

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Detekce transgenních rostlin jarního
ječmene v T0 a T1 generaci kódujících
Cas9 nukleázu k získání tolerance
k WDV**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Michal Nakládal**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michal Nakládal
Název práce	Detekce transgenních rostlin jarního ječmene v T0 a T1 generaci kódujících Cas9 nukleázu k získání tolerance k WDV
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Abstrakt	Virus zakrslosti pšenice (WDV), je závažný virový patogen, způsobující vysoké ekonomické ztráty při pěstování pšenice a ječmene. Pomocí metod genového inženýrství by bylo možné získat rezistentní rostliny. Bakalářská práce se zabývá detekcí rekombinantní DNA v T0 a T1 generaci rostlin jarního ječmene, nesoucí systém CRISPR/Cas9. Rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise byly transformovány pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , třemi různými typy sgRNA komplementární k úsekům virových genů <i>CP</i> , <i>MP</i> , <i>Rep</i> . K detekci transgenů na úrovni DNA byla použita metoda PCR.
Klíčová slova	ječmen, transformace, CRISPR/Cas9, rezistence, WDV
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Surname	Michal Nakládál
Title of thesis	Detection of transgenic spring barley plants in T0 and T1 generation encoding Cas9 nuclease to obtain tolerance to WDV
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of grow regulators
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutkova, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstrakt	<p>Wheat Dwarf virus (WDV) is a serious viral pathogen, causing high economic losses in the wheat and barely cultivation. Using genetic engineering methods, it would be possible to obtain resistant plants. The bachelors thesis deals with the detection of recombinant DNA in T0 and T1 generation plants of the spring barley, which carry CRISPR/Cas9 system. Golden Promise spring barely plants were transformed by three different types of sgRNA complementary to the stretches of viral genes <i>CP</i>, <i>MP</i>, <i>Rep</i> using <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. The PCR method was used to detect transgenes at the DNA level.</p>
Keywords	Barley, transformation, CRISPR/Cas9, resistance,WDV
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne.....

.....

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

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

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	10
2 CÍLE PRÁCE	12
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
3.1 Ječmen	13
3.1.1 Základní charakteristika ječmene	13
3.1.2 Kulturní formy ječmene.....	13
3.1.3 Kultivar Golden Promise.....	14
3.1.4 Ječmen v České republice	14
3.2 Virus zakrslosti pšenice	16
3.2.1 Základní charakteristika WDV	16
3.2.2 Patogenita WDV	17
3.2.3 Přenos WDV.....	18
3.2.4 Genom WDV	19
3.2.5 Replikační protein WDV	21
3.3 Transformace rostlin	22
3.3.1 Mechanismus transformace pomocí <i>A. tumefaciens</i>	22
3.4. CRISPR/Cas9.....	23
3.4.1 CRISPR/Cas systémy	23
3.4.2 Historie metody CRISPR/Cas9.....	27
3.4.3 Technologie CRISPR/Cas9.....	31
3.4.4 Protein Cas9.....	33
3.5 Právní statut GMO	36
3.5.1 GMO, vědecké a etické problémy	36
3.5.2 GMO v České republice	39
4 MATERIÁL A METODY	41
4.1 Materiál.....	41
4.1.1 Rostlinný materiál.....	41
4.1.2 Chemikálie.....	42
4.1.3 Přístroje.....	43
4.1.4 Vektory a protospacery.....	44
4.2 Pracovní postupy.....	46
4.2.1 Kultivace a pěstování rostlin T0 generace.....	46
4.2.2 <i>In vitro</i> kultivace embryí rostlin T1 generace	47

4.2.2.1 Příprava 1/2 MS média.....	47
4.2.2.2 Povrchová sterilizace obilek	48
4.2.2.3 Kultivace nezralých zygotických embryí ječmene	49
4.2.3 Izolace DNA	50
4.2.4 Stanovení přítomnosti expresní kazety pomocí PCR	52
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	55
5.1 Výsledky	55
5.1.1 Detekce transgenních rostlin v T0 generaci	57
5.1.2 <i>In vitro</i> kultivace zygotických embryí rostlin T1 generace.....	59
5.1.3 Detekce transgenních rostlin v T1 generaci	64
5.2 Diskuze.....	70
6 ZÁVĚR.....	73
7 ZDROJE	74
7.1 Seznam použité literatury	74
7.2 Další zdroje.....	81

SEZNAM ZKRATEK

AP (alkaline phosphatase) – alkalická fosfatáza

bp (base pairs) – pár bází

Cas (CRISPR-associated) – přidružený ke CRISPR

coA (cyclic oligoadenylat) – cyklický oligoadenylát

ČK GMO – Česká komise pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty

CP (coat protein) – obalový protein

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

crRNA (CRISPR RNA) – CRISPR RNA

DNA (deoxyribonucleic acid) – deoxyribonukleová kyselina

DSB (double-strand break) – dvouřetězcový zlom

dsDNA (double-stranded DNA) – dvouřetězcová DNA

dsRED (discosoma red fluorescent protein) – červený fluorescenční protein

Discosoma sp.

GM (genetic modification) – genetická modifikace

GMO (genetically modified organism) – geneticky modifikovaný organismus

gRNA (guide RNA) – naváděcí RNA

HB (helix bridge) – šroubovitý most

HD doména (histidine-aspartic domain) – histidin-aspartátová doména

HUH (histidine-nonpolar residue-histidine motif) – histidin-nepolární zbytek-histidin motiv

HUH-tag (HUH endonuclease) – HUH endonukleáza

iap (isozyme of alkaline phosphatase) – izoenzym alkalické fosfatázy

kb (kilobase) – kilobáze

LIR (long intergenic region) – dlouhá intergenní oblast

MP (movement protein) – pohybový protein

mRNA (messenger RNA) – informační RNA
NBT (new breeding techniques) – nové techniky šlechtění
NUC (nuclease) – nukleázový
ORF (open reading frame) – otevřený čtecí rámec
PAM (protospacer adjacent motif) – přilehlý protospacerový motiv
PCR (polymerase chain reaction) – polymerázová řetězová reakce
PI doména (PAM-interacting domain) – doména interagující s PAM
pre-crRNA (pre-CRISPR RNA) – primární CRISPR RNA
RAMP (repeat-associated mysterious protein) – necharakterizovaný s
CRISPR repetitivy asociovaný protein

RCR (rolling-circle replication) – replikace otáčivé kružnice
REC (recognition) – rozpoznávací
Rep (replication protein) – replikační protein
RNA (ribonucleic acid) – ribonukleová kyselina
RRM (RNA recognition motif) – RNA rozpoznávací motiv
RT-PCR (reverse transcription PCR) – reverzní transkripce PCR
sgRNA (single-guide RNA) – samostatná naváděcí RNA
shRNA (short hairpin RNA) – krátká vlásenková RNA
SIR (short intergenic region) – krátká intergenní oblast
SRSR (short regularly spaced repeats) – krátké pravidelně rozmístěné repetice
ssDNA (single-stranded DNA) – jednovláknová DNA
TALEN (transcription activator-like effector nuclease) – transkripční aktivované
efektorové nukleázy

T-DNA (transfer DNA) – přenosová DNA
Ti (tumor inducing) – tumor indukující
Tracr RNA (transactivating CRISPR RNA) – transaktivující CRISPR RNA
VÚRV, v. v. i. – Výzkumný ústav rostlinné výroby
WDV (wheat dwarf virus) – virus zakrslosti pšenice
WDV-H (WDV-hordeum) – kmen WDV ječmene
WDV-W (WDV-wheat) – kmen WDV pšenice
ZFN (zinc finger nuclease) – nukleáza zinkového prstu

1 ÚVOD

Obilniny jsou nejdůležitějším zdrojem potravy pro člověka a krmiva pro hospodářská zvířata. Jejich celkový podíl na lidské výživě je odhadován na 60 až 70 %. Pšenice je nejdůležitější plodinou zajišťující výživu ve světě, ječmen je pak čtvrtou nejdůležitější plodinou. V České republice byly obilniny v roce 2019 pěstovány na 1 272 357 ha, z toho pšenice na 839 406 ha a ječmen na 319 583 ha.

V průběhu růstu jsou obilniny napadány nejrůznějšími patogeny, z nichž hospodářsky významnými jsou rostlinné viry. Pšenici i ječmen napadá virus zakrslosti pšenice (wheat dwarf virus – WDV). Taxonomicky je WDV řazen do rodu *Mastrevirus* z čeledi *Geminiviridae*. Čeleď *Geminiviridae* tvoří velká skupina rostlinných virů s jednovláknovou DNA (single-stranded DNA – ssDNA) napadající široký okruh hostitelů, které celosvětově způsobují velké ztráty na výnosu a kvalitě produkce. Z důvodu absence přirozené genetické rezistence je WDV rizikovým faktorem v produkci obilovin. Virus napadá zástupce z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) především pšenici (*Triticum*) a ječmen (*Hordeum*), dále pak triticales (*Triticosecale*), žito (*Secale*) a oves (*Avena*). Napadené rostliny žloutnou a zpomalí svůj růst. Virus způsobuje značné ztráty obilovin na výnosech, kterými ohrožuje produkci rostlin. Ochrana rostlin se soustředí pouze na preventivní opatření. Virus je přenášen křískem polním (*Psammotettix alienus*), kterému vyhovuje teplé a suché počasí.

V současné době se ukazuje, že jednou z možností, jak u rostlin získat rezistenci k WDV, je použití technologie genového inženýrství CRISPR/Cas. CRISPR/Cas je původně mechanismus adaptivní imunity prokaryotických organismů skládající se ze shluku pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR) a ke CRISPR přidružené (CRISPR-associated – Cas) nukleázy. CRISPR je tvořen úseky deoxyribonukleové kyseliny (deoxyribonucleic acid – DNA) nazývanými spacery oddělenými krátkými repetitivami. Tyto spacery pocházejí z viru nebo plazmidu, jejichž prvotní napadení bakterie přežila. Sekvence spaceru navádí protein Cas s nukleázovou aktivitou na komplementární úseky virové DNA. Upravený systém CRISPR/Cas

lze využít k editaci rostlinného genomu a předpokládá se, že lze využít i k vytvoření rezistence proti virovým chorobám.

Připravené vektory jsou do rostlinných buněk nejčastěji transformovány bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* je přirozeně se vyskytující patogenní bakterie schopná inkorporovat část své plazmidové DNA do genomu rostlinné buňky. Tého vlastnosti se využívá v genovém inženýrství.

V experimentální části bakalářské práce byly pomocí metody polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) analyzovány rostliny jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, L.), odrůdy Golden Promise T0 a T1 generace. Rostliny byly transformovány vektory nesoucí Cas9 a samostatnou naváděcí RNA (single guide RNA – sgRNA), komplementární s úsekem genů WDV *CP*, *MP*, *Rep*. Detekovány byly expresní kazety, amplikony byly separovány pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu.

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše.
 - Ječmen setý (*Hordeum vulgare*).
 - WDV a jeho dopady na zemědělskou produkci obilovin.
 - Transformace rostlin pomocí (*A. tumefaciens*).
 - Technologie CRISPR/Cas a její význam v genovém inženýrství.
 - Etické otázky a právní statut GMO

Experimentální část:

- Detekce expresní kazety v T0 a T1 generaci rostlin jarního ječmene pomocí PCR.
 - Izolace DNA z rostlin jarního ječmene.
 - PCR, amplifikace úseku expresní kazety kódující sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep.
 - Elektroforetická separace DNA v 1% agarózovém gelu.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Ječmen

3.1.1 Základní charakteristika ječmene

Ječmen představuje z botanického hlediska samostatný rod z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Tradiční taxonomie jej odlišuje od ostatních zástupců čeledi, například přítomností jednokvětých klásků vyrůstajících na větvení (lichu) klasu vždy po trojicích. Rod (*Hordeum*) původně zahrnoval zhruba 150 druhů, avšak s nástupem molekulárně genetických poznatků se počet samostatných druhů snížil na 32 druhů, dohromady 45 taxonů. Ječmeny lze podle počtu chromozomů rozdělit na diploidní ($2n = 2x = 14$), tetraploidní ($4n = 4x = 28$) a hexaploidní ($6n = 6x = 42$). Kulturní odrůdy ječmene tvoří jediný druh, ječmen setý (*Hordeum vulgare*), který je diploidní ($2n = 2x = 14$); podle uspořádání klasu rozlišujeme klas dvouřadý nebo šestiřadý.

