyethylenglykol-calcium transfekce (Woo et al., 2015; Lin et al., 2018). Transfekcí izolovaných protoplastů komplexem Cas9 proteinu a gRNA Woo et al. (2015) připravili editační událost v genomu *A. thaliana*, *Nicotiana attenuata*, *O. sativa* a *Latua sativa*. Přímou polyethylenglykol-calcium transfekcí protoplastů systémem CRISPR/Cas9 RNP byl editován gen *MLO-7* *V. vinifera* za účelem zvýšení rezistence vůči padlí a v jablku byly indukovány mutace genů *DIPM-1*, *DIPM-2* a *DIPM-4* k zvýšení odolnosti na bakteriální spálu růžovitých (Malnoy et al., 2016). Regenerace rostlin z jednobuněčného protoplastu je však časově náročná a během procesu regenerace často vznikají nežádoucí somatoklonální variace, jako jsou aneuploidie a strukturální změny chromozomů (Fossi et al., 2019). Přenos CRISPR-Cas9 kazety do zárodečné linie nebo protoplastu je technicky náročný a méně efektivní.

K přenosu CRISPR-Cas9 systému do rostlin lze využít i virové vektory. RNA viry s pozitivním vláknem, například virus kadeřavosti tabáku (Tobacco rattle virus, TRV), mohou být použity k vnesení sgRNA a indukovat tak mutaci bez integrace DNA (Ellison et al., 2020). Nevýhodou přenosu CRISPR/Cas9 virovým vektorem je jeho kapacita, která nepojme celý CRISPR-Cas9 systém, většina virových vektorů disponuje kapacitou menší než 1 kb, gen *Cas9* je velký přibližně 4,2 kb, proto je tato metoda transformace vhodná k editaci transgenních rostlin exprimujících *Cas9* (Varanda et al., 2021). Ellison et al. (2020) vnesli do rostlin exprimující *Cas9* sgRNA konjugovanou s mobilním elementem Flowering locus T (FT). Sekvence sgRNA byla klonována do TRV vektoru transformovaného do rostliny prostřednictvím *A. tumefaciens*. TRV vektor byl infiltrován do listů transgenní *N. benthamiana*. Efektivita editace zájmového genu *PDS* dosahovala až 80 % (Ellison et al., 2020).

K přenosu biomolekul do rostlinné buňky slouží i nanočástice o velikosti menší než 100 nm. K transformaci rostlinných buněk metodou biolistiky se využívají nanočástice těžkých kovů nebo chemicky upravené karbonové tečky či nanotrubičky, které jsou navrženy tak, aby byly schopny přenášet genetický materiál a difúzovat skrz buněčnou stěnu do buněčného jádra či chloroplastu (Demirer et al., 2019). Nanokarbonové částice mají potenciál doručit DNA/RNA/RNP do zárodečných či somatických buněk, přechází přes buněčnou stěnu a k přenosu není potřeba mechanických či chemických metod. Navíc nanokarbonové částice poskytují ochranu před enzymatickou degradací transportované

biomolekuly a mohou být obohaceny specifickým ligandem navádějícím do cílové organely (Cunningham et al., 2018).

### **Využití CRISPR/Cas9 ke zlepšení vlastností zemědělských plodin**

Technologii CRISPR/Cas9 lze využít k vývoji plodin tolerujících abiotický stres, jako je sucho či salinita. U *Z. mays* byla zvýšena tolerance sucha zvýšením exprese *ARGOS* genů (Shi et al., 2017). Taky v *Glycine max* byla tolerance sucha a salinity zvýšena mutací genů *Drb2a* a *Drb2b* (Curtin et al., 2018). Výnos a kvalita plodin je další oblastí potencionálního využití genomové editace. Multiplexový přístup byl použit k editaci tří genů *O. sativa*, *GS3*, *GW2* a *GW5I*, vedoucí k zvýšení velikosti zrna (Xu et al., 2016). Snížení výnosu plodin je mimo jiné způsobeno rostlinnými patogeny, jako jsou viry, bakterie či houby. CRISPR/Cas9 systém lze použít k přípravě rostlin rezistentních vůči vybraným nemocím. Editací promotorové oblasti genu *CsLBO1* v *Citrus paradise* došlo k zvýšení rezistence vůči patogenu *Xanthomonas citri* způsobujícího rakovinu citrusového plodu (Peng et al., 2017). Další příklady editace genů zlepšujících vlastnosti zemědělských plodin jsou uvedeny v tab. 2.

**Tab. 2. Přehled editací zemědělských plodin metodou CRISPR/Cas9.**

<b>Plodina</b>	<b>Cílový gen</b>	<b>Znak</b>	<b>Typ editace</b>	<b>Reference</b>
<i>Glycine max</i>	<i>FAD2-1A</i> , <i>FAD2-1B</i>	Zlepšení kvality oleje	Inaktivace genu	Kim et al., 2017
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNAC041</i>	Tolerance salinity	Inaktivace genu	Bo et al., 2019
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNAC14</i>	Tolerance sucha	Vložení genu	Shim et al., 2018
<i>Oryza sativa</i>	<i>GW5</i>	Váha zrna	Inaktivace genu	Liu et al., 2017
<i>Oryza sativa</i>	<i>IPA</i> , <i>GS3</i> , <i>DEP1</i> , <i>Gn1a</i>	Zlepšení výnosu	Inaktivace genu	Li et al., 2016
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsGRF4</i>	Velikost zrna	Vložení genu	Li et al., 2016
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>GBSS</i>	Zvýšení obsahu amylopektinu/amy- lózy	Inaktivace genu	Andersson et al., 2018
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaDREB2</i> , <i>TaDREB3</i>	Tolerance sucha	Inaktivace genu	Kim et al., 2017
<i>Triticum aestivum</i>	$\alpha$ - <i>gliadin</i>	Tolerance salinity	Inaktivace genu	Sánchez-León et al., 2018
<i>Zea mays</i>	<i>ZmHKT1</i>	Váha zrna	Inaktivace genu	Zhang et al., 2018
<i>Zea mays</i>	<i>PPR</i> , <i>RPL</i>	Snížené množství zein bílkoviny	Inaktivace genu	Qi et al., 2016



## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy ME104E/M (METTLER TOLEDO)
- Centrifuga 5418R (Eppendorf)
- Centrifuga BR4i (Jouan)
- Elektroforetický napájecí zdroj PowerPac™ Basic (Bio-RAD)
- Elektroporátor CelljecT Duo (Thermo Electron Corporation)
- Kultivační box Adaptis A1000 (Coviron)
- Inkubátor INCU-line® 68R (Avantor)
- Inkubátor INCUCCELL® 55 (BMT Medical Technology)
- Laminární box (Gelaire flow general company)
- Magnetický stojan pro izolaci DNA 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack (Bio-RAD)
- pH metr wtw pH 7110 (inoLab®)
- Spektrofotometr DS-11 (DeNovix)
- Suchá lázeň TDB-100 (Biosan)
- Termocycler T100™ (Bio-RAD)
- Třepací inkubátor ES-20 (Biosan)
- UV transiluminátor G:BOX iChemi XR UV/White Light (Syngene)

### 4.2 Software a internetové nástroje

- A plasmid Editor (ApE)
- GeneSnap Viewer (Insighful Science)
- MEGA-X 6.06
- PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), (Lescot et al., 2002)
- Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/>), (Untergasser et al., 2012)
- UNAFold (<http://www.unafold.org/>), (Zuker et al., 2003)

### 4.3 Použité chemikálie

- 10 mM ATP solution (kat. č. PV3227, Invitrogen)

- 10 mM dNTP Mix, PCR Grade (kat. č. 201900, QIAGEN)
- 2,4-dichlorofenoxy octová kyselina (kat. č. D0911, Duchefa Biochemie)
- 6-benzylaminopurin (kat. č. B3408, Sigma-Aldrich)
- Agarose Gel DNA Extraction kit (kat. č. 1169550501, Roche Merck)
- *Bsa I HF* (kat. č. R3535S, New England BioLabs)
- CutSmart pufr 10x (kat. č. B7204S, New England BioLabs)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (kat. č. D4540-500ML, Sigma-Aldrich)
- Dicamba (kat. č. D5417, Sigma-Aldrich)
- Dusičnan amonný (kat. č. A3795, Sigma-Aldrich)
- Ethidium bromid (kat. č. 1239-45-8, Sigma-Aldrich)
- Primery (Generi Biotech)
- Gel Loading dye, Blue (6x) (kat. č. B7021S, New England Biolab)
- Glutamin (kat. č. 65763, Duchefa Biochemie)
- Glycerol (kat. č. G5516-1L, Sigma-Aldrich)
- Hygromycin B (kat. č. 10843555001, Roche Merck)
- Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG) (kat. č. BIO-37036, Bioline)
- Kanamycin (kat. č. 10106801001, Roche Merck)
- Kasein hydrolyzát (kat. č. 22090-100G, Sigma-Aldrich)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (kat. č. 11278, SERVA Electrophoresis)
- Kyselina chlorná (kat. č. 71696-1L, Sigma-Aldrich)
- L-thiamin HCl (kat. č. T3902, Sigma-Aldrich)
- LB (kat. č. L1704, Duchefa Biochemie)
- Maltóza (kat. č. M0811, Duchefa Biochemie)
- Marker molekulové hmotnosti HyperLadder I (kat. č. BIO-33025, Bioline)
- Marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (kat. č. BIO-33039, Bioline)
- *MluI HF* (kat. č. R3198S, New England Biolab)
- Murashige and Skoog (MS) (kat. č. M0221, M0238, Duchefa Biochemie)
- Myo-inositol (kat. č. I0609, Duchefa Biochemie)
- NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (kat. č. 740609-250, Macherey-Nagel)
- NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid/Plasmid (NoLid)/Plasmid (kat. č. 740499-240C, Macherey-Nagel)
- Paramagnetické částice (kat. č. A63880, Backman Coulter)

- Phytigel (kat. č. P8169, Sigma-Aldrich)
- Platinum<sup>TM</sup> Pfx DNA polymerasa (kat. č. 11708039, Invitrogen)
- Prolin (kat.č. 0380, Sigma-Aldrich)
- *PstI HF* (kat. č. R3140T, New England Biolab)
- pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H vektor (kat. č. 66187, Addgene)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (kat. č. 27106X4, QIAGEN)
- Rapid DNA Ligation kit (kat. č. 11635379001, Roche Merck)
- ReadyMix<sup>TM</sup> PCR reakční směs (kat. č. R2523, Sigma-Aldrich)
- Rifampicin (kat.č. 13292-46-1, Duchefa Biochemie)
- RNasa RNase A (kat. č. 9001-99-4, Roche Merck)
- S.O.C. médium (kat. č. 15544-034, Invitrogen)
- Timentin (kat. č. T0190, Duchefa Biochemie)
- Tris-HCl Trizma<sup>®</sup> hydrochloride (kat. č. 1185-53-1, Sigma-Aldrich)
- UltraPure<sup>TM</sup> Agaróza (kat. č. 16500, Invitrogen)
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galakto-pyranosid (X-GAL) (kat. č. R0404, Thermo Fisher Scientific)

#### **4.4 Média**

##### **Kalus indukční (Callus induction, CI) médium 1 l, pH 5,8**

- 4,3 g MS médium M0221
- 30 g maltóza
- 1 g kasein hydrolyzát
- 350 mg myo-inositol
- 690 mg prolin
- 4 mg L-thiamin HCl
- 1,25 mg CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O
- 2,5 mg Dicamba
- 160 mg Timentin
- 50 mg Hygromycin
- 3,5 g phytigel

##### **Transientní (T) médium 1 l, pH 5,8**

- 2,7 g MS médium M0238

- 20 g maltóza
- 165 mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- 750 mg glutamin
- 0,4 mg L-thiamin, HCl
- 160 mg Timentin
- 2,5 mg 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
- 0,1 mg 6-benzylaminopurin
- 1,25 mg CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O
- 3,5 g phytigel

#### **Regenerační médium 1 l, pH 5,8**

- 2,7 g MS médium M0238
- 20 g maltóza
- 165 mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- 750 mg glutamin
- 100 mg myo-inositol
- 160 mg Timentin
- 0,4 mg L-thiamin HCl
- 3,5 g phytigel

#### **4.5 Roztoky**

##### Edwardsovo extrakční činidlo 100 ml

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

##### Lyzační pufr 12,5 ml

- 62,5 mg NaHSO<sub>3</sub>
- 12,5 mg kyseliny askorbová
- 12,5 µl 2-merkptoethanol
- 12,5 µl RNasa

- 12,5 ml destilovaná voda

#### Základní lyzační pufr 100 ml

- 10 ml 5M NaCl
- 10 ml 1M Tris-HCl
- 10 ml 0,5M EDTA
- 70 ml destilovaná voda

#### 50x koncentrovaný TAE pufr, pH 8

- 121 g Tris
- 28,55 ml kyselina octová
- 50 ml 0,5M EDTA
- 421,45 ml destilovaná voda

#### 1x koncentrovaný TAE pufr

- 20 ml 50x TAE pufr
- 980 ml destilovaná voda

### **4.6 Biologický materiál**

- Ječmen jarní (*H. vulgare*) kultivar Golden Promise
- Elektro-kompetentní *A. tumefaciens* AGL1
- Chemicko-kompetentní *E. coli* DH5 $\alpha$

## 4.7 Metody

### 4.7.1 Příprava experimentu *in silico*

1. Sekvence DNA zájmového genu *HORVU1Hr1G009920.2* (v této práci označeného jako *HvABCG11*) byla získána z databáze Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/>).
2. V softwaru ApE byly vybrány potencionální sekvence protospaceru.
3. V internetovém nástroji UNAFold (<http://www.unafold.org/>) byla odvozena sekundární struktura sgRNA a byla vybrána finální sekvence protospaceru.
4. V programu X-MEGA byla provedena analýza homologních genů k *HvABCG11* a byla identifikována sekvence možného výskytu necílené mutace.
5. V internetovém nástroji Primer3plus (<https://www.primer3plus.com/>) byly navrženy primery pro sekvenaci cílové sekvence a sekvence výskytu potencionální necílené mutace.
6. V softwaru PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) byla provedena analýza promotoru genu *HvABCG11* a byly identifikovány motivy účastníci se odpovědi na stres, regulační elementy podílející se na hormonální odpovědi a další promotorové motivy.

### 4.7.2 Příprava expresního vektoru

Expresní vektor byl připraven s modifikacemi dle Ma et al. (2015).

1. Byla připravena reakční směs pro restrikci pUCU6A vektoru enzymem *BsaI HF* dle tab. 3.

**Tab. 3. Složení reakční směsi pro restrikci pUCU6A enzymem *BsaI HF*.**

Složky reakční směsi	Objem [ $\mu$ l]
CutSmart pufr 10x	2
DNA/RNA free voda	7,5
<i>BsaI HF</i> (2 U/ $\mu$ l)	2
pUCU6A vektor (180 ng/ $\mu$ l)	2,5
Celkový objem	14

2. Reakční směs byla vložena do vodní lázně a ponechána při teplotě 37 °C po dobu 40 minut.
3. Reakce byla zastavena zahřátím směsi na 65 °C po dobu 5 minut.
4. Byla provedena hybridizace protospaceru v termocykleru smícháním 5 µl forward sekvence protospaceru a 5 µl reverse sekvence protospaceru. Termocycler byl nastaven na 95 °C po dobu 30 sekund. Poté byla směs ponechána 15 minut zchladnout.
5. Byla připravena ligační směs dle tab. 4. V ligační směsi byl použit připravený hybridizovaný protospacer a produkt restrikční reakce.

**Tab. 4. Složení reakční směsi pro ligaci protospaceru a produktu reakční reakce.**

<b>Složky reakční směsi</b>	<b>Objem [µl]</b>
Produkt restrikce	16
Protospacer (50 µM)	1
ATP (10 mM)	2
T4 ligační pufr 10x	2
T4 ligasa (2 U/µl)	1
Celkový objem	22

6. Ligační reakce byla inkubována 40 minut při laboratorní teplotě (25 °C).
7. Ligační reakce byla zastavena zahřátím směsi na 65 °C po dobu 5 minut.
8. Byl namíchán zásobní roztok reakční směsi Nested polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) obsahující enhancer, pufr, síran hořečnatý, směs deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP), Pfx DNA polymerasu a DNA/RNA free vodu dle tab. 5.
9. Zásobní roztok reakční směsi byl rozdělen po 18,9 µl do dvou PCR mikrozkušavek. Do první PCR mikrozkušavky bylo přidáno 0,5 µl gR-R primeru, 0,5 µl forward protospaceru a 1 µl produktu restrikční-ligační reakce. Do druhé PCR mikrozkušavky bylo k reakční směsi přidáno 0,5 µl U-F primeru, 0,5 µl reverse protospaceru a 1 µl produktu restrikční-ligační reakce, viz tab. 5.

