



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

mgr Yuliya Kloc
Autoreferat rozprawy doktorskiej

**Poznanie funkcji biologicznej genu *HvGSK*
jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Wacława Orczyka
Zakład Inżynierii Genetycznej
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Promotor pomocniczy:

Dr Marta Dmochowska-Boguta
Zakład Inżynierii Genetycznej
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Recenzenci:

Prof. dr hab. Marcin Filipecki
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii i Biotechnologii
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Prof. dr hab. Piotr Masojć
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Radzików, 2021



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania finansowane w ramach projektu **OPUS 7**

Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów GSK3 jęczmienia – kluczowych komponentów szlaku sygnałowego brassinosteroidów oraz tolerancji na stres suszy.

UMO-2014/13/B/NZ9/02381.

Badania współfinansowane w ramach projektu **PRELUDIUM 17**

Czy geny jęczmienia HvGSK1.1 i HvGSK1.2 biorą udział w tolerancji na zasolenie i regulacji cech warunkujących plon?

Kierownik projektu: mgr Yuliya Kloc

UMO-2019/33/N/NZ9/00880.

Część uzyskanych w trakcie realizacji pracy wyników została opublikowana:

Kloc Y, Dmochowska-Boguta M, Zielezinski A, Nadolska-Orczyk A, Karlowski WM, Orczyk W. 2020. Silencing of *HvGSK1.1-A* GSK3/SHAGGY-Like Kinase-Enhances Barley (*Hordeum vulgare* L.) Growth in Normal and in Salt Stress Conditions. *Int J Mol Sci* **21**.

STRESZCZENIE

Brasinosteroidy (BR) są ważną grupą roślinnych regulatorów biorących udział w regulacji różnorodnych procesów wzrostu i rozwoju oraz procesów warunkujących tolerancję roślin na czynniki środowiskowe. BR poprzez ścieżkę sygnałową regulują ekspresję tysięcy genów. Głównymi efektorami ścieżki sygnałowej BR są dwa czynniki transkrypcyjne: BZR1 i BES1 (BZR2).

Kinaza syntazy glikogenu3 (GSK3) jest wysoce konserwatywną kinazą serynowo-treoninową, obecną we wszystkich eukariontach. W roślinach GSK3 jest również określana jako GSK3/Shaggy-like kinase (GSK). Roślinne GSK są kodowane przez wielogenowe rodziny i pełnią funkcje kluczowych regulatorów szlaku sygnałowego zależnego od BR. Najważniejszą funkcją kinaz GSK w szlaku sygnałowym zależnym od BR jest fosforylacja i tym samym inaktywacja obydwu czynników transkrypcyjnych tej ścieżki tj. BZR1 i BES1. W konsekwencji, fosforylacja blokuje asocjację obydwu czynników transkrypcyjnych z DNA i tym samym negatywnie reguluje ekspresję genów zależnych od brasinosteroidów.

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) jest bardzo ważnym gatunkiem roślin zbożowych, czwartym po ryżu, pszenicy i kukurydzy pod względem areалу upraw, a jednocześnie jest to gatunek modelowy badań genetycznych zbóż klimatu umiarkowanego.

Formułując hipotezę badawczą założono, że rośliny jęczmienia zwyczajnego z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* będą charakteryzowały się wzmocnieniem ścieżki sygnałowej zależnej od BR oraz zmianami fenotypowymi takimi jak m.in. większa tolerancja na zasolenie, większa biomasa roślin i większe ziarniaki.

Oczekiwany zakres cech fenotypowych eksperymentalnych roślin jęczmienia wynika z danych literaturowych na temat genów biorących udział w transdukcji sygnałów zależnych od BR oraz zmian wywołanych egzogenną aplikacją tych hormonów. Gen *HvGSK1.1* był pierwszym genem z rodziny genów *GSK* w jęczmieniu zidentyfikowanym i sklonowanym w Zakładzie Inżynierii Genetycznej. Szczegółowa adnotacja tego genu jako *HvGSK1.1* została zaproponowana w publikacji (Groszyk, Yanushevskaya *in.*, 2018). Gen ten wybrano do badań ze względu na jego duże podobieństwo do *OsGSK1* – genu ryżu, którego mutacja typu nokaut warunkowała podwyższoną tolerancję na stresy środowiskowe. Do realizacji celu posłużono się dwoma strategiami. W pierwszej charakteryzowano rośliny, w których posługując się technologią RNAi wyciszono ekspresję badanego genu. W drugiej strategii badany gen poddano edytowaniu metodą CRISPR/Cas9.

Materiałem badawczym było 11 linii transgenicznych jęczmienia zwyczajnego wcześniej uzyskanych w zespole, z których 10 reprezentowało linie zawierające T-DNA z kasetą wyciszającą typu RNAi zintegrowane w pojedynczym locus genomu jęczmienia. W roślinach tych eksperymentalnie potwierdzono obecność krótkich (22–25 nt) cząsteczek RNA (siRNA), komplementarnych do wyciszanego genu *HvGSK1.1* oraz stwierdzono obniżoną ekspresję badanego genu w pokoleniu T₂. Konieczność homozygotyzacji tych linii oraz uzyskania odpowiedniej liczby nasion do kolejnych badań wymagało dwóch dalszych cykli generatywnych. Analiza ekspresji w homozygotach pokolenia T₄ wykazała obniżony poziom transkryptu *HvGSK1.1* w 7 liniach natomiast w 3 liniach poziom transkryptu był podobny do kontroli.

Zamierzone, eksperymentalne wyciszenie *HvGSK1.1* powodowało również zmiany ekspresji czterech paralogów *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1*. Wynik ten wykazał istnienie wzajemnie skorelowanej sieci regulacji *GSK* obserwowanej

w normalnych warunkach wzrostu oraz w stresie zasolenia. We wszystkich 7 liniach z wyciszoną ekspresją *HvGSI.1* zarówno w normalnych warunkach wzrostu, jak i w stresie zasolenia biomasa 14 dniowych siewek była większa w porównaniu z nietransgeniczną kontrolą. Ta cecha była silnie ujemnie skorelowana z ekspresją *HvGSK1.1* i z wybranymi paralogami *GSK*. Ponadto, w liniach z silnym wyciszeniem obserwowano silną ujemną korelację ekspresji genu *HvGSK1.1* z masą tysiąca ziarniaków (MTZ). Wyniki biotestu Leaf Inclination wskazały, że zgodnie z założeniem wyciszenie *HvGSK1.1* wiązało się ze wzmocnieniem reakcji na BR co interpretowano jako wzmocnienie sygnalingu zależnego od BR.

W kolejnym etapie uzyskano mutanty *HvGSK1.1* będące efektem edytowania tego genu przy użyciu technologii CRISPR/Cas9. Analizy molekularne roślin pokolenia T₀ i T₁ potwierdziły integrację T-DNA z kasetą sgRNA/Cas9 oraz potwierdziły obecność mutacji genu docelowego. Sekwencjonowanie NGS edytowanego regionu genu *HvGSK1.1* w 20 roślinach pokolenia T₁ wykazało szeroką gamę mutacji oraz dużą różnorodność genotypów. Zgodnie z oczekiwaniem zdecydowana większość mutacji (zmiana ramki odczytu, przedwczesny kodon stop i terminacja translacji) była typu knock-out. Zidentyfikowano dwa mutanty (del 6 nt i zamiana nukleotydów TCGA na CTAC) w których oczekiwaną zmianą jest niewielka zmiana sekwencji aminokwasów białka GSK, a nie całkowita inaktywacja genu. Oczekiwana zmiana sekwencji aminokwasów to w mutancie pierwszym delekcja dwóch aminokwasów, a w drugim zamiana Glu113-Leu114 na Ala113-Thr114.

Zarówno mutanty typu knock-out jak i mutanty ze zmienioną sekwencją aminokwasów kinazy GSK będą materiałem biologicznym do identyfikacji mutacji off-target i szczegółowej fenotypowej charakterystyki mutantów, porównania obydwu grup roślin (po wyciszeniu i po edytowaniu) oraz porównania obydwu strategii. Badania te są zaplanowane w projekcie Preludium 17.

WPROWADZENIE, CEL I HIPOTEZA BADAWCZA

Brasinosteroidy (BR) są grupą hormonów roślinnych biorących udział w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin oraz procesów reakcji roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki środowiskowe. Szczegółowe badania roślin modelowych pozwoliły poznać receptory brasinosteroidów oraz kolejne etapy szlaku transdukcji sygnałów zależnych od BR. Wykazano, że duża grupa genów oraz wiele procesów jest bezpośrednio regulowanych przez tę grupę hormonów. Wśród cech zależnych od BR są liczne cechy użytkowe roślin uprawnych w tym najważniejsze cechy plonotwórcze.

Kinaza syntazy glikogenu3 (GSK3) jest kluczowym komponentem szlaku transdukcji sygnałów zależnych od BR. Efektem jej aktywności jest fosforylacja, i tym samym inaktywacja, dwóch czynników transkrypcyjnych BZR1 i BES1 (BZR2), będących końcowymi efektorami ścieżki sygnałowej BR. Z tego względu GSK3 opisywana jest jako negatywny regulator ścieżki sygnałowej zależnej od BR. Wiele danych wskazuje, że zmienność tylko tego białka (tj. GSK3) może warunkować istotne i pożądane cechy użytkowe. Identyfikacja wielogenowych rodzin kodujących kinazę GSK3, poznanie wzorów ekspresji, wykazanie ewentualnej ko-regulacji oraz wskazanie cech warunkowanych przez te geny jest ważne poznawczo i nie mniej ważne dla potencjalnego wykorzystania w hodowli.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy badawczej oraz uzyskanie odpowiedzi na związane z hipotezą pytanie: Czy tolerancja na zasolenie oraz wybrane cechy użytkowe jęczmienia zwyczajnego są zależne od genu *HvGSK1.1* kodującego kinazę GSK3?

Hipoteza badawcza: Rośliny jęczmienia zwyczajnego z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* charakteryzują się wzmocnieniem ścieżki sygnałowej zależnej od BR oraz zmianami fenotypowymi takimi jak m.in. większa tolerancja na zasolenie, większa biomasa roślin i większe ziarniaki.