Historie ječmene je přímo spojena s počátky zemědělství na blízkém východě (Von Bothmer *et al.*, 2003). V současné době je ječmen čtvrtou nejpěstovanější plodinou na světě. Předkem kulturních ječmenů je *Hordeum spontaneum*, divoká forma, která je velmi dobře adaptovaná na sucho a nejméně tolerantní na chladné podmínky prostředí. Z toho důvodu dozrává dříve než ostatní divoké cereálie (Willcox, 2005).

3.1.2 Kulturní formy ječmene

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) ($2n = 2x = 14$), dělíme na několik convariet. *H. v. convar. vulgare* – ječmen setý, víceřadý; u něj rozlišujeme dva typy: šestiřadý (hexastichon) a čtyřřadý (tetrastichon) – se všemi třemi plodnými klásky. Další je *H. v. convar. intermedium* – ječmen setý, přechodný; prostřední klásky plodné, postranní buď částečně, nebo zcela sterilní. Třetí *H. v. convar. distichon* – ječmen setý, dvouřadý; se třemi klásky, jen střední je plodný. Ječmen dvouřadý dále dělíme na varietu *nutans* (ječmen nící, háčkující), varietu *erectum* (ječmen vzpřímený), varietu *zeocrithon* (ječmen paví) a varietu *nudum* (ječmen

nahý). Poslední convarietou je *H. v. convar. labile* – ječmen setý, různotvarý; s nestejným počtem plodných klásků (Zimolka *et al.*, 2006).

Ječmen je pro svou značnou biologickou plastičnost schopen přizpůsobit se značně rozdílným růstovým podmínkám. Krátká vegetační doba, zvláště některých forem ječmene, spolu s poměrně nízkými mezními teplotami jeho počátečních růstových fází dovoluje jeho pěstování i v chladnějších podmínkách (Skládal *et al.*, 1967).

3.1.3 Kultivar Golden Promise

Kultivar Golden Promise, je sladovnický ječmen, který byl vyšlechtěn ve Skotsku; registrován v roce 1968. Je to radiomutant vzniklý ovlivněním kultivaru Maythorpe γ -paprsky (Forster, 2002). Nese mutaci projevující se ztrátou funkce ječmenného homologu (orthologu) pro gen rýže *DENSE AND ERECT PANICLE 1 (HvDEP1)*, genu kódujícím podjednotku heterotrimerického typu G-proteinu AGG3, který reguluje prodlužování stébla a velikost zrna (Wendt *et al.*, 2016). Kultivar Golden Promise je v současné době, díky vlastnostem v *in vitro* nepoužívanějším genotypem pro transformace, pro rychle se rozvíjející nové techniky šlechtění (new breeding techniques – NBT). Tyto nové metody úpravy genomu jsou stále více využívány ve výzkumu a šlechtění zemědělských plodin (Kapusi *et al.*, 2017).

3.1.4 Ječmen v České republice

Celková osevní plocha jarního ječmene a ozimého ječmene roce 2019 v České republice činila dle údajů Českého statistického úřadu 319 583 ha. Z toho osevní plocha jarního ječmene 211 876 ha.

(https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02A&z=T&f=TABULKA&skupId=346&katalog=30840&pvo=ZEM02A&evo=v533 ! ZEM02A-2019_1).

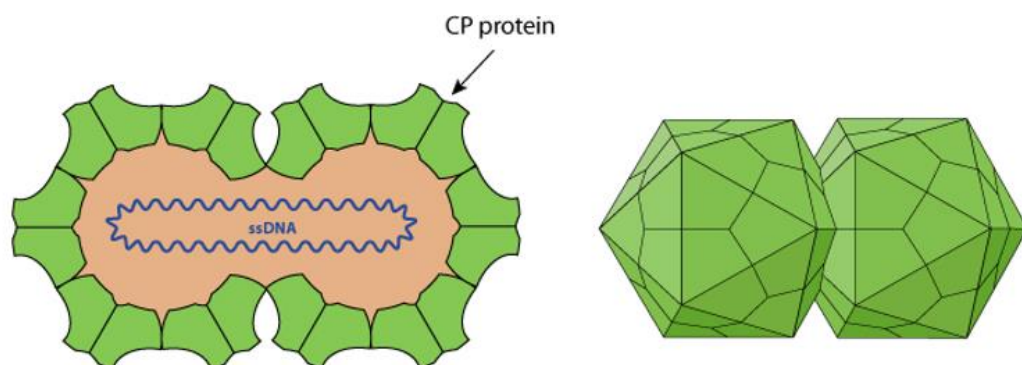
Využití ječmene je mnohostranné. V současné době ječmen dělíme dle užitkových směrů na: sladovnický, krmný, průmyslový, potravinářský a pícninářský. V podmínkách České republiky je ječmen využíván ve sladovnictví a je významným krmivem pro monogastriká zvířata. Ječmen má také

hypocholesterolemický účinek, zejména pro obsah β -glukanů, antioxidantů a podíl vlákniny. Ječmene je také využíván při šlechtění nových druhů obilnin např. (tritordeum) (Zimolka *et al.*, 2006).

3.2 Virus zakrslosti pšenice

3.2.1 Základní charakteristika WDV

WDV je ekonomicky závažný, floém limitovaný, hmyzem přenášený virus zařazený do rodu *Mastrevirus* z čeledi *Geminiviridae* (Tholt *et al.*, 2018). Geminiviry, velká rodina rostlinných DNA virů, způsobují vážné ztráty výnosů plodin s ekonomickými důsledky, které ohrožují celosvětovou dostupnost potravin, zvláště pak v málo rozvinutých oblastech jako je subsaharská Afrika (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Viry z čeledi *Geminiviridae* mají dvojitou ikosahedrickou strukturu kapsidy, která obaluje kruhovou ssDNA o délce mezi 2,3 a 3 kilobází (kilobase – kb) (Obrázek 1). Replikace genomu Geminivirů probíhá buď replikací otáčivé kružnice (rolling-circle replication – RCR) přes replikační formu dvouvláknové DNA (double-stranded – dsDNA), nebo rekombinací zprostředkovanou replikací (Gutierrez, 1999). Geminiviry nekódují svou vlastní DNA polymerázu, místo toho reaktivují S fázi buněčného cyklu a využívají buněčný aparát pro replikaci vlastního genomu (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Replikace virového genomu probíhá v buněčném jádře (Gafni, 2003). Čeleď *Geminiviridae* se taxonomicky dělí na 7 rodů (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Turncurtovirus* a *Topocuvirus*) na základě organizace genomu, hostitelského okruhu, hmyzích vektorů a sekvenční podobnosti genomu (Lapidot *et al.*, 2014).



Obr. 1. Morfologie virionu čeledi *Geminiviridae*

Převzato z: [https://Geminiviridae ~ ViralZone \(expasy.org\)/109](https://Geminiviridae~ViralZone(expasy.org)/109)

3.2.2 Patogenita WDV

WDV je schopen infikovat široký okruh hostitelů z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) včetně ekonomicky významných obilnin zahrnujících pšenici, ječmen, oves a rýži a divoké trávy (Fuchs *et al.*, 2000). Poprvé byl popsán Dr. Vacke z bývalého Československa (Vacke, 1961). Následně byl důkladně popsán v několika zemích. Z evropských zemích se jedná o Německo, Maďarsko, Francii, Finsko a Turecko (Köklü *et al.*, 2007). Mimo Evropu pak v Tunisku (Najar *et al.*, 2000), Zambii (Kapooria and Ndunguru, 2004) a Číně (Xie *et al.*, 2007). V České republice byl z polních vzorků pšenice a ječmene potvrzen výskyt dvou kmenů WDV, z nichž jeden je adaptován na pšenici (WDV wheat – WDV-W) a jeden na ječmen (WDV hordeum – WDV-H) (Lindsten and Vacke, 1991). Kmeny WDV infikující pšenici i ječmen způsobují vážné ztráty na výnosech; přírodní zdroje rezistence jsou omezené (Nygren *et al.*, 2015). Oba kmeny WDV (WDV-W a WDV-H) jsou příčinami zakrslosti, mramorování, pruhování listů, silného zakrnění, a dokonce mohou způsobit až odumření rostlin (hlavně u pšenice, ječmene a ovsa) (Lindsten and Vacke, 1991).

Poznatky související s WDV naznačují, že některé izoláty přednostně infikují pšenici, zatímco jiné přednostně infikují ječmen. To umožnilo definovat kmen WDV-W a kmen WDV-H. V literatuře však existují protichůdné závěry týkající se schopnosti obou kmenů infikovat svého nepreferovaného hostitele. Pro zlepšení znalostí o interakcích obou kmenů WDV s pšenicí a ječmenem byly Dr. Isabelle Abt provedeny přenosové experimenty obou kmenů zprostředkované jedinci *P. alienus* identifikovanými na základě přítomnosti specifických genů. Výsledky experimentu ukázaly: (I) kmeny WDV jsou přenášeny se stejnou účinností samci, samicemi a larvami *P. alienus*, (II) WDV-W a WDV-H kmeny nedokáží samostatně infikovat nepreferované druhy obilnin, (III) funkční překřížení mezi pšeničnými a ječmennými kmeny dovoluje smíšené infekce pšenice a ječmene (Abt *et al.*, 2020).

3.2.3 Přenos WDV

WDV je přenášen mezi rostlinami v perzistentním, neaktivním stavu (Brault *et al.*, 2010) prostřednictvím kříسů z rodu *Psammotettix*. Jedná se o holarktické druhy běžně se vyskytující v obilných polích a na pastvinách (Lindblad and Arenó, 2002). Většina publikovaných údajů označuje za hlavního přenašeče WDV *P. alienus* (Obrázek 2, Obrázek 3) (Zhang *et al.*, 2010), jehož životní cyklus byl důkladně studován (Manurung *et al.*, 2005). Nicméně WDV může kromě *P. alienus* přenášet i *P. provincialis* (Ekzayez *et al.*, 2011).



Obr. 2. Křísek polní (*Psammotettix alienus*) ♀ Imago

Převzato z: <https://truehopperswp.com/species/psammotettix-alienus#image-1>



Obr. 3. Křísek polní (*Psammotettix alienus*) ♂ Imago

Převzato z: <https://truehopperswp.com/species/psammotettix-alienus #image-2>

3.2.4 Genom WDV

Genom WDV (Obrázek 4) se skládá ze čtyř otevřených čtecích rámců (open reading frame – ORF), spojených do dvou oddělených celků: virion-sense ORFs, kódující pohybový protein (movement protein – MP) zapojený do systémové infekce a obalový protein (coat protein – CP); complementary-sense ORFs, kódující replikační proteiny (replication protein – Rep) RepA a RepB (Mullineaux *et al.*, 1990). Genom WDV obsahuje také dvě nekódující sekvence; dlouhou a krátkou intergenní oblast (LIR a SIR), které obsahují sekvence důležité pro replikaci viru a pro regulaci genové exprese (Hofer *et al.*, 1992). Dlouhá intergenní oblast (long intergenic region – LIR) a krátká intergenní oblast (short intergenic region – SIR) jsou nejvíce variabilními částmi genomu (Schubert *et al.*, 2007).