**Tab. 5. Složení reakční směsi Nested PCR reakce.**

<b>Složky reakční směsi</b>	<b>Objem [μl]</b>
Enhancer 10x	2
Pufř 10x	5
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1
dNTP (10mM)	1
Pfx DNA polymerasa (2,5 U/μl)	0,8
DNA/RNA free voda	28
Primer gR-R/U-F 10μM	0,5
Protospacer forward/reverse (50 μM)	0,5
Produkt restrikční-ligační reakce	1
Objem reakční směsi	20,9

10. Připravené reakční směsi byly vloženy do termocyklieru. Termocykler byl nastaven dle programu viz tab. 6.

**Tab. 6. Podmínky Nested PCR reakce.**

<b>Fáze</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Opakování</b>
Iničiační denaturace	94	4 min	1x
Denaturace	94	15 s	
Annealing primerů	60	15 s	27x
Elongace	68	20 s	
Finální elongace	68	1 min	1x

11. Poté byla připravena reakční směs PCR reakce Nested II dle tab. 7. Do reakční směsi byl přidán jako templát 10x zředěný produkt z obou PCR reakcí Nested.

12. Program PCR reakce nastaven dle tab. 8.



**Tab. 7. Složení reakční směsi Nested II PCR reakce.**

<b>Složky reakční směsi</b>	<b>Objem [μl]</b>
Enhancer 10x	1
Pufř 10x	2,5
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	0,5
dNTP (10 mM)	0,5
Primer PpsR (10 μM)	0,5
Primer PgsL (10 μM)	0,5
Pfx DNA polymerasa (2,5 U/μl)	0,5
DNA/RNA free voda	12
Templát 1 10x	1
Templát 2 10x	1
Objem reakční směsi	20

**Tab. 8. Podmínky Nested II PCR reakce.**

<b>Fáze</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Opakování</b>
Iničiační denaturace	95	30 s	1x
Denaturace	95	10 s	
Annealing primerů	58	15 s	27x
Elongace	68	20 s	
Finální elongace	68	1 min	1x

13. Produkt Nested II PCR reakce, U6-sgRNA kazeta, byl smíchán s 5 μl Gel Loading dye, Blue (6x) a elektroforeticky separován v 2% agarózovém gelu (0,8 g agarózy, 40 ml 1x TAE, 1 μl ethidium bromidu). Elektroforetická separace byla vyhodnocena v UV transiluminátoru a obrazový záznam pořízen v programu SnapGene.
14. Byla provedena izolace U6-sgRNA kazety z agarózového gelu použitím Agarose Gel DNA Extraction kit dle návodu výrobce.
15. Následovala restrikce pYLCRISPR/Cas9<sub>ubi</sub>-H vektoru a připravené U6-sgRNA za použití enzymu *Bsa*I HF. Směs byla připravena dle tab. 9.

**Tab. 9.** Složení restriční reakční směsi pro restripci pYL CRISPR/Cas9<sub>P<sub>ubi</sub>-H</sub> vektoru a U6-sgRNA kazety enzymem *BsaI HF*.

Složky reakční směsi	Objem [μl]
CutSmart pufr 10x	2
DNA/RNA free voda	5
<i>BsaI HF</i> (2 U/μl)	2
pYLCRISPR/Cas9 <sub>P<sub>ubi</sub>-H</sub> (150 ng/μl)	2,5
U6-sgRNA kazeta (120 ng/μl)	3,5
Celkový objem	15

16. Restriční směs byla inkubována hodinu ve vodní lázni při teplotě 37 °C.

17. Restrikce byla zastavena inkubací v suché lázni při teplotě 65 °C po dobu 10 minut.

18. Následovala ligační reakce U6-sgRNA kazety a pYLCRISPR/Cas9<sub>P<sub>ubi</sub>-H</sub> vektoru.

K produktu restriční reakce byly přidány složky pro ligační reakci dle tab. 10.

**Tab. 10.** Složky reakční směsi ligace U6-sgRNA kazety a pYL CRISPR/Cas9 <sub>P<sub>ubi</sub>-H</sub> vektoru.

Složky reakční směsi	Objem [μl]
Produkt restrikce	15
ATP (10 mM)	2
T4 ligační pufr 10x	2
T4 ligasa (2 U/μl)	1
Celkový objem	20

19. Směs byla ponechána při teplotě 25 °C hodinu a poté inaktivována v suché lázni při teplotě 65 °C 5 minut.

### 4.7.3 Transformace *E. coli* DH5α teplotním šokem

1. V laminárním boxu k 150 μl bakteriální suspenze *E. coli* DH5α bylo přidáno 5 μl připraveného expresního vektoru, opatrně promícháno špičkou a ponecháno na ledu 20 minut.

2. Bakteriální suspenze byla vystavena teplotnímu šoku při 42 °C po dobu 30 sekund ve vodní lázni.
3. Bakteriální suspenze byla ponechána 5 minut na ledu a poté bylo přidáno 250 µl S.O.C. média.
4. Suspenze byla kultivována 1 hodinu při 37 °C při 180 rpm.
5. Bakteriální suspenze byla rozetřena na selekční tuhé LB médium (25 g LB, 16 g agaru a 1 l deionizované vody) obsahující Kanamycin 50 mg/l ošetřené IPTG a X-Gal roztokem (3 µl IPTG a 30 µl X-Gal), kultivace probíhala v kultivačním boxu do druhého dne při 37 °C.
6. Druhý den bylo odebráno 6 modrých kolonií *E. coli* a přeneseno do tekutého LB média (25 g LB a 1 l deionizované vody) s Kanamycinem 50 mg/l. Kultivace probíhala na třepačce do druhého dne při 180 rpm v 37 °C.
7. Z kultury byly připraveny glycerinové stoky tak, že do mikrozkuřavky bylo přeneseno 200 µl bakteriální suspenze a 200 µl 65% glycerolu. Stoky byly uchovány v – 80 °C.
8. Ze zbývající kultury byla izolována plasmidová DNA (pDNA) za použití NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) dle návodu výrobce.
9. Izolovaná pDNA byla purifikována za použití NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)/Plasmid dle návodu výrobce.
10. Koncentrace a kvalita izolované pDNA byla ověřena spektrofotometricky.
11. pDNA byla naředěna na 100 ng/µl.
12. Transformovaný expresní vektor byl ověřen štěpením pDNA za použití enzymů *PstI HF* a *MluI HF*, viz tab. 11.
13. Produkty štěpení byly smíchány s 5 µl Gel Loading dye, Blue (6x) a separovány v 1% agarózovém gelu (0,4 g agarózy, 40 ml TAE 1x a 1 µl ethidium bromidu). Elektroforetická separace byla vyhodnocena v UV transiluminátoru a obrazový záznam pořízen v programu SnapGene.

**Tab. 11. Složky směsi restriční reakce.**

<b>Složky reakční směsi</b>	<b>Objem [μl]</b>
CutSmart pufr 10x	2
DNA/RNA free voda	6
<i>PstI/MluI HF</i> (2 U/μl)	2
pDNA (100 ng/μl)	10
Celkový objem	20

#### **4.7.4 Transformace *A. tumefaciens* expresním vektorem**

1. Do nádoby s ledem byla umístěna mikrozkuhavka obsahující elektro-kompetentní buňky *A. tumefaciens* kmene AGL1, elektrokyveta a pDNA o koncentraci 100 ng/μl.
2. V aseptických podmínkách byl přenesen 1 μl vektoru do suspenze AGL1 bakterií a směs byla opatrně promíchána špičkou a ponechána 1 minutu na ledu.
3. Poté byla směs přenesena do vychlazené elektrokyvety a ponechána 5 minut při 5 °C.
4. Elektrokyveta obsahující AGL1 buňky a vektor byla přenesena do elektroporátoru s nastavením napětí na 1800 V, kapacitance na 15 uF, odporu na 335 R.
5. Následně k suspenzi v elektokyvetě bylo přidáno 250 μl S.O.C. média předeřátého na 28 °C.
6. Transformované buňky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 28 °C a třepány při 160 rpm.
7. Po inkubaci byly buňky rozetřeny na LB médium obsahující Rifampicin 50 mg/l a Kanamycin 50 mg/l. Buňky byly inkubovány při teplotě 28 °C 2 až 3 dny.
8. Byly odebrány bakteriální kolonie a kultivovány v tekutém LB médiu obsahující Rifampicin 50 mg/l a Kanamycin 50 mg/l. Suspenze byly inkubovány při 28 °C a 160 rpm 48 hodin.
9. Byly připraveny glycerinové zásobní stoky smícháním 200 μl 65% glycerolu a 200 μl bakteriální suspenze a uchovány při -80 °C.
10. Ze zbytku buněčné suspenze transformovaných AGL1 byla izolována pDNA. K izolaci byl použit QIAprep® Spin Miniprep kit dle postupu výrobce.
11. Koncentrace izolované pDNA byla stanovena spektrofotometricky.

12. Izolovaný vektor byl ověřen štěpením pDNA za použití enzymů *PstI HF* a *MluI HF*, viz tab.11.
13. V 50ml zkumavkách byly připraveny bakteriální suspenze o OD600 0,6-0,8, ze kterých byly připraveny stoky uchované v -80 °C.

#### **4.7.5 Transformace nezralých embryí ječmene jarního**

Transformace nezralých embryí ječmene jarního byla provedena dle Harwood et al. (2014)

1. Obilky ječmene jarního byly sbírány ze střední části klasu. Obilky byly zbaveny osin a vloženy do 250ml Erlenmayerovy baňky.
2. Obilky byly sterilizovány 100 ml 70% ethanolu po dobu 2 minut na magnetické míchačce.
3. Ethanol byl odstraněn a obilky byly dvakrát promyty 100 ml sterilní vody 2 minuty na magnetické míchačce.
4. Obilky byly sterilizovány roztokem 6% chlornanu sodného po dobu 4 minut na magnetické míchačce.
5. Roztok chlornanu sodného byl odstraněn a obilky byly dvakrát promyty 100 ml sterilní vody po dobu 2 minut na magnetické míchačce.
6. Obilky byly ponechány v malém množství sterilní vody ve sterilních podmínkách.

Poté byla provedena izolace nezralých embryí ze sterilizovaných obilek.

1. Za sterilních podmínek pomocí skalpelu a pinzety byly odstraněny části embrya – koleoptile a koleorhiza. Izolovaný štítek o velikosti 1,5 až 2 mm byl přenesen na kalus indukční (callus induction, CI) médium v Petriho miskách.
2. Izolované štítky byly inkubovány ve tmě přes noc při teplotě 24 °C v kultivačním boxu.
3. V aseptických podmínkách byla na nezralá embrya pipetou nanesen připravený inokulát *A. tumefaciens*.
4. Embrya byla 3 minuty inkubována a poté byla odstraněna přebytečná suspenze.
5. Ošetřená embrya byla přenesena na nové CI médium s Timentinem 160 mg/l.
6. Embrya byla inkubována 48 hodin ve tmě při teplotě 24 °C.

7. Po inkubaci byla embrya přenesena na nové CI médium obsahující Timentin 160 mg/l a Hygromycin 50 mg/l a inkubována ve tmě po 2 týdny při teplotě 24 °C v kultivačním boxu. Kultivace na CI médiu dále pokračovala dle tab. 12.
8. V další fázi byly explantáty přeneseny na transientní (T) médium s Timentinem 160 mg/l a v pološeru kultivovány týden, poté na plném světle.
9. Regenerující kalusy byly přeneseny na regenerační (R) médium obsahující Timentin 160 mg/l a kultivovány 4 týdny.

Kultivace explantátů probíhala za podmínek uvedených v tab. 12. do úplné regenerace rostlin. Regenerované rostliny byly přesazeny do rašelinových tablet (41/7 mm Jiff, Rosteto, ČR).

**Tab. 12. Plán a podmínky regenerace rostlin T0 generace ječmene jarního.** Explantáty byly kultivovány za použití kalus indukčního (CI), transientního (T) a regeneračního (R) média; média byla obsahovala antibiotika Timentin (Tim) a Hygromycin (Hyg). Regenerované rostliny po 90 dnech od počátku kultivace přesazeny do rašelinových tablet (jiff).

Den	Kultivace	Podmínky	Antibiotikum [mg/l]
1.	CI	Tma, 24 °C	Tim 160
3.	CI	Tma, 24 °C	Tim 160, Hyg 50
17.	CI	Tma, 24 °C	Tim 160, Hyg 50
31.	CI	Tma, 24 °C	Tim 160, Hyg 30
45.	T	1. týden pološero, 16 °C; 2. týden 16 h světlo/8 h tma, 16 °C	Tim 160
60.	R	16 h světlo/8 h tma, 16 °C	Tim 160
90.	jiff	16 h světlo/8 h tma, 16 °C	

#### 4.7.6 Genotypizace rostlin T0 generace

Z regenerovaných rostlin T0 generace byla izolována genomická DNA (gDNA). Izolace gDNA byla provedena dle protokolu Edwards et al. (1991).

1. Z rostliny byl odebrán vzorek listu o délce přibližně 4 cm a homogenizován sterilní homogenizační tyčinkou.
2. K homogenátu bylo přidáno 400  $\mu$ l extrakčního pufu, směs byla promíchána a ponechána při laboratorní teplotě 45 minut.
3. Následovala centrifugace vzorku při 13 000 po dobu 2 minut.
4. V 1,5ml mikrozkuhavce bylo smícháno 300  $\mu$ l supernatantu a 300  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu. Směs byla opatrně promíchána převrácením mikrozkuhavky a ponechána 30 minut v 5 °C.
5. Směs byla 15 minut centrifugována při 13 000 rpm, supernatant odstraněn a k peletu bylo přidáno 300  $\mu$ l 75% ethanolu.
6. Následovala centrifugace 5 minut při 5000 rpm. Supernatant byl odstraněn a pelet byl vysušen asi 20 minut v laminárním boxu.
7. gDNA byla rozpuštěna v 30 až 50  $\mu$ l sterilní DNA/RNA free vodě. Vzorky byly ponechány v 5 °C do druhého dne.
8. Následně byly vzorky krátce promíchány a centrifugovány při 5000 rpm 30 sekund a supernatant přenesen do nové mikrozkuhavky.
9. Kvantita a kvalita izolované gDNA byla spektrofotometricky ověřena.
10. Vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C.

Izolovaná gDNA byla následně použita pro detekci transgenu *Cas9* a transgenu rezistence na Hygromycin (*hyg*) v regenerovaných rostlinách T0 generace. Detekce transgenů byla provedena metodou PCR za použití primerů, viz tab. 13. PCR reakční směs byla namíchána dle tab. 14. Podmínky PCR reakce pro detekci transgenu *Cas9*, viz tab. 15 a transgenu *hyg* viz tab. 16.

**Tab. 13. Seznam primerů použitých pro genotypizaci rostlin metodou PCR.**

<b>gen</b>	<b>Sekvence (5'-3')</b>	<b>Amplikon [bp]</b>
<i>Cas9</i>	TTCGCTACTGTTCGCAAGGT GGTGGATGAGAGTAGCGTCG	811
<i>hyg</i>	AGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTT AGCTGCATCATCGAAATTGCCGTC	335

**Tab. 14. Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek.**

<b>Složky reakční směsi</b>	<b>Objem [μl]</b>
DNA/RNA free voda	2,5
ReadyMix	5
Primer F	0,25
Primer R	0,25
gDNA	2
Celkový objem	10

**Tab. 15. Podmínky PCR reakce pro detekci transgenu *Cas9*.**

<b>Fáze</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Opakování</b>
Iničiační denaturace	95	4 min	1x
Denaturace	95	20 s	
Annealing primerů	58	20 s	36x
Elongace	72	1 min	
Finální elongace	72	5 min	1x



**Tab. 16. Podmínky PCR reakce pro detekci transgenu *hyg*.**

<b>Fáze</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Opakování</b>
Iniciační denaturace	95	4 min	1x
Denaturace	95	20 s	
Annealing primerů	58	20 s	36x
Elongace	72	1 min	
Finální elongace	72	5 min	1x

### **Příprava vzorků na Sangerovo sekvenování**

Z rostlin, u kterých byla potvrzena přítomnost transgenu, byla provedena izolace gDNA o vysoké čistotě paramagnetickými částicemi.

