UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Identifikace a charakterizace mutantních rostlin v genu *LOX-1* u transgenního ječmene

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Petr Mazánek**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Tomáš Vlčko**

Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Mazánek
Název práce	Identifikace a charakterizace mutantních rostlin v genu *LOX-1* u transgenního ječmene
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Vlčko
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Lipoxygenasy jsou enzymatická rodina, která se vyskytuje v živočišné i rostlinné říši. Tyto enzymy katalyzují dioxygenaci polynenasycených mastných kyselin. V jarním ječmeni najdeme dvě lipoxygenasy – LOX-1 a LOX-2. Oba enzymy se liší ve svém účinku v tvorbě derivátů polynenasycených mastných kyselin. Dioxygenovány jsou primárně kyselina linolová a linolenová. Z jejich hydroperoxidů pak vznikají látky *trans*-2-nonenal (T2N) a trihydroxyoktadekenová kyselina (THOD), jenž mají negativní vliv na chuť a stabilitu pěny piva. Šlechtění odrůd se sníženou či nulovou lipoxygenasovou aktivitou je tedy velmi atraktivní z pohledu pivovarnického průmyslu. Cílem této práce bylo charakterizovat transgenní rostliny generace T1 jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise, u nichž je předpokládána mutace v genu *LOX-1*, která byla vyvolána pomocí technologie CRISPR/Cas9. Byl proveden PCR screening T1 generace a identifikovány transgenní rostliny nesoucí kazetu s sgRNA. Cílová sekvence v genu *LOX-1* byla amplifikována a charakterizována Sangerovým sekvenováním. Analýzou získaných sekvencí bylo zjištěno, že transgenní rostliny v T1 generaci nenesly mutaci v genu *LOX-1*.

Klíčová slova	lipoxygenasy, transformace, CRISPR/Cas9, sladovnictví
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Petr Mazánek
Title of thesis	Identification and characterization targeted mutant *LOX-1* in transgenic barley
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Tomáš Vlčko
The year of presentation	2020

Abstract

Lipoxygenases are an enzymatic family that occurs in both the animal and plant kingdoms. These enzymes catalyze the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids. In barley we can find two lipoxygenases – LOX-1 and LOX-2. Both enzymes differ in their effect in the formation of polyunsaturated fatty acid derivatives. Linoleic acid and linolenic acid are primarily dioxygenated. Their hydoperoxides then produce *trans*-2-nonenal (T2N) and trihydroxyoctadecenoic acid (THOD), which have a negative effect on the taste and stability of beer foam. Breeding varieties with reduced or no lipoxygenase activity is therefore very attractive from the perspective of the brewing industry. The aim of this study was to characterize transgenic plants of the T1 generation of barley (*Hordeum vulgare*) Golden Promise variety, which are expected to be mutated in the *LOX-1* gene, which was induced by CRISPR/Cas9 technology. PCR screening of T1 generation was performed and transgenic plants carrying the sgRNA cassette were identified. The target sequence in the LOX-1 gene was amplified and characterized by Sanger sequencing. Analysis of the obtained sequences showed that transgenic plants in the T1 generation did not carry a mutation in the LOX-1 gene.

Keywords	lipoxygenases, transformation, CRISPR/Cas9, malting
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

„Tímto bych chtěl poděkovat odbornému dozoru, doktorce Ludmile Ohnoutkové, a taktéž vedoucímu práce, Mgr. Tomáši Vlčkovi, za velmi profesionální a odborný přístup, kvalitní vedení v rámci celé bakalářské práce a zároveň přátelské prostředí.“

Obsah

Seznam zkratek 7
1 Úvod 8
2 Cíle práce 9
3 Současný stav řešené problematiky 10
3.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) 10
3.2 Lipoxygenasy 11
3.2.1 Charakteristika a funkce lipoxygenas 11
3.2.2 Lipoxygenasy ve sladovnictví ječmene 13
3.3 Transformace 15
3.3.1 Charakteristika 15
3.3.2 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens* 17
3.4 CRISPR/Cas9 22
3.4.1 Charakteristika a funkce 22
3.4.2 Využití CRISPR technologie 23
3.5 GMO legislativa v rámci Evropské Unie (EU) 25
3.5.1 GMO legislativa v ČR 25
4 Experimentální část 27
4.1 Materiál 27
4.2 Metody 29
4.2.1 Izolace genomové DNA z listů rostlin jarního ječmene 29
4.2.2 PCR screening rostlin T1 generace 29
4.2.3 Analýza PCR produktů 30
4.2.4 Izolace genomové DNA paramagnetickými částicemi 31
4.2.5 Příprava vzorků pro sekvenování 32
4.3 Výsledky 33
4.3.1 Ověření přítomnosti transgenu u charakterizovaných rostlin 33
Rostlina LOX-1 6 33
Rostlina LOX-1 8 a LOX-1 40-15 34
Rostlina LOX-1 42 34
Rostlina LOX-1 40-2 35
4.3.2 Amplifikace úseku obsahující gen *LOX-1* 35
4.3.3 Detekce mutace metodou sekvenování 36
4.4 Diskuze 40
5 Závěr 42
6 Literatura 43

Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
crRNA	CRISPR RNA
GM	geneticky modifikovaný
GMO	geneticky modifikovaný organismus
JK	jasmonová kyselina
LOXs	lipoxygenasy
LOX-1	lipoxygenasa-1
LOX-2	lipoxygenasa-2
PAM	protospacer adjacent motif
pre-crRNA	prekurzorová CRISPR RNA
T-DNA	transferred DNA
T2N	*trans*-2-nonenal
THOD	trihydroxyoktadekenová kyselina
Ti-plazmid	tumor inducing plazmid
tracrRNA	transaktivující CRISPR RNA
Vir	virulentní

1 Úvod

Lipoxygenasy jsou enzymatická rodina, která se vyskytuje v živočišné i rostlinné říši. Tyto enzymy katalyzují dioxygenaci polynenasycených mastných kyselin, které ve své struktuře obsahují aspoň jednu jednotku *cis,cis*-1,4,-pentadien. Produkty těchto reakcí jsou konjugované deriváty – hydroperoxidy mastných kyselin – ty jsou pak pomocí isomeras přeměňovány na organické karbonylové sloučeniny, ketony, kyseliny či vyšší alkoholy.

V jarním ječmeni najdeme dvě lipoxygenasy – LOX-1 a LOX-2. Oba enzymy se liší ve svém účinku v tvorbě derivátů polynenasycených mastných kyselin v pozici vznikající hydroperoxidové funkční skupiny v řetězci mastné kyseliny. Dioxygenovány jsou primárně kyselina linolová a linolenová. Z jejich hydroperoxidů pak vznikají látky *trans*-2-nonenal (T2N) a trihydroxyoktadekenová kyselina (THOD), jenž mají negativní vliv na chuť a stabilitu pěny piva. Šlechtění odrůd se sníženou či nulovou lipoxygenasovou aktivitou je tedy velmi atraktivní z pohledu pivovarnického průmyslu.

Mutací je dosaženo editováním genomu pomocí technologie CRISPR/Cas9, což jsou místně specificky programovatelné nukleasy, které jsou schopné tvořit dvouvláknové zlomy DNA na předdefinovaných pozicích v genomu. Mechanismus CRISPR byl objeven u bakterií a archeí jakožto adaptivní imunitní systém vůči DNA a RNA virům. Principem tohoto mechanismu při napadení virem je začlenění krátkých úseků DNA viru do genomu prokaryoty. Když je pak prokaryota napadena tímto virem znovu, vytváří tzv. crRNA, které jsou exprimovány právě ze začleněných úseků DNA. Následně je nukleo-proteinový komplex obsahující crRNA a nukleasu Cas naváděn na vlákno DNA viru na základě komplementarity a Cas pak virovou DNA štěpí.

2 Cíle práce

- Cílem práce bylo v části teoretické zpracovat literární rešerši na zadané téma.
- Cílem části praktické je charakterizace transgenních rostlin generace T1 jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise, u nichž je předpokládána mutace v genu *LOX-1*, která byla vyvolána pomocí technologie CRISPR/Cas9. Mutace a transgeny identifikovány pomocí molekulárních technik, PCR a sekvenování.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare*)

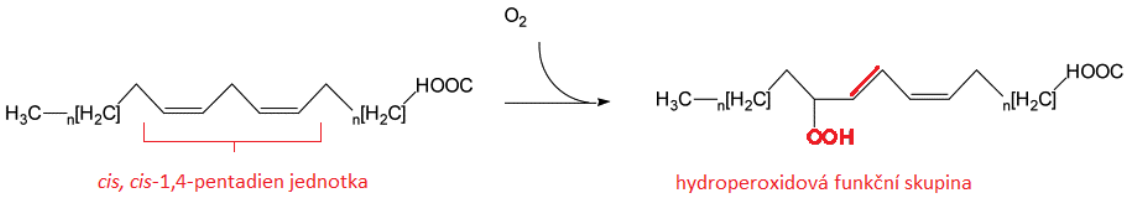
Ječmen jarní (*Hordeum vulgare*) je zástupcem čeledi Lipnicovitých a řadí se mezi diploidní organismy. Je to jednoděložná, krytosemenná, jednoletá rostlina. U ječmene rozlišujeme dvě varianty – ozimý a jarní. Hlavní rozdíl těchto dvou variant spočívá ve výnosu, kdy jarní ječmen má o 20-30 % nižší výnosy než ozimý ječmen (Špunar a kol., 2002). U této rostliny se nachází dutý stonek, který se nazývá stéblo. V raných fázích vegetativního růstu má výsostní postavení kořen hlavní, jeho funkci později přebírají kořeny postranní a hlavní kořen zaniká. Květenství je u ječmene klas a plod obilka. Ječmen spadá mezi obilniny, tedy mezi jedny z nejdůležitějších a hospodářsky velmi významných plodin na světě. Výživově bohaté obilky se již po tisíciletí využívají jako zdroj potravy lidí, krmivo pro zvířectvo a v neposlední řadě v pivovarství, konkrétně sladovnictví (Dyson, 1999; Glombik, 2015).

Se šlechtěním ječmene za účelem vytvoření odolnějších (abiotický a biotický stres) a výnosnějších odrůd se začalo již ve 20. století. Jednou z odrůd je Golden Promise, jenž byla vytvořena vědci ve Velké Británii v druhé polovině 50. let minulého století. Golden Promise byla získána z odrůdy Maythorpe za užití účinků gama záření. Nově vytvořená odrůda přinesla unikátní kombinaci žádaných zemědělských vlastností – rychlý růst a celkově rychlý vývoj, krátká a tuhá stébla, značná odolnost vůči vytřípání klasů a semen a kvalitní slad. Nevýhodou této odrůdy však byla náchylnost k napadení padlí ječmene (*Erisiphe graminis* sp. *Hordei*). Nicméně tento problém byl vyřešen díky užívání ochranných chemických prostředků (Forster, 2001; Glombik, 2015). Pro účely biotechnologií je tato odrůda využívána od 90. let minulého století. Vhodný pro transformaci je Golden Promise zejména díky vlastnosti snadno tvořit kalusy a snadno regenerovat rostliny (Lemaux a kol., 1999).

3.2 Lipoxygenasy

3.2.1 Charakteristika a funkce lipoxygenas

Lipoxygenasy (LOXs) jsou rodina enzymů – bílkoviny s katalytickou aktivitou – (LOXs; EC 1.13.11.12) vyskytující se jak u rostlin, tak i živočichů. Tato enzymatická rodina zahrnuje železo-kompatibilní dioxygenasy katalyzující dioxygenaci (hydroperoxidaci) polynenasycených mastných kyselin (Andreou a Feussner, 2009; Feussner a Wasternack, 2002; Porta a Rocha-Sosa, 2002). Oxygenace probíhá u nenasycených mastných kyselin s jednou či více *cis,cis*-1,4-pentadien jednotkami, jejímž výsledkem je produkce konjugovaných derivátů – hydroperoxidy mastných kyselin (Obr. 1) (Andreou a Feussner, 2009; Feussner a Wasternack, 2002; Foster a Caradonna, 2003; Harwood, 1997; Porta a Rocha-Sosa, 2002). Vlivem příslušných isomeras a lyas jsou tyto reaktivní deriváty dále metabolizovány na soubor organických karbonylových sloučenin, ketonů, kyselin či vyšších alkoholů (Vanko a kol., 2007).

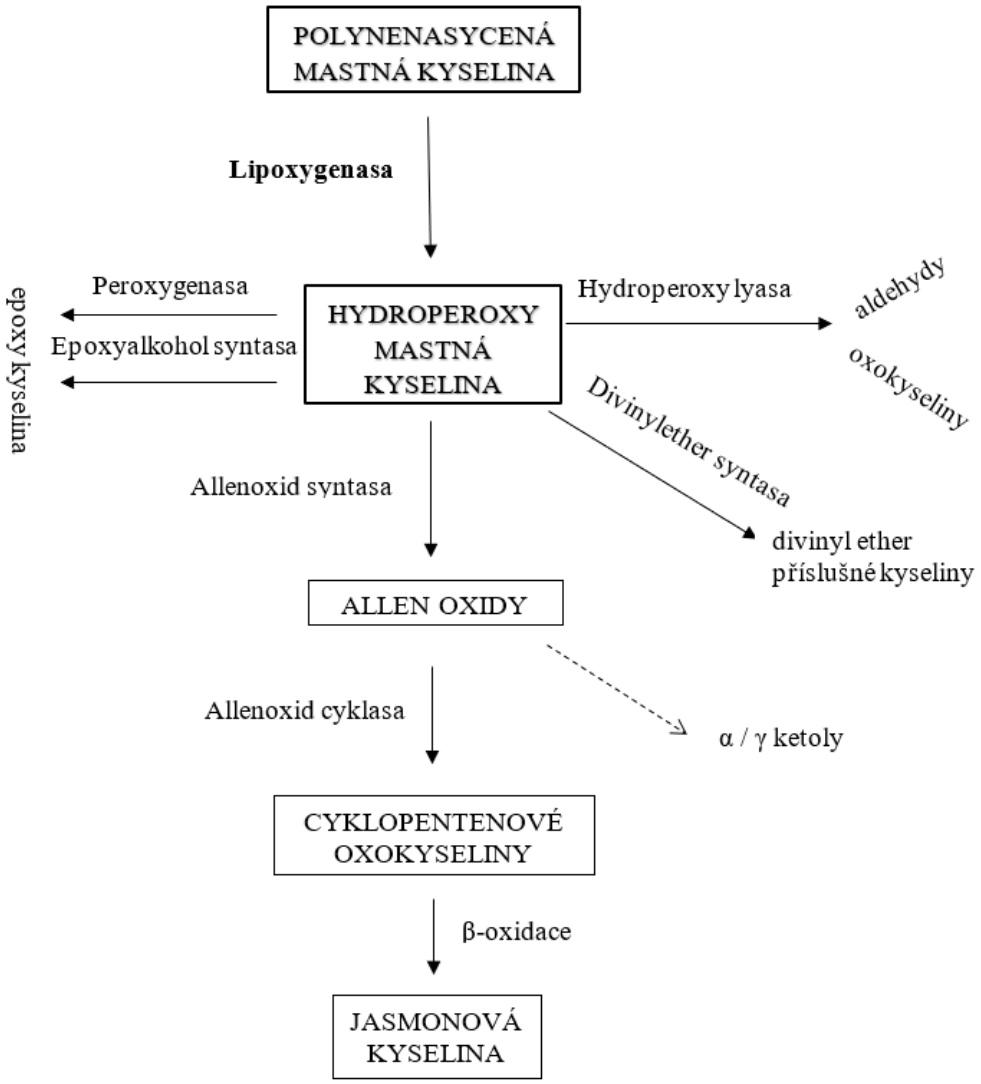


Obrázek 1. Reakční schéma lipoxygenasové dioxygenace (převzato a upraveno z Foster a Caradonna, 2003)

U rostlinných LOXs se jedná o dioxygenaci především kyseliny linolové, linolenové a α-linolenové, kdy většina LOXs katalyzuje oxidaci těchto kyselin na polohách C-9 nebo C-13 uhlovodíkového řetězce, přičemž výsledkem tohoto procesu je vznik 9-hydroperoxidů či 13-hydroperoxidů. Tyto hydroperoxidy dále spouštějí přinejmenším šest enzymatických drah, které jsou pojmenovány dle příslušných bílkovin s katalytickou aktivitou (Andreou a Feussner, 2009; Feussner a Wasternack, 2002; Porta a Rocha-Sosa, 2002; Savchenko a kol., 2014). Prvním krokem spuštění kaskády větvících se reakcí enzymů je oxidace kyseliny linolové. Vlivem aktivity této kaskády dochází, mimojiné, k syntéze tzv. oxylipinů, tedy bioaktivních sloučenin. Oxylipiny jsou participovány v obranných reakcích, kdy je rostlina vystavena abiotickému a biotickému stresu (Göbel a kol., 2001; Maccarrone

a kol., 2001; Mosblech a kol., 2009; Santino a kol., 2013; Savchenko a kol., 2014; Taki a kol., 2005; Vellosillo a kol., 2007; Wasternack a Hause, 2013).