Oczekiwany zakres cech fenotypowych jęczmienia wynikał z danych literaturowych na temat genów biorących udział w transdukcji sygnałów zależnych od BR oraz zmian wywołanych egzogenną aplikacją tych hormonów. Realizacja celu badawczego oraz weryfikacja hipotezy wymagała wykorzystania dwóch technologii analizy funkcjonalnej tj. RNAi oraz CRISPR/Cas9. Zaadaptowany do tej pracy warsztat badawczy obejmował: i) molekularną i fenotypową analizę roślin z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* (RNAi) oraz ii) uzyskanie roślin po edytowaniu genu *HvGSK1.1* (CRISPR/Cas9) oraz pierwsze etapy analizy molekularnej.

MATERIAŁY I METODY

Material roślinny: (i) jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.), odmiana Golden Promise; (ii) transgeniczne linie jęczmienia odmiany Golden Promise pokolenia T₀, linie numer: #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #11 zawierające T-DNA z kasetą wyciszającą typu RNAi, uzyskane w Zakładzie Inżynierii Genetycznej.

Szczepy bakterii: (i) *Escherichia coli*, szczep DH5α oraz One Shot Mach1-T1^R – wykorzystano w trakcie konstruowania wektorów do systemu CRISPR/Cas9; (ii) *Agrobacterium tumefaciens* szczep AGL1 użyto do transformacji genetycznej niedojrzałych zarodków jęczmienia.

Plazmidy: plazmid pBract211_cmCas9-sgRNA otrzymano od zespołu Prof. A. Łyżnika z SGGW. Plazmid ten jest pochodną plazmidu pBract211-Cas GW (Gasparis *i in.*, 2018), w którym wykonano dwie modyfikacje umożliwiające klonowanie krótkich fragmentów DNA kodujących docelowe gRNA bezpośrednio do plazmidu pBract211_cmCas9-sgRNA.

Odczynniki: (i) media roślinne (pożywka Hoagland'a); (ii) media do roślinnych kultur *in vitro*; (iii) media do bakteryjnych kultur *in vitro*.

Startery do amplifikacji genów: wykorzystane w reakcjach PCR, RT-PCR, RT-qPCR. **Inne oligonukleotydy:** sekwencja oligonukleotydów cząsteczki guide RNA.

Metody badawcze:

1. Analiza molekularna roślin uzyskanych w wyniku transformacji genetycznej wektorem zawierającym kasetę wyciszającą typu RNAi – wykonano izolację genomowego DNA oraz identyfikację roślin posiadających wstawkę T-DNA przy użyciu metody PCR.
2. Identyfikacja roślin homozygotycznych w pokoleniu T₁ – wykonano izolację genomowego DNA oraz oznaczano liczbę kopii T-DNA w roślinach transgenicznych metodą RT-qPCR.
3. Analiza ekspresji genu *HvGSK1.1* w pokoleniu T₂ oraz analiza ekspresji *HvGSK1.1* i czterech paralogów w homozygotycznych roślinach pokolenia T₄ w warunkach kontrolnych oraz w warunkach stresu zasolenia – w tym celu z liści 14-dniowych siewek jęczmienia izolowano RNA, które oczyszczano z zanieczyszczeń DNA, syntetyzowano cDNA oraz wykonano pomiar ekspresji genów z wykorzystaniem metody RT-qPCR.

4. Detekcja krótkich interferujących RNA (siRNA) w pokoleniu T₂ – wykonano izolacje frakcji krótkich RNA (siRNA, *ang.* Small interfering RNA) z puli całkowitego RNA oraz wykonano detekcję krótkich interferujących RNA przy użyciu techniki hybrydyzacji Northern blot
5. Analiza fenotypowa homozygotycznych roślin transgenicznych pokolenia T₄ – wykonano pomiary biomasy 14 dniowych siewek jęczmienia uprawianych w warunkach kontrolnych (w pożywce Hoagland'a) oraz w stresie zasolenia (w pożywce Hoagland'a z dodatkiem 200 mM NaCl), w roślinach tych oznaczano również względną zawartość wody (RWC).
6. Adaptacja biotestu z pomiarem kąta nachylenia liści do półilościowej oceny aktywności brassinosteroidów w jęczmieniu – pomiary kątów nachylenia liści po traktowaniu 9-dniowych siewek odpowiednimi stężeniami 24-epibrasinolu i bikininy.
7. Fenotypowa analiza homozygotycznych linii transgenicznych uprawianych w warunkach fitotronowych – pomiary powierzchni liści flagowych oraz masy tysiąca ziaren (MTZ).
8. Analizy statystyczne - obliczano istotność statystyczną różnic przy użyciu testu ANOVA oraz testu NIR używanego jako test post-hoc (STATISTICA 10, StatSoft) lub przy użyciu testu t-studenta. Dla następujących grup danych: względna ekspresja analizowanych genów, biomasa siewek, względna zawartość wody oraz masa tysiąca ziaren obliczano współczynnik korelacji Pearsona.
9. Konstruowanie wektora CRISPR/Cas9 do ukierunkowanej mutagenyzy genu *HvGSK1.1* – projektowanie 20 nt cząsteczki gRNA (*ang.* guide RNA) używając oprogramowania: CRISPOR on-line tool, klonowanie dwuniciowego fragmentu DNA kodującego 20 nt gRNA do wektora pBract211_cmCas9-sgRNA. Weryfikacja uzyskanych konstruktów. Poprawną konstrukcję genetyczną wprowadzono do *Agrobacterium tumefaciens* szczepu AGL1.
10. Transformacja genetyczna niedojrzałych zarodków jęczmienia oraz regeneracja roślin w kulturach *in vitro*.
11. Analizy molekularne roślin T₀ uzyskanych w wyniku transformacji genetycznej wektorem do ukierunkowanej mutagenyzy *HvGSK1.1* – izolacja genomowego DNA oraz identyfikacja roślin posiadających wstawkę T-DNA przy użyciu PCR. Identyfikacja mutacji w genie *HvGSK1.1* – amplifikacji fragmentu genu docelowego (on-target site) genu *HvGSK1.1* przy użyciu PCR, analiza restrykcyjna amplikonów DNA przez Endonukleazę I z bakteriofaga T7 (T7EI) oraz enzym restrykcyjny *AluI*.
12. Analizy molekularne roślin T₁ po edytowaniu *HvGSK1.1*: a) weryfikacja obecności mutacji w regionie edytowanego genu – amplifikacja fragmentu genu docelowego przy użyciu PCR, analiza restrykcyjna amplikonów DNA przy użyciu Endonukleazy I z bakteriofaga T7 (T7EI), b) poznanie typów mutacji w analizowanych roślinach – amplifikacja edytowanego regionu DNA przy użyciu PCR, amplikony zawierające edytowany region genu *HvGSK1.1*, oflankowane sekwencjami adaptorowymi sekwencjonowano przy użyciu metody NGS w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, we Wrocławiu, c) wyniki sekwencjonowania analizowano na platformie: <https://usegalaxy.org/> oraz w programie IGV (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>).

WYNIKI I Dyskusja

Gen *HvGSK1.1* był pierwszym genem z rodziny genów *GSK* w jęczmieniu zwyczajnym zidentyfikowanym i sklonowanym w Zakładzie Inżynierii Genetycznej. Gen ten wybrano do analiz ze względu na jego duże podobieństwo do *OsGSK21* – genu ryżu, którego mutacja typu nokaut warunkowała podwyższoną tolerancję na stresy środowiskowe (Koh *i in.*, 2007).

Materiałem badawczym w niniejszej pracy było 14 linii jęczmienia zwyczajnego T₀ uzyskanych w wyniku transformacji genetycznej przy użyciu *Agrobacterium* wektorem binarnym pBract207 (Kloc *i in.*, 2020) zawierającym kasetę wyciszającą typu hpRNA. pBract207 jest to plazmid typu RNAi dedykowany do wyciszania ekspresji genów zbóż (Harwood, 2014; Harwood *i in.*, 2009). Kasetę wyciszającą zbudowaną jest z dwóch powtórzeń sekwencji wybranego fragmentu ORF genu *HvGSK1.1*, umieszczonych w orientacji 5'3'/intron/3'5' lub 3'5'/intron/5'3'. W wyniku transkrypcji kasety wyciszającej pod kontrolą zbożowego promotora Ubi, następuje synteza RNA o strukturze spinki (hpRNA, *ang. harpin RNA*), indukującą wyciszenie ekspresji genu *HvGSK1.1*. W roślinach weryfikowano obecność T-DNA. Z 14 badanych linii obecność T-DNA potwierdzono w 11 liniach, które oznaczono numerami od #1 do #11.

Drugą, istotną częścią pracy doktorskiej było uzyskanie materiału badawczego przy użyciu technologii CRISPR/Cas9 tj. roślin jęczmienia po edytowaniu genu *HvGSK1.1*. Pierwszy etap badań tj. analiza roślin pokolenie T₁ jest przedmiotem pracy doktorskiej. Pełna analiza roślin jest zaplanowana i będzie wykonana w realizowanym obecnie projekcie Preludium. Jej celem będzie poznanie funkcji edytowanego genu *HvGSK1.1* oraz szczegółowa charakterystyka i porównanie obydwu grup roślin (tj. tych po wyciszeniu i po edytowaniu *HvGSK1.1*), a także porównanie obydwu strategii.

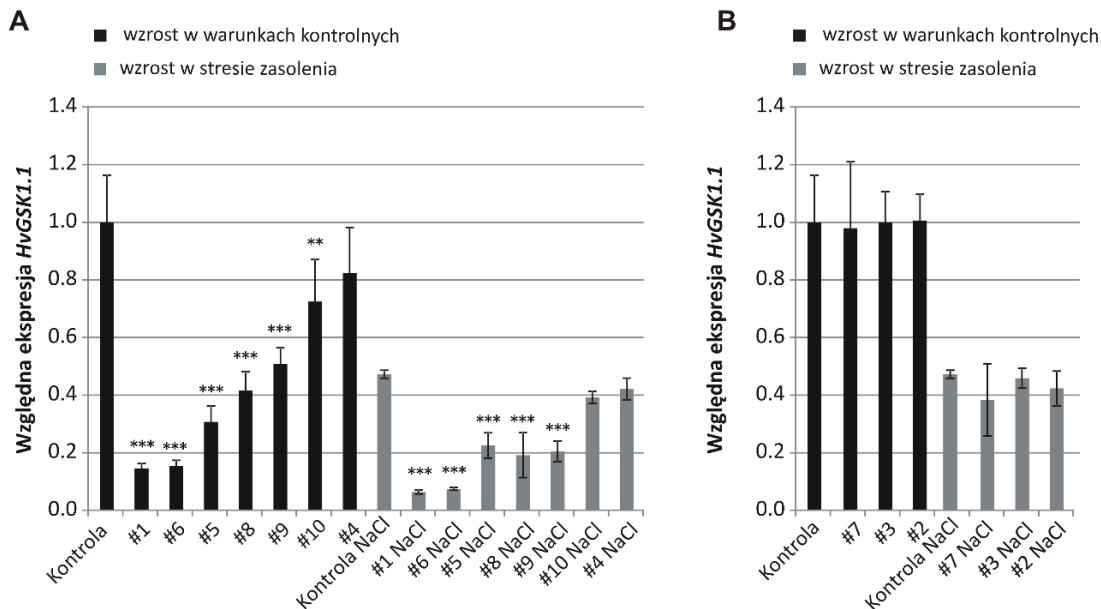
Charakterystyka roślin transgeniczných, w których posługując się technologią RNAi wyciszono ekspresję badanego genu *HvGSK1.1*.