1. Byl připraven čerstvý lyzační pufr za použití základního lyzačního pufru.
2. Byl odebrán rostlinný materiál, zmrazen tekutým dusíkem a homogenizován sterilní tyčinkou.
3. K homogenátu bylo přidáno 250  $\mu$ l lyzačního pufru a směs byla inkubována 45 minut při 65 °C.
4. Směs byla 2 minuty centrifugována při 10 000 rpm.
5. Do 1,5ml mikrokumavky bylo pipetováno 11  $\mu$ l paramagnetických částic, 100  $\mu$ l supernatantu a 80  $\mu$ l isopropanolu.
6. Mikrokumavka obsahující připravenou směs byla umístěna do magnetického stojánku a ponechána 5 minut.
7. Supernatant byl odstraněn a po odejmutí magnetické desky bylo k peletu přidáno 100  $\mu$ l 70% ethanolu.
8. Kroky 8 a 9 byly zopakovány.
9. Po odstranění supernatantu byl pelet vysušen v laminárním boxu.
10. K peletu bylo pipetováno 25  $\mu$ l sterilní DNA/RNA free vody a vzorek byl umístěn do magnetického stojánku na 5 minut.
11. Poté byl supernatant přenesen do nové 1,5ml mikrokumavky a spektrofotometricky byla stanovena kvantita a kvalita izolované gDNA.
12. Izolovaná gDNA byla uchována při -20 °C.

Pomocí internetového nástroje Primer3Plus byly navrženy PCR primery pro sekvenování cílového úseku genu *HvABCG11*, u kterého byla předpokládána mutace a úseku genu *HvABCG10*, v kterém by se mohla vyskytovat necílená mutace, viz tab. 17. Následně byl proveden PCR teplotní gradient pro určení teploty nasedání primerů. K sekvenování genu *HvABCG11* byla použita druhá sada primerů *HvABCG11\_2* amplifikující 300x zředěný produkt amplifikace primery *HvABCG11\_1*.

**Tab. 17. Seznam primerů použitých pro amplifikaci cílové sekvence genu *HvABCG10* a *HvABCG11*.**

gen	Sekvence (5'-3')	Amplikon [bp]
<i>HvABCG10</i>	CCTCGCCCACAGAAGAGTTT GTGTACGACAGGTCAGCGAA	555
<i>HvABCG11_1</i>	GTACGAGAGGTCCGTGAAGG CCAGGAGCCTGTGTGTGTAC	599
<i>HvABCG11_2</i>	ACCTACTCCGATCGGGACTC GTGAAGGAGAGCGTGTACGG	324

**Tab. 18. Podmínky PCR reakce pro amplifikaci cílové sekvence genů *HvABCG10* a *HvABCG11*.**

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Opakování
Iniciační denaturace	95	4 min	1x
Denaturace	95	20 s	
Annealing primerů	60	2 s	37x
Elongace	72	45 s	
Finální elongace	72	5 min	1x

Následovala amplifikace cílového úseku *HvABCG11* a *HvABCG10* gDNA transgenních rostlin izolované paramagnetickými částicemi. Podmínky PCR reakce byly nastaveny dle tab. 18. K redukci nespecifických produktů PCR amplifikace genu *HvABCG11* byl do reakční směsi přidán DMSO (5%). Produkty PCR reakce byly přečištěny za použití NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up dle návodu výrobce. Poté byla spektrofotometricky změřena koncentrace. Připravené vzorky byly předány na Ústav

experimentální botaniky, kde bylo provedeno sekvenování. Data byla následně vyhodnocena v programu SnapGene Viewer.

#### **4.7.7 Genotypizace T1 generace transgenních rostlin**

1. Rostliny jarního ječmene, u kterých byla potvrzena přítomnost transgenu *Cas9*, byly pěstovány ve skleníku (režim 16 hodin světlo, 8 hodin tma při 16 °C).
2. Obilky rostlin T0 generace byly sklizeny a uloženy na 6 týdnů do chladu při teplotě 5 °C.
3. Následně bylo vyseto 30 obilek pocházející z 4 transgenních rostlin do sadbovačů, byl použit zahradní substrát (firma Rašelina Soběslav). Rostliny byly pěstovány ve skleníku (režim 16 hodin světlo, 8 hodin tma při teplotě 16 °C).
4. Po týdnu byla provedena izolace gDNA z listů dle protokolu Edwards et al. (1991).
5. Byla provedena detekce transgenu *Cas9* a *hyg* metodou PCR.
6. U rostlin obsahujících transgen byla provedena izolace gDNA paramagnetickými částicemi.
7. Byla provedena amplifikace úseku genu *HvABCG11*, kde byla předpokládána mutace a amplifikace úseku genu *HvABCG10*.
8. Analýza sekvencí genů *HvABCG10* a *HvABCG11* byla provedena Sangerovým sekvenováním a výsledky sekvenování byly vyhodnoceny v programu SnapGene Viewer.

## 5 Výsledky

Získané výsledky během diplomové práce jsou prezentovány v následující kapitole a jsou seřazeny v chronologickém pořadí. V první části je popsán postup analýzy cílového genu a jeho promotoru a příprava expresního vektoru určeného k editaci genu *HvABCG11* technologií CRISPR/Cas9. Druhá část je zaměřena na stabilní transformaci nezralých embryí ječmene jarního a na analýzu transformovaných rostlin T0 a T1 generace.

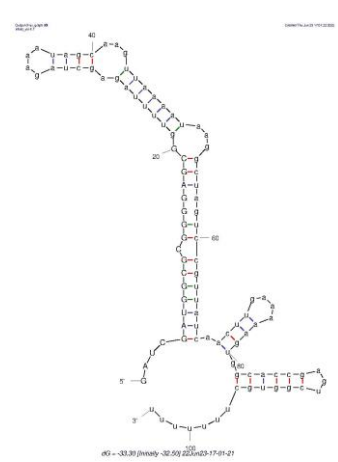
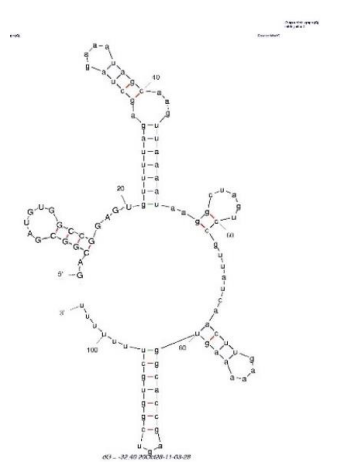
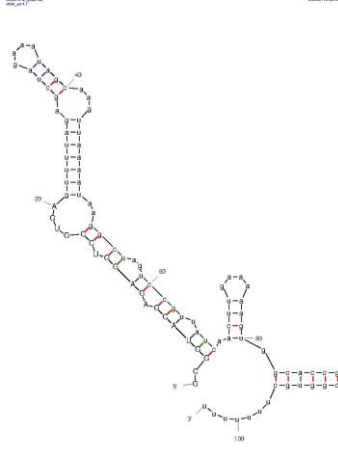
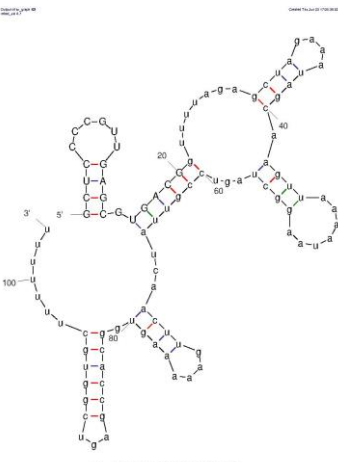
### 5.1 Příprava experimentu *in silico*

#### 5.1.1 Analýza sekvence genu *HvABCG11* a výběr protospaceru

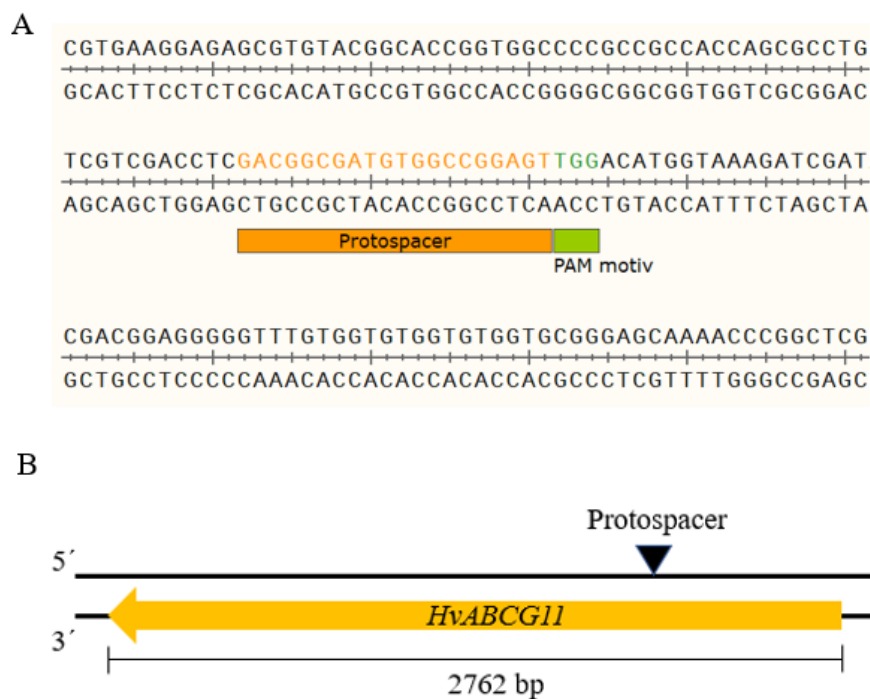
Z databáze Ensembl Plants byla získána sekvence genu *HvABCG11*, který je ortologem genu *OsABCG11*. Gen *HvABCG11* o velikosti 2762 bp se nachází na reverzním vlákně prvního chromozomu ječmene jarního a skládá z jednoho exonu. V programu ApE byla analyzována sekvence cílového genu a byly identifikovány potenciální sekvence protospaceru v orientaci 5'-3'. Velikost sekvencí protospaceru činila 20 nukleotidů, za každým vybraným protospacerem se nacházel na 3'konci PAM a obsah G/C bází u navržených sekvencí se pohyboval mezi 65 až 75 %.

V internetovém nástroji UNAFold byla analyzována sekundární struktura čtyř vybraných sgRNA. Sekvence potenciálního protospaceru byla vložena na 5' konec před sekvencí sgRNA kostry. Na základě sekundární struktury sgRNA byl vybrán protospacer II GACGGCGATGTGGCCGGAGT, viz tab. 19. Vybraný protospacer je v sekvenci *HvABCG11* lokalizovaný mezi 468 a 488 bp, viz obr. 4. Finální sekvence protospaceru obsahovala čtyři báze hybridizující v rámci sekvence protospaceru a žádná báze protospaceru nehybridizovala se sekvencí sgRNA kostry.

**Tab. 19. Přehled navržených protospacerů.**

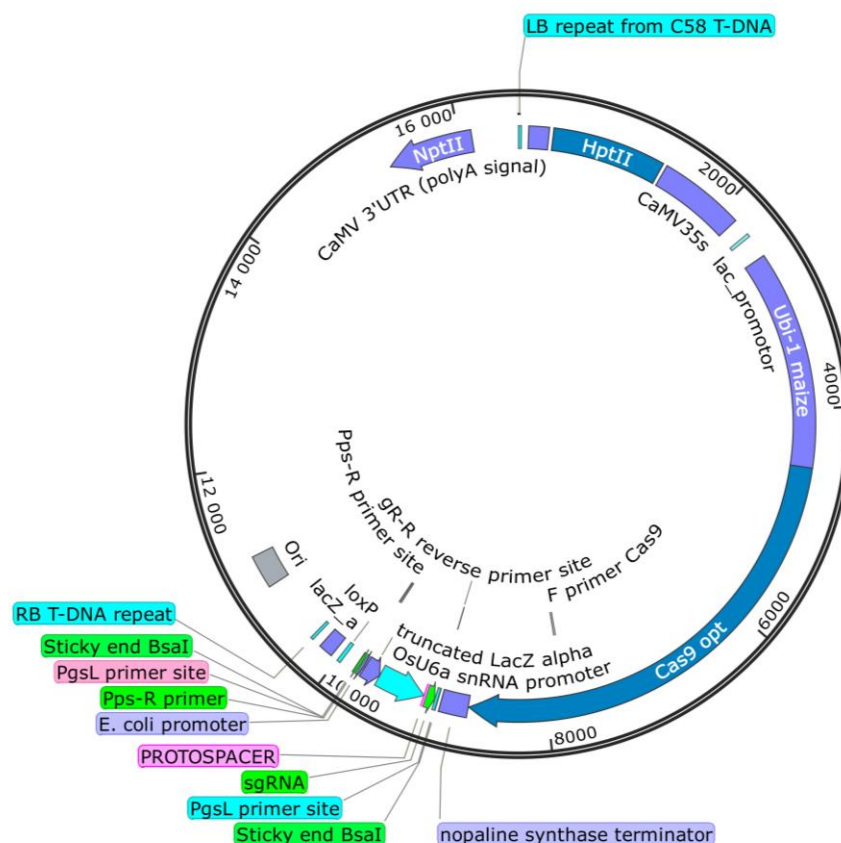
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Sekvence	GATCGATGGCGCGGGGAGCG	GACGGCGATGTGGCCGGAGT	GCGGTACGAGAGGTCCGTGA	GCTCCCCGTTGAGCGTGACG
Obsah G/C	75 %	70 %	65 %	70 %
Sekundární struktura sgRNA				
Self hybrid	0	4	0	4
Guide hybrid	14	0	12	5

Přehled obsahuje schéma sekundární struktury sgRNA, informace o G/C obsahu sgRNA, počet bází hybridizujících v rámci sekvence protospaceru (self hybrid) a počet bází hybridizujících v rámci sgRNA kostry (guide hybrid).



**Obr. 4.** A) Část sekvence exonu cílového genu *HvABCG11*. Oranžově je znázorněný vybraný protospacer, zeleně je vyznačen 5'-NGG PAM. B) Pozice vybraného protospaceru v *HvABCG11*.

K transformaci U6-sgRNA kazety a *Cas9* byl vybrán expresní vektor pYLCRISPR/*Cas9*<sub>P<sub>ubi</sub></sub>-H. Na schématické mapě vektoru jsou vyznačeny elementy jako promotory, zájmové geny a selekční geny, viz obr. 5. Mezi selekční geny patří gen *hptII* kódující rezistenci na antibiotikum Hygromycin, gen *lacZ* kódující enzym  $\beta$ -galaktosidasu,  $\beta$ -galaktosidasa je využita k modrobílé selekci transformovaných *E. coli* a gen *nptII* kódující neomycin fosfotransferasu II způsobující rezistenci na Kanamycin.



Obr. 5. Schéma pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi-H</sub>::U6-sgRNA expresního vektoru.