Biosyntetická dráha LOXs (Obr. 2) obsahuje několik paralelních větví – nejméně šest pojmenovaných dle daných enzymů v těchto drahách. Např. to jsou allenoxid cyklasa (AOC), hydroperoxid lyasa (HPL) či peroxygenasa. Z primárních produktů aktivity LOXs, tedy hydroperoxidů nenasycených mastných kyselin, postupně dále vznikají lipoxiny a hepoxiliny.



Obrázek 2. Schéma biosyntetické dráhy LOX

Oxylipiny vznikající větvícími reakcemi podmiňují syntézu proteinů, enzymů (např. glutation-S-transferasa), a také rostlinných antibiotik (fenylpropan fytoalexiny) (Fukuda a kol., 1997), které se účastní eliminace pro rostlinu toxických sloučenin při napadení patogenem (Fukuda a kol., 1997; Feussner a Wasternack, 2002; Porta

a Rocha-Sosa, 2002; Savchenko a kol., 2014). Mezi význačné produkty těchto drah patří např. monomerní složky pro heteropolymerní kutin, který tvoří hlavní složku ochranného obalu nadzemních částí rostlin. Dalším důležitým produktem je kyselina jasmonová (JK), která je produktem AOC cesty (Feussner a Wasternack, 2002; Porta a Rocha-Sosa, 2002; Santino a kol., 2013; Savchenko a kol., 2014). JK, respektive jasmonáty, se řadí do rodiny oxylipinů (Delporte a kol., 2011). Jasmonáty hrají důležitou roli např. při regulaci klíčení semen, stárnutí semen, syntéze ethylenu atd. V reakcích na biotický a abiotický stres rostlina využívá různých signálních systémů. Součástí těchto signálních drah je právě i JK, která se svojí činností podílí na přenosu signálu jako reakce na tyto stresy a zároveň spolu s ethylenem zprostředkovávají systémovou odpověď (Babenko a kol., 2015; Ballaré, 2011; Piotrowska a Bajguz, 2011; Van der Ent a kol., 2009; Wasternack a Hause, 2013).

V důsledku účinků biotického a abiotického stresu rostlina zapojuje komplexní obranné systémy. Pro aplikaci co nejlepší a nejefektivnější odpovědi rostliny na daný stres se vždy spouští jen určité obranné systémy. Ty se spouští na základě daných faktorů jako typ patogenu a abiotického stresu. Signální molekuly v těchto drahách se vzájemně neovlivňují, nebo naopak spolu interagují jako synergisté či antagonisté (Savchenko a kol., 2014; Lorenzo a Solano, 2005). Zvýšení aktivity LOXs nastává např. v důsledku poškození mechanickými ranami (Fabbri a kol., 2000), hypertermie (Kosakivska a kol., 2012; Kosakivska a kol., 2014; Babenko a kol., 2014), hypotermie (Kopich a kol., 2010), vlivem ozonu či infekcí patogenem (Maccarrone a kol., 2001) a reakce na účinky elicitorů – sloučeniny schopné stimulovat uvnitř buněčného organismu tvorbu jiné sloučeniny (Chandra a kol., 1996).

3.2.2 Lipoxygenasy ve sladovnictví ječmene

U ječmene se vyskytují dvě lipoxygenasy, a to konkrétně LOX-1 a LOX-2 (Hämäläinen, 1995). Bylo dokázáno, že zvýšení aktivity LOXs, a především exprese genů *LOX-1*, je úzce spjato s rostlinným hormonem kyselinou abscisovou. Z velké části při stresu z mechanického poškození (Peña-Cortés a kol., 1995). Naopak exprese genů *LOX-2* je kyselinou abscisovou potlačována (Babenko a kol., 2017). Obě lipoxygenasy vykazují zvýšenou aktivitu ve fázi klíčení zrn (Baxter, 1982) –

ve sladovnictví tzv. rozluštění. Enzym LOX-1 je biologicky aktivní již od fáze máčení, která předchází samotnému klíčení. Ovšem během fáze klíčení oproti fázi máčení aktivita LOX-1 znatelně vzrůstá. LOX-2 započíná svoji aktivitu oproti LOX-1 až s nástupem fáze samotného klíčení (Yang a Schwarz, 1995). LOX-1 katalyzuje primárně oxidaci linolové kyseliny (taktéž linolenové) za vzniku (10*E*,12*Z*)-9-hydroperoxyoktadeka-10,12-dienové kyseliny → 9-hydroperoxid. Isoenzym LOX-2 má obdobné účinky a primárně produkuje kyseliny s hydroperoxidovou funkční skupinou na C-13 (Hämäläinen, 1995; Yang a kol., 1993), které jsou dále metabolizovány na hexanal, jehož chuťový práh[1] je cca 0.4 ppm (Yang a kol., 1993). Z 9-hydroperoxidů mastných kyselin se pak utvářejí *trans*-2-nonenal (T2N) a trihydroxyoktadekenová kyselina (THOD) (Kuroda a kol., 2003; Skadhauge a kol., 2011). Zkoumáním těchto látek bylo zjištěno, že tyto sloučeniny jsou faktory mající negativní vliv na kvalitu piva. T2N má hlavní podíl na „kartónově-papírové“ pachuti u staršího piva. Látka THOD negativně ovlivňuje stabilitu pěny a chuť piva. Při pokusech, kdy byl pro přípravu piva využit slad z ječmene, jenž měl sníženou lipoxygenasovou aktivitu a prokazatelně nižší koncentrace T2N a THOD, bylo dosaženo výsledků vyšší míry čerstvosti a taktéž pozitivního vlivu na stabilitu pěny piva oproti pivu připraveného ze sladu s normální aktivitou LOXs (Hirota a kol., 2006; Yu a kol., 2014). Tento fakt je samozřejmě velmi atraktivní z pohledu pivovarnického průmyslu, pro který by byly tyto kultivary, ať už s nízkou, nebo ještě lépe nulovou lipoxygenasovou aktivitou, velmi zajímavé.

[1] Minimální koncentrace, při které lze vnímat citlivost chuti na konkrétní látku či jídlo

3.3 Transformace

3.3.1 Charakteristika

Transformace je proces zakomponování DNA z jednoho organismu do genomu dalšího organismu. Byla objevena roku 1928 u bakterie *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928). U přírodních bakteriálních populací dochází k zakomponování molekul DNA z okolního prostředí, kdy tyto molekuly pochází zejména z odumřelých mikroorganismů, které uvolnily svůj obsah do okolí (Trevors, 1999). Nevýhoda takovéhoto způsobu výměny genetického materiálu však může tkvět ve vystavení tzv. holé DNA (bez vázaných chromosomálních proteinů) vlivu extracelulárního prostředí, v němž se nachází řada enzymů (např. nukleas) a dalších látek, které poškozují genetickou informaci. Taková DNA je v tomto prostředí stabilizována např. vazbou na částice písku, kdy genetická informace navázaná v takovémto komplexu vykazuje vyšší odolnost vůči štěpícím enzymům než DNA volně se nacházející v prostředí (Lorenz a kol., 1981). Možnost užití jakékoli holé DNA, a ne pouze z totožného bakteriálního druhu, se hojně uplatňuje v laboratorní praxi, kdy k začlenění DNA do zájmového organismu se využívá převážně bakteriálních plasmidových vektorů (Alberts, Bray a kol., 1998). Bakterie, které jsou schopny přijmout cizorodou DNA a skrze buněčnou membránu ji transportovat do svého vnitřního prostředí, nazýváme jako kompetentní. Kompetentní mohou být bakterie přirozeně, kdy tuto schopnost nabývají během pozdní fáze růstového cyklu (Stewart a Carlson, 1986; Trevors, 1999), či se dá kompetence indukovat např. chemickými metodami, elektroporačními metodami a teplotním šokem (Davison, 1999).

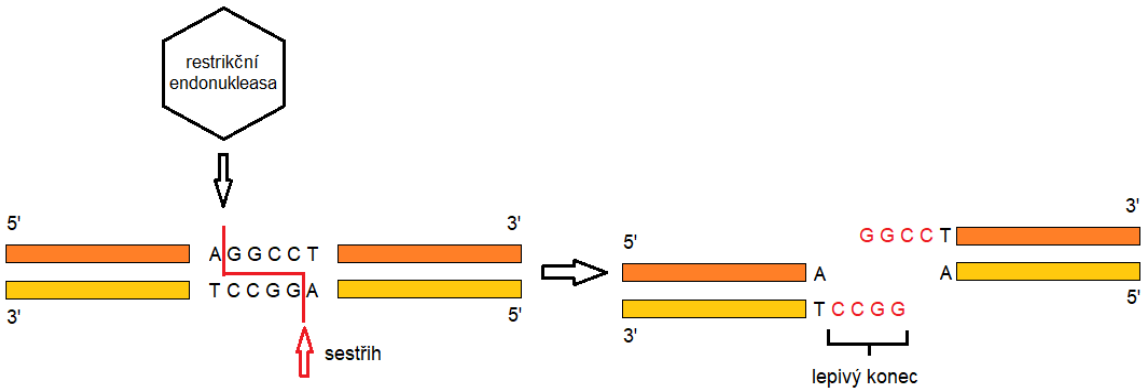
Plazmidy jako vektory v genetice

Plazmidy jsou dvouvláknové, kruhové molekuly extrachromosomální DNA, jenž mají schopnost se replikovat nezávisle na chromozomech (Ebersbach and Gerdes, 2005; Wegrzyn, 2005; Ghosh a kol., 2006). Přirozeně plazmidy najdeme u bakterií, archea, kvasinek a některých eukaryotických buněk (Del Solar a kol., 1998) (např. u zástupců říše Fungi). Genetická informace obsažená v plazmidech může představovat pro daný mikroorganismus určitou výhodu, jakou může být např. rezistence proti antibiotikům, lepší adaptace na změny v okolním prostředí, popřípadě rozšíření zdrojů živin (Sherratt, 1974; Eberhard, 1989). Pro mikroorganismus však nejsou geny kódované v plazmidech nezbytná genetická informace pro přežití. Plazmidy se v hostitelské buňce chovají buď jako symbionti,

kdy hostitely poskytují určité zvýhodnění, nebo jako parazité využívající hostitele pouze jako médium k jejich přežití (Bergstrom a kol., 2000; Slater a kol., 2008). Dřívější klasifikace rozdělovala plazmidy do tří skupin – F-plazmidy, Col-plazmidy (kolicogenní) a R-plazmidy (Datta, 1977; Kline a Palchaudhuri, 1980; Seelke a kol., 1982; Zverev a kol., 1984). F-plazmidy mají zabudovanou schopnost konjugace a přenosu mezi buňkami. Rezistenční plazmidy (R) poskytují svým hostitelům výhodu v podobě obranných mechanismů, které normálně nemají. Zpravidla se jedná o odolnost vůči antibiotikům a dalším antibakteriálním látkám (Sherratt, 1974). Col-plazmidy nesou geny pro tvorbu proteinů (bakteriocinů), které usmrcují citlivé či jiné bakteriální buňky (Reeves, 1972). Současná klasifikace využívá komplexnější soustavu kritérií pro řazení do různých tříd. Plazmidy se rozlišují dle replikačního počátku, selekčního markeru a promotorové sekvence. Na základě replikačního počátku a promotorové sekvence rozlišujeme tři skupiny – prokaryotické, eukaryotické a virové. Skupin dle selekčního markeru je podstatně více – mezi nejznámější patří např. ampicilin, kanamycin, streptomycin či gentamycin (Wang a kol., 2009). Dále můžeme plazmidové vektory rozlišit jako klonovací, do kterých lze snadno vkládat požadované sekvence DNA, a expresní vektory, jenž díky silným promotorům poskytují efektivní transkripci inzerované DNA do mRNA v hostitelské buňce (Vondrejs a Storchová, 1997).

Plazmidy přirozeně samy o sobě mají potenciál být využity jako nástroj v rekombinantních technoligiích. Pro získání účinného a kvalitního mechanismu klonování však bylo zapotřebí jejich genetické úpravy. Důležitými rysy jsou jedinečná místa v sekvenci DNA rozpoznávaná pomocí enzymů restrikčních endonukleas, která nazýváme jako restrikční místa (Obr. 3), a selekční marker, který umožní identifikovat recipientní buňky nesoucí plazmid s vloženou požadovanou sekvencí DNA (Thompson, 1988). Pro vložení úseku DNA do plazmidového vektoru je nezbytné zdrojovou genetickou informaci štěpit stejnou restrikční endonukleasou, která rozpoznává a štěpí restrikční místa plazmidu. Restrikční místa jsou obvykle 4-8 bp dlouhé specifické sekvence (Zheleznaya a kol., 2009), které jsou stejné na každém vláknu DNA ve směru čtení 5‘ → 3‘ (Obr. 3). Řetězce plazmidové a inserované DNA se spojují na základě komplementarity bází, čehož je docíleno vlivem štěpení jedním restrikčním enzymem, který tvoří stejné „lepivé“ (kohezivhní) konce na obou těchto úsecích DNA (Szybalski a kol., 1991). Spojení komplementárních úseků zdrojové a plazmidové DNA se děje za spotřeby energie

získané z adenosintrifosfátu (ATP) prostřednictvím tvorby fosfodiesterových vazeb enzymem DNA ligasou (Takagi a kol., 1968).



Obrázek 3. Ilustrační schéma mechanismu štěpení restrikčních míst enzymem restrikční endonukleasou

3.3.2 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Společně s mikroprojektilovým přenosem(particle bombardment; „genové dělo“), jehož podstatou je vstřelování zlatých či wolframových částic s navázanou DNA do buněk rostlin, patří transformace pomocí *A. tumefaciens* k velmi často používaným metodám sloužícím k přenosu genetické informace. Další metodou je například elektroporace, která využívá k vnesení genetické informace do buňky elektrických pulsů pro penetraci membrány a vytvoření pórů. Ječmen jarní byl poprvé transformován metodou mikroprojektilového přenosu v roce 1994 (Ritala a kol., 1994). Transformace ječmene jarního zprostředkovaná *A. tumefaciens* byla prvně provedena roku 1997 (Tingay a kol., 1997). Metoda využití této bakterie pro transformaci je vhodná hned z několika aspektů – jednoduchá inserce transgenu s jasně danými hraničními sekvencemi, ustálená integrace, stálost exprese genů (Tzfira a Citovsky, 2006). Tyto aspekty velmi přispěly k vývoji reprodukovatelných a účinných postupů pro transformaci dvouděložných i jednoděložných rostlin, ačkoli přirozeně *A. tumefaciens* jednoděložné rostliny neinfikuje (Hiei a kol., 1994; Zhang-Hua a kol., 2005).