W liniach roślin transgeniczných w pokoleniu T₁ (linie #1 - #11) oznaczano liczbę kopii zintegrowanego T-DNA oraz identyfikowano homozygoty i hemizygoty. W 10 liniach (#1 - #10) wykazano integrację T-DNA w pojedynczym locus. Tylko w jednej linii roślin (linii #11) wykazano integrację T-DNA w więcej niż pojedynczym locus. Stosunkowo wysoki udział linii z pojedynczą integracją uzyskany w naszej pracy jest korzystny biorąc pod uwagę oczekiwaną wyższą stabilność ekspresji transgeny w kolejnych pokoleniach. Jak stwierdzili Zalewski *i in.* (2012), jest to szczególnie ważne, gdy docelowy gen jest regulowany rozwojowo i bierze udział w regulacji hormonalnej. W każdej z analizowanych linii udało się zidentyfikować potencjalne rośliny homozygotyczne, posiadające T-DNA na dwóch chromosomach homologicznych oraz hemizygoty, posiadające T-DNA na jednym chromosomie. Rośliny homozygotyczne zostały przeznaczone do dalszych analiz molekularnych w pokoleniu T₂.

W wybranych liniach transgeniczných pokolenia T₂ wykonano detekcję krótkich interferujących RNA (siRNA, *ang. Small interfering RNA*), będących sygnałem wyciszania potranskrypcyjnego. Wyniki analizy Northern blot potwierdziły obecność krótkich (22–25 nt) cząsteczek RNA, komplementarnych do wyciszającego fragmentu genu docelowego. Cząsteczki te były niewykrywalne w nietransgeniczných roślinach kontrolnych. Obecność tej klasy krótkich cząsteczek RNA, komplementarnych do kasety wyciszającej, potwierdza syntezę transkryptu o strukturze hpRNA i jego przetwarzanie do siRNA. Wyniki te są spójne z obserwowanym obniżeniem ilości transkryptu genu docelowego.

Analiza ekspresji wyciszanego genu *HvGSK1.1* w 10 liniach roślin homozygotycznych pokolenia T₂ wykazała znaczne obniżenie ilości transkryptu tego genu. Poziom ekspresji wynosił od 0.1 do 0.6 we wszystkich liniach transgenicznych w porównaniu do nietransgenicznej kontroli. Rozmnożenie nasion niezbędnych do dalszych analiz eksperymentalnych i odpowiedniej liczby powtórzeń biologicznych wymagało dwóch dodatkowych pokoleń roślin uzyskanych po samozapyleniu homozygot dominujących.

W pokoleniu T₄ analizowano ekspresję genu *HvGSK1.1* oraz ekspresję 4 z 7 paralogów *HvGSK*: *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1*, reprezentujących każdą z czterech grup *GSK*. Ekspresję genów analizowano w 14-dniowych siewkach jęczmienia uprawianych w warunkach normalnych oraz w stresie zasolenia. Wyciszenie ekspresji genu docelowego *HvGSK1.1* utrzymało się w siedmiu liniach (Ryc. 1) Linie te reprezentowały gradient wyciszania ekspresji *HvGSK1.1* w zakresie od 0.15 do 0.82. Wyciszenie ekspresji *HvGSK1.1* było związane ze zmienioną ekspresją pozostałych analizowanych paralogów *GSK*. Wyciszenie *HvGSK1.1* i związany z nim zmodyfikowany profil ekspresji paralogów, wskazywał na sieć wzajemnie skorelowanych zmian występujących w obu testowanych warunkach wzrostu.



Ryc. 1. Względna ekspresja *HvGSK1.1* (HORVU3Hr1G034440.2) w liściach 14-dniowych siewek jęczmienia pokolenia T₄ w warunkach normalnych (pożywka Hoagland'a) i w stresie zasolenia (pożywka Hoagland'a z dodatkiem 200 mM NaCl). Względną ekspresję *HvGSK1.1* w liściach roślin kontrolnych uprawianych w warunkach normalnych przyjęto za równą 1.00. Jako gen referencyjny użyto ADP-rybosylasyon factor (ARF) AJ508228. W pokoleniu T₄ linii 1, 6, 5, 8, 9 i 10 obserwowano rośliny z wyciszeniem ekspresji *HvGSK1.1* (A). W pokoleniu T₄ linii 7, 3 i 2 obserwowano zniesienie wyciszenia *HvGSK1.1*. Dane przedstawiają wartości średnie z odchyleniem standardowym z co najmniej trzech powtórzeń biologicznych, każdą analizę wykonano w trzech powtórzeniach technicznych. Różnice istotne statystycznie pomiędzy kontrolną, a liniami transgenicznymi w tych samych warunkach doświadczalnych oznaczano na poziomie: *** p<0.001 i ** p<0.01.

[Uzupełnienie będące odpowiedzią na uwagę Recenzenta, Pana Prof. dr. hab. Marcina Filipeckiego.](#)

Analiza podobieństwa sekwencji kasety wyciszającej (dł. 263 pz) docelowego genu *HvGSK1.1* oraz sekwencji nukleotydowych czterech analizowanych paralogów *GSK* wykazała, że w regionie sekwencji kodującej najdłuższe identyczne fragmenty homologiczne z sekwencją wyciszającą miały długość: 12 nt (1) i 17 nt (1) w genie *HvGSK1.2*; 12 nt (1)

i 16 nt (1) w *HvGSK2.1*; 11 nt (1) i 14 nt (3) w *HvGSK3.1*; 11 nt (3), 12 nt (1) w *HvGSK4.1*. Analiza podobieństwa kasety wyciszającej z sekwencjami czterech paralogów *GSK* w regionach 5'UTR i 3'UTR wykazała, obecność identycznych sekwencji o maksymalnej długości: 5 nt (1) w 5'UTR oraz 6 nt (1) w 3'UTR w genie *HvGSK1.2*; oraz odpowiednio 6 nt (1) oraz 8 nt w *HvGSK2.1*; 9 nt (1) oraz 7 nt (1) w *HvGSK3.1*; oraz 7 nt (1) tylko w 5'UTR w genie *HvGSK4.1*. Podsumowując, regiony o identycznej sekwencji miały długość od 5 do 17 nt, liczba w nawiasach oznacza ile razy jest powtórzona dana sekwencja.

Udowodniono, że przy użyciu pojedynczej kasety wyciszającej możliwe jest jednoczesne wyciszenie wielu genów o dostatecznym podobieństwie sekwencji. Przykładowo w pracy Miki *i in.* (2005) analizowano wyciszenie siedmiu różnych genów z rodziny genów *osRac* u ryżu. Zastosowanie kasety wyciszającej z zakonserwowanym fragmentem genu *osRac1* lub *osRac5* spowodowało wyciszenie ekspresji, pozostałych genów *osRac*. Geny te zawierały fragmenty o identycznej sekwencji o długości od 21 nt do 49 nt.

Nie można wykluczyć niespecyficznego wyciszenia ekspresji paralogów. W literaturze zjawisko to określane jest to jako „off-target gene silencing” (Jackson *i in.*, 2003, Lin *i in.*, 2005). Uważa się jednak, że fragment specyficznie wyciszający dany gen musi być identyczny z transkryptem na odcinku minimum 21 nt, ponieważ takiej długości są najkrótsze cząsteczki siRNA.

Wyniki badań na komórkach ludzkich wykazały, że w niektórych przypadkach nie jest konieczna stuprocentowa zgodność całej, 21-nukleotydowej sekwencji siRNA z docelowym mRNA. W badaniach czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α stwierdzono niespecyficzne wyciszenie genów przez cząsteczki siRNA zawierające 7-nukleotydowy motyw wspólny dla wyciszanych genów, przy czym motyw ten występował w 3'UTR w wielokrotnych powtórzeniach (Lin *i in.*, 2005). W przypadku sekwencji kodujących, częściowa zgodność siRNA o długości 15 nt, a nawet 11 nt była wystarczająca do uruchomienia niespecyficznego wyciszenia genów w komórkach ludzkich (Jackson *i in.*, 2003).

W przypadku paralogów *GSK*, sekwencje identyczne z kasetą wyciszającą dłuższe lub równe 7 nt (7-9 nt) były obecne w 3'UTR i 5'UTR. Natomiast najdłuższe odcinki identyczne z kasetą wyciszającą w sekwencji kodującej były: 11 - 16 nt, i tylko w jednym genie (*HvGSK1.2*) 17 nt. Sekwencje te występowały najczęściej w pojedynczych powtórzeniach.

Jeżeli fragmenty te znalazłyby się w obrębie wyciętych cząsteczek siRNA to, zgodnie z wynikami uzyskanymi na komórkach ludzkich, istnieje możliwość jednoczesnego wyciszenia wszystkich czterech paralogów przez te siRNA.

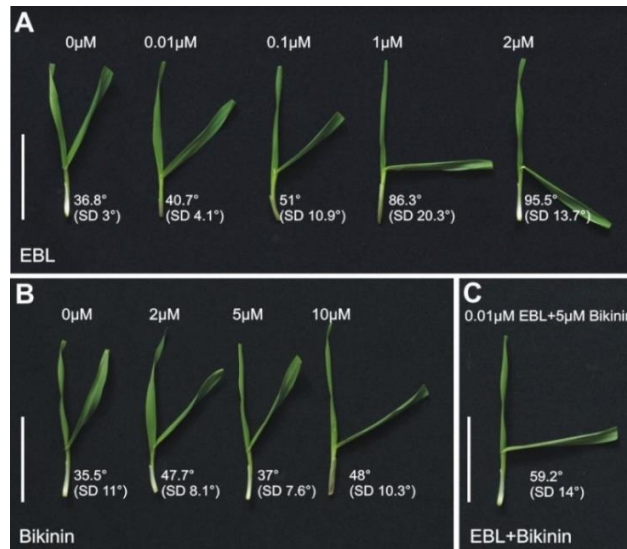
Należy zaznaczyć, że dotąd nie zaobserwowano u roślin wyciszenia typu off-target indukowanego przez fragmenty identyczne, krótsze od 21 nt.