Obr. 4. Schéma genomu WDV

3.2.5 Replikační protein WDV

Doména Rep WDV je HUH endonukleáza (HUH endonuclease – HUH–tag) (Lovendahl *et al.*, 2017). Tyto proteiny byly identifikovány jak ve virových (Eisenberg *et al.*, 1977) tak bakteriálních (Ilyina and Koonin, 1992) genomech a hrají důležitou roli v procesech jako je RCR. Histidinový nepolární zbytek – histidinový motiv (histidine-nonpolar residue-histidin motif – HUH), od kterého je odvozen název proteinové skupiny, umožňuje koordinaci kovových iontů nezbytných pro funkci endonukleázy. Po navázání specifické, konzervativní sekvence ssDNA protein štěpí vlákno a následně se váže na jeho 5' konec fosfotyrosinovou vazbou. To umožňuje zahájení replikace kruhové ssDNA oddělením 5' konce DNA (Chandler *et al.*, 2013).

3.3 Transformace rostlin

3.3.1 Mechanismus transformace pomocí *A. tumefaciens*

Virulentní kmeny bakterie *A. tumefaciens* nesoucí tumor indukující (tumor inducing – Ti) plazmid o velikosti 200 kb jsou schopné integrovat část své DNA do genomu rostlinných buněk (Labereke *et al.*, 1974). Tento přenos bakteriální DNA do genomu rostlinné buňky vede k tvorbě nádorů způsobených indukci buněčného dělení (Schilperoort *et al.*, 1967). K integraci DNA dochází na jaderných chromozomech, nikoli v genomech chloroplastů a mitochondrií. Fragment Ti plazmidu o velikosti 23 kb, označovaný jako přenosová DNA (transfer DNA – T-DNA), je pomocí bakteriálních endonukleáz vystřižen z plazmidu a dalšími bakteriálními proteiny přemístěn do jádra rostlinné buňky, kde dochází k náhodné integraci (Chilton *et al.*, 1980).

Objev možnosti přenosu DNA do rostlin prostřednictvím *A. tumefaciens* našel využití v genovém inženýrství. Jakmile se endonukleázy staly dostupnými, byly geny T-DNA odstraněny rekombinantními technologiemi a nahrazeny zájmovými geny. Tento přirozený a efektivní mechanismus přenosu genů mezi bakterií a rostlinami se rychle změnil na standardní a rutinní technologii k dosažení rostlinné transgenózy. Tato široce používaná technika je využívána jak v základním, tak i v aplikovaném výzkumu. S jejím využitím jsou vytvářeny geneticky modifikované rostliny (genetically modified organism – GMO) se změněnými agronomickými vlastnostmi (Horsch *et al.*, 1985).

3.4. CRISPR/Cas9

3.4.1 CRISPR/Cas systémy

V přirozené podobě mají systémy CRISPR/Cas funkci mechanismu adaptivní imunity, která v bakteriích a archeách zajišťuje sekvenčně specifickou imunitu proti cizí DNA nebo ribonukleové kyselině (ribonucleic acid – RNA); (Marraffini and Sontheimer, 2008). CRISPR/Cas systémy se vyskytují přibližně ve 40 % bakteriálních genomů a v 70 % sekvenovaných druhů archea (Burstein *et al.*, 2016). CRISPR/Cas lokus se skládá z CRISPR segmentu a *cas* genů. CRISPR segment obsahuje krátké repetice oddělené krátkými variabilními sekvencemi DNA, nazývanými spacersy. Imunitní odezva CRISPR/Cas systému se skládá ze tří hlavních fází: adaptační, expresní a interferenční (Barrangou, 2013).

V adaptační fázi se komplex rozdílných Cas proteinů naváže na vlákno cizí invazní DNA, často po rozpoznání konkrétního, krátkého motivu označovaného jako přilehlý protospacerový motiv (protospacer adjacent motif – PAM) a vystřihne část cílové DNA, protospacer. Na 5' konci CRISPR segmentu následně dojde k duplikaci repetice. Adaptační komplex Cas proteinů vloží DNA protospaceru mezi tyto nové repetice v CRISPR segmentu. Začleněním do CRISPR lokusu se z protospacerové DNA stává nový spacer. Některé systémy CRISPR/Cas využívají alternativní mechanismus adaptace, konkrétně získávání spacerů z RNA prostřednictvím reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy kódované v CRISPR/Cas lokusu.

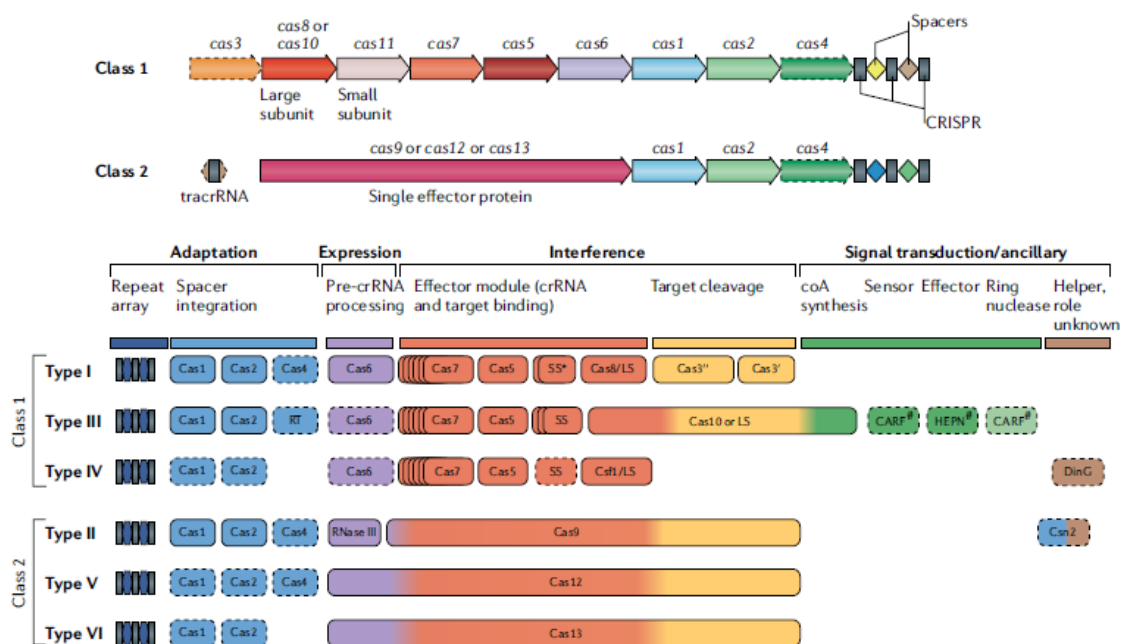
V expresní fázi se segment CRISPR obvykle přepisuje v celku jako jediný transkript. Tato primární CRISPR RNA (pre-CRISPR RNA – pre-crRNA) je následně zpracována na jednotlivé funkční CRISPR RNA (crRNA), z nichž každá obsahuje spacerovou sekvenci a repetici. U popsaných variant CRISPR/Cas systémů je zpracování pre-crRNA zprostředkováno specifickou podjednotkou multiproteinového Cas komplexu, jedním multidoménovým Cas proteinem nebo jinou nukleázou.

V interferenční fázi slouží crRNA, která obvykle zůstává vázána na Cas protein, jako naváděcí sekvence k rozpoznávání protospaceru nebo velmi podobné sekvence v invazním genomu viru nebo plazmidu, který je poté štěpen a inaktivován Cas nukleázou nebo nukleázami (Koonin and Makarova, 2019).

Podobně jako jiné biologické obranné mechanismy, i CRISPR/Cas systémy bakterií a archea vykazují širokou rozmanitost stavby proteinu Cas, skladbu genů a uspořádání genomových lokusů (Klompe *et al.*, 2018). Znalosti o této rozmanitosti se neustále rozšiřují díky skríníngu stále obsáhlejších genomických a metagenomických databází (Makarova *et al.*, 2018). Nová klasifikace z roku 2020 zahrnuje 2 třídy, 6 typů a 33 podtypů ve srovnání s 5 typy a 16 podtypy v roce 2015. Významným je zejména rozšíření klasifikace CRISPR/Cas o mnoho nových systémů třídy 2, která nyní zahrnuje 3 typy a 17 podtypů. Druhou významnou novinkou je objev mnoha odvozených variant CRISPR/Cas, často asociovaných s mobilními genetickými prvky, které postrádají nukleázy potřebné pro interferenci (Makarova *et al.*, 2020). Některé z těchto variant typu I zprostředkovávají naváděcí RNA (guide RNA – gRNA) řízenou transpozici (Klompe *et al.*, 2019). Zatímco u jiných se předpokládá, že budou vykonávat funkce odlišné od adaptivní imunity, jako například přenos signálu, přechod do dormance nebo apoptózu, které je třeba experimentálně charakterizovat (Shmakov *et al.*, 2018). Třetím významným poznatkem je objev mnoha skupin pomocných genů asociovaných s CRISPR, které jsou často zapojeny do přenosu buněčných signálů (Makarova *et al.*, 2020). Funkce těchto pomocných genů v systémech CRISPR/Cas zatím nebyla s výjimkou genu ribonukleázy *Csm6* objasněna. Ribonukleáza *Csm6* je alosterický enzym zapojený v systému CRISPR/Cas podtypu III-A do obrany před invazními plazmidy, nespecificky štěpí plazmidovou RNA. Enzym *Csm6* je aktivován rozštěpením cyklického oligoadenylátu (cyclic oligoadenylat – coA), který je syntetizován *cas10* polymerázou (Koonin and Makarova, 2018).

Klasifikace systémů CRISPR/Cas je založena především na rozdílech ve složení Cas proteinů a rozdílných funkčních modelech (Obrázek 5) (Makarova *et al.*, 2018). Efektorové komplexy třídy 1 zapojené do zpracování pre-crRNA a rozpoznávání cílů mají podobnou strukturu mezi typy I, III a IV, ačkoli zachování sekvence mezi těmito třemi typy je minimální (Özcan *et al.*, 2019). Základ efektorových komplexů ve všech třech typech třídy 1 tvoří necharakterizované s CRISPR repeticemi asociované proteiny (repeat-associated mysterious protein – RAMP) Cas5 a Cas7. Jedná se o vzdáleně příbuzné proteiny obsahující RNA rozpoznávající motiv (RNA recognition motif – RRM), které jsou obvykle v genomu přítomny ve více kopiích. Ve většině

systémů CRISPR/Cas třídy 1 je třetím RAMP Cas6, ribonukleáza vyhrazená pro zpracování pre-crRNA, která může nebo nemusí být fyzicky spojena s efektorovým komplexem. RAMP jsou charakterizovány extrémní různorodostí aminokyselinových sekvencí, takže spojitost mezi sekvencemi Cas5, Cas6 a Cas7 z různých podtypů mohla být prokázána pouze pomocí nejcitlivějších metod pro srovnání sekvencí proteinových profilů nebo přímým porovnáním proteinových struktur (Makarova *et al.*, 2020).



Obr. 5. Systémy CRISPR/Cas
Převzato z Makarova *et al.*, 2020

Efektorové komplexy třídy 1 se dále skládají z velké a malé podjednotky. Velká podjednotka, tvořená v systému typu I proteinem Cas8 a v systému typu III proteinem Cas10, zaujímá v efektorových komplexech analogické pozice. Nevykazuje však žádnou sekvenční podobnost a pouze vzdálenou strukturní podobnost. Otázka, zda jsou Cas8 a Cas10 homologní zůstává nadále otevřená (Makarova *et al.*, 2011). Sekvence proteinů Cas8 navíc nevykazují žádnou detekovatelnou podobnost ani mezi některými podtypy třídy 1, takže příslušné varianty mohou sloužit k rozlišení podtypů. Malá podjednotka efektorových komplexů třídy 1 (Cas11) nevykazuje žádnou statisticky významnou sekvenční podobnost mezi systémy typu I a III, ale strukturní podobnosti mezi proteiny Cas11, stejně jako mezi Cas11 a C-terminální α -helix doménou Cas10 silně

naznačují, že se jedná o velmi odlišné homology (Venclovas, 2016). V systému typu I je klíčovou samostatnou složkou efektorového modulu Cas3. Tento velký protein, který se obvykle skládá z fúzované helikázy a histidin-aspartátových nukleázových domén (histidine-aspartic domain – HD), je přímo zodpovědný za štěpení cílové DNA. Typ III se zásadně odlišuje začleněním HD nukleázy do Cas10, čímž vzniká velká podjednotka komplexu podílející se na transkripčně závislém štěpení cílové DNA.