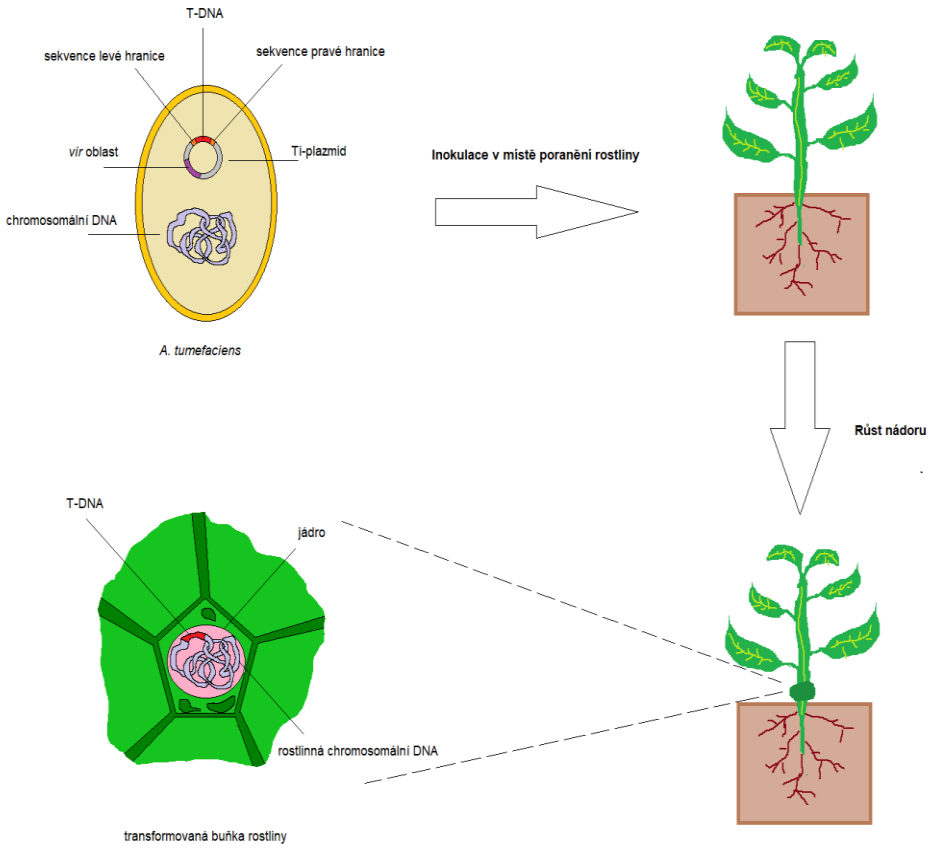
Agrobacterium tumefaciens je gram-negativní půdní bakterie, která u infikovaných dvouděložných rostlin vyvolává růst krčkových nádorů (Fabre a Dunal, 1853; Smith a Townsend, 1907; Gelvin, 2003). Krčkové nádory nazývané proto, že nejčastěji se tyto nádory nachází na rozhraní kořene a stonku (krček) –

obvykle povrch půdy. Zde může dojít ke snadnému poranění epidermis rostlin např. vlivem ohýbání ve větru a třením o povrch půdy. Infikována však může být rostlina v kterékoli části svého těla, kde dojde ke zranění. Důležitou roli při tomto způsobu transformace zde hraje schopnost totipotence rostlinných buněk, tedy že každá dílčí buňka je schopna diferenciace v jakoukoli buňku dospělé rostliny, což ve výsledku znamená, že z jedné buňky lze zregenerovat celou rostlinu (Gelvin, 2003; Snustad a Simmons, 2017).

Po infikování poraněného místa *A. tumefaciens* dochází ke dvěma klíčovým krokům: (1) dělení rostlinných buněk a tvorba nádoru a (2) syntéza opinu – derivát argininu. V závislosti na kmenu *A. tumefaciens* jsou syntetizovány buď oktopin či nopalin, kdy bakterie využívá schopnosti přesměrovat metabolické zdroje rostlinné buňky k tvorbě opinů. Ty jsou posléze degradovány a využity jako zdroj energie bakterie (Escobar a Dandekar, 2003; Valentine, 2003; Brown, 2007; Pacurar a kol., 2011). Molekulární podstatou této transformace je přenos genetické informace ze specifického segmentu bakteriálního plazmidu do genomu rostlinné buňky. Tento specifický segment je nazýván jako T-DNA (z angl. Transferred DNA) a je součástí velkého Ti-plazmidu (z angl. tumor-inducing) (Gelvin, 2003). Pro transformaci jsou nezbytné dvě části, a to výše zmíněná T-DNA a tzv. virulentní (*vir*) oblast, která obsahuje geny kódující enzymy potřebné k vyštěpení, přenosu a zakomponování T-DNA do genomu rostlinné buňky (Valentine, 2003; Pacurar a kol., 2011). Oblast Ti-plazmidu, v níž se nachází T-DNA, označujeme jako T-oblast. Délka její nukleotidové sekvence je v rozmezí cca 10-30 kbp a představuje tak méně než desetinu celkové velikosti Ti-plazmidu (Barker a kol., 1983; Byrne a kol., 1983; Lemmers a kol., 1980; Suzuki a kol., 2000; Zambryski a kol., 1980). T-DNA je v rámci Ti-plazmidu vymezena hraničními sekvencemi (pravá a levá hranice). Tyto sekvence jsou dlouhé 25 bp, jsou homologní a slouží jako restrikční místa pro specifické VirD1/VirD2 endonukleasy, které vyštěpují T-DNA z plazmidu (Jouanin a kol., 1989; Yadav a kol., 1982; Hepburn a White, 1985; Jen a Chilton; 1986; Sen a kol., 1989; Wang a kol., 1984; Wang a kol., 1987). Pravá hranice má nepostradatelný význam pro vyštěpení a přenos T-DNA, kdy delece této sekvence způsobí blokaci jejího přenosu (Wang a kol., 1984; Hepburn a White, 1985; Jen a Chilton, 1986; Wang a kol., 1987;).

Mechanismus transformace

A. tumefaciens je schopna lokalizovat a následně se navázat na poraněné pletivo, které často bývá u báze stonku, díky rozpoznání signálních molekul (fenolové a cukerné sloučeniny), a to i v tak různorodém a komplexním prostředí, jako je půda. Směrem ke zdroji těchto specifických molekul, které jsou vylučovány poraněnými rostlinami, se bakterie pohybuje na principu chemotaxe (Shaw, 1991; Zambryski, 1992). Následně po prvotním připojení bakterie začne syntetizovat síť z celulózových vláken, pomocí které se pevně uchytí na povrchu rostlinné buňky (Matthysse, 1983). Fenolové sloučeniny (kumaryl alkohol, koniferylalkohol, sinapyl alkohol) stimulují aktivitu *vir* genů Ti-plazmidu (Kado a Hooykaas, 1991). Celkem 25 *vir* genů je umístěno v Ti-plazmidu v rámci nejméně osmi operonů (Brown, 2007; Glick, Pasternak, Patten, 2010). V následujících krocích je T-DNA přenesena mechanismem podobným přenosu plazmidu konjugací u bakterií. Enzymy kódované *vir* geny štěpí plazmid v restrikčních místech (pravá a levá hranice) za vzniku lineárních jednovláknových T-DNA s 5´ koncem, na kterém je nesena sekvence pravé hranice, jenž obsahuje geny důležité pro integraci (De Vos a Zambryski, 1989; Gelvin, 2003). Většina genů T-DNA je aktivována teprve po inzerci do genomu rostliny, což poukazuje na skutečnost, že to jsou v podstatě rostlinné geny, které nemohou exprimovat sami bakterie skrze rozdíly transkripční a translační regulace (Kado a Hooykaas, 1991). V oblasti T-DNA jsou kódovány enzymy, které jsou odpovědné za syntézu indoloctové kyseliny (auxin). Jedná se o geny *iaaM* a *iaaH*. Syntéza indoloctové kyseliny spočívá v přeměně tryptofanu na indol-3-acetamid pomocí enzymu tryptofan-2-monooxygenasou, která je kódována genem *iaaM*, a následnou přeměnou indol-3-acetamidu enzymem indol-3-acetamidhydrolasou, jenž je produktem genu *iaaH*, na výslednou kyselinu (Inze a kol., 1984; Schroder a kol., 1984). Dále je v T-DNA přítomen gen *tmr*, který kóduje enzym isopentenyltransferasu. Tento enzym katalyzuje přenos isopentenylového postranního řetězce na 5´-AMP za tvorby isopentenyladenosin-5´-fosfátu, tedy prvního produktu v syntetické dráze cytokininu isopentenyladeninu. Hydroxylací těchto molekul pak vznikají cytokininy *transzeatin* a *transribosylzeatin*. V důsledku lokálně zvýšené koncentrace rostlinných růstových regulátorů (auxinu a cytokininu) je indukována tvorba krčkového nádoru (Akiyoshi a kol., 1983; Barry a kol., 1984; Kado a Hooykaas, 1991).



Obrázek 4. Ilustrační schéma transformace rostlinné buňky *A. tumefaciens*

A. tumefaciens jako biotechnologický nástroj

Poté, co byl objasněn proces transformace hostitele *A. tumefaciens* a vznik nádorů, začalo se nad touto bakterií uvažovat jako nad potencionálním biotechnologickým nástrojem. Pro využití v laboratoři bylo ovšem nutné upravit některé z přirozených rysů. Ti-plazmid bylo nezbytné upravit tak, aby v rostlinném pletivu nedocházelo k indukci růstu nádoru a syntéze opinů. Biotechnologické využití této bakterie se odvíjí od funkcí a struktury T-DNA. Pro přenos této sekvence je důležité pouze zachování vymezujících hraničních sekvencí, což umožnilo nahradit přirozenou genetickou informaci za jakoukoli požadovanou DNA (Lacroix a kol., 2006; Klee a kol., 1987; Pacurar a kol., 2011), a tím dosáhnout přenosu do hostitelské buňky. T-DNA však pro svůj přenos a následné zabudování genetické informace potřebuje *vir* geny. Bylo prokázáno, že úpravou jejich regulace (Ankebauer a kol., 1991) a změnou počtu kopií (Rogowsky a kol., 1987), lze docílit vyšší účinnosti procesu transformace (Klee a kol., 1987). Účinnost transformace však nemusí být pokaždé

v závislosti na expresi *vir* genů a získaná data poukazují na složitější mechanismus a vliv dalších faktorů jako např. volba rostlinného explantátu, transformační protokol (Gelvin, 2003). Na základě schopnosti *vir* genů fungovat v různých druzích organismu došlo k vývoji binárních a super-binárních transformačních vektorů, a tedy rozšíření rozsahu rostlinných druhů pro transformaci pomocí *A. tumefaciens* (Lee a kol., 2008). Snahou bylo také zvýšit účinnost transformace u již transformovatelných druhů. Toho bylo úspěšně dosaženo identifikací či tvorbou vysoce virulentních kmenů *Agrobacteria* (Hansen a kol., 1994), nebo optimalizací kultivačních podmínek (Newell, 2000). Tyto postupy však přes svoji účinnost měly své limity v robustnosti a rozsahu daných metod (Gelvin, 2003). Naopak nejprve sekundární přístup genové manipulace samotného hostitele otevřel potencionálně zajímavé okruhy k dosažení požadované účinnosti. Pro další možnou optimalizaci metody transformace bylo nezbytné určit geny rostlin zapojené do transformačního procesu. Genetickým screeningem byly identifikování mutanti *Arabidopsis* rezistentních vůči transformaci *Agrobacteriem* (Nam a kol., 1999; Zhu a kol., 2003). Geny a jejich produkty participující v transformaci pokrývají v rostlinách širokou škálu funkcí. Mezi ně patří např. geny, které jsou interesované do tvorby složek buněčných stěn (Zhu a kol., 2003; Gaspar a kol., 2004), importu látek (Bako a kol., 2003; Bhattacharjee a kol., 2008), po geny kódující chromatinové proteiny, které mají funkci při integraci T-DNA (Zhu a kol., 2003; Mysore a kol., 2000; Yi a kol., 2002; Gelvin a Kim, 2007) a expresi transgenu (Tenea a kol., 2009). Záporný účinek na transformaci byl shledán u genů obranného systému rostlin. (Gelvin, 2009). Postupně byly identifikovány a nasbírány potřebné informace o rostlinných receptorech pro bakteriální proteiny (Hwang a Gelvin, 2004), jaderných transportérech (Bhatacharjee a kol., 2008) a proteinech účastnících se cílení (Lacroix a kol., 2008) a lokalizace T-DNA (Lee a kol., 2008). Transkripčním profilováním a následným využitím dalších technik genového inženýrství (např. knockout genů nebo jejich nadměrná exprese) byly určeny geny, jejichž aktivita se po napadení *Agrobacteriem* mění (Ditt a kol., 2001; Ditt a kol., 2006; VeenaJiang a kol., 2003; Deeken a kol., 2006), a byla objasněna funkce těchto genů (Gelvin, 2009). Pokud by se podařilo účinně a úspěšně aplikovat zmíněné metody a postupy na různé druhy hostitelů, může tak být *Agrobacterium* velmi všestranným biotechnologickým nástrojem pro transformaci (Pacurar a kol., 2011).

3.4 CRISPR/Cas9

3.4.1 Charakteristika a funkce

Systémy CRISPR/Cas tvoří adaptivní imunitní systém vyskytující se u většiny zástupců archea a mnoha bakterií (Deveau a kol., 2010; Marraffini a Sontheimer, 2010; Koonin a Makarova, 2013; Makarova a kol., 2013; Barrangou a Marraffini, 2014). Tento imunitní systém slouží mikroorganismům jako ochrana před DNA a RNA viry (Barrangou a kol., 2007). Modul CRISPR (z angl. clustered regularly interspersed palindromic repeats) sestává z krátkých repetitivních sekvencí, mezi něž jsou vloženy krátké variabilní sekvence odvozené z cizorodé DNA, které se nazývají spacer (mezerník). Při procesu této adaptivní imunity dochází nejprve k adaptaci, během níž se úseky genetické informace – nové spacery – pocházející z patogenu zabudovávají do „paměti“ (modulu) CRISPRu (Barrangou a kol., 2007). Fázi adaptace následuje fáze exprese, při níž vzniká molekula pre-crRNA, která slouží jako prekurzorový transkript pro finální molekuly crRNA (CRISPR RNA). Konečnou fází je interference, v níž jsou využívány molekuly crRNA jako naváděcí prostředek na specifickou cílovou sekvenci genetické informace patogenu, jenž má být rozštěpena (Garneau a kol., 2010; Barrangou, 2013; Westra a kol., 2012; Wiedenheft a kol., 2012; van der Oost a kol., 2009; Makarova a kol., 2011).

Proteiny Cas tvoří četnou a velmi rozmanitou skupinu. Lze je rozdělit do čtyř různých funkčních modulů – adaptační (získávání spacerů), expresní (zpracování cr-RNA a vazba na cílovou sekvenci), interferenční (cílové štěpení) a pomocné (různé regulační funkce CRISPRu). Adaptace se v CRISPR/Cas systémech účastní proteiny Cas1 a Cas2, případně v systémech typu I je také přítomen enzym Cas4 a v systémech typu II jde o enzym Cas9. Tento fakt tedy vypovídá o značné podobnosti adaptačních modulů (Hooton a kol., 2014; Heler a kol., 2015; Wei a kol., 2015). Funkce Cas1 spočívá ve vkládání nových spacerů do CRISPRu pomocí štěpení specifických repetitivních míst. Lze tedy říci, že tento protein zastává funkci integrasy (Nunez a kol., 2014; Nunez a kol., 2015; Wiedenheft a kol., 2009). Expresní a interferenční moduly vykazují vyšší variabilitu a jsou tvořeny efektorovými komplexy, které se skládají z multipodjednotkových crRNA (Staals a kol., 2013; Staals a kol., 2014; Tamulaitis a kol., 2014; Jackson a kol., 2014; Mulepati a kol., 2014; Zhao a kol., 2014; Taylor a kol., 2015; Brouns a kol., 2008;

Rouillon a kol., 2013), nebo v případě systému typu II jsou tyto multipodjednotkové komplexy nahrazeny jedním velkým proteinem Cas9 (Deltcheva a kol., 2011; Jinek a kol., 2012; Jinek a kol., 2014). Během exprese dochází k připojení pre-crRNA na interferenční modul, který je v systému typu I a III tvořen multipodjednotkovým crRNA efektorovým komplexem a pre-crRNA je za katalýzy RNA endonukleasy (Cas6) přetvářena na crRNA (Carte a kol., 2008; R. Wang a kol., 2011). V případě systému typu II není pre-crRNA přeměněna pomocí enzymu Cas6, jako v předchozím případě, nýbrž alternativním mechanismem pomocí RNasy III a transaktivujících CRISPR RNA (tracrRNA) (Deltcheva a kol., 2011). Štěpení cílové genetické informace je důsledkem aktivity nukleas přítomných v interferenčním modulu. Nedílnou součástí tohoto modulu jsou také vyhrazené domény vázající crRNA, která zprostředkovává vazbu na nukleovou kyslinu (DNA či RNA) na základě komplementarity bází sekvence genetické informace patogenu a crRNA. V systému typu I a III je štěpení katalyzováno proteiny Cas3 (Beloglazova a kol., 2011; Huo a kol., 2014) v kombinaci s působením Cas7 *a* Cas10 (Samai a kol., 2015; Taylor a kol., 2015; Ramia a kol., 2014; Zhu a Ye, 2015; Tamulaitis a kol., 2014). U systému typu II je angažován protein Cas9 (Jinek a kol., 2012;). Pomocný modul se skládá z různých proteinů – např. Csn2 a DinG. Kromě úlohy v adaptaci je mu také přisuzována účast v programované buněčné smrti a kontrole aktivity CRISPR/Cas systému. Funkce těchto genů však nejsou detailně známy (Koonin a Makarova, 2013; Makarova a kol., 2012; Makarova a kol., 2014).