Niski poziom podobieństwa nukleotydów między kasetą wyciszającą, a paralogami wykluczył wyciszenie krzyżowe jako proces odpowiedzialny za ko-regulację. Być może, ta sieć korelacji, która została dodatkowo wzmocniona przez stres solny, wskazuje na natywny mechanizm regulacji genów z rodziny *GSK*.

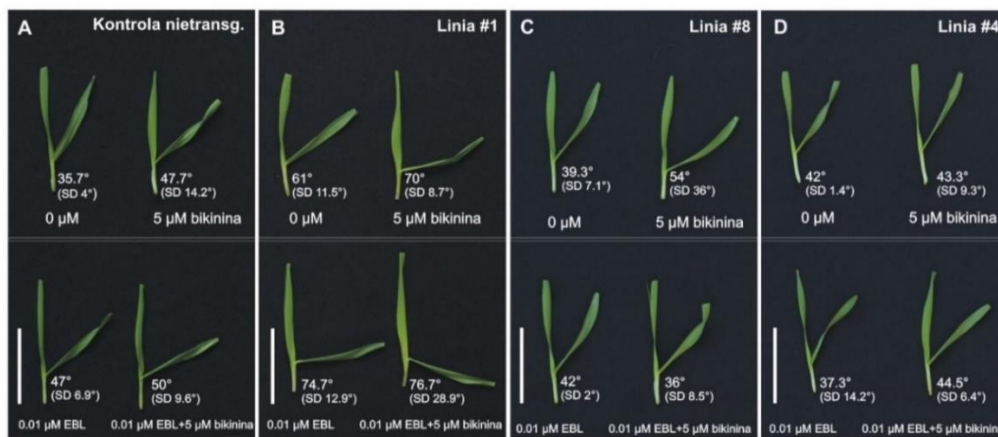
Chociaż w tym momencie brak bezpośrednich danych eksperymentalnych, które wyjaśniałyby ten proces uważamy, że wzór miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne (TFBS) znalezione w regionach promotorowych genów wskazuje na możliwość występowania takiego mechanizmu. Jak wykazaliśmy wcześniej, regiony promotorowe badanych *GSK* jęczmienia zawierały wiele miejsc wiązania BZR1 i BZR2 – dwóch zależnych od BR czynników transkrypcyjnych (Kloc *i in.*, 2020). Czynniki te poprzez fosforylację ulegają inaktywacji zależnej od *GSK* (Wang *i in.*, 2012; Zhu *i in.*, 2013). To połączenie

elementów regulacji pozytywnej i negatywnej wskazuje na możliwy mechanizm sprzężenia zwrotnego koordynującego ekspresję genów *GSK*. Założenie, że istnieje sieć wzajemnej współregulacji genów *GSK* jest spójne z: (i) obecnością miejsc wiążących BZR1/BZR2 w regionach promotorowych *OsSK11* i *OsGSK1*, dwóch ortologów ryżu genu *HvGSK1.1* oraz (ii) dużą liczbą TFBS w regionach promotorowych wybranych genów *GSK* jęczmienia, ryżu i *Arabidopsis* (Kloc *i in.*, 2020). Obserwacje te są zgodne z rozległą i silną korelacją genów *GSK* występującą w narządach generatywnych jęczmienia (Groszyk, Yanushevskaya *i in.*, 2018) oraz z wynikami immunoprecypitacji chromatyny pokazującymi, że w *Arabidopsis* geny *GSK* (*AtSK12*, *AtSK13*, *AtSK21* i *AtSK41*) oraz geny kodujące BZR2 są celami czynnika transkrypcyjnego BZR1 (Sun *i in.*, 2010). Obecność TFBS swoistych dla regulacji zależnej od BR w *Arabidopsis* potwierdza złożoną sieć koregulacji tej grupy genów. Wyniki pokazujące skoordynowaną regulację *GSK* w jęczmieniu dostarczają nowych danych na temat mechanizmów homeostazy BR u roślin. Podobne dane, dotyczące wyciszenia genu *TaCKX1* w oparciu o strategię RNAi i związaną z tym współregulację paralogów *CKX*, zostały opisane przez Jabłońskiego *i in.* (2020). Autorzy wykazali, że różne poziomy wyciszenia ekspresji genu docelowego były związane z różnymi modelami ko-ekspresji z innymi genami *TaCKX* i parametrami cech związanych z plonem.

Bikinina jest cząsteczką hamującą specyficznie aktywność kinazy GSK3. W *Arabidopsis thaliana*, 7 z 10 *AtGSK* było wyraźnie hamowanych przez ten związek, co korelowało ze wzmocnieniem sygnalizacji zależnej od BR (De Rybel *i in.*, 2009; Rozhon, 2014). Postawiliśmy hipotezę, że wyciszenie genu *HvGSK1.1* powinno wzmocnić odpowiedź zależną od BR i naśladować efekt traktowania bikiuiną. Aby to zweryfikować, zaadaptowaliśmy procedurę biotestu kątów nachylenia liści siewek jęczmienia na podstawie oryginalnego testu opracowanego dla ryżu (Wada *i in.*, 1984; Yamamuro *i in.*, 2000). Test dostosowany do jęczmienia wykazał, że wyższe stężenia EBL i bikiuiny były związane z większymi kątami nachylenia blaszek liściowych. Biorąc pod uwagę tę funkcję, bikiuinę można uznać za fizjologiczny odpowiednik wyciszenia genów kodujących *GSK*. Efekt ten był wyraźnie widoczny we fragmentach siewek traktowanych testowanymi stężeniami EBL i bikiuiny (Ryc. 2 A, B). Jednoczesne traktowanie EBL i bikiuiną wykazało silniejszy efekt niż wpływ każdego ze związków zastosowanych oddzielnie (Ryc. 2 C). Zmiany obserwowane po traktowaniu EBL i bikiuiną w liściach nietransgenicznej kontroli i trzech linii #1, #8 i #4 wskazują, że wyciszenie *HvGSK1.1* wzmocniło reakcję egzogenne podanego EBL w podobny sposób, jak egzogenne traktowanie bikiuiną (Ryc. 3). Na podstawie tych wyników doszliśmy do wniosku, że wyciszenie *HvGSK1.1* wzmocniło sygnalizację zależną od BR w roślinach. Ostateczny efekt był wynikiem eksperymentalnego wyciszenia *HvGSK1.1* i był skorelowany z ko-regulacją innych paralogów *GSK*. Zgadza się to z odkryciami wskazującymi, że bikiuina hamująca aktywność *GSK* działa jako aktywator sygnalizacji BR i naśladuje efekt egzogennej aplikacji BR (De Rybel *i in.*, 2009). Zaproponowane przez nas podejście wykazało, że zarówno wyciszenie genu *HvGSK1.1* oraz skorelowana z nim ko-regulacja ekspresji paralogów *GSK* wzmocniły sygnalizację zależną od BR i w ten sposób promowały pewne cechy regulowane przez BR.



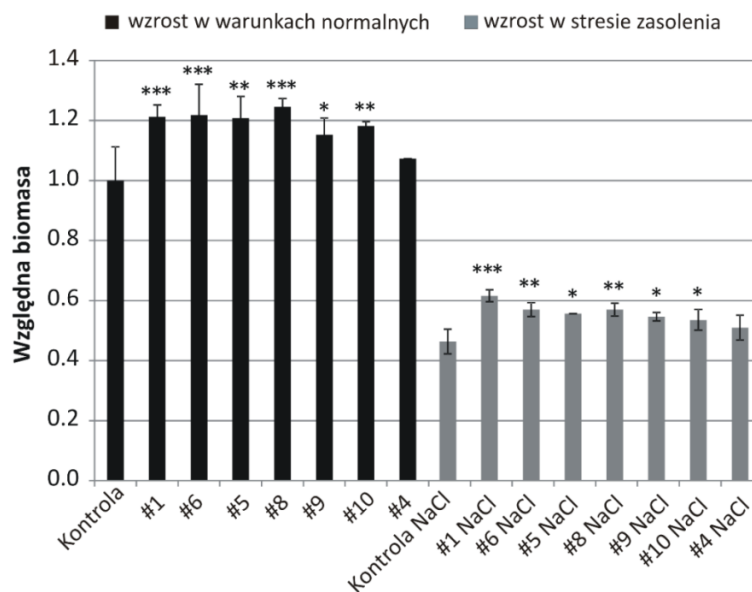
Ryc. 2. Zdjęcie przedstawiające reprezentatywne fragmenty nietransgeniczných siewek jęczmienia odmiany Golden Promise traktowanych: (A) roztworem 24-epibrasinolidu (EBL) w stężeniach 0 μM (kontrola), 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM i 2 μM, (B) roztworem bikinin w stężeniach: 0 μM (kontrola), 2 μM, 5 μM i 10 μM oraz (C) roztworem zawierającym EBL 0.01 μM i 5 μM bikininę. Opisano średni kąt nachylenia liścia wraz z odchyleniem standardowym dla każdej próby. Pasek skali reprezentuje 5 cm.