Systémy CRISPR/Cas typu IV jsou vysoce odvozené varianty, které obvykle postrádají adaptační moduly i nukleázy potřebné pro interferenci. Kromě toho pouze proteiny Cas5 a Cas7 jsou v lokusech typu IV snadno identifikovatelné podle sekvenční podobnosti s jejich analogy v jiných typech. Nedávné srovnání struktur efektorových komplexů systémů typu IV a I identifikovalo podobnost u velké podjednotky efektorového komplexu typu IV (Özcan *et al.*, 2019), což naznačuje, že systémy typu IV mohou být vysoce odlišnými deriváty typu I nebo typu III.

Systémy třídy 2 tvoří typy II, V a VI, které se funkčním modelem a stavbou své domény zřetelně odlišují od ostatních typů. V systémech třídy 2 vykonávají efektorovou funkci samostatné velké proteiny. (Shmakov *et al.*, 2017). Typy a podtypy se ve třídě 2 podstatně liší v ohledu mechanismů zpracování pre-crRNA (Chyou and Brown, 2019). V systémech typu VI a podtypu V-A zajišťuje velký efektorový protein také aktivitu ribonukleázy zpracovávající pre-crRNA, zatímco u typu II a několika podtypů typu V je tato aktivita obvykle přenesena na ribonukleázu III, která nepatří mezi Cas proteiny (Liu *et al.*, 2017). V případě typu II a několika podtypů typu V zahrnuje efektorový modul další molekulu RNA, transaktivující CRISPR RNA (transactivating CRISPR RNA – tracrRNA), která vytváří stabilní duplexy s částečně komplementárním přímým opakováním pre-crRNA. Po odštěpení RNA duplexu pomocí ribonukleázy III zůstává funkční gRNA, komplex crRNA-tracrRNA, stabilně navázaná na efektor, což umožňuje specifické štěpení DNA (Chyou and Brown, 2019).

Sada proteinů Cas1 až Cas13, která obsahuje adaptační a efektorové moduly, definuje typy a podtypy v 2. třídě CRISPR/Cas. Toto jádro je doprovázeno řadou pomocných proteinů, které jsou volněji asociovány s CRISPR/Cas. Množství identifikovaných pomocných genů se v poslední době podstatně rozšířilo, a to především díky využívání specializovaných výpočetních

protokolů pro systematickou detekci genů spojených s CRISPR (Shah *et al.*, 2019).

3.4.2 Historie metody CRISPR/Cas9

Historie objevu metody CRISPR/Cas9 začíná v roce 1987, když Yoshizumi Ishino se svými kolegy jako první objevil sekvenci CRISPR během studia izoenzymové přestavby alkalické fosfatázy (alkaline phosphatase – AP). Při hledání proteinu zodpovědného za přestavbu izoenzymu AP v periplazmě buněk *E. coli* K-12 sekvenovali fragment DNA o velikosti 1,7 kb nesoucí gen izoenzymu alkalické fosfatázy (isozyme of alkaline phosphatase – *iap*). Během sekvenování fragmentu DNA objevili zvláštní opakující se sekvenci za terminačním kodonem genu *iap*. Tato sekvence se nepochybně podobala žádné doposud známé sekvenci v sekvenčních databázích (Ishino *et al.*, 1987). Brzy poté byly objeveny podobné sekvence pomocí Southern blotu i v dalších kmenech *E. coli* (Nakata *et al.*, 1989) stejně jako v dalších druzích bakterií (Hermans *et al.*, 1991).

Objev metody CRISPR/Cas9 dále pokračuje v roce 1993, když Francisco Mojica s kolegy objevil zvláštní strukturu ve fragmentu DNA z halofilního mikroorganismu archea *Haloferax mediterranei*. Strukturu tvořilo několika kopií, téměř dokonalých, zhruba palindromických, opakujících se sekvencí 30 bází, oddělených spacery o zhruba 36 bázích. (Mojica *et al.*, 1993). Mojica s kolegy následně objevil podobné repetice i v dalších archeách a v odborné literatuře našel spojitost repetic s bakteriemi. Mojica a jeho spolupracovníci si uvědomili, že přítomnost tak podobných struktur u velmi vzdálených mikrobů signalizuje její důležitou funkci u prokaryot (Mojica *et al.*, 1995). Do roku 2000 Mojica s kolegy objevil CRISPR lokus v dalších 20 mikrobech, aniž by však objevil jejich funkci (Mojica *et al.*, 2000). Proto se Mojica a jeho kolegové rozhodli podivné repetice prozkoumat pomocí bioinformatiky. Samotné repetice nazvali krátkými pravidelně rozmístěnými repeticemi (short regularly spaced repeats – SRSR) (Mojica and Garrett, 2012). Název repetic později změnil Jansen s kolegy na shluk pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic (CRISPR), který lépe charakterizoval strukturu repetic a byl přijat i ostatními vědci studujícími tyto repetice. Jansen s kolegy také objevil existenci čtyř

konzervativních genů nacházejících se v těsné blízkosti CRISPR segmentu. Tyto geny nazvali jako *cas* geny 1 až 4 (Jansen *et al.*, 2002).

V roce 2003 Mojica s kolegy přenesl svoji pozornost od repetice ke spacerům, které je oddělují. U jednoho spaceru z CRISPR lokusu pocházejícího z *E. coli* nakonec objevili odpovídající sekvenci v genomu bakteriofága P1, který napadá mnoho kmenů *E. coli*. Avšak u konkrétního kmene *E. coli*, který nesl spacer byla známa rezistence k infekci P1 fágem. Z 88 spacerů, u nichž se podařilo objevit shodnou sekvenci, se dvě třetiny shodovaly s viry nebo konjugovanými plazmidy, které souvisely s mikroben nesoucím spacer. Mojica s kolegy si uvědomil, že CRISPR lokusy musí kódovat instrukce pro adaptivní imunitní systém, který chrání mikroby před konkrétními infekcemi (Mojica *et al.*, 2005).

V roce 2005 se doktor Philippe Horvath ve spolupráci s Rodolphem Barrangouem, Sylvainem Moineauem a dalšími kolegy rozhodl přímo otestovat hypotézu, že CRISPR je adaptivní imunitní systém. Pokus byl založen na genetické selekci pro získání bakterií rezistentních k bakteriofágům. K selekci byl použit dobře charakterizovaný kmen *S. thermophilus* citlivý k infekci bakteriofágy a dva druhy bakteriofágů. U získaných rezistentních kmenů došlo k získání sekvencí odvozených od bakteriofága v CRISPR lokusech. Dále pozorovali, že množství vložených spacerů souvisí se zvýšením odolnosti. Horvath a jeho spolupracovníci tedy prokázali funkci CRISPR jako systému získané imunity. Studovali dále roli dvou *cas* genů, *cas7* a *cas9*. Bakterie vyžadovaly *cas7* pro získání rezistence. Avšak bakterie již nesoucí spacer odvozený z bakteriofága gen *cas7* pro zachování rezistence nevyžadovaly. Toto zjištění naznačovalo, že Cas7 se účastní tvorby nových spacerů a repetice, ale ne samotné imunity. Naopak *cas9* byl nezbytný pro rezistenci k bakteriofágu. Z toho usoudili, že protein Cas9 je aktivním komponentem bakteriálního imunitního systému. Závěrem zjistili, že imunita závisí na přesné shodě sekvence DNA mezi spacerem a cílem (Barrangou *et al.*, 2007).

Další významný posun v pochopení mechanismu CRISPR učinil s kolegy John van der Oost. CRISPR systém bakterie *E. coli* vložili do odlišného kmene *E. coli* postrádajícího svůj vlastní CRISPR systém. To umožnilo biochemicky charakterizovat komplex pěti Cas proteinů, označených jako CasCade (Brouns *et al.*, 2008). Oddělenou inaktivací jednotlivých složek prokázali, že CasCade

je potřebný pro odštěpení 61 nukleotidů dlouhé crRNA z precrRNA, transkribované z CRISPR lokusu. Po naklonování a sekvenaci souboru crRNA, které vyizolovali společně s CasCade komplexem zjistili, že všechny začínají osmi posledními bázemi z opakující se sekvence, následovanými kompletním spacerem a začátkem další opakující se sekvence. Toto zjištění podpořilo dřívější hypotézy, že palindromická povaha repetice může sloužit k tvorbě sekundární struktury crRNA (Sorek *et al.*, 2008). Aby prokázali, že sekvence crRNA jsou zodpovědné za rezistenci založenou na CRISPR, rozhodli se vytvořit první umělý segment CRISPR. Naprogramovali CRISPR, aby cílil na čtyři významné geny bakteriofágu *lambda*. Podle očekávání byly kmeny nesoucí nové sekvence CRISPR rezistentní vůči bakteriofágu *lambda* (Brouns *et al.*, 2008).

Luciano Marraffini usuzoval, že CRISPR musí štěpit DNA a ve skutečnosti funguje jako restriční enzym. Při svém výzkumu navázal spolupráci s Erikem Sontheimerem a společně zkoumali, zda dokáže CRISPR systém bakterie *Staphylococcus* zabránit konjugaci plazmidů. Všimli si, že kmen *Staphylococcus epidermidis* nese sekvenci, která se shoduje s úsekem plazmidu, kódujícím gen *nes*, ve kmeni *Staphylococcus aureus*. Zjistili, že tento plazmid lze přenést do *Staphylococcus epidermidis* pouze po narušení *nes* sekvence plazmidu nebo odpovídajících sekvencí spacerů v CRISPR lokusu. Jejich výzkum tím prokázal, že CRISPR poskytuje adaptivní imunitu nejen proti virům ale i plazmidům. Marraffini a Sontheimer upravili *nes* gen v plazmidu na nějž cílil CRISPR, vložením intronu doprostřed sekvence. Pokud by CRISPR cílil na informativní RNA (messenger RNA – mRNA), změna by neovlivnila jeho funkci, protože intronová sekvence bude vystřižena. Pokud by naopak CRISPR cílil na DNA, inserce naruší jeho funkci, protože sekvence spaceru se již nebude shodovat. Výsledek experimentu jednoznačně prokázal, že systém CRISPR cílí na DNA (Marraffini and Sontheimer 2008).

Sylvain Moineau se s kolegy zabýval pochopením mechanismu, kterým CRISPR štěpí DNA. Problém spočíval v tom, že CRISPR byl obvykle tak účinný, že Moineau a jeho kolegové nemohli snadno pozorovat, jak byla invazní DNA rozložena. Výzkumná skupina objevila několik bakteriálních kmenů *S. thermophilus*, u nichž CRISPR poskytoval pouze částečnou ochranu před plazmidy vloženými elektroporací. Proces štěpení plazmidů byl dostatečně zpomalen, aby mohli pozorovali funkci přímých produktů CRISPR (Garneau

et al., 2010). V souladu s dřívějšími výsledky došli k závěru, že štěpení plazmidu zprostředkovává Cas9 nukleáza (Barrangou *et al.*, 2007). Při sekvenování linearizovaných plazmidů objevili jedinou pozici štěpení s tupými konci, která se nachází 3 nukleotidy před PAM sekvencí. Tato PAM sekvence je klíčovým znakem štěpené sekvence. Při dalších analýzách zjistili, že konkrétní pozice štěpení virové DNA se také vztahuje k PAM sekvenci. Jejich výsledky definitivně prokázali, že Cas9 nukleázy štěpí DNA v přesných místech kódovaných specifickými sekvencemi crRNA (Horvath *et al.*, 2008).