Systémy CRISPR/Cas se rozdělují do dvou tříd. Třída I. je definována multipodjednotkovým crRNA efektorovým komplexem, kdy tato třída zahrnuje typ I a typ III CRISPR/Cas systémů. Třída II. je definována jednou podjednotkou crRNA efektorového modulu – Cas9. Tato třída zahrnuje typ II systému CRISPR/Cas (Makarova a kol., 2019).

3.4.2 Využití CRISPR technologie

Technologie CRISPR/Cas má obrovský potenciál, který spočívá zejména v podpoře výzkumu funkce genů pro budoucí klinické využití, jako může být genová terapie, či v modifikování zemědělsky významných plodin. CRISPR je velmi pokrokový nástroj pro editaci genomu kteréhokoli organismu. O této technologii pojednává řada autorů, kdy hodně z nich může být až přehnaně optimistická a nedostatečně kritická,

či na druhé straně jsou autoři příliš kritičtí až konzervativní. Nicméně většina vědců připouští určité námitky ohledně CRISPRU – potřeba dalších zlepšování tohoto systému, zejména pak on-target efektu.

Systémy CRISPR/Cas byly shledány jako důležitý a užitečný nástroj v úpravě genetické informace rostlin a plodin, kdy díky této technologii a dalším metodám, které z ní byly odvozeny, bylo možno stanovit postavení a úlohu různých kódujících a nekódujících sekvencí DNA v genomu především modelových organismů (Duan a kol., 2016; Yan a kol., 2016; Wang a kol., 2016; Meng a kol., 2017; Minkenberg a kol., 2017). Další možné využití systému CRIPSR/Cas je v oblasti vývoje požadovaných vlastností – od tolerance abiotického a biotického stresu, přes zlepšení výnosových výsledků, až po zvýšení kvality plodin – u významných hospodářských plodin. Tolerancí k biotickému stresu se myslí zejména indukovaná tolerance vůči patogenům. U stresu abiotického je hlavní pozornost upřena směrem tolerance k environmentálním stresům, jako je v posledních letech sucho a zasolování půd. Výhoda práce s CRISPRem se skrývá také v možnosti vytváření dědičné, cílené mutace, aniž by daný výsledný organismus obsahoval transgen, jelikož obsah cizorodé DNA v organismu je obava mnoha lidí (Ricroch a kol., 2017). Vytvořením stabilní linie CRISPR/Cas mutantů bez expresního modulu a postupem genetické segregace lze získat rostliny s požadovanou mutací bez přítomnosti transgenu (Zhang a kol., 2016; Andersson a kol., 2016).

CRISPR jako biotechnologie nachází široké využití v zemědělství, kde je kladen velký důraz na výnosnost plodin. Jedním z faktorů, který negativně ovlivňuje výnosnost, jsou plevelové rostliny. Tyto rostliny pěstovaným plodinám ubírají vláhu, probíhá zde kompetice o prostor a přístup ke zdroji světla a živin (Delye a kol., 2013). V důsledku tohoto jsou pak hojně užívány k odstranění nebo snížení počtu plevele na minimum herbicidy. Aby bylo možné užívat herbicidy, je nutné u daných plodin docílit odolnosti vůči těmto látkám. Ta se může u rostliny vyskytovat přirozeně a lze tedy využít klasických šlechtitelských a genetických metod, nebo lze odolnost navodit editací genomu (Endo a Toki, 2013). V rychle se měnících podmínkách životního prostředí je zapotřebí vytvářet rostliny s požadovanými vlastnostmi v co nejkratším časovém intervalu. Oproti klasickým šlechtitelským a genetickým metodám je CRISPR velmi rychlým a efektivním biotechnologickým nástrojem k tvoření mutací u požadovaných genů participujících v reakcích na dané herbicidní látky. Technologie CRISPR/Cas byla využita pro modifikaci genů např. u plodin jako je rajče, u něhož bylo modifikováno 14 genů; pšenice, u které bylo modifikováno 7

genů; a v neposlední řadě hospodářsky velmi významná plodina – rýže, u níž bylo modifikováno celkem přes 30 genů (Korotkova a kol., 2017).

3.5 GMO legislativa v rámci Evropské Unie (EU)

Ke garanci, že vývoj moderní biotechnologie, přesněji pak tedy geneticky modifikovaných organismů (GMO), bude probíhat v bezpečných podmínkách, existuje v rámci EU právní rámec. Ten se zaměřuje především na:

i. Ochranu zdraví lidí, zvířat a životního prostředí zavedením posouzení bezpečnosti na nejvyšší možné úrovni v rámci EU před uvedením GMO na trh,
ii. Zavedení účinných, časově omezených a transparentních postupů pro posuzování rizik a povolování GMO,
iii. Zajištění jasného označování GMO uváděných na trh za účelem informovanosti spotřebitelů i odborníků,
iv. Zajištění dohledu nad GMO přivedeným na trh

(https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation_en)

3.5.1 GMO legislativa v ČR

Geneticky modifikované organismy

Za geneticky modifikovaný organismus je považován takový organismus (s výjimkou člověka), který je schopen rozmnožování a do jehož genetického materiálu bylo zasaženo modifikačním technickým postupem stanoveným zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů a vyhláškou č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů

Za účelem ochrany zdraví člověka a zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti je nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty umožněno pouze na základě těchto právních předpisů. Za genetický produkt je považováno vše, co obsahuje jeden a více GMO a bylo vyrobeno či jinak

opatřeno bez ohledu na stupeň zpracování a je stanoveno k uvedení na trh (https://www.mzp.cz/cz/geneticky_modifikovane_organismy).

Legislativa

V České republice je nakládání s GMO a genetickými produkty upraveno zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů, a vyhláškou č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů.
(https://www.mzp.cz/cz/narodni_legislativa_gmo)

GM plodiny v ČR

Na území České republiky byla jako první geneticky modifikovaná hospodářská plodina pěstovaná ve velkém kukuřice MON 810. Osev polí touto plodinou začal v roce 2005, kdy bylo oseto pouhých 270 ha na celém našem území. Největší míra osetých ploch byla zaznamenána v roce 2008, kdy bylo oseto přes 8300 ha půdy. Od té doby se výměra ploch zmenšovala a v posledních 3 letech se tato geneticky modifikovaná plodina přestala vysévat úplně. V roce 2019 byly nahlášeny polní pokusy s celkem třemi geneticky modifikovanými plodinami. Jedná se o slivoň klon C5, jenž ve své genetické výbavě nese odolnost vůči šarce – virové onemocnění napadající peckoviny způsobující významné hospodářské škody. Dále je to sója luštinatá, která nese gen *LTB*, a v ČR hospodářsky nejvýznamnější geneticky modifikovaná plodina – ječmen jarní, který produkuje lidský peptid katelicidin.
(https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/$FILE/OERES-polni_pokusy_2019-20191104.pdf;
https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/$FILE/OERES-Plochy_MON810-20190711.pdf.pdf)

4 Experimentální část

4.1 Materiál

Přístroje

- Centrifuga model 5418, Eppendorf
- Centrifuga model BR4i, Jouan
- Termo cyklér T100 Thermal Cycler, Bio-RAD
- UV transiluminátor G:Box iChemi XR UV/White Light, SYNGENE
- Elektroforetický napájecí zdroj PowerPac™ Basic, Bio-RAD
- Elektroforetická komora Wide Mini-Sub Cell GT cell, Bio-RAD
- Předvážky BWL-51, Boeco
- Minicentrifuga M-6, Boeco
- Spektrofotometr / Fluorometr DS-11, DeNovix
- Termoblok Bio TDB-100, Biosan
- Magnetický stojan pro izolaci DNA 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack, Bio-RAD

Chemikálie

- Extrakční pufr Edwards Buffer (200 mM Tris HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10% SDS)
- Basic lysis buffer (5 M NaCl, 1 M Tris HCl, 0,5 M EDTA, pH = 7,2)
- Lyzační pufr (Basic lysis buffer, bisulfát sodný, kyselina askorbová, merkaptoethanol)
- Marker molekulové hmotnosti HyperLadder™ 50bp (HyperLadder II), Bioline (Cat. No. BIO-33054)
- Agarosa UltraPure™ Agarose, ThermoFisher (Cat. No. 16500500)
- PCR master mix REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, Sigma-Aldrich (Cat. No. R2523)
- Ethidium bromid, Sigma-Aldrich (Cat. No. E1510)
- Primery:
    - PROTO CK 2 Fwd – *GAC CAA GCC CGT TAT TCT GA*
    - PROTO CK 2 Rev – *TGT GGA ATT GTG AGC GGA TA*

- Primery pro sekvenování LOX-1:
    - SEQLoxFwd – *GGA GGG AGA GAG GGG AGA AG*
    - SEQLoxRev – *ACC AGA GAG CAG AGG AGA GG*

- Isopropanol
- Ethanol 75%
- DNA/RNA free H_2O
- 50x TAE pufr (50 mM EDTA, 2 M Tris, 1 M kyselina octová)

Biologický materiál

- T1 generace rostlin jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůda Golden Promise

Tabulka 1 Linie rostlin T1 generace pro charakterizaci a identifikaci mutace v genu LOX-1

Linie rostlin	Počet
LOX-1 6	11
LOX-1 8	8
LOX-1 40-2	11
LOX-1 40-15	1
LOX-1 42	12

Použitý software

- Chromas
- ApE

4.2 Metody

4.2.1 Izolace genomové DNA z listů rostlin jarního ječmene

Z rostliny jarního ječmene byl odebrán vzorek listu (přibližně 4-5 cm), vložen do mikrozkumavky (Eppendorf) a zmrazen ponořením uzavřené mikrozkumavky do tekutého dusíku. Pomocí homogenizačních tyčinek byl zmrazený vzorek listu v mikrozkumavce důkladně homogenizován. K homogenizovanému materiálu bylo přidáno 400 µl extrakčního pufru (Edwards buffer) a promícháno. Extrahovaný vzorek byl centrifugován při 13000 rpm po dobu 5 min. Po centrifugaci bylo 300 µl supernatantu přeneseno do nové mikrozkumavky a přidáno stejné množství isopropanolu. Směs byla promíchána pozvolným otáčením mikrozkumavky a ponechána při teplotě 4 °C po dobu cca 15 min. Následná centrifugace probíhala při 14000 rpm a 4 °C po dobu 15 min. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 400 µl 75% ethanolu a znovu centrifugováno při 5000 rpm 5 min. Supernatant byl opatrně a důkladně odstraněn a pelet sušen v laminárním boxu (cca 15 min), a poté rozpuštěn v DNA/RNA free H_2O. Vzorek byl uložen do druhého dne při 4 °C. Následně byl vzorek krátce centrifugován (0,5 min; 10000 rpm) a supernatant přenesen do nové mikrozkumavky. Koncentrace DNA a její čistota byly stanoveny spektrofotometricky.

4.2.2 PCR screening rostlin T1 generace

Připravené vzorky DNA byly použity pro PCR screening. Práce byla prováděna na ledu v laminárním boxu.

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix byl před použitím promíchán. Reakční směs byla připravena na objem 10 µl pro jeden vzorek (viz Tab. 2). Do mikrozkumavky (Eppendorf) bylo postupně přidáno 2,5 µl ddH_2O; 5 µl REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix; 0,25 µl primer forward (10 µM) a 0,25 µl primer reverse (10 µM). Výsledná směs byla důkladně promíchána.

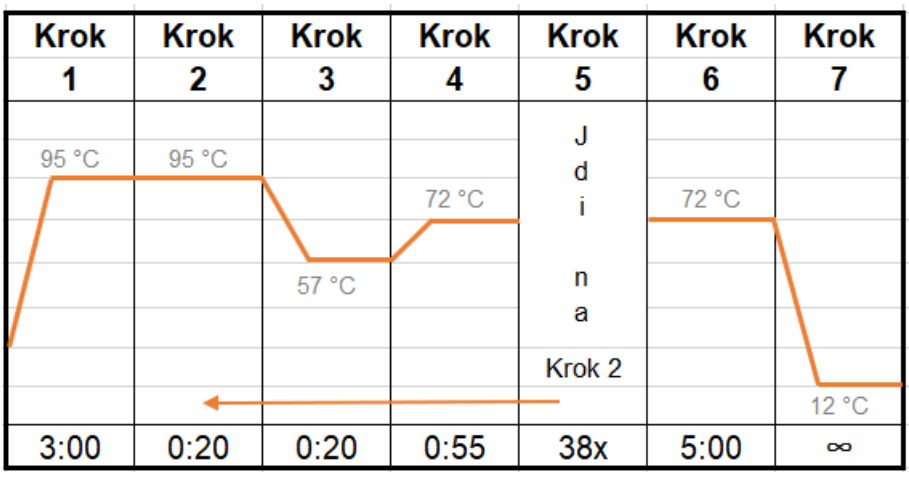
Do tenkostěnných PCR mikrozkumavek bylo rozpipetováno 8 µl reakční směsi a smícháno s 2 µl vzorku izolované DNA. U vzorku negativní kontrola (c-) bylo přidáno 2 µl DNA izolované z netransgenní kontrolní rostliny jarního ječmene.

V případě přípravy kontrolního vzorku ddH_2O bylo místo DNA přidáno 2 µl vody. Jako pozitivní kontrola (c+) byly užity 2 µl izolované DNA z transgenních rostlin.

Tabulka 2 Složení PCR reakční směsi

ReagentMix	**Mix 1x10 µl**	
ddH2O ReadyMix 2x Primer F 10 µM Primer R 10 µM	2,5 µl 5,0 µl 0,25 µl 0,25 µl	8 µl
DNA		2 µl
Celkem		10 µl

Připravené vzorky byly vloženy do termo cykléru (T100 Thermal Cycler) a zvolen program PROTO_CK, reakční podmínky viz Obr. 5. Po ukončení reakce byly vzorky uchovávány při 4 °C až do dalšího zpracování.



Obrázek 5 Schéma programu polymerázové řetězové reakce PROTO_CK

4.2.3 Analýza PCR produktů

Byl připraven 1% agarosový gel, do kterého byl pro vizualizaci DNA přidán roztok Ethidium Bromidu v koncentraci 10 mg/l. Pro přípravu gelu byl použit pufr TAE.

Vzorky byly naneseny do jamek v gelu. Vždy bylo naneseno 8 µl PCR produktu, a pro vyhodnocení marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (5 µl). Elektroforetická komora byla připojena k napájecímu zdroji PowerPac™ Basic a spuštěna separace při konstantním napětí 100 V.

Po skončení separace byl gel přemístěn do UV transiluminátoru (G:Box iChemi XR UV/White Light) a pod UV světlem pořízen fotografický záznam s vizualizovanou DNA a vzorky vyhodnoceny.