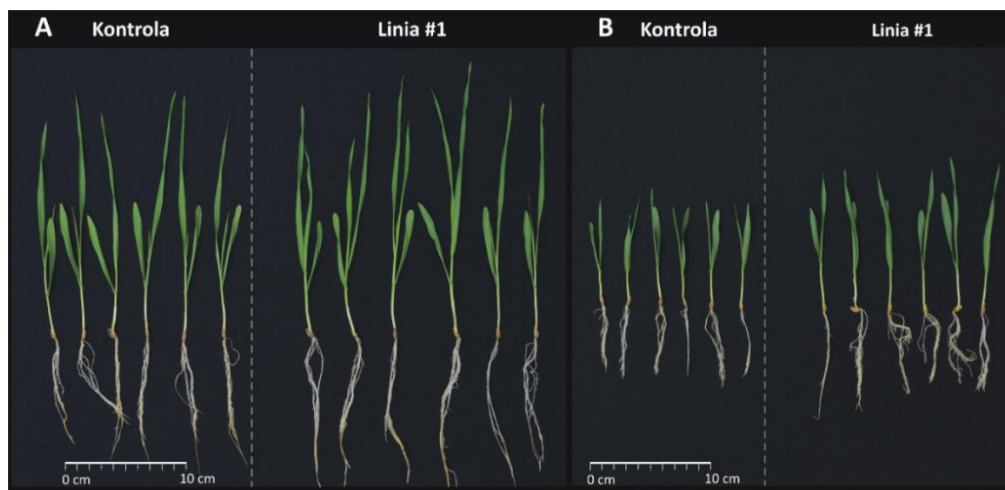
Ryc. 3. Zdjęcia fragmentów siewek reprezentatywnych dla każdej próby poddanej inkubacji w wodzie (0 μM), w roztworze bikinin 5 μM, roztworze 24-epibrasinolidu (EBL) 0.01 μM oraz w roztworze bikinin 5 μM i EBL 0.01 mM. Na zdjęciu podano średnie kąty nachylenia blaszki liściowej i wartości odchylenia standardowego (SD) tego pomiaru, wykonanego dla co najmniej pięciu roślin w każdej z testowanych grup roślin. (A) Rośliny kontrolne (nietransgeniczne). (B) Rośliny linii #1 z silnym wyciszeniem *HvGSK1.1*. (C) Rośliny linii #8 ze średnim wyciszeniem *HvGSK1.1*. (D) Rośliny linii #4 ze słabym wyciszeniem *HvGSK1.1*. Pasek skali reprezentuje 5 cm.

Najbardziej godną uwagi cechą wszystkich linii transgeniczných, uprawianych w warunkach normalnych i w warunkach stresu solnego, była większa biomasa siewek w porównaniu z kontrolą nietransgeniczną (Ryc. 4 i Ryc. 5). Cecha ta wykazała silną ujemną korelację z ekspresją *HvGSK1.1* i paralogów *GSK*. Analogiczne obserwacje uzyskano dla ryżu, gdzie zaobserwowano większą masę roślin rosnących w warunkach normalnych oraz w warunkach stresu solnego po traktowaniu EBL (Anuradha i Ram Rao, 2003). Podobne wyniki pobudzania wzrostu i łagodzenia stresu solnego przez egzogenną aplikację EBL zostały także przedstawione w kilku innych badaniach (Bajguz i Hayat, 2009; Sharma *in.*, 2013; Vriet *in.*, 2012). Zdaniem Perez-Perez *in.* (2002) obserwowane efekty fenotypowe egzogennej aplikacji BR mogą angażować ścieżki sygnałowe zależne od auksyn. Zwiększony przyrost biomasy jęczmienia obserwowany po wyciszeniu *HvGSK1.1* jest również zgodny

z wynikami Wang *i in.* (2019). W pracy tej wykazano, że *PeGSK1* działa jako negatywny regulator wzrostu komórek w innym gatunku jednoliściennych - bambusie Moso, który jest jedną z najszybciej rosnących roślin.



Ryc. 4. Względna biomasa nietransgenicznej kontroli i roślin transgenicznych pokolenia T₄ uprawianych w warunkach normalnych (pożywka Hoagland'a) oraz w warunkach stresu zasolenia (pożywka Hoagland'a z dodatkiem 200 mM NaCl). Średnią biomasę siewek roślin kontrolnych rosnących w warunkach normalnych przyjęto za 1.00. Dane przedstawiają wartości średnie i odchylenie standardowe co najmniej z trzech roślin, stanowiących powtórzenia biologiczne. Istotności statystyczne między kontrolą a badanymi liniami transgenicznymi uprawianymi w tych samych warunkach oznaczano: *** p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.01 i * p ≤ 0.05.



Ryc. 5. Zdjęcie reprezentujące 14-dniowe siewki jęczmienia roślin kontrolnych oraz linii #1 (A) w warunkach normalnych (pożywka Hoagland'a) oraz (B) w warunkach stresu zasolenia (pożywka Hoagland'a z dodatkiem 200 mM NaCl). Pasek skali reprezentuje 10 cm.

Inną cechą związaną z eksperymentalnym wyciszeniem *HvGSK1.1* i skorelowaną z tym ko-regulacją paralogów *GSK* była zwiększona masa ziarniaków. MTZ była znacznie większa w liniach #1 i #6, w których obserwowano najsilniejsze wyciszenie *HvGSK1.1* oraz w linii #5 ze średnim wyciszeniem *HvGSK1.1*. Wartości MTZ wykazały silną ujemną korelację z ekspresją *HvGSK1.1* ($r = -0,82$), *HvGSK1.2* ($r = -0,87$) i *HvGSK3.1* ($r = -0,88$).

Ten zestaw wyników w pełni zgadza się z artykułami pokazującymi, że cechy związane z produktywnością są stymulowane przez BR i sygnalizację zależną od BR. Wśród opisywanych w literaturze zmian fenotypowych są: znacznie większa liczba nasion w mutancie ze wzmocnionym szlakiem sygnałowym BR (Huang *i in.*, 2013), mniejsze nasiona w mutantach z niedoborem BR oraz potwierdzenie, że wielkość, masa i kształt nasion w *Arabidopsis* były regulowane przez BR (Jiang *i in.*, 2013). Zgadza się to z odkryciem Che *i in.* (2015), w którym wykazano, że mutacja w locus *GL2* (*ang. grain-size-associated locus*) w ryżu aktywowała odpowiedzi zależne od BR i w konsekwencji zwiększała masę ziaren ryżu o 27%. W tej pracy wykazano również, że mutacja typu knock-out *GSK2* w ryżu powodowała znacznie większe ziarniaki. W innej pracy wykazano, że związane z membraną plazmatyczną białko *GW5* (*ang. grain width and weight 5*) oddziałuje z *OsGSK2* – ryżowym homologiem *BIN2*, hamując jego aktywność fosforylacyjną, i poprzez wzmocnienie sygnalingu BR, pozytywnie reguluje wielkość i masę ziaren w ryżu (Liu *i in.*, 2017). We wcześniejszej pracy Wu *i in.* (2008) zaobserwowali znacznie zwiększony plon i masę ziarna ryżu przy zwiększonej produkcji BRs. Wyciszenie ekspresji *HvGSK1.1* oraz skorelowana z nią cecha większej masy tysiąca ziaren w liniach transgenicznych są zgodne z wynikami uzyskanymi w pracy Zhu *i in.* (2015), w której wykazano, że rośliny ryżu z nadekspresją *OsBZR1* charakteryzowały się większymi ziarnami, większą masą tysiąca ziaren i większą liczbą kłosek na wiechę w porównaniu z typem dzikim.

Manipulowanie ekspresją genów regulowanych przez BR często powoduje fenotypy plejotropowe, takie jak zmiany kątów nachylenia liści (Mantilla Perez *i in.*, 2014; Sakamoto *i in.*, 2006; Tanaka *i in.*, 2009), wysokości roślin (Hirano *i in.*, 2017; Li *i in.*, 2013; Yamamoto *i in.*, 2000), architektury kwiatostanu (Li *i in.*, 2013; Liu *i in.*, 2007; Makarevitch *i in.*, 2012) lub biomasy roślin (Morinaka *i in.*, 2006; Sakamoto *i in.*, 2006; Tanaka *i in.*, 2009). Opisywane w niniejszej pracy rośliny transgeniczne linii #6 z silnym wyciszeniem ekspresji genu *HvGSK1.1* charakteryzowały się większym kątem nachylenia liści w porównaniu do kontroli. Średni kąt nachylenia liści w pędach głównych roślin w fazie krzewienia w linii #6 wynosił 84.3° (SD ±9.9°), a w kontroli 40.7° (SD ±5.7°). Cecha ta jest zgodna z wynikami opisanymi w pracy Sun *i in.* (2015), w której wykazano zależną od BR regulację kąta nachylenia liści w roślinach ryżu, poprzez modulowanie liczby komórek sklerenchymy odosiowej w stawach blaszki ryżowej. Rośliny linii #6 charakteryzowały się również większymi ziarnami oraz większą MTZ. W analizowanych liniach transgenicznych mierzono długość liści flagowych w pędach w fazie kłoszenia. Liście flagowe linii #6 były istotnie statystycznie dłuższe (17.5 cm (SD ±2.96)) w porównaniu do kontroli (10.26 cm (SD ±1.24)). Obserwacja ta jest zgodna z danymi literaturowymi wykazującymi, że czynniki transkrypcyjne *BZR1* i *BES1* bezpośrednio modulują transkrypcję wielu genów związanych z wydłużaniem komórek, takich jak *CESA*, *MYB30*, *IL11 / PRE1*, *IBH1*, *MDP40*, *MYBL2*, *AGB1* i *AIF2* (Li *i in.*, 2018). Charakterystyka linii jęczmienia z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* jest zgodna z oczekiwanymi fenotypami roślin o wzmocnionej sygnalizacji BR. Wyniki pokazują, że manipulacja genami kodującymi GSK dostarcza danych do badania ich funkcji biologicznych, a jednocześnie wskazuje na realną strategię generowania roślin o ulepszonych cechach rolniczych.

Edytowanie genomu w oparciu o system CRISPR/Cas9

Edytowanie genomu stało się potężnym narzędziem do badań funkcjonalnej genomiki roślin, umożliwiającym precyzyjne wprowadzanie mutacji w określonych regionach genomu. Zastosowanie endonukleazy Cas9 kierowanej przez RNA zaadaptowanej

z prokariotycznego mechanizmu immunologicznego opartego na CRISPR/Cas9 jest wysoce wydajnym systemem edycji genomu, który został z powodzeniem zastosowany w roślinach jęczmienia (Gasparis *i in.*, 2018; Gasparis *i in.*, 2019; Kapusi *i in.*, 2017; Lawrenson *i in.*, 2015). W niniejszej pracy zastosowaliśmy endonukleazę Cas9 kierowaną przez RNA do edytowania genomu roślin jęczmienia odmiany Golden Promise w celu uzyskania roślin z mutacjami genu *HvGSK1.1*.