Emmanuelle Charpentier a Jörg Vogel při identifikaci regulačních RNA v mikrobech objevili, že třetí nejvíce zastoupenou třídou transkriptů, hned po ribozomální a transferové RNA, je nově objevená malá RNA. Tato RNA o velikosti 25 bází s téměř dokonalou komplementaritou ke CRISPR repetičím byla transkribována ze sekvence bezprostředně sousedící s CRISPR lokusem. Komplementarita sekvence tracrRNA se sekvencí RNA nesoucí jednotlivé crRNA naznačovala, že spolu obě RNA hybridizují a jsou zpracovány na hotové produkty štěpením ribonukleázou III. Experimentální genetické pokusy založené na delecii tuto teorii potvrdily a prokázaly, že tracrRNA je nezbytná pro zpracování crRNA a tedy pro funkci CRISPR (Deltcheva *et al.*, 2011). Následné biochemické studie ukázaly, že tracrRNA se neuplatňuje pouze při zpracování crRNA, ale je také nezbytná pro funkci nukleázového komplexu Cas9 při štěpení DNA (Siksnys *et al.*, 2012).

Virginus Siksnys se spolu se svými spolupracovníky rozhodl zjistit, zda lze systém CRISPR ze *S. thermophilus* znovu sestavit v plně funkční podobě ve vzdálené bakterii *E. coli*. Zjistili, že celý přenesený CRISPR lokus byl dostatečně účinný, aby způsoboval cílené štěpení jak plazmidové tak bakteriofágové DNA (Sapranaukas *et al.*, 2011). Pomocí svého heterologního systému také dokázali, že Cas9 je jediným proteinem potřebným pro štěpení DNA, konkrétně jeho RuvC a HNH nukleázové domény (Makarova *et al.*, 2006).

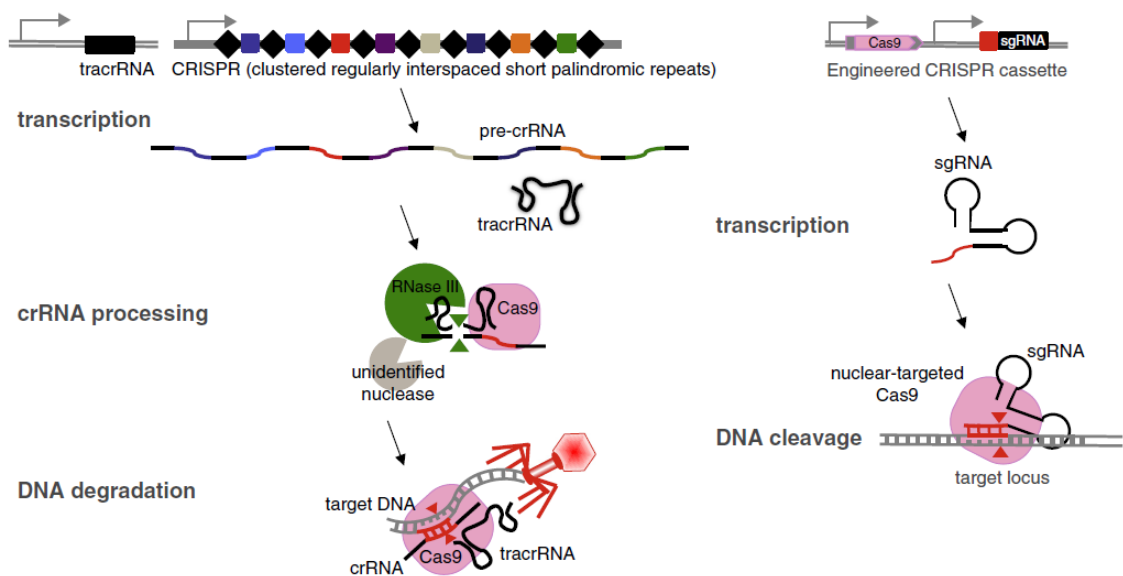
Siksnys a jeho kolegové izolovali komplex Cas9-crRNA ze *S. thermophilus* navázáním proteinu Cas9 na streptavidin a následně studovali jeho aktivitu *in vitro* (Gasiunas *et al.*, 2012). Pozorovali, že komplex CRISPR/Cas9 štěpí cílovou DNA *in vitro*, tvorbou tupých dvouvláknových zlomů (double-stranded break – DSB) přesně tři nukleotidy od PAM sekvence. Nejvýznamnějším poznatkem experimentu bylo prokázání možnosti přeprogramovat Cas9 pomocí

uměle navržených spacerů v CRISPR segmentu tak, aby v *in vitro* podmínkách štěpil zvolené místo. Mutacemi katalytických zbytků HNH a RuvC nukleázových domén také prokázali, že první doména štěpí vlákno komplementární k crRNA zatímco druhá štěpí vlákno opačné. Dále pozorovali, že i při zkrácení crRNA na pouhých 20 nukleotidů stále dosahují účinného štěpení. V souhrnu Siksnyš prokázal, že systém CRISPR/Cas9 lze znovu sestavit i jiným způsobem, kombinací purifikovaného His-vázaného Cas9 a *in vitro* transkribované tracrRNA, crRNA a ribonukleázy III a že oba druhy RNA jsou nezbytné pro štěpení DNA proteinem Cas9 (Siksnyš *et al.*, 2012). Emmanuelle Charpentier a Jennifer Doudna použili rekombinantní Cas9 a *in vitro* transkribovanou crRNA a tracrRNA. Stejně jako Siksnyš prokázali, že Cas9 může *in vitro* štěpit purifikovanou DNA, že může být naprogramován pomocí uměle navržených crRNA, že dvě nukleázové domény štěpí protilehlé řetězce a že pro funkci Cas9 je zapotřebí jak crRNA tak tracrRNA. Kromě toho dokázali, že *in vitro* mohou obě spojené RNA fungovat jako sgRNA. Po dalších úpravách pro efektivní funkci *in vivo*, se koncept sgRNA stal široce používaný při editaci genomu (Jinek *et al.*, 2012).

3.4.3 Technologie CRISPR/Cas9

V přirozené podobě systému CRISPR/Cas9 jsou z invazivní virové nebo plazmidové DNA pomocí nukleáz Cas1 a Cas2 vystřiženy krátké úseky (protospacer) nacházející se před 5'-NGG-3' PAM motivem. Tyto úseky jsou včleněny do bakteriálního genomu v podobě nehomologních sekvencí (spacer) uspořádaných v pravidelných opakováních s krátkými, vysoce homologními repeticemi (interspaced) s nimiž tvoří CRISPR segment. CRISPR segment je transkribován v celku jako protocrRNA. Současně dochází k transkripci tracrRNA z odlišné části CRISPR/Cas9 lokusu, která je nezbytná pro přestavbu proteinu Cas9 do aktivní formy a zprostředkování vazby crRNA na Cas9 prostřednictvím komplementární sekvence ke CRISPR repetici. Jednotlivé funkční crRNA jsou po vytvoření vazby s komplexem tracrRNA/Cas9 následně vystřiženy z protocrRNA pomocí ribonukleázy III. Funkční transkripty spacer sekvencí crRNA následně navádějí endonukleázu Cas9 na komplementární sekvenci, za níž musí následovat PAM motiv (Makarova *et al.*, 2020).

Protein Cas9 lze přeprogramovat pro cílené štěpení jakékoliv zájmové sekvence DNA, po níž následuje PAM motiv pomocí jednoduše navržené gRNA (Obrázek 6). Sekvence navržené gRNA o velikosti 20 nukleotidů navádí Cas9 na základě komplementarity bází na cílovou sekvenci. Spojením crRNA a tracrRNA lze sestavit jedinou sgRNA nesoucí 20 nukleotidovou gRNA sekvenci na 5' konci (Wright *et al.*, 2016). Vlákno sgRNA se tedy skládá ze sekvence 20 nukleotidů homologních s cílovou genomickou oblastí, následovaných krátkou vlásenkovou RNA (short hairpin RNA – shRNA). Protein Cas9 indukuje tvorbu DSB, které jsou umístěny tři páry bází směrem k 5' konci od pozice PAM (Nekrasov *et al.*, 2013). Sestrojení sgRNA výrazně zjednodušuje systém CRISPR/Cas9 na minimální počet dvou komponent, Cas9 a sgRNA, čímž vzniká velmi jednoduchý a účinný nástroj pro genové inženýrství (Obrázek 6). Systém CRISPR/Cas9 díky jednoduchosti sestavení sgRNA překonal starší systémy (Eid and Mahfouz, 2016).



Obr. 6. Srovnání systému adaptivní imunity a technologie genového inženýrství CRISPR/Cas9

Převzato z Belhaj *et al.*, 2015

Dříve vyvinuté a používané technologie nukleázy zinkového prstu (zinc finger nuclease – ZFN) a *transkripční aktivované* efektorové nukleázy (transcription activator-like effector nuclease – TALEN) jsou uměle navržené dvousložkové enzymy, které se skládají z upravitelné domény pro vazbu DNA a nukleázové domény Fok1. U obou enzymů může být DNA vazebná doména

navržena pro rozpoznávání specifické DNA sekvence. Navržení a klonování velkých modulovatelných proteinů je pracné a nákladné. Navíc existuje vysoká míra selhání při rozpoznání a štěpení zamýšlené DNA sekvence, alespoň u ZFN (Voytas, 2013).

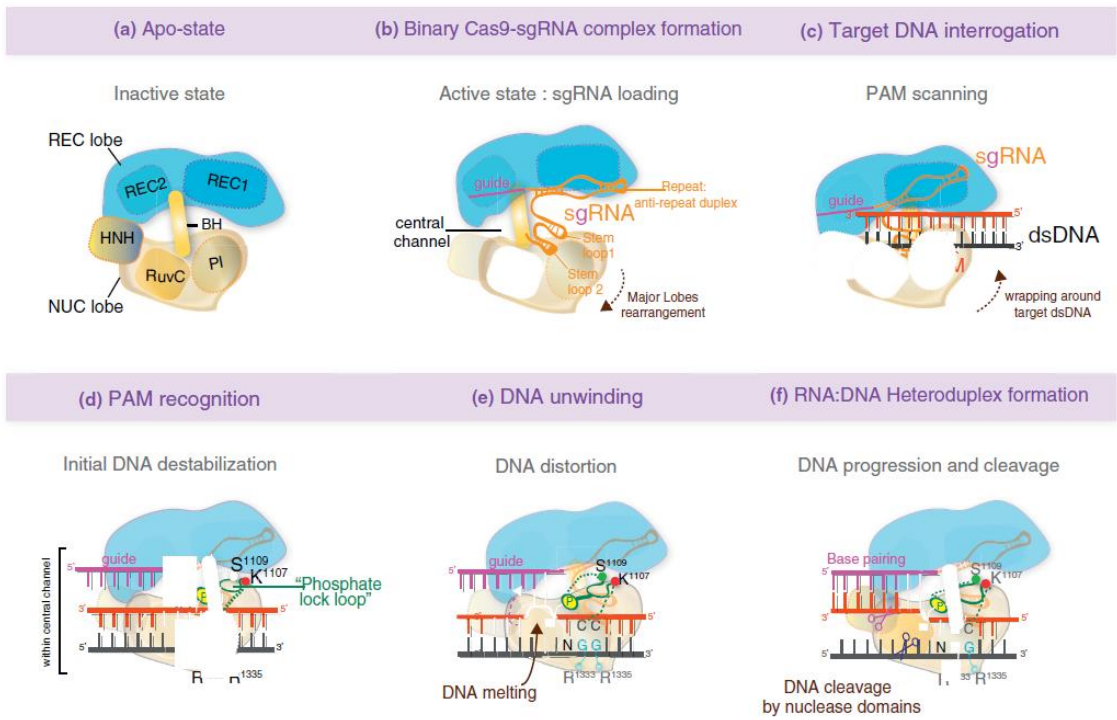
3.4.4 Protein Cas9

Studium krystalové struktury různých podtypů Cas9 endonukleáz odhalilo dvoualobčnou strukturu proteinu s konzervovaným jádrem obsahující přiléhající aktivní místa a dva žlábků pro vazbu nukleové kyseliny. Dvoualobčná struktura proteinu se skládá z velké globulární části s rozpoznávací (recognition – REC) funkcí a malé části s nukleázovou (nuclease – NUC) funkcí. REC je funkční doména specifická pro Cas9, která se skládá ze dvou domén REC1 a REC2 a dlouhé α -helikální domény bohaté na arginin, označované jako šroubovitý most (helix bridge – HB). NUC nese dvě nukleázové domény RuvC a HNH a doménu interagující s PAM (PAM-interacting domain – PI). Ze žlábků pro vazbu nukleové kyseliny se široký hlavní žlábek nachází REC a úzký menší žlábek v NUC.