U pozitivních rostlin, tedy obsahujících kazetu s sgRNA, byla opětovně provedena izolace genomické DNA magnetickými částicemi pro zaručení vysoké čistoty vyizolované DNA a amplifikace úseku s genem *LOX-1* pomocí PCR.

4.2.4 Izolace genomové DNA paramagnetickými částicemi

Z rostliny jarního ječmene byl odebrán vzorek listu (přibližně 4-5 cm), vložen do mikrozkumavky (Eppendorf) a zmrazen ponořením uzavřené mikrozkumavky do tekutého dusíku. Pomocí homogenizačních tyčinek byl zmrazený vzorek listu v mikrozkumavce důkladně homogenizován. Poté bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru a mikrozkumavka vložena na dobu 45 minut do termobloku (Bio TDB-100) při teplotě 65 °C. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 2 minut při 10 000 rpm. Do nové mikrozkumavky bylo přidáno 11 µl paramagnetických částic, 100 µl supernatantu a 80 µl isopropanolu. Takto připravený vzorek byl vložen do magnetického stojanu (16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack) a ponecháno do vyčeření roztoku (cca 5 min). Mimo magnetický stojan byl supernatant odstraněn a k peletu přidáno 100 µl 70% ethanolu. Tyto dva kroky byly 2x opakovány. Poté byl odstraněn supernatant a pelet ponechán k vysušení v laminárním boxu. Pelet byl následně rozpuštěn v DNA/RNA free H_2O a opět vložen na magnetický stojan. Dále byl supernatant přenesen do nové mikrozkumavky. Koncentrace a čistota DNA byly stanoveny spektrofotometricky.

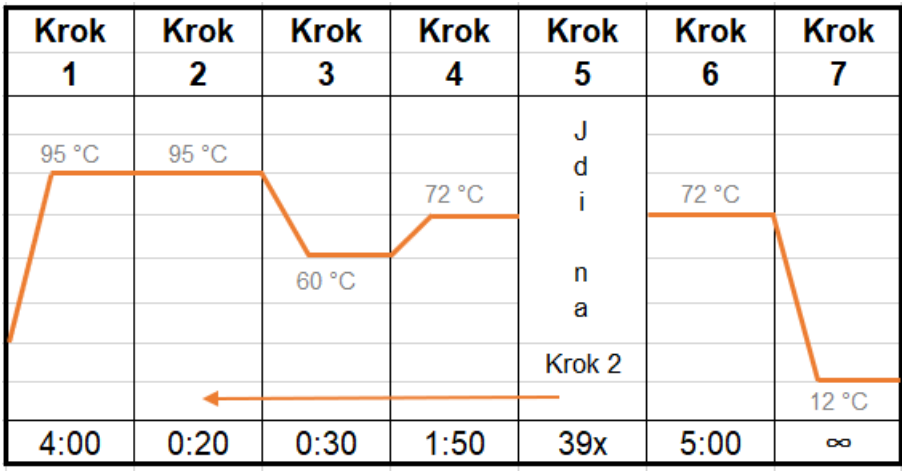
4.2.5 Příprava vzorků pro sekvenování

Postup obdobně jako v bodě 4.2.2 s odchylkou ve složení reakční směsi viz Tab. 3.

Tabulka 3 Složení PCR reakční směsi

ReagentMix	Mix 1x20 µl	
ddH2O ReadyMix 2x Primer F 10 µM Primer R 10 µM	5,0 µl 10,0 µl 0,5 µl 0,5 µl	16 µl
DNA		4 µl
Celkem		20 µl

Připravené vzorky byly vloženy do termo cykléru (T100 Thermal Cycler) a zvolen program, reakční podmínky viz Obr. 6. Po amplifikaci úseku obsahující gen *LOX-1* byly PCR produkty zkontrolovány elektroforeticky. Vzorky pak byly předány k sekvenování na Ústav experimentální botaniky. Přítomnost mutace z výsledků sekvenování byla vyhodnocena pomocí software Chromas.



Obrázek 6 Schéma programu polymerázové řetězové reakce pro amplifikaci úseku obsahující gen *LOX-1*

4.3 Výsledky

Bylo vyseto celkem 48 obilek z 5 linií jarního ječmene. Po 1-2 týdnech od vysetí byla vyizolována genomická DNA z listu, celkem z 43 rostlin. Spektrofotometricky byla stanovena kvalita a kvantita DNA. Rozsah koncentrací byl v intervalu hodnot od 20 do 700 ng/µl. V případě vyšších koncentrací byly DNA vzorky zředěny vodou na koncentraci 300 ng/µl. Všech 43 vzorků izolované DNA bylo použito pro PCR screening.

Z celkového počtu charakterizovaných rostlin byl transgen detekován u celkem 3 rostlin pocházejících z linie rostlin LOX-1 6, LOX-1 8 a LOX-1 42 (viz Tab. 4).

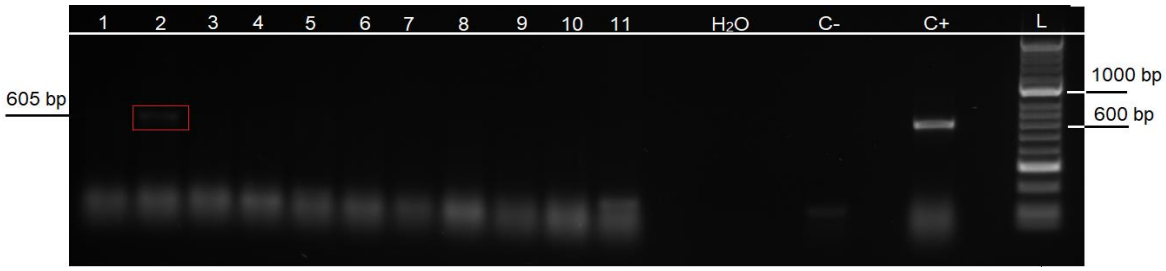
Tabulka 4 Detekce sgRNA kazety v T1 generaci

Linie rostlin	Počet charakterizovaných rostlin	Počet rostlin obsahujících T-DNA kazetu s sgRNA
LOX-1 6	11	1
LOX-1 8	8	1
LOX-1 40-2	11	0
LOX-1 40-15	1	0
LOX-1 42	12	1

4.3.1 Ověření přítomnosti transgenu u charakterizovaných rostlin

Rostlina LOX-1 6

Z transgenní linie rostliny T0 generace označené jako LOX-1 6 byla metodou PCR prokázána přítomnost T-DNA kazety s sgRNA u 1 z 11 rostlin T1 generace (Obr. 7).

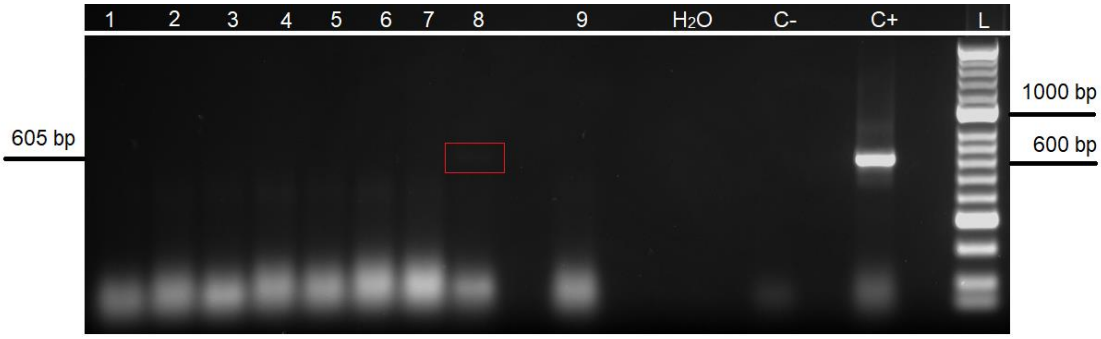


Obrázek 7 PCR analýza rostlin T1 generace LOX-1 6.

1-11 – vzorky DNA rostlin, H_2O – voda, C- – negativní kontrola (netransgenní rostlina), C+ – pozitivní kontrola (DNA transgenní rostliny), L – velikostní marker HyperLadder II, PCR produkt – 605 bp

Rostlina LOX-1 8 a LOX-1 40-15

Z transgenní linie rostliny T0 generace označené jako LOX-1 8 byla metodou PCR prokázána přítomnost T-DNA kazety s sgRNA u 1 z 8 rostlin T1 generace (Obr. 8). Z linie rostliny T0 generace označené jako LOX-1 40-15 nebyla přítomnost T-DNA kazety s sgRNA rostliny T1 generace prokázána (Obr. 8).

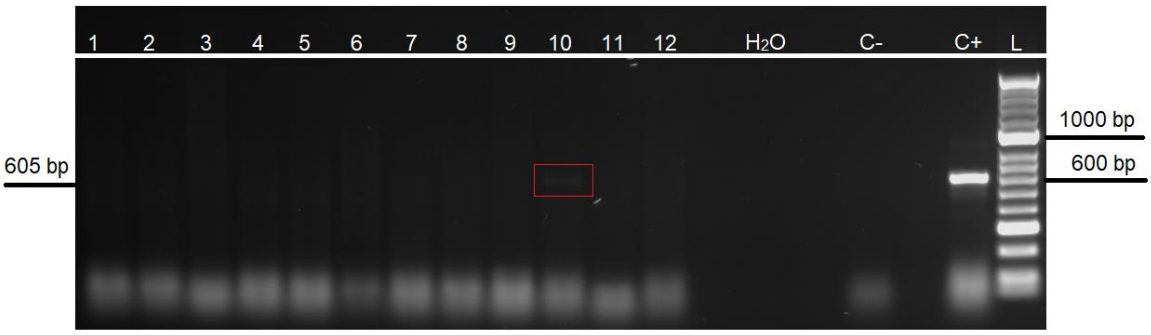


Obrázek 8 PCR analýza rostlin T1 generace LOX-1 8 a LOX-1 40-15

1-8 – vzorky DNA rostlin LOX-1 8, 9 – vzorek DNA rostliny LOX-1 40-15, H_2O – voda, C- – negativní kontrola (netransgenní rostlina), C+ – pozitivní kontrola (DNA transgenní rostliny), L – velikostní marker HyperLadder II, PCR produkt – 605 bp

Rostlina LOX-1 42

Z transgenní linie rostliny T0 generace označené jako LOX-1 42 byla metodou PCR prokázána přítomnost T-DNA kazety s sgRNA u 1 z 12 rostlin T1 generace (Obr. 9).

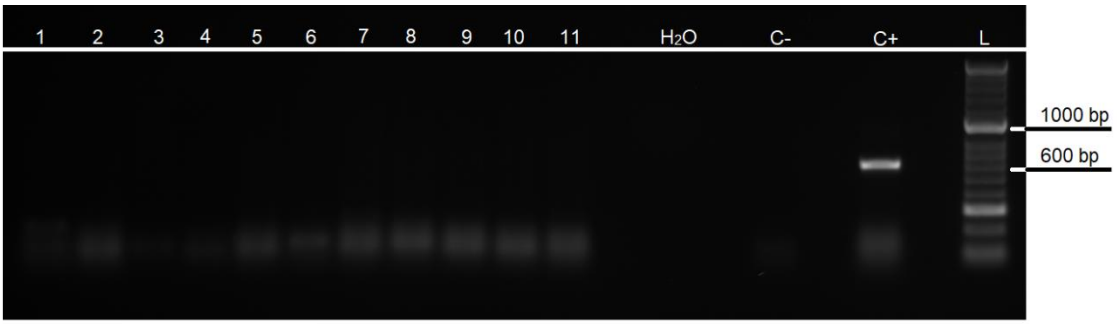


Obrázek 9 PCR analýza rostlin T1 generace LOX-1 42.

1-12 – vzorky DNA rostlin, H_2O – voda, C- – negativní kontrola (netransgenní rostlina), C+ – pozitivní kontrola (DNA transgenní rostliny), L – velikostní marker HyperLadder II, PCR produkt – 605 bp

Rostlina LOX-1 40-2

Z transgenní linie rostliny T0 generace označené jako LOX-1 40-2 nebyla metodou PCR prokázána přítomnost T-DNA kazety s sgRNA u žádné z 11 rostlin T1 generace (Obr. 10).



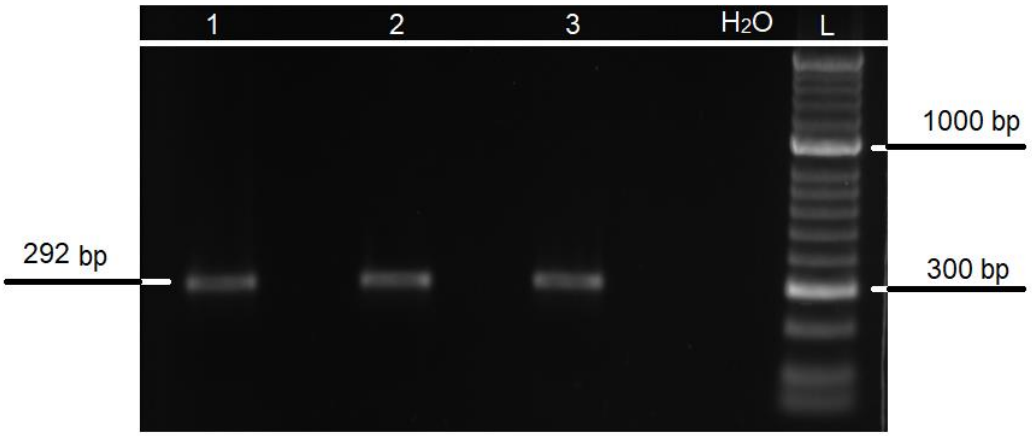
Obrázek 10 PCR analýza rostlin T1 generace LOX-1 40-2.

1-11 – vzorky DNA rostlin, H_2O – voda, C- – negativní kontrola (netransgenní rostlina), C+ – pozitivní kontrola (DNA transgenní rostliny), L – velikostní marker HyperLadder II, očekávaný PCR produkt – 605 bp

Transgenní rostliny T1 generace byly dále analyzovány sekvenováním cílového lokusu. Byla izolována genomická DNA o vysoké čistotě pomocí magnetických částic. Hodnoty koncentrací byly 586, 1225 a 633 ng/µl. Tyto vzorky byly zředěny vodou na výslednou koncentraci cca 50 ng/µl. Byla provedena PCR amplifikace cílové sekvence s použitím specifických primerů s očekávanou velikostí produktu 292 bp a vzorky předány k sekvenování na Ústav experimentální botaniky.

4.3.2 Amplifikace úseku obsahující gen *LOX-1*

U tří transgenních rostlin T1 generace LOX-1 6, LOX-1 8 a LOX-1 42 byla provedena amplifikace úseku obsahujícího gen *LOX-1* pro následnou detekci mutace pomocí metody sekvenování (Obr. 11).



Obrázek 11 PCR amplifikace úseku obsahujícího gen *LOX-1* rostlin generace T1.