Z databáze Ensembl Plants byly získány sekvence šesti genů *HvABCG*. V programu MEGA-X byl proveden alignment a na základě alignmentu byly identifikovány dva homologní geny genu *HvABCG11*, *HORVU5Hr1G021120.1* a *HORVU0Hr1G007130.1* a byla určena sekvence možného výskytu necílené mutace v genu *HORVU5Hr1G021120.1*, v této práci označeného jako *HvABCG10*, viz obr. 6. V programu MEGA-X byl dále vytvořen fylogenetický strom za použití metody Neighbor-Joining Tree, viz obr. 7.

```

HORVU3Hr1G087130.1 C-----GGAGCCGGCGCTCGCGCCGCTGCGCCAGCGGGGAGCGGAGGAAC
HORVU1Hr1G009920.2 CTCCCCACGACTCGGAAACGCACCTCCTCCCTCCTCCCCCTATATATTACAGTACGCT
HORVU5Hr1G021120.1 -----
-----

HORVU3Hr1G087130.1 CCGTCCCTCTCCGAGATGCTCAGCCTCGTCAGCGCCGCCACCGTCGACCCGGCCGGCAGC
HORVU1Hr1G009920.2 CCAACCATACACGGCACGACACACGGAGCGAGCCGGGTTTTGCTCCCGCACCACACCACA
HORVU5Hr1G021120.1 -----
-----

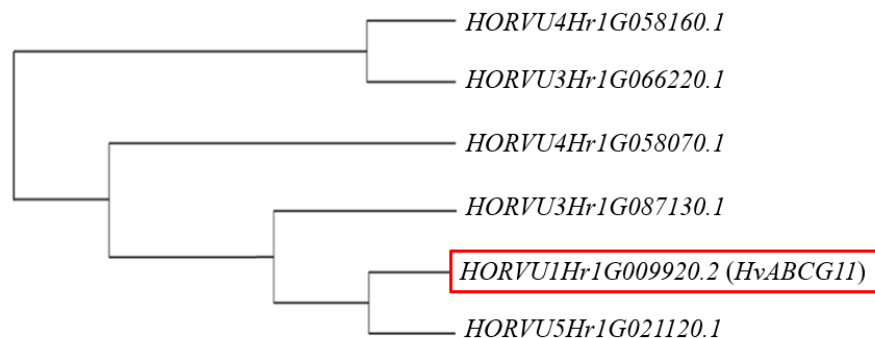
HORVU3Hr1G087130.1 GACGACGACGGCTCCGTCTTCT-----CCCTCCCGATGCCGCAG
HORVU1Hr1G009920.2 CCACAAACCCCTCCGTGCTGATCCATCGACTCCTCTATCGATCTTACCATGTCCAC
HORVU5Hr1G021120.1 -----ATGGCCAC
*** *

HORVU3Hr1G087130.1 TCCGCGGCTGCCGGCGT-----CGGCACAAATATGC-----GGGCGCGCAG
HORVU1Hr1G009920.2 TCCGGCCACATCGCCGCTCAGGTGACGACGCGCGGAGCGGGAGCTGCAGGCGCTGGTG
HORVU5Hr1G021120.1 TCCGGCCACATCGTCGTCAGGTGCGCACCGATGAAGA-----TGCTTGGCGGGTCCAG
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HORVU3Hr1G087130.1 GCGCCGGGAAGGACCATCCAGTTCGGCTGGCGTTACCGACCTCACCTACAGCGTCCGG
HORVU1Hr1G009920.2 GCGCGGGGCCACCGGTGCGGTACACGCTCTCCTTACGGACCTCTCGTACCAGCGTGAAG
HORVU5Hr1G021120.1 CCGCCCGTGGCGCCAGTGCAGTACCCTGTCCTTCCGCTGACCTGTCGATACCGTCAAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Obr. 6. Výsek alignmentu genů *HORVU1Hr1G009920.2* (*HvABCG11*), *HORVU5Hr1G021120.1* (*HvABCG10*) a *HORVU3Hr1G087130.1*. Červeně je vyznačen protospacer a sekvence možného výskytu necílené mutace v genu *HvABCG10*.

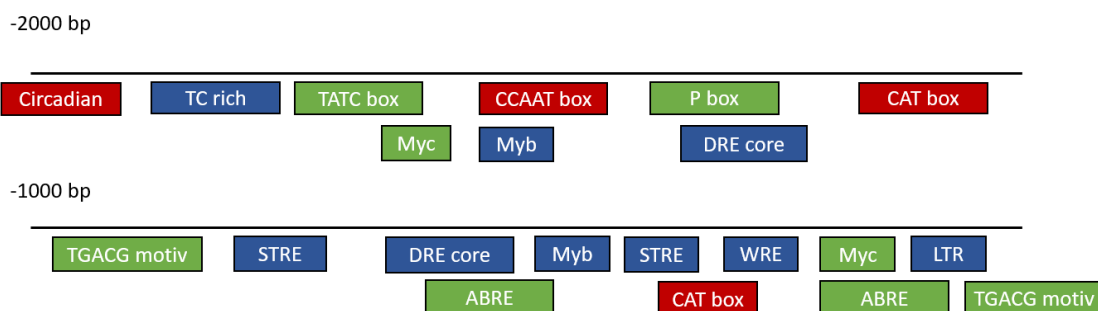


Obr. 7. Fylogenetický strom 6 vybraných genů *HvABC*.

### 5.1.2 Analýza promotorové oblasti genu *HvABCG11*

Z databáze Ensembl Plants byla stažena sekvence promotorové oblasti genu *HvABCG11* nacházející se 2000 bp před samotnou sekvencí genu. V internetovém nástroji PlantCARE byla provedena analýza promotorové oblasti a byly identifikovány motivy podílející se na odpovědi na abiotický stres, motivy zapojené do odpovědi na rostlinné hormony a motivy, které jsou součástí cirkadiální kontroly nebo zapojeny do regulace syntézy flavonoidů, viz obr. 8 a tab. 20.





**Obr. 8. Schéma promotorové oblasti genu *HvABCG11* znázorňující rozmístění vybraných motivů.** Modře znázorněny motivy podílející se na odpovědi na abiotický stres, zeleně jsou značeny motivy účastníci se odpovědi na rostlinné hormony, motivy podílející se na kontrole cirkadiálních rytmtů, biosyntéze flavonoidů či expresi v meristému jsou znázorněny červeně.

**Tab. 20. Seznam motivů identifikovaných v promotorové sekvenci genu *HvABCG11*.**

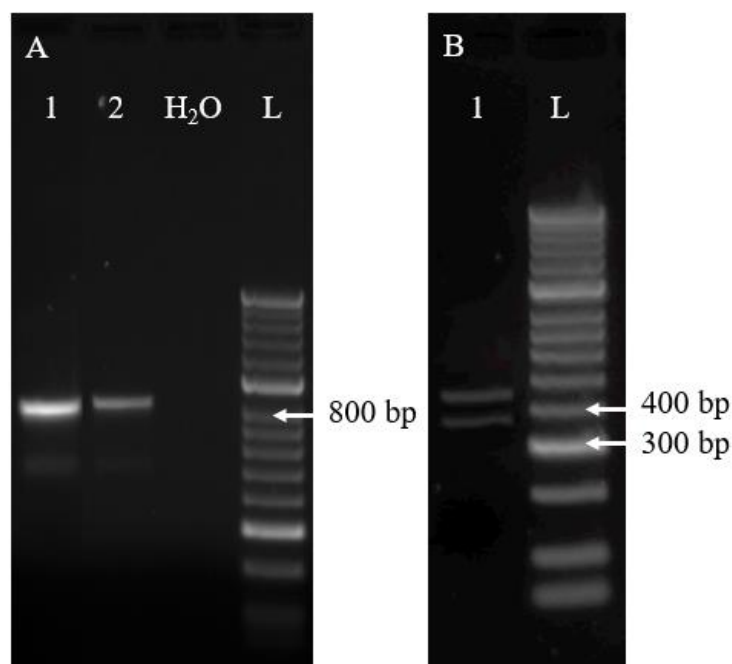
Promotorový motiv	Funkce
ABRE	Element zapojený do odpovědi na ABA
CAT box	Element podílející se na expresi meristému
CCAAT box	pravděpodobně součástí regulace biosyntézy flavonoidů
TGACG motiv	Element zapojený do odpovědi na metyl-jasmonát
Circadian	Regulační element podílející se na cirkadiální kontrole
DRE core	Element zapojený do odpovědi na sucho
LTR	Element podílející se na odpovědi na nízkou teplotu
Myb	Element součástí odpovědi na abiotický stres
Myc	Element podílející se na odpovědi na sucho
P box	Element zapojený do odpovědi na giberliny
STRE	Element účastníci se odpovědi na biotický a abiotický stres
WRE	Element zapojený do odpovědi na poranění

## 5.2 Příprava expresního vektoru

### 5.2.1 Klonování pYLCRISPR/Cas9<sub>ubi</sub>-H a U6-sgRNA kazety

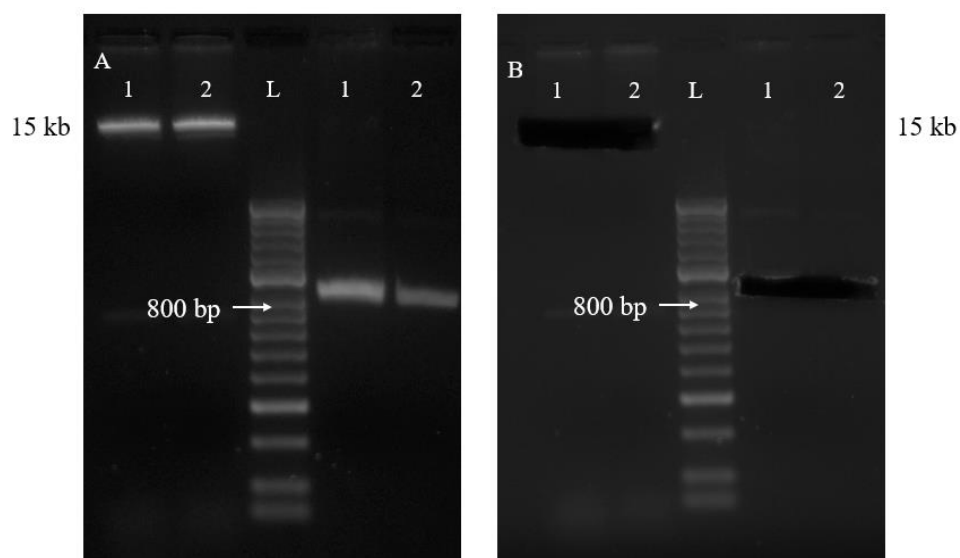
Byla klonována U6-sgRNA kazeta a protospacer. Byla provedena restriční-ligační reakce, kdy byly za použití enzymu *BsaI HF* získány lepivé konce pYLSgRNA vektoru, které byly využity k ligaci protospaceru. Takto připravená U6-sgRNA byla

amplifikována metodou PCR. Nested PCR reakcí byl získán amplikon o velikosti 813 bp. Kvalita amplikonu, U6-sgRNA kazety, byla ověřena elektroforetickou separací v agarózovém gelu, viz obr. 9A. Správnost klonování U6-sgRNA kazety byla ověřena restrikcí za použití restrikčního enzymu *PstI HF*. Restrikcí byly získány dva specifické fragmenty o velikosti 467 bp a 346 bp. Produkty štěpení byly ověřeny elektroforetickou separací v agarózovém gelu a vizualizovány v UV transiluminátoru, viz obr. 9B.



**Obr. 9. A) Elektroforetogram Nested PCR produktu.** Dráha 1, 2 – produkt Nested PCR reakce o velikosti 813 bp, L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda. **B) Elektroforetogram štěpení U6-sgRNA kazety enzymem *PstI HF*.** Dráha 1 – produkt štěpení U6-sgRNA, velikost fragmentů - 467 bp a 346 bp, L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline).

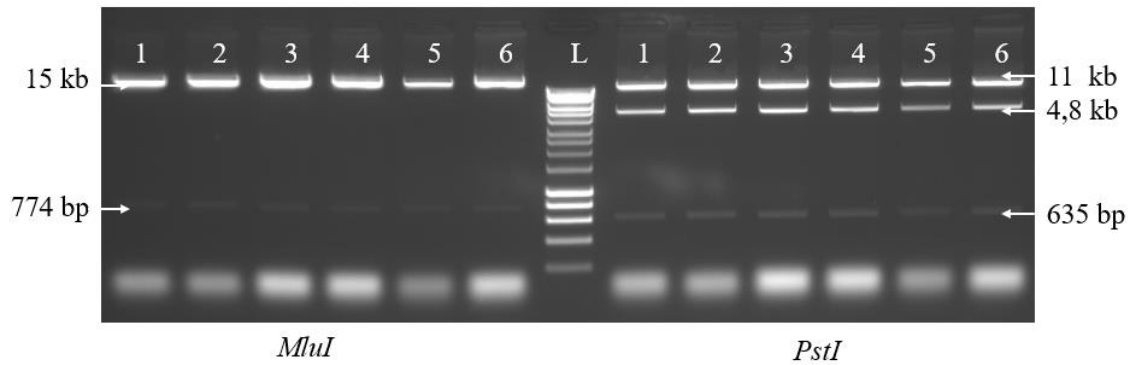
Následovalo klonování připravené U6-sgRNA kazety a pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H expresního vektoru. Restrikčním enzymem *BsaI HF* byly získány specifické nepalindromické lepivé konce, které zabraňují vlastní ligaci v rámci U6-sgRNA kazety a pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H. Produkty restrikční reakce byly elektroforeticky separovány v agarózovém gelu, viz obr. 10. Velikost pYLCRISPR vektoru činila 15 726 bp a velikost U6-sgRNA kazety činila 813 bp. pYLCRISPR vektor a sgRNA kazeta byly izolovány z agarózového gelu. Poté byla připravena ligační reakce inzertu sgRNA kazety a expresního vektoru.



**Obr. 10. Elektroforetogram separace expresního vektoru a U6-sgRNA kazety.** A) Vlevo v dráze 1, 2 - pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H vektor o velikosti 15 726 bp; vpravo v dráze 1, 2 - U6-sgRNA kazeta o velikosti 813 bp, L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline) B) L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline)

### 5.2.2 Vnesení expresního vektoru do *E. coli*

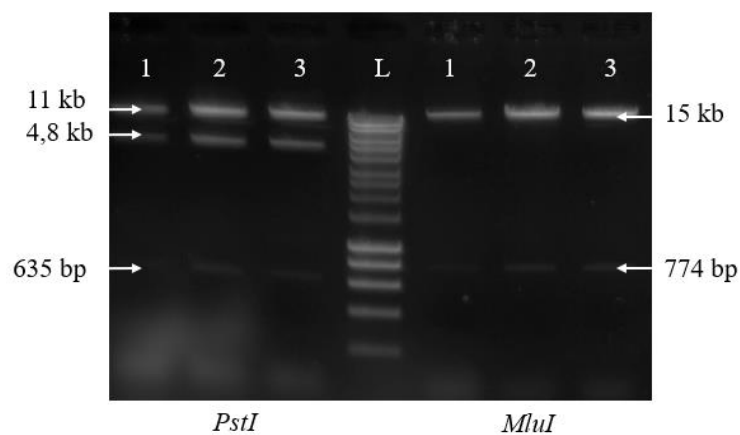
Produkt ligační reakce byl použit pro transformaci teplotním šokem do chemicko-kompetentních buněk *E. coli*, kmen DH5 $\alpha$ . Kultivací transformovaných DH5 $\alpha$  na selekčním LB médiu s X-Gal/IPTG byly získány modré kolonie. Přítomnost pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H::U6-sgRNA expresního vektoru ve vybraných šesti modrých koloniích DH5 $\alpha$  byla ověřena restričním štěpením. K ověření restričním štěpením byly použity enzymy *MluI HF* a *PstI HF*. Produkty restrikce byly elektroforeticky separovány a vizualizovány v UV transiluminátoru, viz obr. 11. Všech šest klonů *E. coli* bylo potvrzeno restričním štěpením.



**Obr. 11. Elektroforetogram restrikčního štěpení pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H::U6-sgRNA enzymy *MluI HF* a *PstI HF*.** V drahách 1 až 6 - produkty restrikce pDNA; produkty restrikce enzymem *MluI HF* - 15 765 bp a 774 bp (vlevo), produkty restrikce enzymem *PstI HF* - 11 060 bp, 4844 bp a 635 bp (vpravo), L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 1 kb, Bioline).

### 5.2.3 Vnesení expresního vektoru do *A. tumefaciens*

pYLCRISPR expresní vektor obsahující U6-sgRNA kazetu byl elektroporací vpraven do elektro-kompetentních buněk *A. tumefaciens*, AGL1. Kultivací transformovaných AGL1 na selekčním LB médiu byly získány tři kolonie. Přítomnost a správnost plasmidového vektoru pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H::U6-sgRNA byla ověřena restrikcí enzymy *MluI HF* a *PstI HF*, viz obr. 12. U všech tří kolonií *A. tumefaciens* byla potvrzena přítomnost expresního vektoru.



**Obr. 12. Elektroforetogram restrikčního štěpení pYLCRISPR/Cas9P<sub>ubi</sub>-H::U6-sgRNA enzymy *MluI HF* a *PstI HF*.** V drahách 1–3 produkty restrikce plasmidového vektoru; produkty restrikce enzymem *PstI HF* - 11 060 bp, 4844 bp a 635 bp (vlevo), produkty restrikce *MluI HF* - 15 765 bp a 774 bp (vpravo), L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 1 kb, Bioline).

### 5.3 Transformace nezralých embryí ječmene jarního *A. tumefaciens*

Nepřímou metodou prostřednictvím *A. tumefaciens* byla transformována nezralá embrya jarního ječmene odrůdy Golden Promise. Během dvou transformačních událostí bylo celkem transformováno 375 embryí. Nejprve byly explantáty kultivovány šest týdnů na kalus indukčním (CI) médiu obsahující antibiotika Hygromycin a Timentin, viz obr. 13. V další fázi byly explantáty přeneseny na transientní (T) médium s Timentinem a v pološeru kultivovány týden, poté na plném světle. Regenerující kalusy byly přeneseny na regenerační (R) médium obsahující Timentin a kultivovány 4 týdny. V poslední fázi byly rostliny s kořenovým systémem přesazeny do rašelinových tablet (jiff). Doba kultivace od transformace do přesazení rostlin do zeminy trvala 90 dnů. Celkem regenerovalo 31 rostlin ječmene jarního.



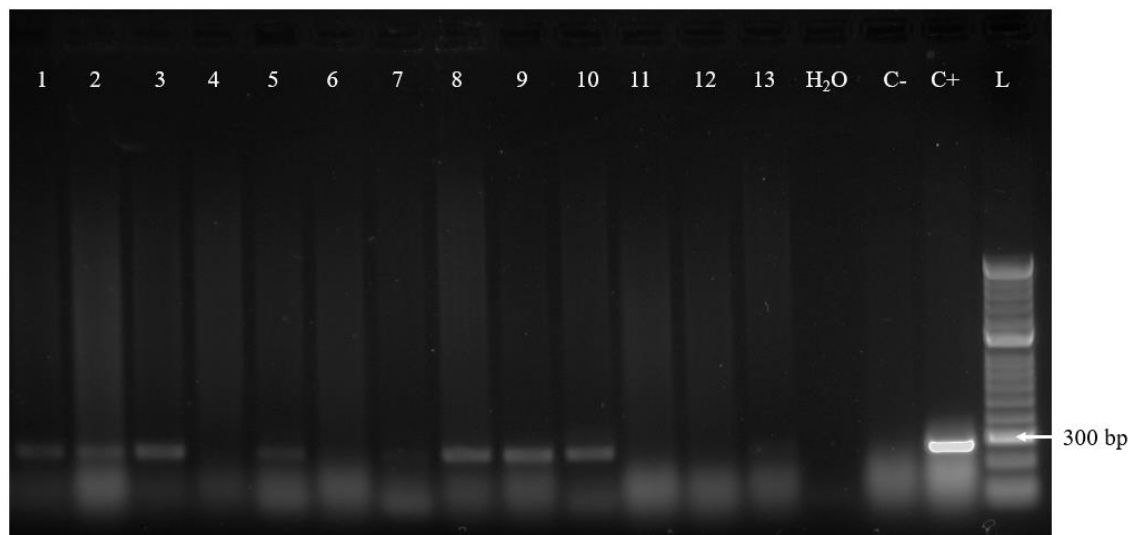
Obr. 13. Indukce kalusů transformovaných pYLCRISPR/ $P_{ubi}$ -H:: $U6$ -sgRNA vektorem na CI médiu s Hygromycinem a Timentinem.

### 5.4 Genotypizace T0 generace ječmene jarního

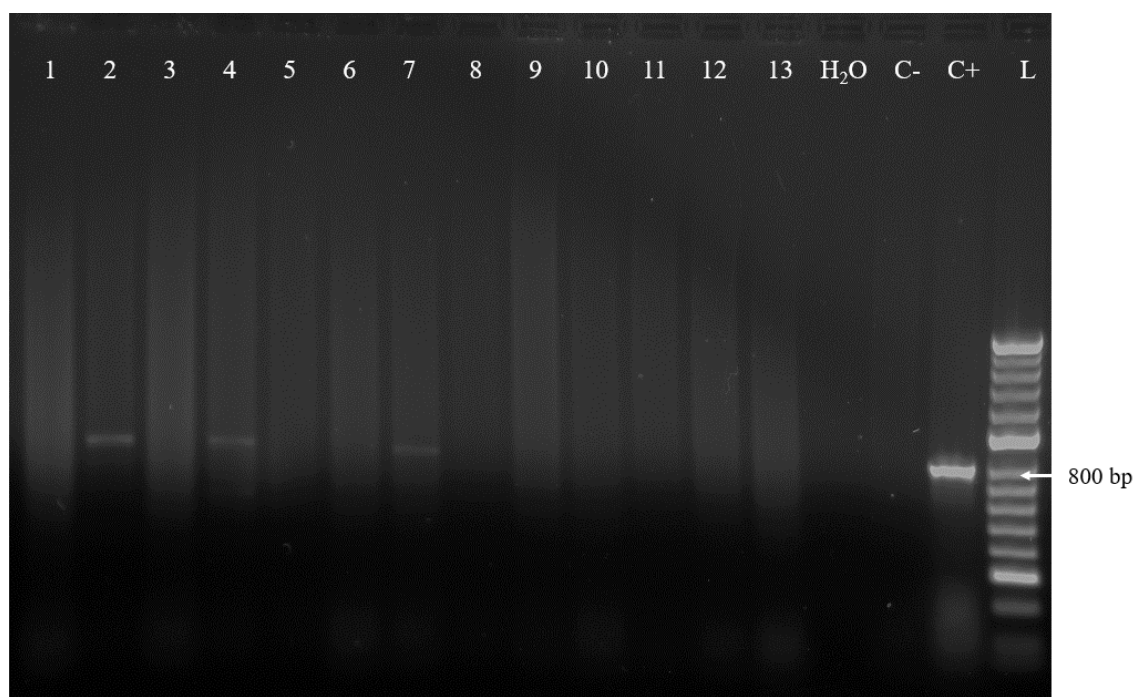
#### 5.4.1 Detekce transgenů *Cas9* a *hyg* v T0 generaci

Z 31 regenerovaných rostlin T0 generace byla izolována gDNA z mladého listu. Koncentrace izolované gDNA byla v rozmezí od 180 ng/ $\mu$ l do 500 ng/ $\mu$ l. Identifikace transgenních rostlin byla provedena detekcí transgenů *Cas9* a *hyg* metodou PCR. PCR produkt byl následně elektroforeticky separován, viz obr. 14. a 15. Porovnáním testovaných vzorků s kontrolním vzorkem pocházejícím z netransformované rostliny

a gDNA obsahující detekovaný transgen byly vyhodnoceny výsledky. Velikost produktu PCR reakce detekující transgen *hyg* byla 335 bp a velikost produktu detekující transgen *Cas9* činila 811 bp.



**Obr. 14. Elektroforetogram detekce *hyg* metodou PCR v T0 regenerovaných rostlinách.** V drahách 1-13 vzorky gDNA, velikost ampliconu - 335 bp, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, gDNA ječmene jarního obsahující *hyg* transgen), L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda.

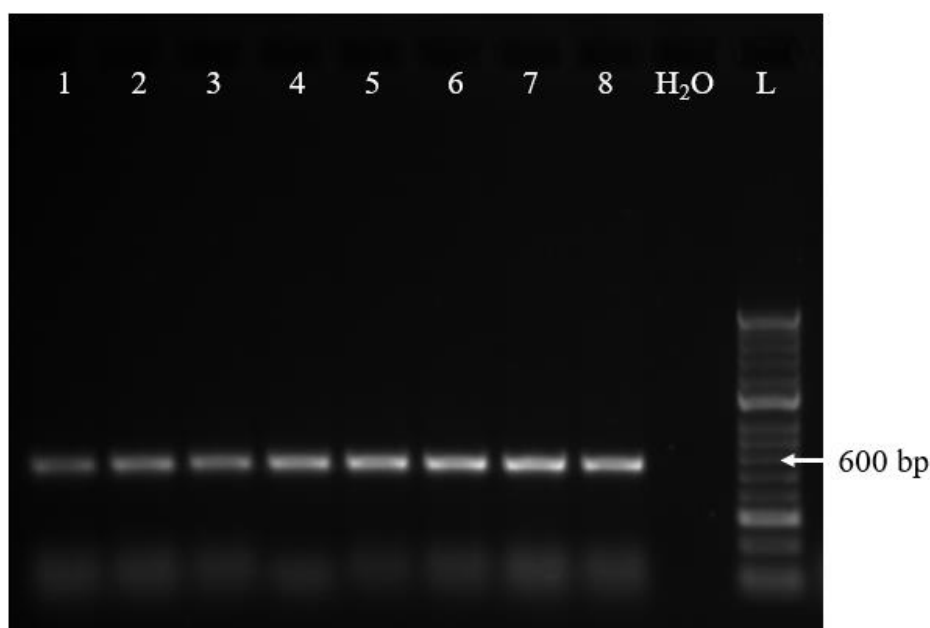


**Obr. 15. Elektroforetogram detekce transgenu *Cas9* metodou PCR v T0 regenerovaných rostlinách.** V drahách 1-13 vzorky gDNA, velikost ampliconu - 811 bp, C- (negativní kontrola, netransformovaná

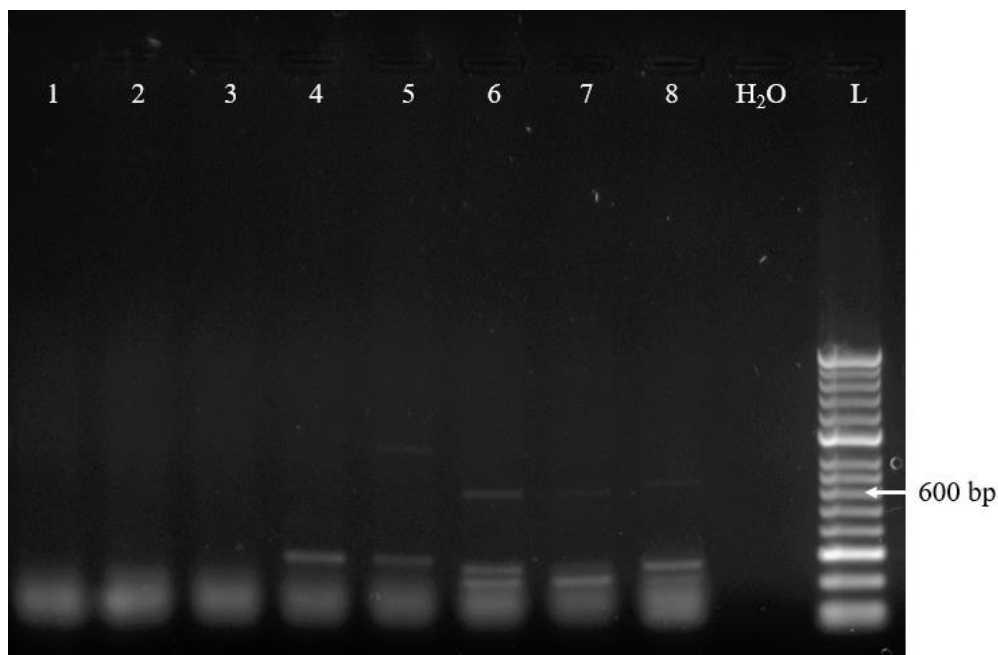
rostlina), C+ (pozitivní kontrola, gDNA ječmene jarního obsahující *Cas9* transgen), L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda.

#### 5.4.2 Optimalizace primerů pro sekvenování cílové sekvence

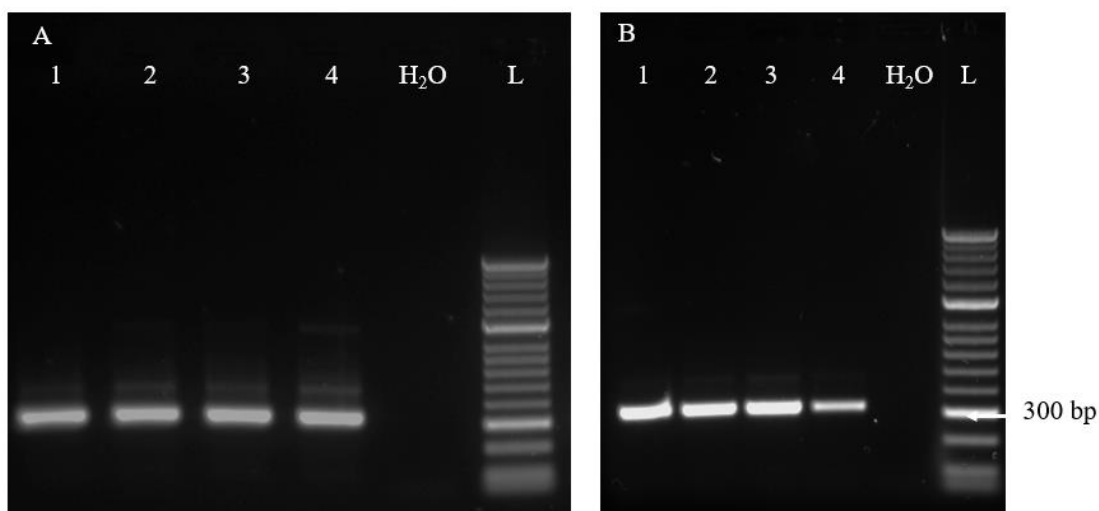