Elektronová mikroskopie odhalila, že protein Cas9 se při absenci vazby na nukleovou kyselinu nachází v auto-inhibiční konformaci. K přechodu do aktivní formy dochází po vytvoření vazby s gRNA (Jinek *et al.*, 2014). Ta spouští konformační změny laloků REC a NUC vedoucí k vytvoření centrálního kanálu, do něhož je následně umístěn heteroduplex RNA-DNA (Jinek *et al.*, 2014). Naváděcí RNA interaguje primárně s lalokem REC za vzniku binárního komplexu Cas9-sgRNA (Nishimasu *et al.*, 2014). Komplex Cas9-sgRNA následně vyhledává PAM motiv ve dvoušroubovici DNA na nekomplementárním řetězci k naváděcí RNA (Jinek *et al.*, 2014). Protože helikázová aktivita Cas9 není závislá na energii z ATP, předpokládá se, že rozpoznání PAM vede k destabilizaci přilehlé sekvence spuštěním tvorby R-smyčky (Sternberg *et al.*, 2014).

Mechanismus rozpoznání a separace DNA založený na PAM byl nedávno objasněn (Obrázek 7). Experimenty založené na zesíťování proteinů naznačují, že do rozpoznávání PAM jsou zapojeny dvě nestrukturované flexibilní smyčky

v PI doméně obsahující tryptofan (Jinek *et al.*, 2014). Krystalová struktura Cas9 v komplexu s částečně separovanou cílovou DNA obsahující PAM motiv a sgRNA osvětluje molekulární pochody, které jsou základem rozpoznání PAM a separace řetězců DNA (Anders *et al.*, 2014). Rozpoznávání bází ve hlavním žlábků pro vazbu PAM zajišťují dva argininové zbytky rozpoznávají dinukleotidy GG motivu PAM na nekomplementárním řetězci. Dále interakce dvou dalších zbytků lysinu a serinu v menším žlábků s PAM duplexem tvoří K-S smyčku, která se spojuje s fosfátovou skupinou PAM sekvence v komplementárním řetězci. To umožňuje fosfátové skupině orientovat komplementární řetězec DNA pro párování bází a hybridizaci s naváděcí RNA, což vede k oddělení řetězců DNA. Komplex Cas9-sgRNA pak zkoumá přiléhající řetězec DNA pro potenciální komplementaritu s naváděcí RNA (Sternberg *et al.*, 2014). Párování bází komplementárních nukleotidů v konzervativní oblasti (o velikosti 8 – 12 bp) umožňuje postupnou destabilizaci cílové DNA a vede k tvorbě RNA-DNA heteroduplexu. Řetězec je následně sevřen mezi NUC a REC lalokem komplexu Cas9 pro uchycení HB bohatým na arginin pomocí čtyřmístného spoje (Anders *et al.*, 2014). V této konformaci jsou obě nukleázové domény NUC laloku připravené pro štěpení cílové DNA. Mobilní HNH doména štěpí komplementární vlákno v terciárním komplexu, zatímco RuvC doména přerušuje nekomplementární vlákno (Nishimasu *et al.*, 2014).



Obr. 7. Mechanismus štěpení DNA proteinem Cas9
Převzato z Belhaj *et al.*, 2015

3.5 Právní statut GMO

3.5.1 GMO, vědecké a etické problémy

V EU je nakládání s geneticky modifikovanými organismy a jejich produkty regulováno směrnicemi 2001/18/ES, 2009/41/ES, ES 1829/2003, 1830/2003. Pro EU jsou charakteristické přísné právní předpisy pro GMO, jejichž cílem je zajistit co nejnižší míru rizika pro lidské zdraví a životní prostředí v souladu se zásadami předběžné opatrnosti. Důraz na předběžnou opatrnost je kladen s ohledem na riziko trvalého a nezvratného poškození životního prostředí. Celý proces schvalování povolení pro uvedení GMO na trh a pěstování je finančně, časově a administrativně velmi náročný; navíc povolení se v EU vydává na dobu 10 let. Hlavním cílem pravidel pěstování GMO v EU je oddělit GMO a jejich produkty od geneticky nemodifikovaných organismů a produktů. Jednotlivé členské státy EU mohou zakázat pěstování GMO na svém území. Všechny GMO a produkty z nich musí být na trhu EU označeny.

Legislativa v USA je naproti tomu založena na konstatování, že potenciálně škodlivá není samotná metoda přípravy GMO, ale některé specifické vlastnosti organismů, bez ohledu na to, jakým způsobem vznikly. Riziko konkrétního organismu tedy není odvozováno od způsobu přípravy, ale od jeho vlastností. Povolení pro uvedení na trh udělují rozdílné kontrolní úřady v závislosti na vlastnostech produktu. Na území Ruské federace je zákonem z roku 2016 zakázán chov a pěstování GMO. Byl dále zpřísněn státní dohled nad dovozem a zpracováním produktů z GMO. Tento zákon se však nevztahuje na GMO, které vznikly pomocí nových technik šlechtění rostlin NBT. V Čínské lidové republice musí být GMO a produkty z nich viditelně označeny.

(https://bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace1/Moderni_biotechnologie_WEB.pdf).

Úprava genomu pomocí NBT, mezi něž patří i metoda CRISPR/Cas9, poskytuje nové možnosti pro efektivní výzkum rostlin a zlepšení jejich vlastností, jako je odolnost rostlin proti abiotickému stresu, odolnost proti chorobám a zvýšení výnosů rostlin.

V červenci 2018 vydal Soudní dvůr EU rozhodnutí, že organizmy včetně rostlin, vytvořené inovativními biotechnologiemi, editací genomu

(např. CRISPR/Cas), budou regulovány dle právních nařízení vztahujících se ke GMO (Judgement of the Court of Justice of 25 July 2018. Case C-528/16. ECLI:EU:C:2018:583). S tímto závěrem však nesouhlasí řada významných vědců, protože podle nich toto rozhodnutí může v budoucnu ovlivnit evropské zemědělství z hlediska konkurenceschopnosti, produkce, kvality a životního prostředí (van Erp *et al.*, 2015).

Technologie CRISPR/Cas9 je založena na vyřazování, vypínání funkce zájmových genů cílenou mutagenezí pomocí proteinu Cas9 naváděného prostřednictvím navržené sgRNA. Tato technologie se používá v řadě plodin včetně ječmene, pšenice, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, brambor a rajčat. CRISPR/Cas9 technologie je také využívána pro výzkum abiotického stresu, odolnosti vůči chorobám, vývoje rostlin, účinného využití dusíku a kvality potravin a krmiv (Lawrenson *et al.*, 2015).

Příkladem využití technologie CRISPR/Cas9 jsou cílené úpravy genomu ječmene a tabáku pro získání vhodnějších a produktivnějších rostlin pro tvorbu průmyslově a farmaceuticky významných látek. Vědci v Rakousku provedli úpravy rostlin, jejichž cílem bylo vypnutí genů zahrnující stresové regulátory metabolické dráhy endoplazmatického retikula pomocí CRISPR/Cas9. Výsledné rostliny neobsahují rekombinantní nukleové kyseliny a neměly by tedy být regulovány jako GMO (Kapusi *et al.*, 2017).

Od první publikované vědecké práce v roce 2013, která se zabývala využitím technologie CRISPR/Cas9 bylo dosaženo značného pokroku v editaci rostlinného genomu. V současnosti je vedena odborná a politická debata zabývající se vztahem mezi GMO a použitím metody CRISPR/Cas9. Existuje mnoho vědeckých studií poukazujících na tvorbu netransgenních rostlin pomocí NBT, kterými se vědci snaží prokázat, že technologie CRISPR/Cas9 je odlišná od předchozích metod genetické modifikace (GM) (Zong *et al.*, 2017).

Navzdory tomu, že CRISPR/Cas9 technologie je stále více aplikována rostlinnými biotechnologiemi zejména jako nástroj pro editaci genomu, stále existuje otázka, jak přesná je tato technologie a jak významný je mimocílový efekt nebo jakékoliv jiné nezamýšlené změny vyvolané technologií CRISPR/Cas9 v genomu (Hahn and Nekrasov, 2019). Existují také značné obavy ze závažných etických a sociálních důsledků, zvláště při modifikaci zvířat pomocí CRISPR/Cas9 technologie (Bassett, 2017).

Ačkoliv vědci i šlechtitelé v EU volají po urychlené změně přístupu ke NBT, zatím nedošlo k přehodnocení a vymezení vůči novým technologiím. Příloha B1 směrnice EU 2001/18/EC uvádí seznam technik, které nejsou pokládány za GMO a nespádají do regulace. Mezi tyto techniky patří i mutagenese. Směrnice však přesně neuvádí žádnou definici mutagenese. Definice GMO je navíc poněkud nejednoznačná, protože odkazuje na organismus, ve kterém byl genetický materiál změněn způsobem, který se přirozeně nevyskytuje (European Parliament, Council of the European Union, 2001). Vědeckou komunitou je definice GMO interpretována tak, že při posuzování, zda organismus spadá pod regulační legislativu GMO je třeba zohlednit nejen techniku použitou při jeho vzniku, ale i modifikace výsledného produktu. Ne všechny zúčastněné strany, které se podílí na legislativním procesu, však s tímto výkladem souhlasí. Tento názorový rozkol komplikuje snahy o změny regulačních předpisů pro GMO (Sprink *et al.*, 2016).

V roce 2019 řada vědců z různých států EU, opět žádala otevřeným prohlášením Evropský parlament a Evropskou komisi o legislativní změnu. Hlavním iniciátorem výzvy vědců ke změně legislativy je Prof. Dirk Inzé, vědecký ředitel Centra pro systémovou biologii rostlin VIB z belgického Gentu. Čeští vědci se rovněž připojili k této již celoevropské iniciativě. V České republice iniciativu koordinují vědci z brněnského institutu CEITEC z Masarykovy univerzity za aktivní podpory vědců z Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum.

Podle vědeckých pracovníků, rostliny, u kterých byly provedeny cílené úpravy genomu pomocí technologie CRISPR a které neobsahují cizí geny, jsou přinejmenším stejně bezpečné, jako kdyby byly odvozeny od klasických technik šlechtění. Metoda CRISPR má velký potenciál zejména v souvislosti se změnami klimatu, při tvorbě nových odrůd plodin, které jsou odolnější k patogenům nebo vůči suchu a poskytují zvýšené výnosy při současném snížení používání hnojiv a pesticidů.

(Tisková zpráva: <http://www.avcr.cz/cs/vyhledavani/index.html?query=GMO>)

3.5.2 GMO v České republice

V České republice lze s GMO nakládat pouze na základě zákona 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Zákonem je definováno, co je GMO a jak vzniká:

Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je organismus (kromě člověka) schopný rozmnožování, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací provedenou některým z technických postupů uvedených zákonem 78/2004 Sb.

1. Geneticky modifikované organismy mohou vzniknout mimo jiné při použití

a) techniky rekombinantní nukleové kyseliny vytvářející nové kombinace dědičného materiálu vložením úseku nukleové kyseliny připravené jakýmkoli způsobem mimo organismus do jakéhokoliv viru, bakteriálního plasmidu nebo jiného vektorového systému a jeho následným začleněním do organismu příjemce, ve kterém se normálně nevyskytuje, ale ve kterém je schopen dalšího množení,

b) techniky zavádějící dědičný materiál připravený jakýmkoli způsobem mimo organismus přímo do organismu příjemce, zahrnující mikroinjekce, makroinjekce, biolistické metody, mikroenkapsulace a umělé chromosomy, nebo

c) techniky buněčné fúze, včetně fúze protoplastů, nebo hybridizace buněk, při nichž jsou fúzí dvou nebo několika buněk vytvářeny životaschopné buňky s novou kombinací dědičného materiálu, a to metodami nebo prostředky, které se nevyskytují přirozeně.