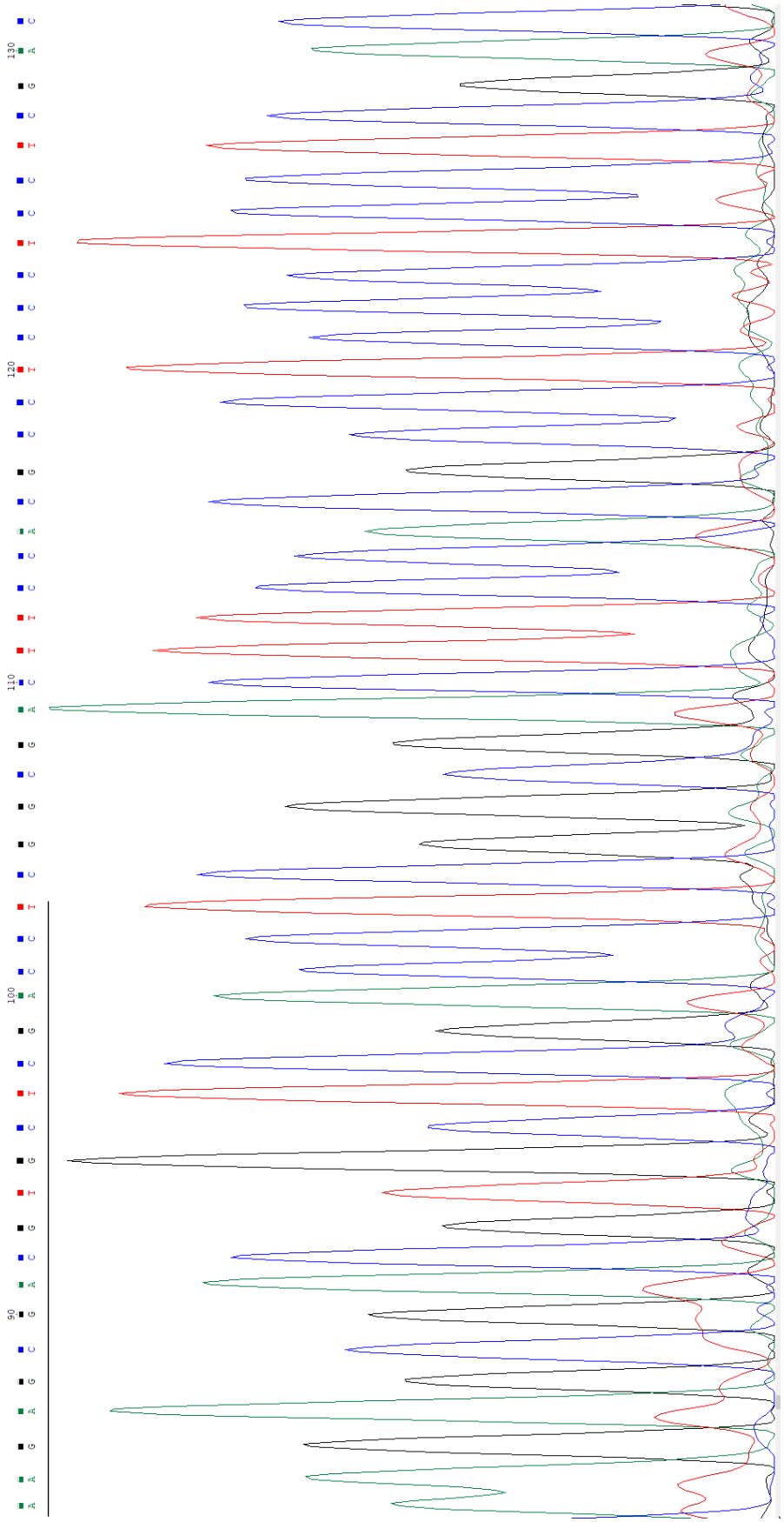
1 – vzorek DNA rostliny LOX-1 6, 2 – vzorek DNA rostliny LOX-1 8, 3 – vzorek DNA rostliny LOX-1 42, H_2O – voda, L – velikostní marker HyperLadder II, PCR produkt – 292 bp

4.3.3 Detekce mutace metodou sekvenování

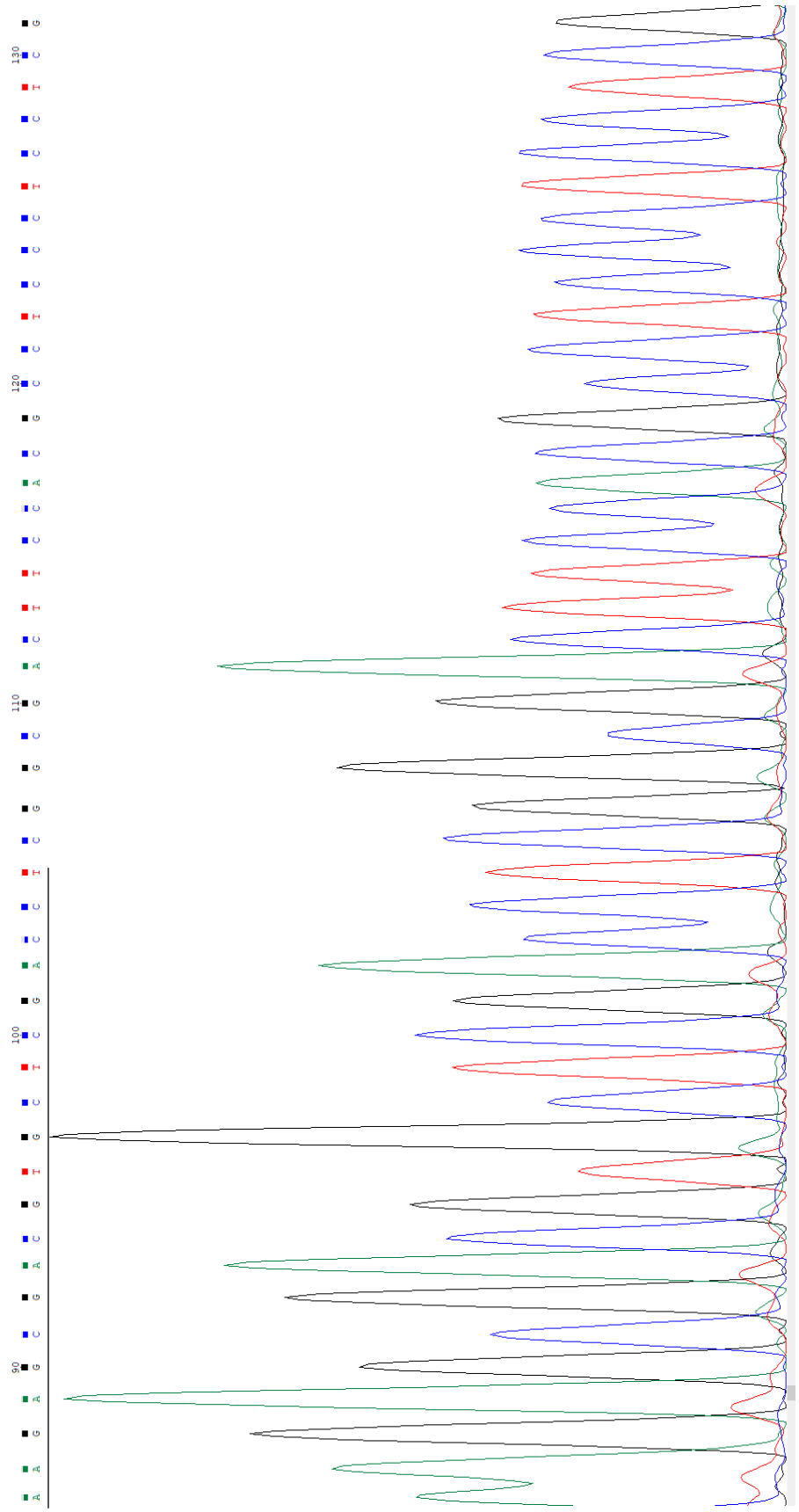
Byly sekvenovány tři PCR produkty pocházející ze tří nezávislých linií. Z veřejně dostupné databáze byla stažena sekvence genu *LOX* ječmene setého (Obr. 12). V software Chromas byly výsledky sekvenování porovnány s původní sekvencí. V analyzovaných sekvencích nebyla nalezena žádná mutace (Obr. 13-15).

```
ACCACCTCGCCCTCCCTCCGGCGATCTCTCTCCATCTCTGACATCGCTGCGGCTGGGTTGGTGGCCGCGGTAAATTGGTAGTATCGG
CGAGGCGCCCTATAAATCCCGCCGCAGCGGCCCTGCATCTAGGCCACCCTACCACCACCACTGCCCTCCTTGTGCCAAGTGCATCAG
CAAGGGGACAGGCACCCACCGGTTGTGTTCCTCGTGCTCTGCTCTGCCCTGCCTCCGCTGCAGAACCAGAGAGCAGAGGAGAGGAGA
GATGCTGCTGCACGGGCTGGTGGACCGGCTGACGGGGAAGAACAAGGAGGCGTGGAAGGAGGGCAAGATCCGGGGCACGGCGGTGCT
GGTCAAGAGCGACGTGCTCGACCTCGGCGACTTCCACGCCTCCCTCCTCGACGGCGTCCACAAGATCCTCGGCAAGGACGACGGCGT
CTCCTTCCGCCTCGTCAGCGCCACCGCCCCTGACCCACGTAACCTTTCTTCCCCCTTCCCCTTCGCTTCTCCCCTCTCTCCCTCCCT
GCGTCGGTCGCACGCCGCCGCCGCGTAACCGCCGGCTCTCGCCTCGTACGCGCGTGCGTTTCAGTTTCCCAACTCATGGGTCATGGC
```

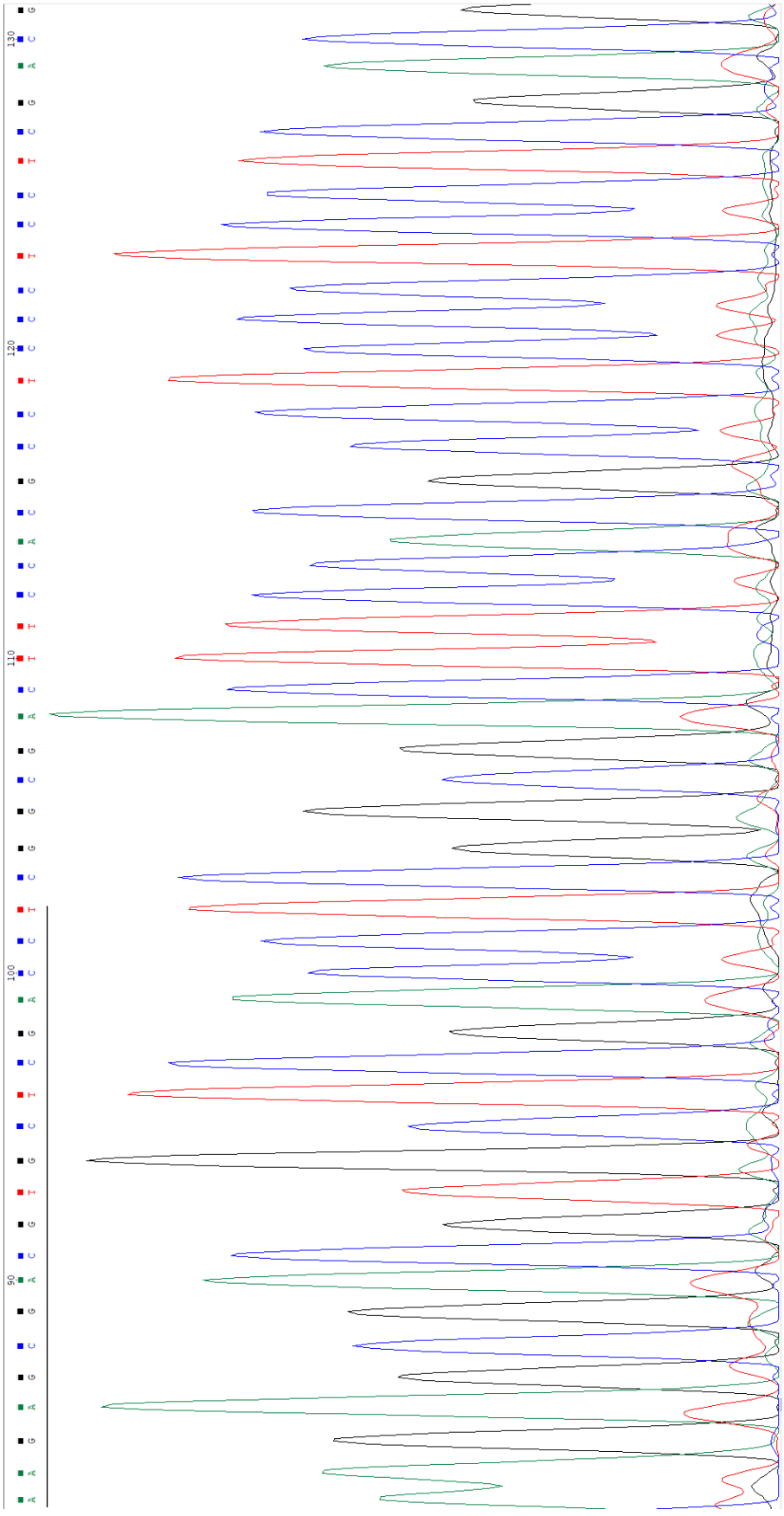
Obrázek 12 Sekvence genu *LOX* s vyznačenými primery. F primer značen zeleně, R primer značen růžově; protospacer značen žlutě.



Obrázek 13 Chromatogram sekvenování *LOX-1* genu u LOX-1 6 rostliny (vyznačena sekvence protospaceru)



Obrázek 14 Chromatogram sekvenování *LOX-1* genu u LOX-1 8 rostliny (vyznačena sekvence protospaceru)



Obrázek 15 Chromatogram sekvenování *LOX-1* genu u LOX-1 42 rostliny (vyznačena sekvence protospaceru)

4.4 Diskuze

V této práci byly analyzovány potomstva transgenních rostlin T1 generace. Bylo analyzováno celkem 43 rostlin původem z 5 nezávislých transgenních událostí. Byly získány 3 transgenní rostliny, u kterých byla identifikována kazeta s sgRNA. Tyto identifikované transgenní rostliny byly dále analyzovány sekvenováním vybraného úseku genu *LOX*-1. Sekvenováním bylo zjištěno, že žádná z charakterizovaných rostlin neobsahovala mutaci v cíleném genu *LOX-1*. Tato skutečnost mohla být způsobena několika faktory, které ovlivňují aktivitu a efektivitu systému CRISPR/Cas9.

Jedním z hlavních nedostatků technologie CRISPR je vysoká frekvence (≥ 50%) účinku mimo požadovaný cíl – off-target – způsobená RNA-naváděnou endonukleasou (Zhang a kol., 2015). Pro využití CRISPRU u eukaryoty jsou důležité – Cas9, crRNA určující specifičnost a transaktivační tracrRNA (Cong a kol., 2013; Hsu a kol., 2013). Systém však může být aktivní i v případě vzniku chimérické sgRNA. Prvních 20 nukleotidů sgRNA je komplementárních k cílové sekvenci DNA. Za těmito nukleotidy následuje v sekvenci cílové DNA tzv. protospacer sousedící motiv (angl. protospacer adjacent motif – PAM) – obvykle NGG (N = A, T, C nebo G) (Mojica a kol., 2009; Sternberg a kol., 2014; Anders a kol., 2014). Předpokládá se, že cílová specifita Cas9 je striktně řízena dvacetinukleotidovou sekvencí sgRNA a přítomností PAM v genomu, avšak potencionální off-target štěpení může nastat dokonce i v případě, že se sekvence DNA liší o 3-5 párů bází (Cong a kol., 2013; Hsu a kol., 2013). Rozbory ukázaly, že kritická pro vazbu a aktivaci Cas9 je také sekvence na 3‘ konci crRNA (Nishimasu a kol., 2014; Jinek a kol., 2014). Některé studie ukázaly, že přímým dodáním purifikovaného proteinu Cas9 a sgRNA do buněk lze dosáhnout snížení frekvence off-target účinků oproti užití plasmidových vektorů, protože komplexy Cas9-sgRNA štěpí chromozomální DNA téměř okamžitě po dodání a tímto způsobem jsou pak i rychle degradovány (Kim a kol., 2014; Ramakrishna a kol., 2014). Účinky off-target mohou být taktéž specifické pro daný typ buněk a velmi se tyto účinky mohou odvíjet také od integrity opravných drah dvouvláknových zlomů konkrétních buněk (Duan a kol., 2014). V současné době nelze predikovat, zda naprogramovaná sgRNA bude mít požadovanou účinnost či nikoliv. Některé sgRNA mají efektivitu vyšší, některé nižší. Nízká efektivita pak může způsobit, že při získání malého množství transgenních rostlin nemusí být daná rostlina s mutací objevena (Graf a kol., 2019).