V internetovém nástroji Primer3plus byly navrženy PCR primery pro sekvenování cílové sekvence genu *HvABCG11* a genu *HvABCG10*. Byla provedena teplotní gradientová PCR a byla identifikována vhodná teplota nasedání primerů PCR reakce pro navržené primery. Pro sekvenaci *HvABCG10* byla určena teplota nasedání primerů 59 °C, viz obr. 16. Primery pro amplifikaci cílového úseku zájmového genu *HvABCG11* poskytovaly při testovaných teplotách amplikony o nízké koncentraci a nespecifické produkty, viz obr. 17, velikost amplikonu měla činit 599 bp. Proto byla použita druhá sada primerů amplifikující úsek uvnitř amplifikované sekvence obsahující protospacer o velikosti 324 bp. Ke snížení nespecifických produktů byl do reakční směsi přidán DMSO (5%), viz obr. 18.



**Obr. 16. Optimalizace teploty nasedání primerů pro detekci genu *HvABCG10*.** Teplota annealingu stoupá směrem doprava od 56 °C do 62 °C. Velikost amplikonu činila 555 bp, jako templát byla použita gDNA jarního ječmene Golden Promise, L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda.



**Obr. 17. Optimalizace teploty nasedání primerů pro amplifikaci genu *HvABCG11* za použití primerů *HvABCG11\_1*.** Teplota annealingu stoupá směrem doprava od 56 °C do 62 °C. Velikost amplikonu měla činit 599 bp, jako templát použita gDNA jarního ječmene Golden Promise, L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda.

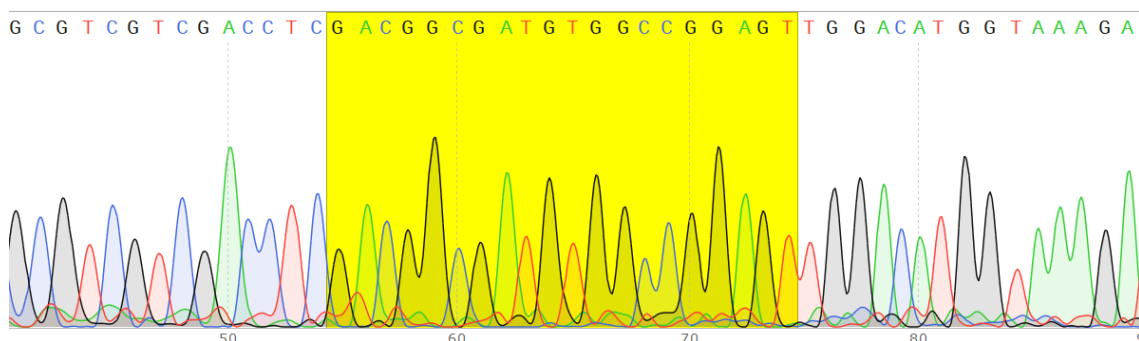


**Obr. 18. Optimalizace PCR reakce pro amplifikaci úseku genu *HvABCG11* za použití primerů *HvABCG11\_2*.** V drahách 1–4 vzorky gDNA jarního ječmene Golden Promise, amplikon - 324 bp, L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda. **A)** V drahách 1-4 přítomny nespecifické produkty PCR reakce. **B)** Po přidání DMSO do PCR reakční směsi, došlo ke snížení výskytu nespecifických produktů.



### 5.4.3 Detekce mutace genu *HvABCG11* T0 generaci

Ze sedmi transgenních rostlin obsahujících transgen *Cas9* byla provedena izolace gDNA paramagnetickými částicemi. Následně byla stanovena koncentrace izolované gDNA, která se pohybovala v rozsahu od 230 ng/μl do 660 ng/μl. Poté byla metodou PCR amplifikována cílová sekvence genů *HvABCG11* a *HvABCG10*. Přítomnost produktu PCR reakce byla elektroforeticky ověřena a vzorky byly předány do Ústavu experimentální botaniky, kde byla provedena sekvenace cílových sekvencí metodou Sangerova sekvenování. Výsledky sekvenování byly analyzovány v programu SnapGene Viewer. Výřez sekvenování cílové sekvence *HvABG11*, viz obr. 19. Žádná z analyzovaných transgenních rostlin T0 generace neobsahovala mutaci cílové sekvence, viz tab. 20.



Obr. 19. Výřez čtení sekvenování cílové sekvence *HvABCG11* transgenní rostliny T0 generace v SnapGene Viewer. Žlutě je vyznačena sekvence protospaceru.

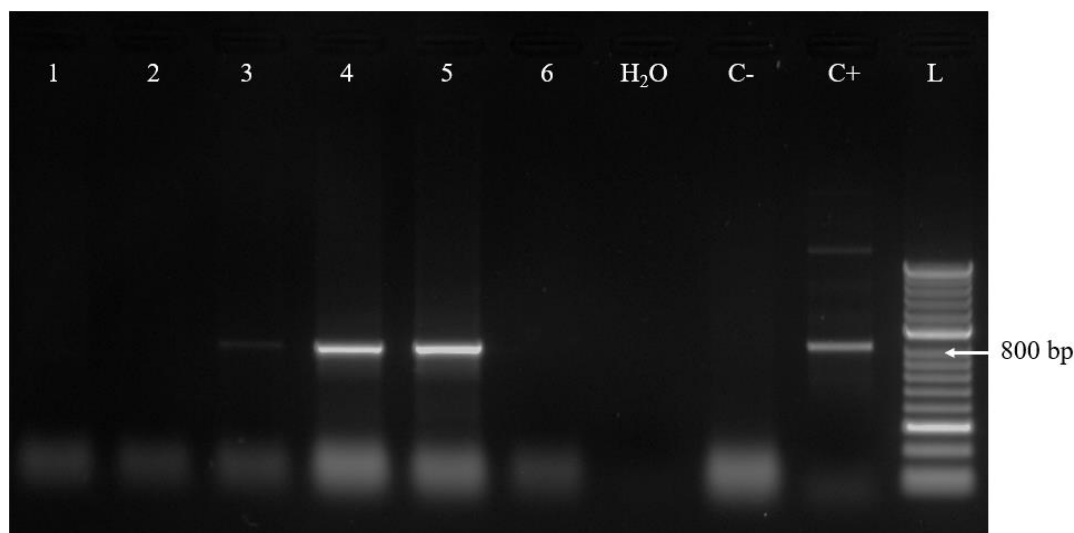
Tab. 21. Transformace rostlin jarního ječmene T0 generace.

Transformační událost	Počet nezralých embryí	Počet regenerovaných rostlin	Transgen <i>Cas9</i>	Transgen <i>hyg</i>	Mutace <i>HvABCG11</i>
1	250	18	4	8	0
2	125	13	3	10	0

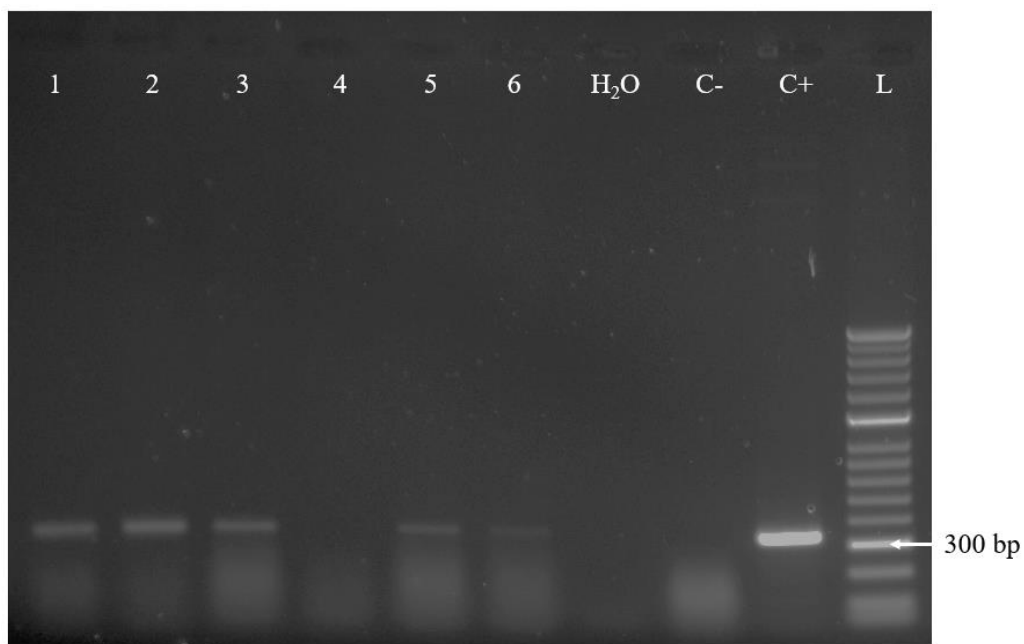
U regenerovaných rostlin byla metodou PCR detekována přítomnost transgenů *Cas9*, *hyg* a metodou Sangerova sekvenování detekována mutace v genu *HvABCG11*.

## 5.5 Genotypizace T1 generace ječmene jarního

Byly vybrány čtyři rostliny T0 generace, u kterých byla potvrzena přítomnost transgenu *Cas9* a vyseto šest až sedm obilek z každé rostliny. Následně byla izolována gDNA z mladého listu všech vyšetých rostlin T1 generace. Poté byla metodou PCR provedena detekce transgenu *Cas9* a *hyg*. Analýza 30 rostlin T1 generace odhalila, že šest rostlin obsahovalo transgen *Cas9*, viz obr. 20 a u 11 rostlin byla potvrzena přítomnost transgenu *hyg*, viz obr. 21. Z šesti transgenních rostlin, u kterých byl detekován *Cas9*, byla izolována gDNA paramagnetickými částicemi a provedena amplifikace cílové sekvence genu *HvABCG11* a amplifikace sekvence genu *HvABCG10*. Připravené vzorky byly předány do Ústavu experimentální botaniky, kde byla provedena sekvenace cílových sekvencí metodou Sangerova sekvenování. Žádná z analyzovaných transgenních rostlin T1 generace neobsahovala mutaci v genu *HvABCG11*, viz tab. 22.



**Obr. 20. Elektroforetogram detekce *Cas9* metodou PCR v T1.** V drahách 1-6 vzorky gDNA, velikost amplikonu - 811 bp, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, pDNA obsahující *Cas9* transgen), L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda.



**Obr. 21. Elektroforetogram detekce *hyg* metodou PCR v T1.** V drahách 1-6 vzorky gDNA, velikost amplikonu - 335 bp, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, pDNA obsahující *hyg* transgen), L – DNA marker molekulové hmotnosti (HyperLadder 50 bp, Bioline), H<sub>2</sub>O – voda.

**Tab. 22. Výsledky analýzy rostlin jarního ječmene T1 generace.**

Číslo linie	2	4	7	14
Počet vyšetých rostlin	6	6	7	7
Rostliny obsahující <i>Cas9</i>	3	0	0	3
Rostliny obsahující <i>hyg</i>	5	0	0	6
Rostliny obsahující mutaci	0	0	0	0

## 6 Diskuze

ATP transportéry jsou transmembránové proteiny účastníci se v rostlinách řady buněčných procesů, jako je reakce na biotický a abiotický stres, ukládání lipidů na povrchu pletiv, transport fytohormonů, růst a diferenciacie či příjem živin. Ječmenný genom kóduje 131 ABC transportérů (Zhang et al., 2020). Cílem práce bylo připravit mutaci genu *HvABCG11* v ječmeni jarním odrůdy Golden Promise. *HvABCG11* je blízký homolog genu *AtWBC18*. *AtWBC18* společně s *AtWBC1* a *AtWBC19* kódují kandidáty podílející se na tvorbě kutikuly (Suh et al., 2005). Gen *HvABCG11* je ortolog genu *OsABCG11*. Matsuda et al. (2012) provedli RT-PCR analýzu exprese vybraných *OsABCG* genů a zjistili, že exprese *OsABCG11* byla signifikantně zvýšena jak v kořenu, tak v nadzemní části při vystavení rostliny teplotě 6 °C. Při expozici rostliny teplotě 42 °C došlo k zvýšení exprese *OsABCG11* v nadzemní části (Matsuda et al., 2012). Lze tedy předpokládat, že transportér *HvABCG11* hraje roli v reakci na abiotický stres.

K indukci mutace byla použita technologie místně specifických programovatelných nukleas CRISPR/Cas9. V experimentální části byl navržen expresní vektor s U6-sgRNA a Ubi-Cas9 cílící na sekvenci genu *HvABCG11*. Účinnost vektoru pYL<sub>CRISPR/Cas9</sub>P<sub>ubi</sub>-H byla potvrzena u *O. sativa*, *T. aestivum*, *V. vinifera* a *H. vulgare* (Nawaz et al., 2019; Vlčko et Ohnoutková, 2020; Wan et al., 2020; Zhang et al., 2018). Nezralá embrya ječmene jarního odrůdy Golden Promise byla transformována *A. tumefaciens* nesoucí expresní vektor. Celkem bylo transformováno 375 nezralých embryí. V experimentální části byly provedeny dvě transformační události. Jelikož analýza rostlin T<sub>0</sub> generace regenerovaných z první transformační události nepotvrdila přítomnost mutace, transformace nezralých embryí ječmene jarního prostřednictvím *A. tumefaciens* byla opakována za použití nové AGL1 linie. Analýza regenerovaných rostlin z druhé transformační události nepotvrdila mutaci v genu *HvABCG11*. Celkem regenerovalo 31 rostlin T<sub>0</sub> generace, což odpovídalo regenerační efektivitě 8,26 %. Efektivita transformace činila pro první transformační událost 1,2 % a pro druhou transformační událost 2,4 %. Přestože efektivita druhé transformační události vzrostla, dosahovala nižších hodnot oproti průměrným hodnotám efektivit transformace následovaného protokolu (25 %) (Harwood et al., 2014). Vysoká frekvence regenerovaných transgenních rostlin je kritická pro získání mutantní rostliny.

Li et al. (2019) využili systém CRISPR-Cas9 k editaci zájmového genu v *H. vulgare*, z 23 regenerantů získali 21 transgenních rostlin. Účinná selekce tak zajistila vysoký podíl transgenních rostlin, ve kterých byla identifikována jedna mutantní rostlina. Efektivita editace byla přibližně 4 % (Li et al., 2019). K zvýšení pravděpodobnosti indukce mutace je potřeba optimalizovat podmínky transformace. Transformovaná nezralá embrya obou transformačních událostí byla kultivována na kalus indukčním (CI) médiu s Hygromycinem. Kultivace explantátů na CI médiu s Hygromycinem měla zajistit selekci transgenních kalusů. Genotypizace rostlin T0 generace odhalila, že pouze 58 % regenerovaných rostlin obsahovalo gen rezistence na Hygromycin, což naznačuje nedostatečný tlak na selekci transgenních rostlin. Selektce transgenních rostlin by mohla být zlepšena zvýšením koncentrace Hygromycinu v CI médiu, případně lze použít Hygromycin při kultivaci explantátu na transientním (T) i regeneračním (R) médiu. Harwood et al. (2014) navrhovali použít Hygromycin 30 mg/l v T i R médiu k získání regenerujících transgenních rostlin. Popřípadě lze využít jinou metodu selekce, například gen *bar* kódující enzym fosfotricinacetyltransferasu pro rezistenci k herbicidu fosfotricinu. Selektční gen *bar* byl použit k selekci ječmene transformovaného prostřednictvím *A. tumefaciens* a mikroprojektilového přenosu (Travella et al., 2005).

Technologie CRISPR/Cas9 je hojně využívána k inaktivaci funkce genů. Díky své vysoké efektivitě a spolehlivosti se tato metoda stala dominantní technikou mezi ostatními dostupnými metodami genomové editace. Technologii CRISPR/Cas9 lze využít k vývoji plodin tolerujících abiotický stres a plodin rezistentních k patogenům. Efektivita tvorby mutací metodou CRISPR/Cas9 se u jednotlivých rostlinných druhů liší. Zatímco úspěšnost indukce mutace v *A. thaliana* systémem sgRNA-Cas9 transformovaného *A. tumefaciens* dosahuje až 90 %, efektivita editace genomu touto metodou je u některých jednoděložných rostlin výrazně nižší, například u *O. sativa* činí 8,2 % či u *T. aestivum* 5,6 % (Kang, et al. 2018; Shan et al., 2013, Wang et al., 2014). Efektivita tvorby mutací je mimo jiné závislá na výběru vhodného promotoru pro expresi jak sgRNA, tak *Cas9*. Například při editaci genu *A. thaliana* za použití AtU6-sgRNA a AtRPS5a-Cas9 úspěšnost indukce mutace po transformaci *A. tumefaciens* činila 85 %, avšak při editaci zájmového genu *A. thaliana* za použití promotoru 35DPPDK k expresi *Cas9* se efektivita mutagenese snížila na hodnoty mezi 1,5 až 5,6 % (Li et al., 2013; Kang et al., 2018). Podobně výběr promotorů ovlivňuje

efektivitu indukce mutace u jednoděložných rostlin. Zhu et al. (2016) k tvorbě mutace zájmového genu v *Z. mays* použili k expresi sgRNA promotor ZmU6, efektivita dosahovala 10 %, zatímco úspěšnost indukce mutace za využití OsU3-sgRNA se pohybovala mezi 90 a 100 % (Lee et al., 2019). Vysoká exprese *Cas9* pozitivně ovlivňuje vznik mutace v zájmovém genu (Hajiahmadi et al., 2019). Volba vhodného promotoru je nezbytná pro kontrolu exprese *Cas9*. U *A. thaliana* frekvence výskytu mutace byla nižší při použití konstitutivního CaMV35S promotoru ve srovnání s využitím Egg-cell specific promotoru (Wang et al., 2015). Dle Hajiahmadi et al. (2019) vyšší výskyt mutací lze přisuzovat vyšší expresi *Cas9* řízeného Egg-cell specific promotorem. Navíc u jednoděložných rostlin endogenní promotory využití k expresi *Cas9* vykazují větší potenciál k indukci mutace než například CaMV35S či Ubi promotor (Shan et al., 2013; Xu et al., 2014). Ubi promotor využitý k expresi *Cas9* v této práci mohl způsobit nižší expresi *Cas9* a ovlivnit vznik mutace v zájmovém genu *HvABCG11*.