2. Ke vzniku geneticky modifikovaných organismů nemohou vést následující technické postupy, pokud současně nezahrnují použití rekombinantního dědičného materiálu technikami podle bodu 1 této přílohy nebo použití geneticky modifikovaných organismů těmito technikami vzniklých,

a) oplození in vitro,

b) bakteriální konjugace, transformace, transdukce a podobné přirozené procesy,

c) indukce polyploidie a haploidie.

Česká komise pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty (ČK GMO) na Ministerstvu životního prostředí vydala

stanovisko k technice zinkových prstů 3 a dalším podobným technikám využívajícím cílených nukleáz 3 (site-directed nuclease 3, SDN-3) kam spadá i TALEN. Pracovní skupina pro nové genové techniky při Výboru kompetentních autorit došla k závěru, že technika zinkových prstů 3 vede ke vzniku GMO spadajících do působnosti směrnice 2001/18/EC. Zdůvodnila to tím, že pokud jsou v rámci této techniky vnášeny do recipienta velké funkční celky DNA a to se týká právě techniky SDN-3, pak se na ně vztahuje legislativa pro používání GMO. ([https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/\\$FILE/oeres-stanovisko_CKGMO_nove_techniky_ZnF3-20130722.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/$FILE/oeres-stanovisko_CKGMO_nove_techniky_ZnF3-20130722.pdf))

Pracovní skupina pro nové genetické techniky při Výboru kompetentních autorit dále došla k závěru, že cisgenozie a intragenozie vedou ke vzniku GMO spadajících do působnosti směrnice 2001/18/EC. Obecné stanovisko ČK GMO k novým genovým technikám zní: Rizika rostlin připravených tradičními šlechtitelskými postupy, transgenozí nebo novými genovými technikami by měla být posuzována v závislosti na vlastnostech těchto rostlin, nikoliv podle techniky jejich vzniku.

([https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/\\$FILE/oeres_nove_techniky_cisgeneze_20151005.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/$FILE/oeres_nove_techniky_cisgeneze_20151005.pdf))

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

V rámci bakalářské práce byly analyzovány transgenní rostliny ječmene jarního (*Hordeum vulgare*, L.), odrůdy Golden Promise nesoucí Cas9 a sgRNA komplementární s úsekem genů WDV CP, MP a Rep.

Transgenní jarní ječmen nesoucí Cas9 nukleázu byl transformován pomocí *A. tumefaciens* (Harwood *et al.*, 2009). Nezralá zygotická embrya byla transformována plazmidovým vektorem s jednou ze tří rozdílných sgRNA: sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep.

Kazety nesoucí sgRNA byly navrženy na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů PřF UPOL ve spolupráci s Výzkumným ústavem rostlinné výroby (VÚRV, v. v. i.) oddělení virologie. Zvolené sgRNA navádějí Cas9 nukleázu na komplementární sekvence v genech WDV. sgRNA/CP cílí na sekvenci v genu kódujícím protein CP, sgRNA/MP cílí na sekvenci v genu kódujícím protein MP a sgRNA/Rep cílí na sekvenci v genu kódujícím protein Rep.

4.1.2 Chemikálie

EDTA, SIGMA-ALDRICH, 129 K0015

Ethidium bromid, SIGMA-ALDRICH, 1.11608

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

Isopropanol, SERVA, 45629.01

Marker molekulové hmotnosti Bioline, BIO-33039

MS médium, Duchefa, MO 222.0050

NaCl, SIGMA-ALDRICH, 31658 1202

Phyto agar, Duchefa, P1003.1000

Primer F Generi Biotech

Primer R Generi Biotech

ReadyMix, SIGMA-ALDRICH, R2523-100RXN

Sacharosa, Lachner, 40135-APO

SDS, SIGMA-ALDRICH, 306040897

TRIS HCl, SIGMA-ALDRICH, 93362

UltraPure Agarose, Invitrogen, 16500-500

Voda (DNA/RNA free), SIGMA-ALDRICH, W5402

4.1.3 Přístroje

Analytické váhy M124Ai, BELengineering, Itálie

Binokulární lupa, VWR, USA

Centrifuga D1008, DLAB, Čína

Centrifuga 5418, Eppendorf, Německo

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

Chlazená centrifuga Jouan BR4i, DJB, UK

Kultivační komora Adaptis A1000, Conviron, Kanada

Laminární flowbox, GELAIRE, Austrálie

Laminární flowbox, MERCI, ČR

Magnetická míchačka vícemístná bez topení POLY 15, Thermo Scientific

pH metr, WTW, USA

Sestava PC ibronze II 1702, HAL 3000, CZ

Spektrofotometr/Fluorometr DS-11 FX, DeNovix, USA

Technické váhy, BOECO GERMANY, Německo

Termocycler T100™, Bio-Rad, USA

WARIOMAG, USA

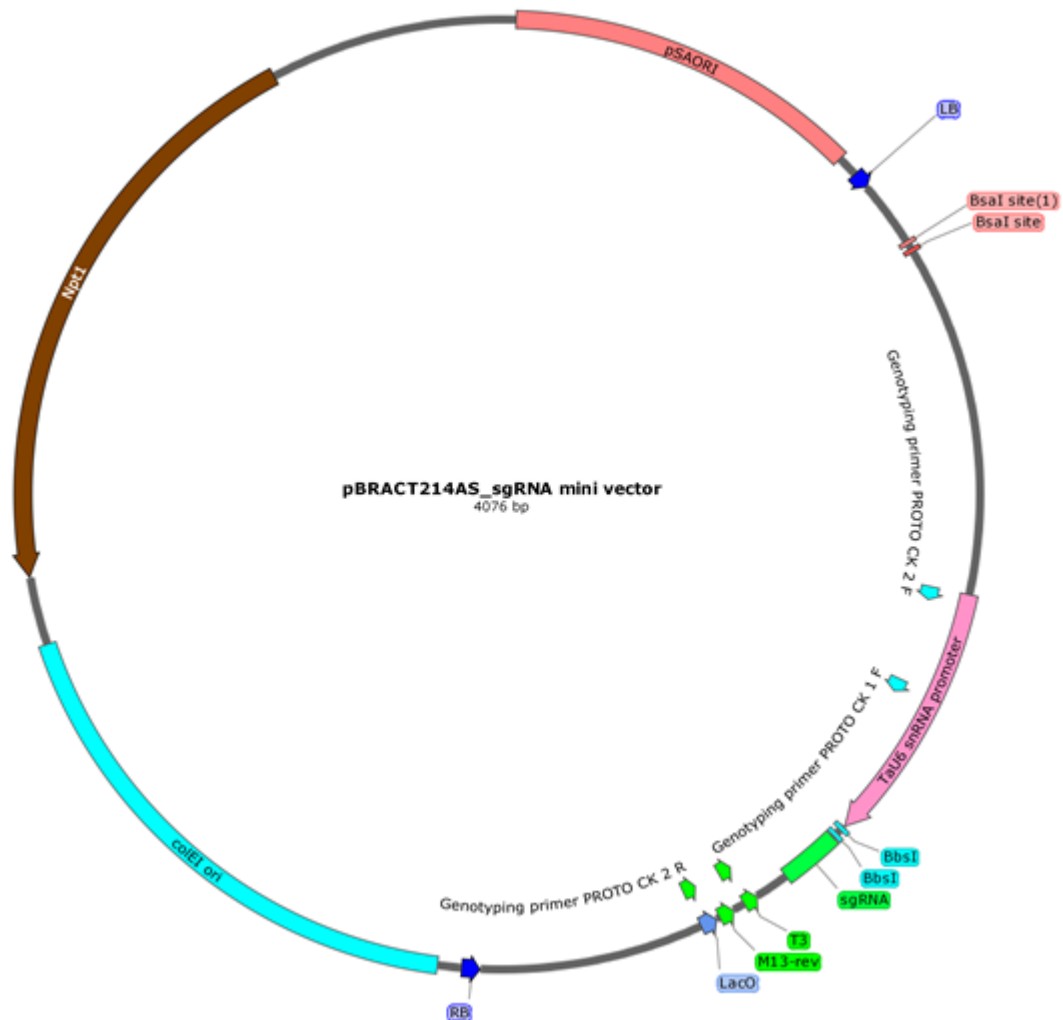
Zdroj napětí pro elektroforézu PowerPac™, BioRad, USA

4.1.4 Vektory a protospacery

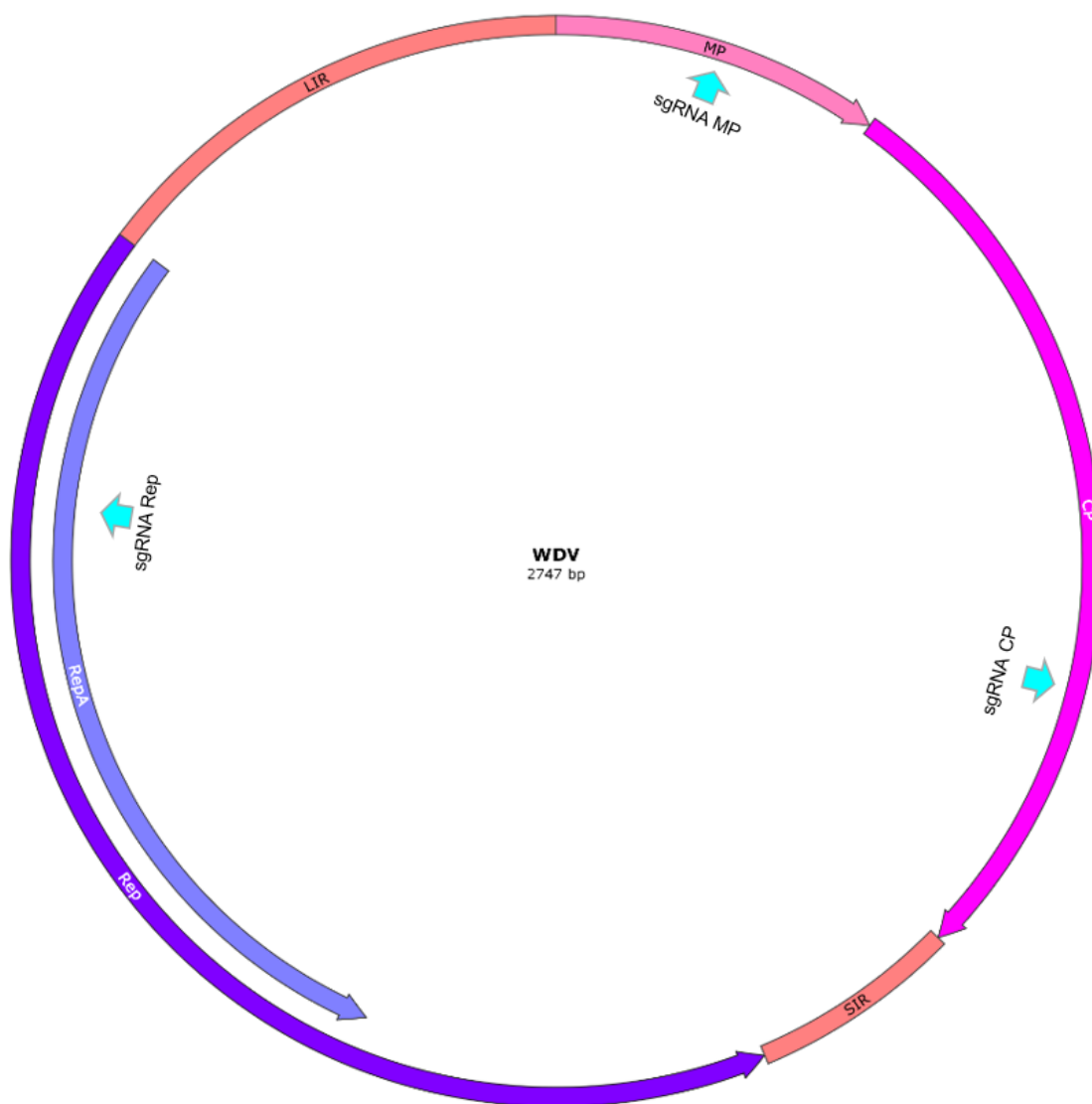
Transgenní jarní ječmen nesoucí Cas9 nukleázu byl transformován v roce 2019 pomocí *A. tumefaciens* (Harwood *et al.*, 2009) vektorem nesoucím rozdílné sgRNA:

- 1) pBract 214AS_sgRNA_CP
- 2) pBract 214AS_sgRNA_MP
- 3) pBract 214AS_sgRNA_Rep

Schéma vektoru pBract 214AS nesoucí sg RNA (Obrázek 8), schéma genomu WDV s vyznačenými pozicemi protospacerů (Obrázek 9), sekvence protospacerů v genech WDV s přesahy pro klonování (tabulka 1).