Bylo popsáno, že snížit off-target účinek lze např. pomocí editace sekvence sgRNA, ať už na jejím 5´ či 3´ konci, kdy se sekvence sgRNA může zkrátit až o 3 nukleotidy nebo naopak prodloužit o 2 guaninové nukleotidy. Takovou úpravou lze zvýšit specifičnost a snížit off-target až 5000-krát (Pattanayak a kol., 2013; Cho a kol., 2014; Fu a kol., 2014). Nicméně na druhou stranu tyto způsoby mohou snížit aktivitu on-target (Cho a kol., 2014). Dalším způsobem je kontrola koncentrace komplexu Cas9-sgRNA titrací množství obou dodaných složek. Zvyšování specifity snížením množství transfektované DNA taktéž vede ke snížení off-target štěpení (Hsu a kol., 2013; Pattanayak a kol., 2013). Obecně lze říci, že je nezbytné pečlivě navrhnout jednotlivé klíčové komponenty systému CRISPR/Cas9 (Zhang a kol., 2015).

Další možnou příčinou absence mutace v genu *LOX-1* může být tzv. gene silencing. Jedná se o způsob regulace exprese genů pomocí modifikace DNA či degradace mRNA. Umlčení genu může nastat vlivem methylace promotoru, čímž dochází k zamezení transkripce, nebo na posttranslační úrovni degradací mRNA transgenů v cytosolu (Rajeevkumar a kol., 2015). U rostlin se methylace DNA často vyskytuje u opakujících se sekvencí, a ještě více v případě invertních opakujících se sekvencí. Invertní repetitivní sekvence se typicky objevují u transgenů vnesených do organismu (Selker, 1999). Fenomén nežádoucího umlčování genů je tedy jeden z problémů při vytváření transgenních rostlinných linií (Rajeevkumar a kol., 2015).

Vzhledem k tomu, že nebyla detekována mutace, bude experiment dále optimalizován. V potaz přichází využití nového vektoru či použití komplexu Cas9-sgRNA, kterým by bylo zajištěno zvýšení on-target efektu, dále také budou navrženy nové protospacery.

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla zpracována literární rešerše na téma lipoxygenasy, konkrétně LOX-1 ve sladovnictví ječmene, transformace rostlin zprostředkovanou *A. tumefaciens* a editace genomu pomocí inovativního systému CRISPR/Cas9. Lipoxygenasy jsou důležitým faktorem ve sladovnictví, kdy tyto enzymy, a zejména pak metabolity vznikající v biosyntetických drahách s participací těchto enzymů, ovlivňují kvalitu a stabilitu piva.

Cílem experimentální části byla stanovena charakterizace a identifikace mutagenních rostlin T1 generace v genu *LOX-1* ječmene jarního (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise. Analyzovány byly rostliny T1 generace, které byly získány z transgenních rostlin generace T0. Charakterizace a identifikace rostlin v sobě zahrnovala izolaci genomické DNA a detekci přítomnosti T-DNA kazety s sgRNA. Z celkového množství analyzovaných rostlin pouze 3 obsahovaly kazetu s sgRNA. U těchto rostlin byla provedena opakovaná izolace genomické DNA a následně tyto vzorky byly podrobeny amplifikaci úseku DNA obsahující gen *LOX-1*. Detekce mutací byla provedena metodou sekvenování. Mutace detekována nebyla, a tedy nebyl získán biologický materiál s mutací v genu *LOX-1*. Proto budou dále studovány možné příčiny nízké efektivity CRISPR systému. Exprese transgenů bude také předmětem zkoumání. Předpokládá se také navržení nových protospacerů nebo použití jiného vektoru pro transformaci.

6 Literatura

Akiyoshi, D. E., Morris, R. O., Hinz, R., Mischke, B. S., Kosuge, T., Garfinkel, D. J., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1983). Cytokinin/auxin balance in crown gall tumor is regulated by specific loci in the T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 407.

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, N.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (1998). Essential Cell Biology: An Introduction to Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc.: New York, ISBN 978-0-81532-971-8.

Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., and Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. Nature, 513, 569–573.

Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A.-S., Samuelsson, M. and Hofvander, P. (2016). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep., 36, 117–128.

Andreou, A., Feussner, I. (2009). Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. Phytochemistry, 70(13-14), 1504-1510.

Ankebauer, R.G., Best, E.A., Palanca, C.A., Nester, E.W. (1991). Mutants of the *Agrobacterium tumefaciens virA* gene exhibiting acetosyringone-independent expression of the *vir* region. Mol Plant-Microbe Interact,4, 400–6.

Babenko, L.M., Kosakivska, I.V., Akimov, Yu.A., Klymchuk, D.O., Skaternya, T.D. (2014). Effect of temperature stresses on pigment content, lipoxygenase activity and cell ultrastructure of winter wheat seedlings. Genet Plant Physiol., 4(1-2), 117-125.

Babenko, L.M., Kosakivska, I.V., Skaterna, T.D. (2015). Jasmonic acid: a role in the regulation of biotechnology and biochemical processes in plants. Biotechnologia acta., 8(2), 36-51.

Babenko, L.M., Shcherbatiuk, M.M., Skaterna, T.D., Kosakivska, I.V. (2017) Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. Ukr Biochem J., 89(1), 5-21.

Bailey, J. (2019). Genetic modification of animals: scientificand ethical concerns. In: Herrmann, K., Jayne, K. (Eds.), Animal Experimentation: Working towards a Paradigm Change. Brill, pp. 443–479

Bako, L., Umeda, M., Tiburcio, A.F., Schell, J., Koncz, C. (2003). The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box binding protein and a nuclear protein kinase in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 10108–13.

Ballaré, C.L. (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. trends Plant Sci., 16(5), 249-257.

Barker, R. F., K. B. Idler, D. V. Thompson, and J. D. Kemp. (1983). Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti-plasmid pTi15955. Plant Mol. Biol., 2, 335–350.

Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Mol. Cell, 54, 234–244.

Barrangou, R. (2013). CRISPR–Cas systems and RNA-guided interference. Wiley Interdiscip. Rev. RNA, 4, 267–278.

Barrangou, R. *et al.* (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315, 1709–1712.

Barry, G. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Brand, L. (1984). Identification of a cloned cytokinin bio-synthetic gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 4776.

Bassett, A.R. (2017). Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models, Mamm. Genome, 28, 348–364.

Baxter, E. D. (1982). Lipoxidase in malting and mashing. J. Inst. Brew, 88, 390-396.

Beloglazova, N. *et al*. (2011). Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference. EMBO J., 30, 4616–4627.

Bergstrom, C.T., Lipsitch, M., and Levin, B.R. 2000. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. Genetics. 155(4), 1505-1519.

Bhattacharjee, S., Lee, L.Y., Oltmanns, H., Cao, H., VeenaCuperus, J., Gelvin, S.B. (2008). AtImpa-4, an *Arabidopsis* importin a isoform, is preferentially involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. The Plant Cell, 20, 2661–80.

Brendel, J. *et al*. (2014). A complex of Cas proteins 5, 6, and 7 is required for the biogenesis and stability of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (crispr)-derived rnas (crrnas) in *Haloferax volcanii*. J. Biol. Chem., 289, 7164–7177.

Brouns, S. J. *et al*. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science, 321, 960–964.

Brown, T. A. (2007). Klonování genů a analýza DNA, Univerzita Palackého Olomouc, Olomouc, Česká republika, pp. 141-150.

Byrne, M. C., Koplow, J., David, C., Tempe, J., and Chilton, M.-D. (1983). Structure of T-DNA in roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Mol. Appl. Genet., 2, 201–209.

Carroll, D. (2018). p53 throws CRISPR a curve. Trends Pharmacol. Sci., 39, 783–784.

Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R.M., Terns, M.P. (2008). Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. Genes Dev., 22(24), 3489–3496.

Cong, L, Ran, FA, Cox, D, Lin, S, Barretto, R, Habib, N. *et al*. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339, 819–823.

Datta, N., (1977). Classification of plasmids as an aid to understanding their epidemiology and evolution. J. Antimicrob. Chemother., 3 (Suppl. C), 19–23.

Davison, J. (1999). Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. Plasmid, 42(2), 73–91

De Vos, G., and Zambryski, P. (1989). Expression of Agrobacterium nopalinespecific VirD1, VirD2, and VirC1 proteins and their requirement for T-strand production in E. coli. Mol. Plant-Microbe Interact. 2, 43–52.

Deeken, R., Engelmann, J.C., Efetova, M., Czirjak, T., Muller, T., Kaiser, W.M., *et al*. (2006). An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. The Plant Cell, 18, 3617-34.

Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62(2), 434–464.

Delporte, A., Lannoo, N., Vandenborre, G., Ongenaert, M., Van Damme, E.J. (2011). Jasmonate response of the *Nicotiana tabacum* agglutinin promoter in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochem., 49(8), 843-851.

Deltcheva, E. *et al.* (2011). CRISPR RNA maturation by transencoded small RNA and host factor RNase III. Nature, 471, 602–607.

Delye, C., Jasieniuk, M., Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Trends Genet. 29, 649–658

Deveau, H., Garneau, J. E. & Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. Annu. Rev. Microbiol., 64, 475–493.

Ditt, R.F., Kerr, K.F., de Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., Nester, E.W. (2006). The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Plant-Microbe Interact, 19, 665-81.

Ditt, R.F., Nester, E.W., Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci USA, 98, 10954-9.

Duan, J., Lu, G., Xie, Z., Lou, M., Luo, J., Guo, L. *et al*. (2014). Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. Cell Res, 24, 1009–1012.

Duan, Y.-B., Li, J., Qin, R.-Y., Xu, R.-F., Li, H., Yang, Y.-C. *et al*. (2016). Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice OsRAV2 through ex situ and in situ promoter analysis. Plant Mol. Biol., 90, 49–62.

Dyson, T. (1999). World food trends and prospects to 2025. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 5929-5936.

Eberhard, W.G. (1989). Why do bacterial plasmids carry some genes and not others? Plasmid, 21(3), 167-174.

Ebersbach, G., Gerdes, K. (2005). Plasmid segregation mechanisms. Annu. Rev. Genet. 39, 453–479.

Endo, M., Toki, S. (2013). Creation of herbicide-tolerant crops by gene targeting. J Pestic Sci. 38,49–59

Escobar, M.A., Dandekar, A.M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. Trends Plant Sci, 8, 380-6.

Fabbri, A.A., Fanelli, C., Reverberi, M., Ricelli, A., Camera, E., Urbanelli, S., Rossini, A., Picardo, M., Altamura, M.M. (2000). Early physiological and cytological events induced by wounding in potato tuber. J exp Bot., 51(348), 1267-1275.

Fabre E, Dunal F. (1853). Observations sur les maladies regantes de la vigne. Bull Soc Cent Agric Dep Herault, 40-46.

Feussner, I., Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. annu rev Plant Biol., 53, 275-297.

Forster, B. P. (2001). Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. Euphytica, 120, 317-328.

Foster, T. L., & Caradonna, J. P. (2003). Non-heme Mono-iron Enzymes. Comprehensive Coordination Chemistry II, 343–368.

Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M. and Joung, J.K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat Biotechnol, 32, 279–284.

Fukuda, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H., Osawa, T., Uchida, K. (1997). Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. Biochem Biophys res commun., 236(2), 505-9.

Garneau, J. E*. et al.* (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature ,468, 67–71.

Gaspar, Y.M., Nam, J., Schultz, C.J., Lee, L.Y., Gilson, P.R., Gelvin, S.B., *et al*. (2004). Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactanprotein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. Plant Physiol, 135, 2162–71.

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(1), 16–37.

Gelvin, S.B. (2003). Improving plant genetic engineering by manipulating the host. Trends Biotechnol, 21, 95–8.

Gelvin, S.B. (2009). *Agrobacterium* in the Genomics Age. Plant Physiol, 150, 1665-76.

Gelvin, S.B., Kim, S.I. (2007). Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. Biochim Biophys Acta, 1769, 410-21.

Ghosh, S.K., Hajra, S., Paek, A., Jayaram, M. (2006). Mechanisms for chromosome and plasmid segregation. Annu. Rev. Biochem. 75, 211–241.

Glick, B. R., Pasternak, J. J., Patten, C. L. (2010). Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA (4th Edition). ASM Press, Washington D. C., USA., ISBN 978-1-55581-498-4.

Glombik, M. (2015). Fenotypová a proteomická charakterizace ječmene (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise) v podmínkách chladového stresu. Olomouc.

Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., Rosahl, S. (2001). Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. J Biol chem., 276(9), 6267-6273.

Graf, R., Li, X., Chu, V. T., & Rajewsky, K. (2019). sgRNA Sequence Motifs Blocking Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. Cell Reports. 26(5), 1098–1103.e3.
Griffith, F. (1928). The Significance of *Pneumococcal* Types. Journal of Hygiene, 27(02), 113–159.

Haapaniemi, E. *et al*. (2018). CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat.Med., 24, 927–930.

Hämäläinen, J., Kaukovirta-Norja, A., Reinikainen, P., & Olkku, J. (1995). A mathematical model for lipoxygenase activity during kilning of malt. In Proceedings of the 25th Congress Brussels 1995, Oxford University Press.

Hansen, G., Das, A., Chilton, M.D. (1994). Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. Proc Natl Acad Sci USA, 91, 7603-7.

Harwood, J. L. (1997). Plant Lipid Metabolism. Plant Biochemistry, 237–272.

Heler, R. *et al*. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation. Nature, 519, 199–202.

Hepburn, A. G., and White, J. (1985). The effect of right terminal repeat deletion on the oncogenicity of the T-region of *pTiT37*. Plant Mol. Biol., 5, 3–11.

Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant Journal, 6, 271-282.

Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., Ito, K., Takeda, K. (2006). Brewing performance of malted Lipoxygenase-1 Null barley and effect on the flavor stability of beer. Cereal Chem., 83, 250–254.

Hooton, S. P. & Connerton, I. F. (2014). *Campylobacter jejuni* acquire new host-derived CRISPR spacers when in association with bacteriophages harboring a CRISPR-like Cas4 protein. Front. Microbiol., 5, 744.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V. *et al*. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol, 31, 827–832.

Huo, Y. et al. (2014). Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. Nat. Struct. Mol. Biol. 21, 771–777.

Hwang, H.H., Gelvin, S.B. (2004). Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. The Plant Cell, 16, 3148-67.

Chandra, S., Heinstein, P.F., Low, P.S. (1996). Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. Plant Physiol., 110(3), 979-986.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S. *et al*. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Genome Res, 24, 132–141.

Inze, D., Follín, A., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, M., Van Montagu, M., and Schell, J. (1984). Genetic analysis of the individual T-DNA genes of Agrobacterium tumefaciens: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Mol. Gen. Genet. 194, 265.

Jackson, R. N. Lavin, M., Carter, J., & Wiedenheft, B. (2014). Fitting CRISPR-associated Cas3 into the helicase family tree. Curr Opin Struct Biol., 24, 106–114.

Jen, G. C., and M.-D. Chilton. 1986. The right border region of *pTiT37* T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3895–3899.

Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E. *et al*. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science, 343, 1247997.

Jinek, M*. et al*. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816–821.

Jinek, M*. et al*. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science, 343, 1247997.

Jouanin, L., Bouchez, D., Drong, R. F., Tepfer, D., and Slightom, J. L. (1989). Analysis of TR-DNA/plant junctions in the genome of a *Convolvulus arvensis* clone transformed by *Agrobacterum rhizogenes* strain A4. Plant Mol. Biol., 12, 75–85.

Kado, C. I., & Hooykaas, P. J. J. (1991). Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. Critical Reviews in Plant Sciences. 10(1), 1–32.

Kanchiswamy, C.N. *et al*. (2016). Fine-tuning next-generation genome editing tools. Trends Biotech., 34, 562–574.

Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., and Kim, J.S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res, 24, 1012–1019.

Klee, H., Horsch, R., Rogers, S. (1987). *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann Rev Plant Physiol, 38, 467-86.

Kline, B.C., Palchaudhuri, S., (1980). Genetic studies of F plasmid maintenance genes. Plasmid, 4, 281–291.

Koonin, E. V. & Makarova, K. S. (2013). CRISPR–Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. RNA Biol., 10, 679–686.

Kopich, V.N., Kretynin, S.V., Kharchenko, O.V., Litvinovskaya, R.P., Chashina, N.M., Khripach, V.A. (2010). Effect of 24-epibrassinolide on lipoxygenase activity in maize seedlings under cold stress. Biopolym cell., 26(3), 218-224.

Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. (2017). Crop genes modified using the CRISPR/Cas system. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 7(8), 822-832.

Kosakivska, I.V., Babenko, L.M., Skaterna, T.D., Ustinova, A.Yu. (2014). Influence of hypo- and hyperthermia on lipoxygenase activity, content of pigments and soluble proteins in *triticum aestivum L.* cv. Yatran 60 seedlings. Fiziol rast Genet., 46(3), 212-220.

Kosakivska, I.V., Babenko, L.M., Ustinova, A.Yu., Skaterna, T.D. (2012). The influence of temperature conditions on lipoxygenase activity in seedling of rape *Brassica napus var. Oleifera*. Dopov Nac akad Nauk Ukr., 6, 134-137.

Kuroda, H., Furusho, S., Maeba, H., Takashio, M. (2003). Characterization of factors involved in the production of 2(*E*)-nonenal during mashing. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 691–697.

Lacroix, B., Li, J., Tzfira, T., Citovsky, V. (2006). Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. Can J Physiol Pharmacol, 84, 333–45.

Lacroix, B., Loyter, A., Citovsky, V. (2008). Association of the *Agrobacterium* T-DNA protein complex with plant nucleosomes. Proc Natl Acad Sci USA, 105, 15429-34.

Lee, L.Y., Fang, M.J., Kuang, L.Y., Gelvin, S.B. (2008). Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells. Plant Methods, 4, 24.

Lemaux, P. G., Cho, M.-J., Zhang, S., & Bregitzer, P. (1999). Transgenic Cereals: Hordeum vulgare L. (barley). Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, 255–316.

Lemmers, M., DeBeuckeleer, M., Holsters, M., Zambryski, P., Depicker, A., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M., and Schell, J. (1980). Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. J. Mol. Biol., 144, 353–376.

Liang, P. *et al.* (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes, Protein Cell, 6, 363–372.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., *et al*. (2000). Molecular Cell Biology (4th edition). New York: W. H. Freeman. Section 7.1, DNA Cloning with Plasmid Vectors. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/

Lorenz, M. G., Aardema, B. W., Krumbein, W. E. (1981). Interaction of marine sediment with DNA and DNA availability to nucleases. Mar. Bioi. 64, 225-30.

Lorenzo, O., Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. curr opin Plant Biol., 8(5), 532-540.

Maccarrone, M., Melino, G., Finazzi-Agrò, A. (2001). Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. Cell Death Differ., 8(8), 776-784.

Magadán, A. H., Dupuis, M. E., Villion, M. & Moineau, S. (2012). Cleavage of phage DNA by the *Streptococcus thermophilus* CRISPR3–Cas system. PLoS ONE, 7, e40913

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 13(11), 722–736.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., … Koonin, E. V. (2019). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology.

Makarova, K. S. *et al.* (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. Nat. Rev. Microbiol., 9, 467–477.

Makarova, K. S., Anantharaman, V., Aravind, L. & Koonin, E. V. (2012). Live virus-free or die: coupling of antivirus immunity and programmed suicide or dormancy in prokaryotes. Biol. Direct, 7, 40.

Makarova, K. S., Anantharaman, V., Grishin, N. V., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2014). CARF and WYL domains: ligand-binding regulators of prokaryotic defense systems. Front. Genet., 5, 102.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2013). The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems. Biochem. Soc. Trans., 41, 1392–1400.

Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat. Rev. Genet., 11, 181–190.

Matthysse, A.G. (1983). Role of bacterial cellulose fibrils in Agrobacterium tumefaciens infection. Journal of Bacteriology. 154(2), 906-915.

Meng, Y., Hou, Y., Wang, H., Ji, R., Liu, B., Wen, J. *et al*. (2017). Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. Plant Cell Rep., 36, 371–374.

Minkenberg, B., Xie, K. and Yang, Y. (2017). Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. Plant J., 89, 636–648.

Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology, 155(3), 733–740.

Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. Plant Physiol Biochem., 47(6), 511-517.

Mulepati, S., Heroux, A. & Bailey, S. (2014). Crystal structure of a CRISPR RNA-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. Science, 345, 1479–1484.

Mysore, K.S., Nam, J., Gelvin, S.B. (2000). An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. Proc Natl Acad Sci USA, 97, 948-53.

Nam, J., Mysore, K.S., Zheng, C., Knue, M.K., Matthysse, A.G., Gelvin, S.B. (1999). Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. Mol Gen Genet, 261, 429–38.

Newell, C.A. (2000). Plant transformation technology: developments and applications. Mol Biotechnol, 16, 53–65.

Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N. *et al*. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 156, 935–949.

Nunez, J. K. *et al.* (2014). Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. Nat. Struct. Mol. Biol., 21, 528–534.

Nunez, J. K., Lee, A. S., Engelman, A. & Doudna, J. A. (2015). Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. Nature, 519, 193–198.

Osawa, T., Inanaga, H., Sato, C. & Numata, T. (2015). Crystal structure of the CRISPR–Cas RNA silencing *Cmr* complex bound to a target analog. Mol. Cell, 58, 418–430.

Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. Physiological and Molecular Plant Pathology, 76(2), 76–81.

Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A. and Liu, D.R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. Nat Biotechnol, 31, 839–843.

Peña-Cortés, H., Fisahn, J., Willmitzer, L. (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. Proc Natl acad Sci USA., 92(10), 4106-4113.

Piotrowska, A., Bajguz, A. (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. Phytochemistry., 72(17), 2097-2112.

Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. Plant Physiol., 130(1), 15-21.

Rajeevkumar, S., Anunanthini, P., & Sathishkumar, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. Frontiers in Plant Science, 6.

Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A.B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S.K. and Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. Genome Res, 24, 1020–1027.

Ramia, N. F. *et al*. (2014). Essential structural and functional roles of the *Cmr4* subunit in RNA cleavage by the *Cmr* CRISPR–Cas complex. Cell Rep., 9, 1610–1617.

Reeves, P. (1972). The Bacteriocins (London: Chapman and Hall; Berlin: Springer-Verlag).

Ricroch, A., Clairand, P., & Harwood, W. (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. Emerging Topics in Life Sciences, 1(2), 169–182.

Ritala, A., Aspegren, K., Kurtén, U., Salmenkallio-Marttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T., H., Enari, T. M. (1994). Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. Plant Molecular Biology, 24(2), 317-325.

Rogowsky, P.M., Close, T.J., Chimera, J.A., Shaw, J.J., Kado, C.I. (1987). Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. J Bacteriol,169, 5101–12.

Rouillon, C. *et al*. (2013). Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. Mol. Cell, 52, 124–134.

Samai, P. *et al*. (2015). Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR–Cas immunity. Cell, 161, 1164–1174.

Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. Plant cell, 32(7), 1085-1098.

Savchenko, T.V., Zastrijnaja, O.M., Klimov, V.V. (2014). Oxylipins and plant abiotic stress resistance. Biochemistry (Mosc), 79(4), 362-375.

Seelke, R.W., Kline, B.C., Trawick, J.D., Ritts, G.D. (1982). Genetic studies of F plasmid maintenance genes involved in copy number control, incompatability, and partitioning. Plasmid, 7, 163–179.

Selker, E. U. (1999). Gene Silencing: Repeats that Count. Cell. 97(2), 157–160.

Sen, P., Pazour, G. J., Anderson, D., and Das, A. (1989). Cooperative binding of *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 protein to single-stranded DNA. J. Bacteriol., 171, 2573–2580.

Shaw, CH. (1991). Swimming against the tide-chemotaxis in *agrobacterium*. Bioessays, 13, 25–9.

Sherratt, D.J. (1974). Bacterial Plasmids. Cell. 3(3), 189-195.

Schroder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W., and Schroder, J. (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 138, 387.

Skadhauge, B., Lok, F., Breddam, K., Olsen, O., Bech, M., Knudsen, S. (2011). Barley with reduced lipoxygenase activity and beverage prepared therefrom. US Patent 0318469 A1.

Slater, F.R., Bailey, M.J., Tett, A.J., and Turner, S.L. (2008). Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. FEMS Microbiol. Ecol. 66, 3-13.

Smith, E. F., & Townsend, C. O. (1907). A PLANT-TUMOR OF BACTERIAL ORIGIN. Science, 25(643), 671–673.

Snustad, D.P., a Simmons, M.J. (2017). Genetika (2. vydání). MUNI PRESS, Brno, Česká republika, ISBN 978-80-210-8613-5.

Staals, R. H. *et al*. (2013). Structure and activity of the RNAtargeting Type III-B CRISPR–Cas complex of *Thermus thermophilus*. Mol. Cell, 52, 135–145.

Staals, R. H. *et al.* (2014). RNA targeting by the type III-A CRISPR–Cas Csm complex of *Thermus thermophilus*. Mol. Cell, 56, 518–530.

Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature, 507, 62–67.

Stewart, G.J. & Carlson, C.A. (1986). The biology of natural transformation. Annual Review of Microbiology 40, 211–235.

Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kato, A., and Yoshida, K. (2000). Complete nucleotide sequence of a plant tumorinducing Ti plasmid. Gene, 242, 331–336.

Szybalski, W., Kim, S. C., Hasan, N., & Podhajska, A. J. (1991). Class-IIS restriction enzymes — a review. Gene. 100, 13–26.

Špunar, J., Vaculová, K., Špunarová, M., Nesvadba, Z. (2002). Comparison of important parameters of spring and winter barley cultivated in sugar beet production area of Czech Republic. Rostlinná Výroba, 48, 237-242.

Takagi, J., Ando, T., & Ikeda, Y. (1968). Repair of single strand breaks in transforming DNA by polynucleotide ligase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 31(4), 540–544.

Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., Ohta, H. (2005). 12-oxophytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in woundinduced gene expression in *arabidopsis*. Plant Physiol., 139(3), 1268-1283.

Tamulaitis, G. *et al*. (2014). Programmable RNA shredding by the type III-A CRISPR–Cas system of *Streptococcus thermophilus*. Mol. Cell, 56, 506–517.

Taylor, K.D. (2018). Harms versus benefits: a practical critique of utilitarian calculations. In: Linzey, A., Linzey, C.(Eds.),The Ethical Case against Animal Experiments. University of Illinois Press, pp. 148–159.

Taylor, D. W. *et al*. (2015). Structures of the CRISPR–Cmr complex reveal mode of RNA target positioning. Science, 348, 581–585.

Tenea, G.N., Spantzel, J., Lee, L.Y., Zhu, Y., Lin, K., Johnson, S.J., *et al*. (2009). Overexpression of several *Arabidopsis* histone genes increases *Agrobacterium*-mediated transformation and transgene expression in plants. The Plant Cell, 21, 3350-67.

Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettell, R. (1997). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. The Plant Journal, 11(6), 1369-1376.

Trevors, J. T. (1999). Evolution of gene transfer in bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(1), 1–6.

Tzfira T., Citovsky V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 17, 147-154.

Valentine, L. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliath of modern Genetics. Plant Physiol, 133, 948-55.

Van der Ent, S., Van Wees, S.C., Pieterse, C.M. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry., 70(13-14), 1581-1588.

van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. & Brouns, S. J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. Trends Biochem. Sci., 34, 401–407.

Vanko, M., Holková, I., Obložinský, M., Bilka, F., Bezáková, L. (2007). Rastlinné lipoxygenázy – štruktúra a mechanizmus biokatalýzy. Chem. Listy, 101(5), 384-390.

VeenaJiang, H., Doerge, R.W., Gelvin, S.B. (2003). Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. Plant J, 35, 219-36.

Vellosillo, T., Martínez, M., López, M.A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., Castresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. Plant cell., 19(3), 831-846.

Vondrejs V., Storchová Z. (1997). Genové inženýrství I., Karolinum – nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika, ISBN 382-110-97.

Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., and Zambryski, P. (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. Cell, 38, 455–462.

Wang, K., S. E. Stachel, B. Timmerman, M. Van Montagu, and P. C. Zambryski. (1987). Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of *Agrobacterium vir* gene expression. Science, 235, 587–591.

Wang, L., Wang, L., Tan, Q., Fan, Q., Zhu, H., Hong, Z. *et al*. (2016). Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicus* using CRISPR-Cas9. Front Plant. Sci., 7, 1333.

Wang, Z., Jin, L., Yuan, Z., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2009). Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria. Plasmid, 61(1), 47–51.

Wang, R., Preamplume, G., Terns, M. P., Terns, R. M. & Li, H. (2011). Interaction of the Cas6 riboendonuclease with CRISPR RNAs: recognition and cleavage. Structure, 19, 257–264.

Wasternack, C., Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. ann Bot., 111(6), 1021-1058.

We˛grzyn, G. (2005). What does ‘‘plasmid biology” currently mean? Summary of the Plasmid Biology 2004 Meeting. Plasmid. 53, 14–22.

Wei, Y., Terns, R. M. & Terns, M. P. (2015). Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR–Cas adaptation. Genes Dev., 29, 356–361.

Westra, E. R. *et al*. (2012). The CRISPRs, they are a-changin’: how prokaryotes generate adaptive immunity. Annu. Rev. Genet., 46, 311–339.

Wiedenheft, B. *et al*. (2009). Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPRmediated genome defense. Structure, 17, 904–912.

Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, 482, 331–338.

Yadav, N. S., Van der Leyden, J., Bennett, D. R., Barnes, W. M., and Chilton, M.-D. (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6322–6326.

Yan, W., Chen, D. and Kaufmann, K. (2016). Efficient multiplex mutagenesis by RNA-guided Cas9 and its use in the characterization of regulatory elements in the AGAMOUS gene. Plant Methods, 12, 23.

Yang, G., & Schwarz, P. B. (1995). Activity of Lipoxygenase Isoenzymes During Malting and Mashing. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 53(2), 45–49.

Yang, G., Schwarz, P.B., Vick, B.A. (1993). Purification and characterization of lipoxygenase isozymes in germinating barley. Cereal Chem., 70, 589–595.

Yi, H., Mysore, K.S., Gelvin, S.B. (2002). Expression of the *Arabidopsis* histone *H2A-1* gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. Plant J, 32, 285-98.

Yu, J., Huang, S., Dong, J., Fan, W., Huang, S., Liu, J., Chang, Z., Tian, Y., Hao, J., Hu, S. (2014). The influence of LOX-less barley malt on the flavour stability of wort and beer. J. Inst. Brew., 120, 93–98.

Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicker, A., Schell, J., Van Montagu, M., and Goodman, H. M. (1980). Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. Science, 209, 1385–1391.

Zambryski, P.C. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 43, 465-90.

Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S., & Yang, S.-H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 4, e264.

Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen, K. et al. (2016). Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. Nat. Commun., 7, 12617.

Zhang-Hua, H., Jin-Qing, C., Guan-Ting, W., Wei, J., Chun-Xiu, L., Rui-Zhi, H., Fu-Lin, W., ZhiHong, L., Xiao-Yun, C. (2005). Highly efficient transformation and plant regeneration of tall fescue mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 31, 149-159.

Zhao, H*. et al*. (2014). Crystal structure of the RNA-guided immune surveillance Cascade complex in *Escherichia coli*. Nature, 515, 147–150.

Zheleznaya, L. A., Kachalova, G. S., Artyukh, R. I., Yunusova, A. K., Perevyazova, T. A., & Matvienko, N. I. (2009). Nicking endonucleases. Biochemistry (Moscow). 74(13), 1457–1466.

Zhu, Y., Nam, J., Carpita, N.C., Matthysse, A.G., Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated root transformation is inhibited by mutation of an *Arabidopsis* cellulose synthase-like gene. Plant Physiol, 133, 1000–10.

Zhu, Y., Nam, J., Humara, J.M., Mysore, K.S., Lee, L.Y., Cao, H., *et al*. (2003). Identification of *Arabidopsis* rat mutants. Plant Physiol, 132, 494–505.

Zhu, X. & Ye, K. (2015). *Cmr4* is the slicer in the RNA-targeting *Cmr* CRISPR complex. Nucleic Acids Res., 43, 1257–1267.

Zverev, V.V., Kuzmin, N.P., Zuyeva, L.A., Burova, E.I., Alexandrov, A.A., Khmel, I.A. (1984). Regions of homology in small colicinogenic plasmids. Plasmid, 12, 203–205.