Příčinou nevytvoření mutace mohla být nedostačující efektivita sgRNA. sgRNA je složená z 20-nukleotidového protospaceru a RNA kostry tvořící vhodnou sekundární strukturu pro navázání *Cas9* endonukleasy. Sekvence protospaceru, variace sekvence sgRNA a její sekundární struktura mohou ovlivnit efektivitu tvorby mutace. Liang et al. (2016) navrhli 21 sgRNA k editaci genomu rýže a identifikovali kritéria k výběru efektivní sgRNA. tracrRNA je složena z repeat oblasti a anti-repeat oblasti tvořící RAR smyčku a smyček 1, 2, 3. Liang et al. (2016) uvádí, že přítomnost RAR, 2 a 3 smyčky je kritická pro efektivitu sgRNA. Liang et al. (2016) dále zjistili, že počet bazí hybridizujících v rámci sgRNA sekvence by neměl přesahovat 12, hybridizovat by nemělo více jak šest po sobě jdoucích bazí a obsah G/C by se měl pohybovat mezi 30 až 80 %. Za použití internetového nástroje UNAFold byla analyzována sekundární struktura sgRNA vybrané k tvorbě mutace *HvABCG11*. Z potencionálních sekvencí protospaceru byl na základě vyhodnocení sekundární struktury sgRNA vybrán protospacer II. Vybraná sekvence protospaceru obsahovala čtyři báze hybridizující v rámci sekvence protospaceru a žádná báze protospaceru nehybridizovala se sekvencí sgRNA. Ve schématu sekundární struktury vybrané sgRNA byly identifikovány smyčky RAR, 2 a 3. Řešením obtížného výběru sgRNA může být použití většího počtu sgRNA cílících na zájmový gen, a tak zvýšit pravděpodobnost indukce mutace. Lawrenson a Harwood (2019) využili technologii CRISPR/Cas9 k editaci vybraných genů

v ječmeni. Pro každý gen měli připravené dva vektory obsahující vždy dvě unikátní sgRNA, celkem tak byl jeden gen zaměřen čtyřmi sgRNA. Úspěšnost vzniku mutací v editovaných genech u analyzovaných rostlin byla stoprocentní.

Návrh specifické sgRNA je kritický ke snížení necílených mutací. Přestože obsah G/C v cílové sekvenci v rozmezí 30 a 80 % zvyšuje pravděpodobnost indukce cílené mutace, G/C obsah cílové sekvence vyšší než 70 % může zvýšit pravděpodobnost výskytu i necílené mutace (Liang et al., 2016). Jelikož cílová sekvence obsahovala 70 % G/C, byla identifikována sekvence homologního genu *HvABCG10*, u kterého by se mohla vyskytovat necílená mutace. Sangerovo sekvenování cílové sekvence *HvABCG10* neodhalilo přítomnost necílené mutace. Mutace může vznikat i v místě vzdálenějším od protospaceru, proto byla ověřena oblast 50 bp před a za cílovou sekvencí genu *HvABCG11*. Genetická editace nebyla v této oblasti detekována.

Genotypizací 30 rostlin T1 generace pocházejících ze čtyř transgenních linií T0 byla potvrzena přítomnost transgenů *Cas9* u 20 % analyzovaných rostlin. Podařilo se připravit stabilní transgenní rostliny, u kterých došlo k přenosu genu *Cas9* do T1 generace. Žádná z analyzovaných rostlin T1 generace neobsahovala mutaci v zájmovém genu. Lawrenson et al. (2015) indukovali mutaci ve třech genech *H. vulgare*, k detekci mutace v zájmovém genu rostlin T1 generace analyzovali průměrně 90 rostlin T1 generace z každé linie T0 generace. V této práci bylo genotypizováno vždy šest až sedm rostlin potomstva jedné T0 transgenní linie. Bylo by tedy potřeba charakterizovat větší množství potomstva T0 transgenních linií k odhalení možné cílové mutace. Transgenní rostliny mohou být dále použity například k transformaci expresním vektorem obsahující sgRNA kazetu a gen růstového regulátoru (Debernardi et al., 2020; Maher et al., 2019).

## 7 Závěr

Cílem práce bylo připravit mutaci v genu *HvABCG11*. *HvABCG11* je ortolog genu *O. sativa OsABCG11*. Transportér *OsABCG11* se pravděpodobně podílí na transportu komponent kutikuly. V rámci experimentální části byl navržen expresní vektor s U6-sgRNA a Ubi-Cas9 cílící na gen *HvABCG11*. Nepřímou transformací *A. tumefaciens* byl expresní vektor vnesen do nezralých embryí ječmene jarního odrůdy Golden Promise. Regenerovalo 8,26 % rostlin T0 generace. Genotypizace regenerovaných rostlin odhalila, že žádná z analyzovaných rostlin neobsahovala mutaci v cílové sekvenci genu *HvABCG11*. Z důvodu nízké frekvence regenerovaných transgenních rostlin je potřeba optimalizovat podmínky transformace *A. tumefaciens* a zvýšit tak pravděpodobnost zachycení mutace v zájmovém genu. Analýza 30 rostlin T1 generace potvrdila přítomnost transgenu *Cas9*, avšak mutace v zájmovém genu nebyla identifikována. K detekci zájmové mutace je potřeba analyzovat větší počet potomstva T0 generace. Transgenní rostliny obsahující *Cas9* mohou být dále získány například transformací expresním vektorem obsahující sgRNA kazetu a gen pro expresi růstového regulátoru *Wuschel* či podobné růstové regulátory prostřednictvím *A. tumefaciens* a zvýšit tak pravděpodobnost indukce mutace. K zvýšení pravděpodobnosti vzniku mutace lze zájmový gen zacílit expresním vektorem s více sgRNA.



## Seznam použité literatury

Alejandro S., Lee Y., Tohge T., Sudre D., Osorio S., Park J., Bovet L., Lee Y., Geldner N., Fernie A.R., Martinoia E. (2012) AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Current Biology*, 22, 1207–1212.

Ali Z., Mahfouz M.M., Mansoor S. (2019) CRISPR-TSKO: A Tool for Tissue-Specific Genome Editing in Plants. *Trends in Plant Science*, 25(2), 123-126.

Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.-S., Ohlsson P., González M.N., Samuelsson M., Hofvander P., Olsson P. (2018) Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*, 164, 378–384.

Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.K., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576, 149–157.

Badri D.V., Quintana N., El Kassis E.G., Kim H.K., Choi Y.H., Sugiyama A., Verpoorte R., Martinoia E., Manter D.K., Vivanco J.M. (2009) An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. *Plant Physiology*, 151(4), 2006-17.

Bauer H., Ache P., Lauthner S., Fromm J., Hartung W., AL-Rasheid K., Sonnewald S., Sonnewald U., Kneitz S., Lachmann N., Mendel R.R., Bittner F., Hetherington, Hedrich R. (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Current Biology*, 23, 53–57.

Baxter I., Tchieu J., Sussman M.R., Boutry M., Palmgren M.G., Gribskov M., Harper J.F., Axelsen K.B. (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 132(2), 618-28.

Bernard D.G., Cheng Y., Zhao Y., Balk J. (2009) an allelic mutant series of *ATM3* reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 151(2), 590–602.

Bessire M., Borel B., Fabre G., Carraça L., Efremova N., Yephremov A., Yan Cao, Jetter R., Jacquat A.-C., Métraux J.-P., Nawrath C. (2011) A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 23(5), 1958–1970.

Bird D.A., Beisson F., Brigham A., Shin J., Geer S., Jetter R., Kunst L., Wu X., Yephremov A., Samuels A.L. (2007) Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion, *Plant Journal*, 52(3), 485–98.

Bo W., Zhaohui Z., Huanhuan Z., Xia W., Binglin, L., Lijia Y., Xiangyan H., Deshui Y., Xuelian Z., Chunguo W., Wenqin S., Chengbin C., Yong Z. (2019) Targeted Mutagenesis of NAC Transcription Factor Gene, OsNAC041, Leading to Salt Sensitivity in Rice. *Rice Science*, 26, 98–108.

Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A.-. Bonas U. (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326, 1509–1512.

Borghgi L., Kang J., Ko D., Lee Y., Martinoia E. (2015) The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 924–930.

Bortesi L., Zhu C., Zischewski J., Perez L., Bassié L., Nadi R., Forni G., Lade S.B., Soto E., Jin X., Medina V., Villorbina G., Muñoz P., Farré G., Fischer R., Twyman R.M., Capell T., Christou P., Schillberg S. (2016) Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnology Journal*, 14(12), 2203–2216.

Cathomen T., Joung J.K. (2008) Zinc-finger nucleases: The Next Generation Emerges. *Molecular Therapy*, 16(7), 1200-7.

Cunningham F. J., Goh N. S., Demirer G. S., Matos J. L., Landry M. P. (2018) Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, 36, 882–897.

Curtin S.J., Xiong Y., Michno J.M., Campbell B.W., Stec A.O., Čermák T., Starker C., Voytas D.F., Eamens A.L., Stupar R.M. (2018) CRISPR/Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of Glycine max and Medicago truncatula. *Plant Biotechnology Journal*, 16(6), 1125–1137.

Davidson A.L., Dassa E., Orelle C., Chen J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317–64.

Dean M., Annilo T. (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6, 123-142.

Debernardi J.M., Tricoli D.M., Ercoli M.F., Hayta S., Ronald P., Palatnik J.F., Dubcovsky J. (2020) A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 38(11), 1274-1279.

Demirer G. S., Zhang H., Matos J. L., Goh N.S., Cunningham F. J., Sung Y., Chang R., Aditham A.J., Chio L., Cho M.J., Staskawicz B., Landry M.P. (2019) High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nature Nanotechnology*, 14(5), 456–464.

Do T.H.T., Martinoia E., Lee Y., Hwang J.U. (2021) 2021 update on ATP-binding cassette (ABC) transporters: how they meet the needs of plants. *Plant Physiology*, 187(4), 1876-1892.

Domagalska M.A., Leyser O. (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4), 211-21.

Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19, 1349.

Ellison E.E., Nagalakshmi U., Gamo M.E., Huang P.J., Dinesh-Kumar S., Voytas D.F. (2020) Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nature Plants*, 6(6), 620-624.

Flodh H. (1986) Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: development and production. *Acta Paediatrica*, 325, 1-9.

Fossi M., Amundson K., Kuppu S., Britt A., Comai A. (2019) Regeneration of *Solanum tuberosum* Plants from Protoplasts Induces Widespread Genome Instability. *Plant Physiology*, 180(1), 78–86.

Franke R., Briesen I., Wojciechowski T., Faust A., Yephremov A., Nawrath C., Schreiber L. (2005) Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues: a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, 66(22), 2643-2658.

Geisler G., Aryal B., Donato M.D., Hao P. (2017) A Critical View on ABC Transporters and Their Interacting Partners in Auxin Transport. *Plant Cell Physiology*, 58(10), 1601–1614.

Geisler M., Blakeslee J.J., Bouchard R., Lee O.R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bailly A., Richards E.L., Ejendal K.F.K., Smith A.P., Baroux C., Grossniklaus U., Müller A., Hrycyna C.A., Dudler R., Murphy A.S., Martinoia E. (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant Journal*, 44(2), 179–194.

Gleditsch D., Pausch P., Müller-Esparza H., Özcan A., Guo X., Bange G., Randau L. (2019) PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biology*, 16(4), 504-517.

Hajiahmadi Z., Movahedi A., Wei H., Li D., Orooji Y., Ruan H., Zhuge Q. (2019) Strategies to Increase On-Target and Reduce Off-Target Effects of the CRISPR/Cas9 System in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3719.

Harwood W.A. (2014) A protocol for high-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. V *Cereal Genomics: Methods and Protocols* (Henry R.J., Furtado, A., eds.), pp. 251–260, Humana Press: Totowa, NJ, USA.

Hayashi M., Nito K., Takei-Hoshi R., Yagi M., Kondo M., Suenaga A., Yamaya T., Nishimura M. (2002) Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrate for fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Plant Cell Physiology*, 43, 1-11.