Używany przez nas system Cas9 sterowany przez RNA do ukierunkowanej mutagenyzy genu *HvGSK1.1* został skonstruowany w oparciu o wektor binarny pBract211_cmCas9-sgRNA, który jest pochodną plazmidu pBract211-Cas GW (Gasparis *i in.*, 2018). Zaletą wektorów pBract jest ich optymalizacja pod kątem protokołów transformacji roślin jednoliściennych (Harwood *i in.*, 2009; Zalewski *i in.*, 2010). W naszym zespole, w Zakładzie Inżynierii Genetycznej oraz Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej opracowano technikę transformacji zbóż przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens*, szczep AGL1 (Bińka *i in.*, 2012; Gasparis *i in.*, 2008; Gasparis *i in.*, 2011; Jablonski *i in.*, 2020; Kloc *i in.*, 2020; Zalewski *i in.*, 2010).

W wyniku transformacji genetycznej niedojrzałych zarodków jęczmienia odmiany Golden Promise wektorem pBract211_cmCas9-sgRNA-gsk1.1 do ukierunkowanej mutagenyzy *HvGSK1.1* przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* szczep AGL1, uzyskano 57 roślin pochodzących z różnych zarodków somatycznych. Wydajność transformacji genetycznej wynosiła 3.17%. Obecność wstawki T-DNA potwierdzono w 50 z 57 uzyskanych roślin - wydajność selekcji wynosiła 87.72%. Wydajność transformacji wahająca się od 3% do 12% jest rutynowa dla transformacji przy użyciu *Agrobacterium*, roślin jęczmienia odmiany Golden Promise w naszym zespole (Zalewski *i in.*, 2012). Obecność mutacji w edytowanym regionie *HvGSK1.1* w transgenicznym roślinach pokolenia T₀, zawierających T-DNA potwierdzono w 29 badanych roślin (58%).

Dane literaturowe wskazują, że pierwsze próby edycji niektórych gatunków jednoliściennych opartej na Cas9 pod kontrolą RNA skutkowały znacznie niższymi częstościami mutacji, takimi jak 8% w ryżu (Shan *i in.*, 2013), 5.6% w pszenicy (Wang *i in.*, 2014) oraz wydajnościami do 23% w jęczmieniu (Lawrenson *i in.*, 2015). Obecnie po zoptymalizowaniu systemu Cas9 kierowanego przez RNA dla roślin jednoliściennych, wydajność mutacji wynosi od 60 do 100% w ryżu (Xie *i in.*, 2015; Zhou *i in.*, 2014), kukurydzy (Svitashev *i in.*, 2015; Xing *i in.*, 2014) i jęczmieniu (Gasparis *i in.*, 2018). Wykazano, że istotny wpływ na wydajność cięcia docelowego DNA przez Cas9/sgRNA ma procentowa zawartość GC w sekwencjach docelowych (Pan *i in.*, 2016). Zawartość GC w sekwencji docelowej genu *HvGSK1.1* wynosiła 55%, a wydajność mutacji w roślinach T₀ w edytowanym regionie *HvGSK1.1* wynosiła 58%.

Jęczmień zwyczajny jest gatunkiem diploidalnym, w którym po integracji systemu CRISPR/Cas9 do genomu, jedna lub obie kopie genu docelowego (na chromosomach homologicznych) mogą być mutowane przez Cas9. W efekcie można oczekiwać pięciu rodzajów genotypów w transgenicznym roślinach T₀: mutantów homozygot, mutantów biallelicznych, heterozygot, chimer i roślin typu dzikiego (wt). W 29 roślinach T₀, w których potwierdzono obecność mutacji zidentyfikowano 5 roślin potencjalnie homozygotycznych (17.24%), 14 roślin heterozygotycznych (48.28%) oraz 10 roślin (34.49%), wśród których były potencjalne rośliny bialleliczne bądź chimeralne.

Odnosząc się do całkowitej liczby transgenicznych roślin T₀ (50 roślin), obecność potencjalnych homozygot stwierdzono w 10% (5/50) roślin, heterozygoty były w 28%

(14/50), a roślin biallelicznych i/lub chimer w 20% (10/50). W 42% (21/50) roślin nie stwierdzono mutacji genu docelowego. Wyniki te są zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Zhang *i in.* (2014), w których wykazano, że 10.5% analizowanych roślin ryżu T₀ to były homozygoty, 15.8% to były potencjalne rośliny bialleliczne, 21% to były heterozygoty, najczęściej było roślin chimer 40.4%, natomiast 12% to były rośliny, nie zawierające mutacji.

Spośród 29 roślin transgenicznych pokolenia T₀, zawierających mutacje w edytowanym regionie *HvGSK1.1*, wybrano linię: #VIII.8, której potomstwo T₁ poddano analizie Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS). Celem była szczegółowa charakterystyka typów mutacji, które zostały indukowane w tej linii. Rośliny T₁ reprezentowały pokolenie segregujące. Obecność mutacji w genie *HvGSK1.1* obserwowano w 66 roślinach indywidualnych pochodzących z poszczególnych kłosów spośród 88 badanych (75%), (Tabela 10 Doktorat). Sekwencjonowanie NGS edytowanego regionu genu *HvGSK1.1* w 20 indywidualnych roślinach T₁ wykazało szeroką gamę mutacji oraz dużą różnorodność genotypów. Zgodnie z oczekiwaniem zdecydowana większość mutacji (zmiana ramki odczytu, przedwczesny kodon stop i terminacja translacji) była typu knock-out (Tabela 1, Ryc. 6). Zidentyfikowano dwa mutanty (delecja 6 nukleotydów i zamiana nukleotydów TCGA na CTAC) w których oczekiwane zmiany (delecja dwóch aminokwasów kodowanej kinazy GSK3 i zamianę dwóch aminokwasów Glu113-Leu114 na Ala113-Thr114) nie wiązały się z wyłączeniem genu.

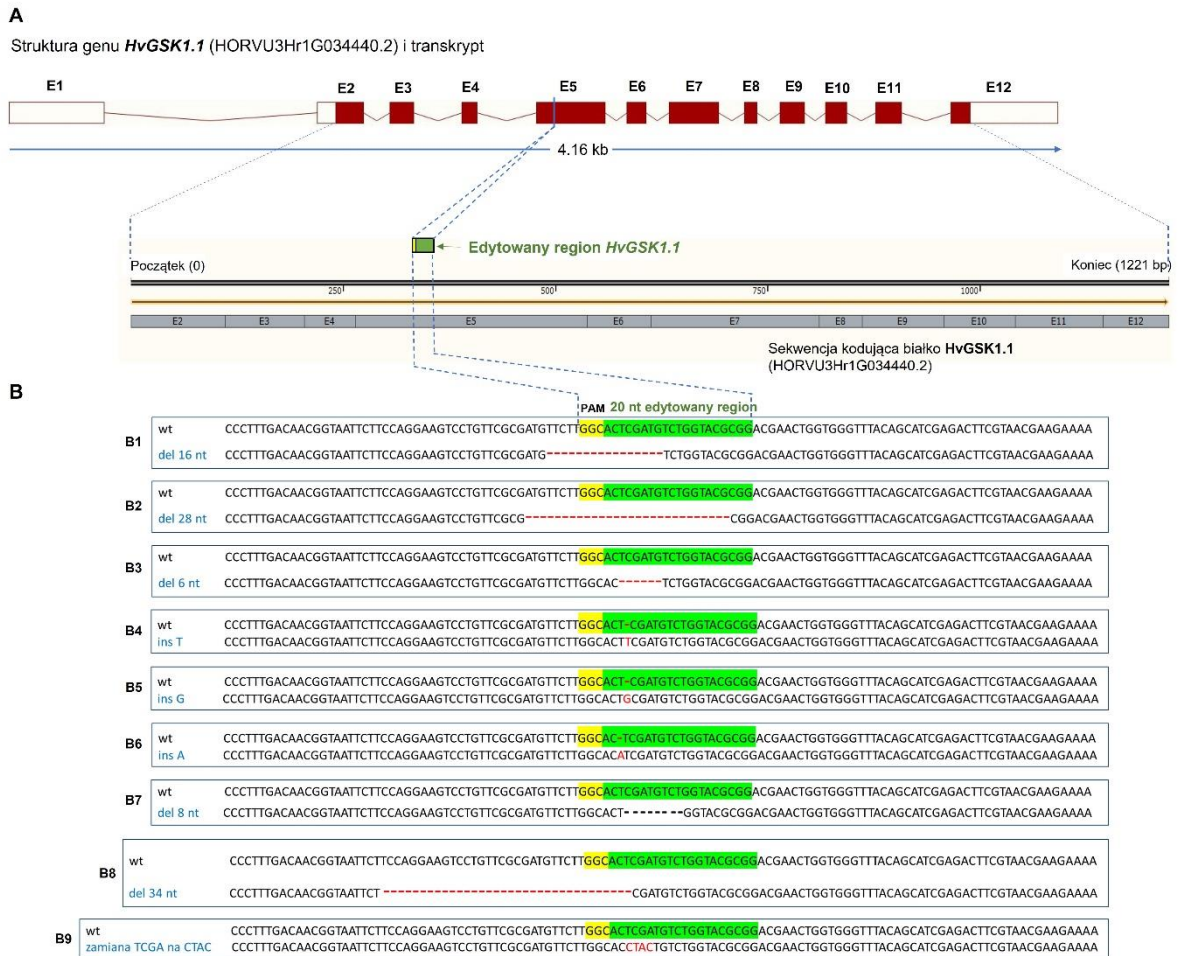
Nasze wyniki wskazują, że różne typy mutacji mogą być indukowane niezależnie w komórkach tkanek somatycznych (tj. w komórkach liścia) i komórkach somatycznych linii generatywnej. Zakładamy, że mutacja homozygotyczna typu delecja 6 nt (100%) obserwowana we wszystkich roślinach T₁ pochodzących z kłosa 22 (Tabela 1) zaszła w komórkach somatycznych linii generatywnej i w trakcie podziałów mitotycznych w procesie somatycznego crossing-over powstała linia komórek homozygotycznych, z której w toku dalszego rozwoju powstał jednorodny genetycznie kłos. Ten kierunek wnioskowania jest wzmocniony heterogennością genotypów pozostałych roślin T₁. Rośliny te uzyskane z poszczególnych kłosów były heterozygotami, zawierającymi gen docelowy typu dzikiego oraz różne mutacje tego genu, ponadto były to rośliny bialleliczne bądź chimeralne. Obecność większej liczby typów mutacji może również świadczyć o tym, że nukleaza Cas9 kierowana przez sgRNA może tolerować niedopasowania między kierującym RNA, a docelowym DNA. W konsekwencji niewielka pierwotna zmiana w docelowym locus może w dalszym ciągu wykazywać powinowactwo do sgRNA i tym samym może być dalej mutowana. Takie przypuszczenie jest zgodne z wynikami Hsu *i in.* (2013), którzy wykazali, że SpCas9 tolerował niedopasowania między kierującym RNA, a docelowym DNA w różnych pozycjach, w sposób zależny od sekwencji i był wrażliwy na liczbę, pozycję i rozkład niedopasowań.

Tabela 1. Analiza NGS (Next Generation Sequencing) i charakterystyka typów mutacji w edytowanym regionie *HvGSK1.1* w roślinach pokolenia T₁ linii #VIII.8.

Zmiana ramki odczytu – prawie zawsze powoduje przedwczesny kodon STOP i przedwczesną terminację translacji. Zamiana TCGA na CTAC powoduje zamianę dwóch aminokwasów Glu113-Leu114 na Ala113-Thr114, bez zmiany ramki odczytu. del 6 jest delecją 6 nukleotydów i delecją dwóch aminokwasów Leu114 i Gln115, bez zmiany ramki odczytu.

Linia #VIII.8 gsk1.1			
Nr kłosa (T0)	Roślina (T1)	Typy mutacji w edytowanym regionie	Zmiany spowodowane zajęciem mutacji w edytowanym regionie
Kłos 2	#VIII.8_T1_5	<i>ins T (64%), del 16 nt (22%) oraz * del 14 nt, del 8 nt, del 4 nt</i>	<i>ins T</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
	#VIII.8_T1_13	<i>brak, del 16 nt (8%), zamiana CTAC oraz * ins T, del 6 nt, del 8 nt, del 14 nt</i>	<i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>zamiana TCGA na CTAC</i> - zamiana <i>Glu113-Leu114</i> na <i>Ala113-Thr114</i> , bez zmiany ramki odczytu
	#VIII.8_T1_14	<i>del 28 nt (100%)</i>	<i>del 28</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 4	#VIII.8_T1_19	<i>brak, ins G (21%), del 16 nt (47%) oraz * del 2 nt, del 5 nt, del 6 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
	#VIII.8_T1_21	<i>brak, del 16 nt (57%) oraz * ins G, del 8 nt, del 6 nt, del 5 nt, del 4 nt, del 12 nt</i>	<i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 6	#VIII.8_T1_29	<i>brak, ins G (15%), del 16 nt (30%) oraz * del 29 nt, del 24 nt, del 11 nt, del 1 nt, del 2 nt, del 8 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
	#VIII.8_T1_38	<i>brak, ins G (10%), del 16 nt (12%) oraz * del 7 nt, del 6 nt, del 4 nt, del 2 nt, del 20 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 5	#VIII.8_T1_44	<i>ins G (9%), del 16 nt (43%) oraz * del 8 nt, del 6 nt, del 5 nt, del 4 nt, del 1 nt, del 10 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 9	#VIII.8_T1_52	<i>ins G (18%), del 16 nt (33%) oraz * del 8 nt, del 34 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
	#VIII.8_T1_58	<i>ins G (68%), del 16 nt (28%), del 34 nt (9%)</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 34</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 18	#VIII.8_T1_59	<i>brak, ins G (19%), del 16 nt (31%) oraz * del 24 nt, del 6 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 20	#VIII.8_T1_76	<i>brak, ins G (10%), del 16 nt (7%), del 8 nt (31%) oraz * del 1 nt</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 8</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
	#VIII.8_T1_77	<i>brak, ins G (17%), del 16 nt (8%), del 8 nt (36%), del 24 nt (9%), del 6 nt (30%)</i>	<i>ins G</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 8</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 24</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu
Kłos 21	#VIII.8_T1_80	<i>brak, ins A (68%), del 16 nt (30%) oraz * del 8 nt</i>	<i>ins A</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop <i>del 16</i> - zmiana ramki odczytu i kodon stop
Kłos 22	#VIII.8_T1_81	<i>del 6 nt (100%)</i>	<i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu
	#VIII.8_T1_82	<i>del 6 nt (100%)</i>	<i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu
	#VIII.8_T1_83	<i>del 6 nt (100%)</i>	<i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu
	#VIII.8_T1_84	<i>del 6 nt (100%)</i>	<i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu
	#VIII.8_T1_85	<i>del 6 nt (100%)</i>	<i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu
	#VIII.8_T1_86	<i>del 6 nt (100%)</i>	<i>del 6</i> - delecja Leu114 i Gln115 bez zmiany ramki odczytu

* Mutacje rzadko reprezentowane w odczytach NGS



Ryc. 6. Schemat edytowanego regionu *HvGSK1.1* z sekwencją nukleotydową edytowanego regionu w indywidualnych roślinach T₁ linii #VIII.8 (A). Każda ze zmienionych sekwencji zidentyfikowana w indywidualnych roślinach T₁ jest zestawiona z sekwencją nukleotydową typu dzikiego (wt) (B). Zaznaczono strukturę genu *HvGSK1.1*, długość transkryptu, sekwencję kodującą białko oraz lokalizację sekwencji docelowej (zielone podświetlenie) i sekwencji PAM (żółte podświetlenie). Przedstawiono sekwencję nukleotydową regionu docelowego i PAM oraz regionów flankujących w genomie niezmienionym (wt) oraz w genomie roślin po edytowaniu (B1-B9). Przedstawiono mutacje najczęściej reprezentowane w analizowanych roślinach T₁. Z 9 mutacji tylko mutacje B3 i B9 nie są mutacjami typu knock-out. Mutacja B3 jest delecją 6 nukleotydów i przewidywaną delecją 2 aminokwasów: Leu114 i Gln115 (Tabela 11). Mutacja B9 jest zamianą TCGA na CTAC i przewidywaną zamianą dwóch aminokwasów Glu113-Leu114 na Ala113-Thr114 (Tabela 1).

Bezpośrednim efektem tego etapu pracy jest kolekcja roślin jęczmienia, zawierających mutacje w genie *HvGSK1.1*. Do dalszych etapów wybrane będą rośliny homozygotyczne pod względem określonego typu mutacji oraz jednocześnie segreganty niezawierające T-DNA z kasetą CRISPR/Cas9. Wykonane będą szczegółowe analizy cech fenotypowych oraz analizy molekularne. Sprawdzone będą potencjalne mutacje w miejscach nie docelowych (off-target) wstępnie zidentyfikowane w analizie *in silico*. Dla tak wybranych genotypów jednocześnie z najbardziej interesującymi użytkowo cechami fenotypowymi zostaną zaplanowane doświadczenia polowe po uprzednim uzyskaniu zgody na kontrolowane uwolnienie roślin genetycznie zmodyfikowanych. Zgoda ta będzie wymagana, mimo iż rośliny te nie będą zawierały T-DNA, ponieważ, w myśl dyrektywy

2001/18/WE (orzeczenie TSUE C-528/16, (25.07.2018)) całe potomstwo roślin GM jest uznawane za GMO.

Uzyskane wyniki wskazują, że wyciszenie genu *HvGSK1.1* kodującego kinazę GSK3 wzmacnia szlak sygnałowy zależny od BR, co było potwierdzone większym kątem nachylenia liści obserwowanym w bioteście oraz szeregiem zmian fenotypowych takich jak: większa tolerancja na zasolenie, większa biomasa roślin oraz większe ziarniaki. Zmiany te są spójne z danymi literaturowymi dotyczącymi genów biorących udział w zależnej od BR transdukcji sygnałów oraz zmian fenotypowych wywołanych egzogenną aplikacją tych hormonów.

Uzyskane wyniki pozwalają pozytywnie zweryfikować postawioną na wstępie hipotezę badawczą. Rośliny jęczmienia z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* charakteryzują się wzmocnieniem ścieżki sygnałowej zależnej od BR oraz zmianami fenotypowymi takimi jak m.in. zwiększona tolerancja na zasolenie, większa biomasa roślin i większe ziarniaki. Wyniki te wskazują, że zmienność genu *HvGSK1.1* uzyskana metodami eksperymentalnymi i prawdopodobnie również zmienność naturalna, może być źródłem ważnych cech agronomicznych i użytkowych.

Wyniki drugiej części pracy dotyczącej edytowania *HvGSK1.1* potwierdzają dużą skuteczność tej metody. Szczegółowe analizy molekularne i fenotypowe mutantów, zaplanowane w dalszych etapach projektu Preludium, pozwolą porównać zarówno obydwie grupy roślin jak i obydwie strategie.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Zastosowana procedura transformacji jęczmienia zwyczajnego z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens* i kasety typu RNAi pozwoliła uzyskać rośliny, w których T-DNA zostało zintegrowane głównie w pojedynczym locus genomu.
2. Silne wyciszenie docelowego genu *HvGSK1.1* było obserwowane we wszystkich liniach transgenicznych w pokoleniu T₂.
3. Obecność małych RNA komplementarnych do fragmentu genu docelowego jest zgodna z obserwowanym wyciszeniem *HvGSK1.1*.
4. W homozygotycznych roślinach pokolenia T₄ wyciszenie genu docelowego obserwowano w 7 liniach, natomiast w pozostałych 3 obserwowano zanik wyciszenia.
5. Wyciszenie genu docelowego korelowało ze zmianą ekspresji paralogów tego genu zarówno w normalnych warunkach wzrostu jak i w stresie zasolenia.
6. Niski poziom podobieństwa kasety wyciszającej i paralogów wykluczał wyciszenie krzyżowe jako proces odpowiedzialny za ko-regulację.
7. Obserwowana ko-regulacja paralogów *HvGSK*, obecność miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych zależnych od BR w regionach promotorowych tych genów oraz dane literaturowe pozwalają założyć istnienie odrębnego mechanizmu ko-regulującego ekspresję genów rodziny *GSK*.
8. Wyciszenie *HvGSK1.1* powoduje wzmocnienie ścieżki sygnałowej zależnej od BR.
9. Wyciszenie *HvGSK1.1* i wzmocnienie szlaku sygnałowego zależnego od BR warunkowało: i) większą biomasę roślin w normalnych warunkach wzrostu i w stresie zasolenia, ii) większą masę tysiąca ziarniaków, iii) większy kąt nachylenia liści i iv) dłuższe liście flagowe w porównaniu do kontroli.
10. Technologia CRISPR/Cas9, zaadaptowana do jęczmienia, pozwala skutecznie i z dużą wydajnością generować mutacje w zdefiniowanym regionie badanego genu.