Hefferin M.L., Tomkinson A.E. (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, 4(6), 639–48.

Hellmich U.A., McIlwain B., Doshi R. (2018) Where do we go from here? Membrane protein research beyond the structure-function horizon. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1860(4), 801-803.

Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44,113-39.

Hinchliffe A., Harwood W.A. (2019) *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Barley. V *Barley: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 1900* (Harwood W.A., ed), pp. 115–126, Springer Protocols, Norwich, UK.

Huo W., Zhao G., Yin J., Ouyang X., Wang Y., Yang C., Wang B., Dong P., Wang Z., Watari H., Chaum E., Pfeffer L.M., Yue J. (2017) Lentiviral CRISPR/Cas9 vector

mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Journal of Cancer*, 8(1), 57-64.

Hwang J., Song W., Hong D., Song W.Y., Hong D., Ko D., Yamaoka Y., Jang S., Yim S., Lee E., Khare D., Kim K., Palmgren M., Yoon S. H., Martinoia E., Lee Y. (2016) Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Molecular Plant*, 9(3), 338–355.

Chaffai R., Koyama H. (2011) Chapter 1 - Heavy Metal Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. V *Advances in Botanical Research, Academic Press, Vol. 60* (Kader J.-C., Delseny M., eds.), pp. 41-49, Elsevier, France.

Che P., Wu E., Simon M.K., Anand A., Lowe K., Gao H., Sigmund A.L., Yang M., Albertsen M.C., Gordon-Kamm W., Jones T.J. (2022) Wuschel2 enables highly efficient CRISPR/Cas-targeted genome editing during rapid de novo shoot regeneration in sorghum. *Communications Biology*, 5, 344.

Chen G., Komatsuda T., Ma J.F., Nawrath C., Pourkheirandish M., Tagiri A., Hu Y., Sameri M., Li X., Zhao X., Liu Y., Li C., Ma X., Wang A., Nair S., Wang N., Miya A., Sakuma S., Yamaji N., Zheng X., Nevo E. (2011) An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 108(30), 12354-12359.

Cho C.H., Jang S., Choi B.Y., Hong D., Choi D. S., Choi S., Kim H., Han S.K., Kim S., Kim M.-S., Palmgren M., Sohn K.H., Yoon H.S., Lee Y. (2021) Phylogenetic analysis of ABCG subfamily proteins in plants: functional clustering and coevolution with ABCGs of pathogens. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1422-1438.

Choi H., Jin J.Y., Choi S., Hwang J.U., Kim Y.Y., Suh M.C., Lee Y. (2011) An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *Plant Journal*, 65(2), 181-193.

Choi H., Ohya K., Kim Y.Y, Jin J.-Y., Lee S.B., Yamaoka Y., Muranaka T., Suh M.C., Fujioka S., Lee Y. (2014) The role of *Arabidopsis* ABCG9 and ABCG31 ATP binding cassette transporters in pollen fitness and the deposition of sterol glycosides on the pollen coat. *Plant Cell*, 26, 310-324.

Christian M., Čermák K., Doyle E.L., Schmidt C. Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757–761.

Internetová databáze Plants Ensembl obsahující volně dostupný genom ječmene jarního. [http://plants.ensembl.org/Hordeum\\_vulgare/Info/Index](http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index); Staženo 30.3 2020.

Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-33.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.

Johnson I.S. (1983) Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, 219(4585), 632-7.

Kamimoto Y., Terasaka K., Hamamoto M., Takanashi K., Fukuda S., Shitan N., Sugiyama A., Suzuki H., Shibata D., Wang B., Pollmann S., Geisler M., Yazaki K. (2012) *Arabidopsis* ABCB21 is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant Cell Physiology*, 53(12), 2090-100.

Kamoun S., Furzer O., Jones J.D.G., Judelson H.S., Ali G.S., Dalio R.J.D., Roy S.G., Schena L., Zambounis A., Panabières F., Cahill D., Ruocco M., Figueiredo A., Chen X-R, Hulvey J., Stam R., Lamour K., Gijzen M., Tyler B.M., Grünwald N.J., Mukhtar M.S., Tomé D.F.A., Tör M., Van DenAckerveken G., McDowell J., Daayf F., Fry W.E.,

Lindqvist-Kreuzer H., Meijer H.J.G., Petre B., Ristaino J., Yoshida K., Birch P.R.J., Govers F. (2015) The top 10 *oomycete* pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413–434.

Kang B.-C., Yun J.-Y., Kim S.-T., Shin Y., Ryu J., Choi M., Woo J.W., Kim J.-S. (2018) Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nature Plants*, 4(7), 427.

Kang J., Hwang J.U., Lee M., Kim Y.Y., Assmann S.M., Martinoia E. & Lee Y. (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 107(5), 2355–2360.

Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretschmar T., Lee Y., Martinoia E. (2011) Plant ABC Transporters. *Arabidopsis book*, 9, e0153.

Kearns N.A., Pham H., Tabak B., Genga R.M., Silverstein N.J., Garber M., Maehr R. (2015) Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nature Methods*, 12(5), 401–403.

Khan S., Ullah M.W., Siddique R., Nabi G., Manan S., Yousaf M., Hou H. (2016) Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, 2405954.

Khare D., Choi H., Huh S.U., Bassin B., Kim J., Martinoia E., Sohn K.H., Paek K.H., Lee Y. (2017) *Arabidopsis* ABCG34 contributes to defense against necrotrophic pathogens by mediating the secretion of camalexin. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 114, E5712–E5720.

Kim D., Kim D., Alptekin B., Budak H. (2017) CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 18, 31–41.

Kim H., Kim S.T., Ryu J., Kang B.C., Kim J.S., Kim S.-G. (2017) CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature Communications*, 8, 14406.



Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 93(3), 1156-1160.

Kim D.Y., Bovey L., Maeshima M., Martinoia E., Lee Y. (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *The Plant Journal*, 50(2), 207–218.

Kiryushkin A.S., Ilina E.L., Guseva E.D., Pawlowski K., Demchenko K.N. (2021) Hairy CRISPR: Genome Editing in Plants Using Hairy Root Transformation. *Plants (Basel)*, 11(1), 51.

Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K.J., Kwon M., Endler A., Song W.-Y., Martinoia E., Sakakibara H., Lee Y. (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 111(19), 7150-7155.

Kong L., Liu Y., Zhi P., Wang X., Xu B., Gong Z., Chang C. (2020) Origins and Evolution of Cuticle Biosynthetic Machinery in Land Plants. *Plant Physiology*, (184)4, 1998–2010.

Krattinger S.G., Lagudah E.S., Spielmeier W., Singh R.P., Huerta-Espino J., McFadden H., Bossolini E., Selter L.L., Keller B. (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 323(5919), 1360-3.

Kretschmar T., Kohlen W., Sasse J., Borghi L., Schlegel M., Bachelier J.B., Reinhardt D., Bours R., Bouwmeester H.J., Martinoia E. (2012) A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*, 483(7389), 341-4.

Kumar S., Kumar A. (2015) Role of genetic engineering in agriculture. *Plant Archives*, 15, 1–6.

Kuromori T., Miyaji T., Yabuuchi H., Shimizu H., Sugimoto E., Kamiya A., Moriyama Y., Shinozaki K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid

transport and responses. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 107(5), 2361–2366.

Larsen P.B., Cancel J., Rounds M., Ochoa V. (2007) Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment, *Planta*, 225(6), 1447–1458.

Lau C.H., Suh Y. (2018) In vivo epigenome editing and transcriptional modulation using CRISPR technology. *Transgenic Research*, 27(6), 489-509.

Lawrenson T., Harwood W.A. (2019) Creating Targeted Gene Knockouts in Barley Using CRISPR/Cas9. V *Barley: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 1900* (Harwood W.A., ed), pp. 217–232, Springer Protocols, Norwich, UK.

Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology*, 16, 258.

Lee K., Zhang Y., Kleinstiver B.P., Guo J.A., Aryee M.J., Miller J., Malzahn A., Zarecor, S., Lawrence-Dill C.J., Joung J.K., Qi Y., Wang K. (2019) Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 17(2), 362–372.

Lee M., Lee K., Lee J., Noh E.W., Lee Y. (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 827-36.

Lefèvre F., Boutry M. (2018) Towards identification of the substrates of ATP-binding cassette transporters. *Plant Physiology*, 178(1),18-39.

Lescoz M., Dahais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer. Y., Rouz P., Rombauts S. (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences, *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-327.

Li J. F., Norville J. E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31(8), 688–691.

Li M., Hensel G., Mascher M., Melzer M., Budhagatapalli N., Rutten T., Himmelbach A., Beier S., Korzun V., Kumlehn J., Börner T., Stein N. (2019) Leaf Variegation and Impaired Chloroplast Development Caused by a Truncated CCT Domain Gene in *albostrians* Barley. *The Plant Cell*, 31(7), 1430–1445.

Li M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G., Li H. (2016) Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, 7, 377.

Li S., Gao F., Xie K., Zeng X., Cao Y., Zeng J., He Z., Ren Y., Li W., Deng Q., Wang S., Zheng A., Zhu J., Liu H., Wang L., Li P. (2016) The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 14(11), 2134–2146.

Li X.S., Wang Y., Liu Y.J., Yang B., Wang X., Wei J., Lu Z., Zhang Y., Wu J., Huang X., Yang L., Chen J. (2018) Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 36(4), 324-327.

Liang G., Zhang H., Lou D., Yu D. (2016) Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific Reports*, 6, 21451.

Lin C.-S., Hsu C.-T., Yang L.-H., Lee L.-Y., Fu J.-Y., Cheng Q.-W., Yu C.T., Wang W., Liao L.J., Gelvin S.B., Shih M.C. (2018) Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnology Journal*, 16(7), 1295-1310.

Liu J., Chen J., Zheng X., Wu F., Lin Q., Heng Y., Tian P., Cheng Z.J., Yu X., Zhou K., Zhang X., Guo X., Wang J., Wang H., Wan J. (2017) GW5 acts in the

brassinosteroid signalling pathway to regulate grain width and weight in rice. *Nature Plants*, 3, 17043.

Liu W., Feng X., Cao F., Wu D., Zhang G., Vincze E., Wang Y., Chen Z.H., Wu F. (2021) An ATP binding cassette transporter HvABCB25 confers aluminum detoxification in wild barley. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 12337.

Liu X.S., Wu H., Krzisch M., Wu X., Graef J., Muffat J., Hnisz D., Li C.H., Yuan B., Xu C., Li Y., Vershkov D., Cacace A., Young R.A., Jaenisch R. (2018) Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell*, 172(5), 979-992.e6.

Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.-J., Scelonge C., Lenderts B., Chamberlin M., Cushatt J., Wang L., Ryan L., Khan T., Chow-Yiu J., Hua W., Yu M., Banh J., Bao Z., Brink K., Igo E., Rudrappa B., Shamseer PM, Bruce W., Newman L., Shen B., Zheng P., Bidney D., Falco C., Register J., Zhao Z.-Y., Xu D., Jones T., Gordon-Kamm W. (2016) Morphogenic Regulators *Baby boom* and *Wuschel* Improve Monocot Transformation. *The Plant Cell*, 28(9), 1998–2015.

Lu Y. (2018) Assembly and Transfer of Iron-Sulfur Clusters in the Plastid. *Frontiers in Plant Science*, 14(9), 336.

Ma J.F. (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology*, 264, 225-252.

Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. (2015) A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274-84.

Maher M. F., Nasti R. A., Vollbrecht M., Starker C. G., Clark M. D., Voytas, D. F. (2019) Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nature. Biotechnology*, 38, 84–89.

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. (2020) Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 67–83.

Malnoy M., Viola R., Jung M.-H., Koo O.-J., Kim S., Kim J.-S., Velasco R., Kanchiswamy C.N. (2016) DNA-free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers of Plant Science*, 7, 1904.

Martinoia E., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu U., Muller-Rober B., Schulz B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta*, 214(3), 345–355.

Matsuda S., Funabiki A., Komori N., Koike M., Tokuji Y., Takamure I., Kato K. (2012) Genome-wide analysis and expression profiling of half-size ABC protein subgroup G in rice in response to abiotic stress and phytohormone treatments. *Molecular Genetics and Genomics*, 287, 819–835.

McFarlane H.E., Shin J.H., Bird D.A., Samuels A.L. (2010) Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell*, 22(9), 3066–3075.

Mendiondo G.M., Medhurst A., van Roermund C.W., Zhang X., Devonshire J., Scholefield D., Fernández J., Axcell B., Ramsay L., Waterham H.R., Waugh R., Theodoulou F.L., Holdsworth M.J. (2014) Barley has two peroxisomal ABC

transporters with multiple functions in beta-oxidation. *The Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4833-484.

Moons A. (2008) Transcriptional profiling of the PDR gene family in rice roots in response to plant growth regulators, redox perturbations and weak organic acid stresses. *Planta*, 229(1), 53–71.

Nawaz G., Han Y., Usman B., Liu F., Qin B., Li R. (2019) Knockout of *OsPRP1*, a gene encoding proline-rich protein, confers enhanced cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *3 Biotech*, 9(7), 254.

Nguyen V.N.T., Lee S.B., Suh M.C., An G., Jung K.H. (2018) OsABCG9 Is an Important ABC 845 Transporter of Cuticular Wax Deposition in Rice. *Frontiers of Plant Science*, 9, 960.

Noh B., Bandyopadhyay A., Peer W.A., Spalding E.P., Murphy, A.S. (2003). Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature*, 423(6943), 999–1002.

Noh B., Murphy A.S., Spalding E.P. (2001) Multidrug resistancelike genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell*, 13(11), 2441–2454.

Osbourn A.E. (1996) Performed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8(10), 1821-1831.

Pang K., Li Y., Liu M., Meng Z., Yu Y. (2013) Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in maize (*Zea mays* L.) *Gene*, 526(2), 411–428.

Panikashvili D., Shi J.X., Schreiber L., Aharoni A. (2011) The *Arabidopsis* ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytologist*, 190, 113-124.

Park J., Song W.Y., Ko D., Eom Y., Hansen T.H., Schiller M., Lee T.G., Martinoia E., Lee Y. (2012) The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant Journal*, 69(2), 278-88.

Pausch P., Al-Shayeb B., Bisom-Rapp E., Tsuchida C.A., Li Z., Cress B.F., Knott G.J., Jacobsen S.E., Banfield J.F., Doudna J.A. (2020) CRISPR-Cas $\Phi$  from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*, 369(6501), 333-337.

Peng A., Chen S., Lei T., Xu L., He Y., Wu L., Yao L., Zou X. (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), 1509–1519.

Puchta H. (2005) The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 1–14.

Pyott D. E., Sheehan E., Molnar A. (2016) Engineering of CRISPR/Cas9- mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1276–1288.

Qi W., Zhu T., Tian Z., Li C., Zhang W., Song, R. (2016) High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnology*, 16(1), 58.

Razzaq A., Saleem F., Kanwal M., Mustafa G., Yousaf S., Imran Arshad H.M., Hameed M.K., Khan M.S., Joyia F.A. (2019) Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 40–45.

Rea P.A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 347-375.

Sánchez-Fernández R., Davies T.G., Coleman J.O., Rea P.A. (2001) The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30231–44.

Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 16(4), 902–910.

Sasse J., Simon S., Gübeli C., Liu G.W., Cheng X., Friml J., Bouwmeester H., Martinoia E., Borghi L. (2015) Asymmetric localizations of the ABC transporter PaPDR1 trace paths of directional strigolactone transport. *Current Biology*, 25(5), 647–55.

Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.-L., Gao C. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(8), 686.

Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H.R., Archibald R.L., Yang M., Hakimi S.M., Mo H., Habben J.E. (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 207–216.

Shim J.S., Oh N., Chung P.J., Kim Y.S., Choi Y.D., Kim J.K. (2018) Overexpression of *OsNAC14* Improves Drought Tolerance in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 9, 310.

Shiono K., Ando M., Nishiuchi S., Takahashi H., Watanabe K., Nakamura M., Matsuo Y., Yasuno N., Yamanouchi U., Fujimoto M., Takanashi H., Ranathunge K., Franke R.B., Shitan N., Nishizawa N.K., Takamure I., Yano M., Tsutsumi N., Schreiber L., Yazaki K., Nakazono M., Kato K. (2014) RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *Plant Journal*, 80(1), 40–51.



Schneider E., Hunke S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(1), 1–20.

Stein M., Dittgen J., Sánchez-Rodríguez C., Hou B.-H., Molina A., Schulze-Lefert P., Lipka V., Somerville S. (2006) Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *The Plant Cell*, 18(3), 731–746.

Suh M.C., Samuels L.A., Jetter R., Kunst L., Pollard M., Ohlrogge J., Beisson F. (2005) Cuticular Lipid Composition, Surface, Structure, and Gene Expression in Arabidopsis Stem Epidermis. *Plant Physiology*, 139(4), 1649-1665.

Tan X., Li K., Wang Z., Zhu K., Tan X., Cao J. (2019) A review of plant vacuoles: formation, located proteins, and functions. *Plants*, 8(9), 327.

Tanaka K.J., Song S., Mason K., Pinkett H.W. (2018) Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1860(4), 868-877.

Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bandyopadhyay A., Makam S.N., Lee O.R., Richards E.L., Murphy A.S., Sato F., Yazaki K. (2005) PGP4, an ATP binding cassette P glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell*, 17(11), 2922-2939.

Travella S., Ross S.M., Harden J., Everett C., Snape J.W., Harwood W.A. (2005) A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23(12), 780-9.

Trevino A.E., Zhang F. (2014) Genome editing using Cas9 nickases. *Methods in Enzymology*, 546, 161-74.

Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faricloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115.

Varanda C.M., Félix M.D.R., Campos M.D., Patanita M., Materatski P. (2021) Plant Viruses: From Targets to Tools for CRISPR. *Viruses*, 13(1),141.

Verrier P. J., Bird D., Burla B., Dassa E., Forestier C., Geisler M., Klein M., Kolukisaoglu U., Lee Y., Martinoia E., Murphy A., Rea P.A., Samuels L., Schulz B., Spalding E.J., Yazaki K., Theodoulou F.L. (2008) Plant ABC proteins – A unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4), 151–159.

Vlčko T., Ohnoutková L. (2020) Allelic Variants of CRISPR/Cas9 Induced Mutation in an Inositol Trisphosphate 5/6 Kinase Gene Manifest Different Phenotypes in Barley. *Plants*, 9(2), 195.

Wan D.-Y., Guo Y., Cheng Y., Hu Y., Xiao S., Wang Y., Wen Y.-Q. (2020) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Research*, 7, 116.

Wang Y., Cordewener J.H.G., America A.H.P., Shan W., Bouwmeester K., Govers F. (2015) Arabidopsis lectin receptor kinases LecRK-IX.1 and LecRK-IX.2 are functional analogs in regulating Phytophthora resistance and plant cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 1032–1048.

Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9), 947–51.

Wang Z.-P., Xing H.-L., Dong L., Zhang H.-Y., Han C.-Y., Wang X.-C., Chen Q.-J. (2015) Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome Biology*, 16(1), 144.

Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.-G., Kim S.-T., Choe S., Kim J.-S. (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33(11), 1162-1164.

Xiong J., Feng J., Yuan D., Zhou J., Miao W. (2015) Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter super-family. *Scientific Reports*, 5, 16724.

Xu R., Li H., Qin R., Wang L., Li L., Wei P., Yang J. (2014) Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 7(1), 5.

Xu R., Yang Y., Qin R., Li H., Qiu C., Li L., Wei P., Yang J. (2016) Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of Genomics*, 43(8), 529–532.

Yadav V., Molina I., Ranathunge K., Castillo I.Q., Rothstein S.J., Reed J.W. (2014) ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26(9), 3569-3588.

Yim S., Khare D., Kang J., Hwang J.U., Liang W., Martinoia E., Zhang D., Kang B., Lee Y. (2016) Postmeiotic development of pollen surface layers requires two *Arabidopsis* ABCG-type transporters. *Plant Cell*, 35(9), 1863-1873.

Zhang D., Li H. (2014) Exine export in pollen. V *Plant ABC Transporters, Vol. 22 Signaling and Communication in Plants* (Geisler M., ed.), pp. 49-62, Springer, Switzerland.

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

Zhang M., Cao Y., Wang Z., Wang Z.Q., Shi J., Liang X., Song W., Chen Q., Lai J., Jiang C. (2018) A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes

variation of leaf Na<sup>+</sup> exclusion and salt tolerance in maize. *New Phytology*, 217(3), 1161–1176.

Zhang S., Zhang R., Song G., Gao J., Li W., Han X., Chen M., Li Y., Li G. (2018) Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biology*, 18(1), 302.

Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J. Chen K., Qiu J.-L., Gao C. (2016) Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 7, 12617.

Zhang Z., Tong T., Fang Y., Zheng J., Zhang X., Niu C., Li J., Zhang X., Xue D. (2020) Genome-wide identification of barley ABC genes and their expression in response to abiotic stress treatment. *Plants*, 9(10), 1281.

Zhao G., Shi J., Liang W., Xue F., Luo Q., Zhu L., Qu G., Chen M., Schreiber L., Zhang D. (2015) Two ATP binding cassette G transporters, rice ATP Binding Cassette G26 and ATP Binding Cassette G15, collaboratively regulate rice male reproduction. *Plant Physiology*, 169(3), 2064-2079.

Zhao J., Yu N., Ju M., Fan B., Zhang Y., Zhu E., Zhang M., Zhang K. (2019) ABC transporter OsABCG18 controls the shootward transport of cytokinins and grain yield in rice. *Journal of Experimental Botany*, 70(21), 6277-6291.

Zhu J., Song N., Sun S., Yang W., Zhao H., Song W., Lai J. (2016) Efficiency and inheritance of targeted mutagenesis in maize using CRISPR-Cas9. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(1), 25–36.

Zpráva o celosvětové poptávce a dodávce obilnin organizace Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (vydána 8. 7. 2022): FAO Cereal Supply and Demand Brief. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>; Staženo 14.7. 2022).

Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406-15.