11. W grupie tak uzyskanych mutacji dominuje typ knock-out. Ponadto, są obserwowane zmiany 2-3 kodonów i tym samym aminokwasów kodowanej kinazy.
12. Edytowanie genomu przy użyciu CRISPR/Cas9 pozwala uzyskać mutanty homozygotyczne już w pierwszym pokoleniu po edytowaniu.
13. Profilowanie mutacji w pokoleniu T₀ wykazało obecność homozygot, heterozygot, roślin biallelicznych i chimeralnych.

Literatura

- Anuradha S, Ram Rao SS.** 2003. Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation* **40**, 29-32.
- Bajguz A, Hayat S.** 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem* **47**, 1-8.
- Bińska A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A.** 2012. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*x Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes. *J Appl Genet* **53**, 1-8.
- Che R, Tong H, Shi B, Liu Y, Fang S, Liu D, Xiao Y, Hu B, Liu L, Wang H, Zhao M, Chu C.** 2015. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature Plants* **2**, 15195.
- De Rybel B, Audenaert D, Vert G, Rozhon W, Mayerhofer J, Peelman F, Coutuer S, Denayer T, Jansen L, Nguyen L, Vanhoufte I, Beemster GTS, Vleminckx K, Jonak C, Chory J, Inze D, Russinova E, Beeckman T.** 2009. Chemical Inhibition of a Subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like Kinases Activates Brassinosteroid Signaling. *Chem Biol* **16**, 594-604.
- Gasparis S, Bregier C, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A.** 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of oat (*Avena sativa* L.) cultivars via immature embryo and leaf explants. *Plant Cell Rep* **27**, 1721-1729.
- Gasparis S, Kala M, Przyborowski M, Lyznik LA, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A.** 2018. A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Methods* **14**.
- Gasparis S, Orczyk W, Zalewski W, Nadolska-Orczyk A.** 2011. The RNA-mediated silencing of one of the *Pin* genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, and increases grain hardness. *J Exp Bot* **62**, 4025-4036.
- Gasparis S, Przyborowski M, Kala M, Nadolska-Orczyk A.** 2019. Knockout of the *HvCKX1* or *HvCKX3* Gene in Barley (*Hordeum vulgare* L.) by RNA-Guided Cas9 Nuclease Affects the Regulation of Cytokinin Metabolism and Root Morphology. *Cells* **8**, 782.
- Groszyk J, Yanushevska Y, Zielezinski A, Nadolska-Orczyk A, Karlowski WM, Orczyk W.** 2018. Annotation and profiling of barley *GLYCOGEN SYNTHASE3/Shaggy-like* genes indicated shift in organ-preferential expression. *PLoS One* **13**.
- Harwood WA.** 2014. A protocol for high-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Methods Mol Biol* **1099**, 251-260.
- Harwood WA, Bartlett JG, Alves SC, Perry M, Smedley MA, Leyland N, Snape JW.** 2009. Barley Transformation using *Agrobacterium*-Mediated Techniques *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*. **478**, 137-147.
- Hirano K, Kawamura M, Araki-Nakamura S, Fujimoto H, Ohmae-Shinohara K, Yamaguchi M, Fujii A, Sasaki H, Kasuga S, Sazuka T.** 2017. Sorghum DW1 positively regulates brassinosteroid signaling by inhibiting the nuclear localization of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2. *Scientific Reports* **7**, 126.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F.** 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* **31**, 827-832.
- Huang HY, Jiang WB, Hu YW, Wu P, Zhu JY, Liang WQ, Wang ZY, Lin WH.** 2013. BR signal influences *Arabidopsis* ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1. *Molecular Plant* **6**, 456-469.
- Jablonski B, Ogonowska H, Szala K, Bajguz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A.** 2020. Silencing of *TaCKX1* Mediates Expression of Other *TaCKX* Genes to Increase Yield Parameters in Wheat. *Int J Mol Sci* **21**.

- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS.** 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**, 635-637.
- Jiang WB, Huang HY, Hu YW, Zhu SW, Wang ZY, Lin WH.** 2013. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **162**, 1965-1977.
- Kapusi E, Corcuera-Gómez M, Melnik S, Stoger E.** 2017. Heritable Genomic Fragment Deletions and Small Indels in the Putative ENGase Gene Induced by CRISPR/Cas9 in Barley. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Kloc Y, Dmochowska-Boguta M, Zielezinski A, Nadolska-Orczyk A, Karlowski WM, Orczyk W.** 2020. Silencing of *HvGSK1.1-A* GSK3/SHAGGY-Like Kinase-Enhances Barley (*Hordeum vulgare* L.) Growth in Normal and in Salt Stress Conditions. *Int J Mol Sci* **21**.
- Koh S, Lee S-C, Kim M-K, Koh JH, Lee S, An G, Choe S, Kim S-R.** 2007. T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of *Arabidopsis* *BIN2*, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* **65**, 453-466.
- 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.
- Li H, Jiang L, Youn JH, Sun W, Cheng Z, Jin T, Ma X, Guo X, Wang J, Zhang X, Wu F, Wu C, Kim SK, Wan J.** 2013. A comprehensive genetic study reveals a crucial role of *CYP90D2/D2* in regulating plant architecture in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol* **200**, 1076-1088.
- Li QF, Lu J, Yu JW, Zhang CQ, He JX, Liu QQ.** 2018. The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* **1861**, 561-571.
- Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, Shen Y.** 2005. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* **33**, 4527-4535.
- Liu J, Chen J, Zheng X, Wu F, Lin Q, Heng Y, Tian P, Cheng Z, 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 T, Zhang J, Wang M, Wang Z, Li G, Qu L, Wang G.** 2007. Expression and functional analysis of *ZmDWF4*, an ortholog of *Arabidopsis* *DWF4* from maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* **26**, 2091-2099.
- Makarevitch I, Thompson A, Muehlbauer GJ, Springer NM.** 2012. *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. *PLoS One* **7**, e30798.
- Mantilla Perez MB, Zhao J, Yin Y, Hu J, Salas Fernandez MG.** 2014. Association mapping of brassinosteroid candidate genes and plant architecture in a diverse panel of *Sorghum bicolor*. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 2645-2662.
- Miki D, Itoh R, Shimamoto K.** 2005. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* **138**, 1903-1913.
- Morinaka Y, Sakamoto T, Inukai Y, Agetsuma M, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M.** 2006. Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiol* **141**, 924-931.
- Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L, Lu G.** 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports* **6**, 24765.
- Perez-Perez JM, Ponce MR, Micol JL.** 2002. The *UCU1 Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. *Developmental Biology* **242**, 161-173.
- Rozhon W, Wang W, Berthiller F, Mayerhofer J, Chen T, Petutschnig E, Sieberer T, Poppenberger B, Jonak C.** 2014. Bixin-like inhibitors targeting GSK3/Shaggy-like kinases: characterisation of novel compounds and elucidation of their catabolism *in planta*. *BMC Plant Biol* **14**, 172.
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata K, Takatsuto S, Yoshida S, Tanaka H, Kitano H, Matsuoka M.** 2006. Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol* **24**, 105-109.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu J-L, Gao C.** 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 686-688.
- Sharma I, Ching E, Saini S, Bhardwaj R, Pati PK.** 2013. Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1. *Plant Physiol Biochem* **69**, 17-26.

- Sun S, Chen D, Li X, Qiao S, Shi C, Li C, Shen H, Wang X.** 2015. Brassinosteroid signaling regulates leaf erectness in *Oryza sativa* via the control of a specific U-type cyclin and cell proliferation. *Dev Cell* **34**, 220-228.
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang WQ, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu SW, Oh E, Patil S, Kim TW, Ji HK, Wong WH, Rhee SY, Wang ZY.** 2010. Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **19**, 765-777.
- Svitashev S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM.** 2015. Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiol* **169**, 931-945.
- Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, Shimatani Z, Ohtake M, Nomura T, Jiang CJ, Dubouzet JG, Kikuchi S, Sekimoto H, Yokota T, Asami T, Kamakura T, Mori M.** 2009. *BRASSINOSTEROID UPREGULATED1*, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the lamina joint in rice. *Plant Physiol* **151**, 669-680.
- Vriet C, Russinova E, Reuzeau C.** 2012. Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* **24**, 842-857.
- Wada K, Marumo S, Abe H, Morishita T, Nakamura K, Uchiyama M, Mori M.** 1984. A Rice Lamina Inclination Test – A Micro-quantitative Bioassay for Brassinosteroids. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**, 719-726.
- Wang T, Li Q, Lou S, Yang Y, Peng L, Lin Z, Hu Q, Ma L.** 2019. GSK3/shaggy-like kinase 1 ubiquitously regulates cell growth from Arabidopsis to Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant Science* **283**, 290-300.
- 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. *Nat Biotechnol* **32**, 947-951.
- Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY.** 2012. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. In: Bassler BL, ed. *Annual Review of Genetics*, **46**. Palo Alto: Annual Reviews, 701-724.
- Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, Wang J, Wan J, Zhai H, Takatsuto S, Matsumoto S, Fujioka S, Feldmann KA, Pennell RI.** 2008. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell* **20**, 2130-2145.
- Xie K, Minkenberg B, Yang Y.** 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 3570-3575.
- Xing H-L, Dong L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Han C-Y, Liu B, Wang X-C, Chen Q-J.** 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol* **14**, 327.
- Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M.** 2000. Loss of Function of a Rice *brassinosteroid insensitive1* Homolog Prevents Internode Elongation and Bending of the Lamina Joint. *Plant Cell* **12**, 1591-1605.
- Zalewski W, Galuszka P, Gasparis S, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A.** 2010. Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *J Exp Bot* **61**, 1839-1851.
- Zalewski W, Orczyk W, Gasparis S, Nadolska-Orczyk A.** 2012. *HvCKX2* gene silencing by biolistic or Agrobacterium-mediated transformation in barley leads to different phenotypes. *BMC Plant Biol* **12**.
- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu J-K.** 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* **12**, 797-807.
- Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B.** 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research* **42**, 10903-10914.
- Zhu JY, Sae-Seaw J, Wang ZY.** 2013. Brassinosteroid signalling. *Development* **140**, 1615- 1620.
- Zhu X, Liang W, Cui X, Chen M, Yin C, Luo Z, Zhu J, Lucas WJ, Wang Z, Zhang D.** 2015. Brassinosteroids promote development of rice pollen grains and seeds by triggering expression of Carbon Starved Anther, a MYB domain protein. *Plant J* **82**, 570-581.