Obr. 8. Schéma vektoru pBract 214AS nesoucího sgRNA



Obr. 9. Schéma genomu WDV s vyznačenými pozicemi protospacerů

Tabulka 1. Sekvence protospacerů v genech WDV s přesahy pro klonování

Název sekvence protospaceru	Sekvence s přesahy pro klonování	Cílený gen
PROTO_F_1st_WDV-CP	CTTGgccactaccagttgtagcgt	WDV CP
PROTO_R_1st_WDV-CP	AAACacgctacaactggtagtgcc	
PROTO_F_1st_WDV-MP	CTTGgagcaagccaagcaacgccta	WDV MP
PROTO_R_1st_WDV-MP	AAACtaggcgttgcttgctgctc	
PROTO_F_1st_WDV-Rep	CTTGgcaatgccttaaacctccgta	WDV Rep
PROTO_R_1st_WDV-Rep	AAACtacggaggttaaggcattgc	

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Kultivace a pěstování rostlin T0 generace

1. Regenerované rostliny jarního ječmene T0 generace byly po transformaci kultivovány v *in vitro* podmínkách v Erlenmeyerových baňkách. Postupně byly přesazovány do rašelinových bločků (Jiffů), které byly umístěny do plastových sáčků a pěstovány ve fytostronu.
2. Po dosažení 10 cm byly rostliny pomocí PCR testovány na přítomnost kazety nesoucí U6 promotor a sqRNA.
3. PCR pozitivní rostliny byly z Jiffů přesazeny do zahradnického substrátu B (Rašelina Soběslav) a pěstovány v kontejnerech 10 x 10 cm, ve skleníku při fotoperiodě 16 hod. světlo (intenzita osvětlení 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), teplota 18 °C, 8 hod. tma při teplotě 15 °C.

4.2.2 *In vitro* kultivace embryí rostlin T1 generace

Za účelem rychlejšího získání rostlin T1 generace, byl pomocí *in vitro* kultivace zkrácen vývojový cyklus rostlin. Z nezralých obilek byla po sterilizaci extirpována nezralá zygotická embrya (2 mm), která byla kultivována na 1/2 MS médium v Petriho miskách.

4.2.2.1 Příprava 1/2 MS média

1. Navážené složky 1/2 MS média (Tabulka 2) byly rozpuštěny ve sterilní deionizované vodě.
2. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 5,8.
3. V láhvi s GL uzávěrem byl smíchán roztok 1/2 MS média s naváženým množstvím fytoagaru.
4. Médium bylo sterilizováno autoklávováním (20 min. při 120 °C).
5. Vysterilizované kultivační médium bylo v laminárním boxu rozlito po 25 ml do Petriho misek, průměr 9 cm.

Tabulka 2. Složení 1/2 MS média

Složka média	Hmotnost [g]
Sacharóza	15
MS včetně vitamínů	2,2
Fytoagar	3

4.2.2.2 Povrchová sterilizace obilek

1. Z pozitivních rostlin T0 generace byly vybrány klasy, které byly označeny štítkem s číslem klasu.
2. Z každého vybraného klasu bylo odebráno osm obilek, které byly zbaveny osin.
3. V odměrném válci byl připraven 6% roztok chlornanu sodného.
4. Obilky byly vloženy do Erlenmeyerových baněk s magnetickým míchadlem a v několika krocích (Tabulka 3) povrchově sterilizovány.

Tabulka 3. Sterilizace obilek

Sterilizační roztok	Objem [ml]	Délka působení [min]
70% etanol	25	2
Destilovaná H ₂ O	25	2
6% NaClO	25	4
Destilovaná H ₂ O	25	2
Destilovaná H ₂ O	25	2
Destilovaná H ₂ O	25	2

4.2.2.3 Kultivace nezralých zygotických embryí ječmene

1. V laminárním boxu byla pod binokulární lupou ze sterilizovaných obilek pomocí pinzety a skalpelu vyjmuta embrya o velikosti 2 mm.
2. Embrya extirpovaná vždy z jednoho klasu byla přenesena na 1/2 MS médium v Petriho misce.
3. Explantáty v Petriho miskách byly přeneseny do kultivační komory (Adaptis) a kultivovány při teplotě 18 °C, při fotoperiodě 16 hod. světlo, 8 hod. tma.
4. Po 14 dnech kultivace byly regenerující rostliny přesazeny do zeminy v sadbovačích.

4.2.3 Izolace DNA

DNA rostlin T0 a T1 generace byla izolována dle protokolu Edwards *et al.* 1991.

1. List ječmene o délce přibližně 3 cm byl odebrán ve vývojové fázi 10–12 do plastové mikrozkušavky. Mikrozkušavka byla po odběru zchlazena tekutým dusíkem.
2. Odebraný list byl v mikrozkušavce homogenizován sterilní homogenizační tyčinkou za opakovaného chlazení v tekutém dusíku.
3. K rozdrcenému vzorku bylo napipetováno 400 μ l extrakčního pufru EB (Tabulka 4) o laboratorní teplotě. Směs byla promíchána homogenizační tyčinkou.
4. Centrifugace při 14 000 rpm trvající 2 minuty.
5. 300 μ l supernatantu bylo přepipetováno do nové mikrozkušavky.
6. K 300 μ l odebraného supernatantu bylo napipetováno 300 μ l isopropanolu. Směs byla promíchána.
7. Centrifugace při 14 000 rpm trvající 20 min.
8. Supernatant byl odpipetován a k vysrážené DNA bylo napipetováno 300 μ l 70% etanolu. Směs byla promíchána.
9. Centrifugace při 8 000 rpm trvající 5 min.
10. Z mikrozkušavky byl odpipetován ethanol. Přečištěná DNA byla vysušena v laminárním boxu (30 minut).
11. DNA byla rozpuštěna v 50 μ l sterilní vody (SIGMA-ALDRICH, W5402). Vzorek byl uchován 24 hod. v chladničce při teplotě 4 °C.
12. Koncentrace a čistoty DNA byla změřena pomocí spektrofotometru (DeNovix), DNA byla zředěna na koncentraci 300–400 ng/ μ l.

Tabulka 4. Složení pufu EB

Složka	Koncentrace ve 100 ml [nM]
Tris HCl	200
NaCl	250
EDTA	25
SDS	0,5% (v/v)

4.2.4 Stanovení přítomnosti expresní kazety pomocí PCR

Ve vzorcích izolované genomické DNA byla pomocí PCR ověřena přítomnost vložených expresních kazet nesoucích sgRNA. Úsek kazety nesoucí sgRNA komplementární k úseku jednoho z virových genů *CP*, *MP*, *Rep* byl amplifikován metodou PCR. Amplifikované úseky expresní kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA byly následně elektroforeticky rozděleny v 1% agarózovém gelu a detekovány.

1. Byla připravena reakční směs pro PCR (Tabulka 5).
2. Reakční směs pro PCR byla amplifikována pomocí přístroje termocycler (Bio-Rad 100) nastaveném na program PROTO CK (Tabulka 6).
3. Po ukončení amplifikace byly produkty PCR rozděleny pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu a detekovány pomocí UV transiluminátoru (G:BOX,SYNGENE).

Tabulka 5. Složení reakční směsi PCR, pro jeden vzorek

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

Tabulka 6. Amplifikace úseku expresní kazety kódující U6 promotor a sgRNA proběhla podle programu PROTO CK

Děj	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Aktivační denaturace	95	3:00	1 x
Denaturace	95	0:20	
Nasedání primerů	57	0:20	38 x
Extenze	72	0:55	
Závěrečná amplifikace	72	5:00	1 x

Primery PROTO CK 1 a PROTO CK 2 (Tabulka 7) byly navrženy tak, aby amplifikovaly expresní kazetu kódující:

- 1) U6 promotor a sgRNA/CP
- 2) U6 promotor a sgRNA/MP
- 3) U6 promotor a sgRNA/Rep

Tabulka 7. Sekvence primerů pro amplifikaci úseku expresní kazety tvořeného U6 promotorem a sgRNA

Název primeru	Sekvence	Velikost ampliconu
PROTO CK 1 F	5'-CTCTCACTGATCTGGGTCGC-3'	401 bp
PROTO CK 1 R	5'-CAAGCGCGCAATTAACCCTC-3'	
PROTO CK 2 F	5'-GACCAAGCCCGTTATTCTGA-3'	605 bp
PROTO CK 2 R	5'-TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3'	

Příprava 1% agarózového gelu

V Erlenmeyerově baňce byl připraven 1% agarózový gel, do kterého byl přidán roztok ethidium bromidu o koncentraci 10 mg/ml (Tabulka 8).

Tabulka 8. Složení 1% agarózového gelu

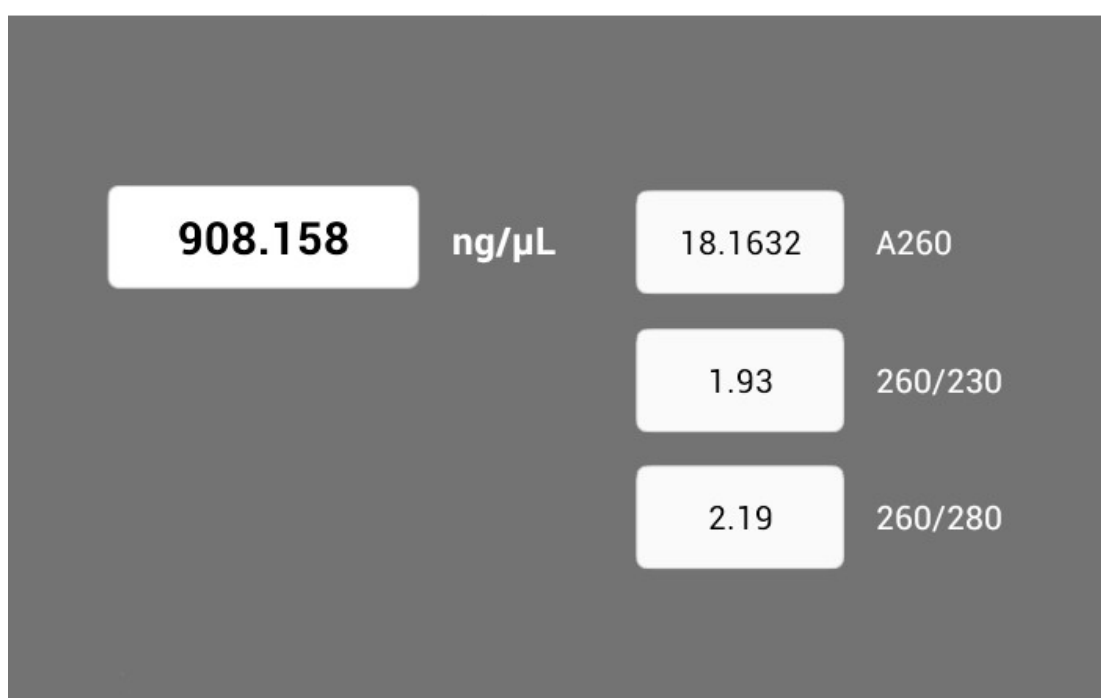
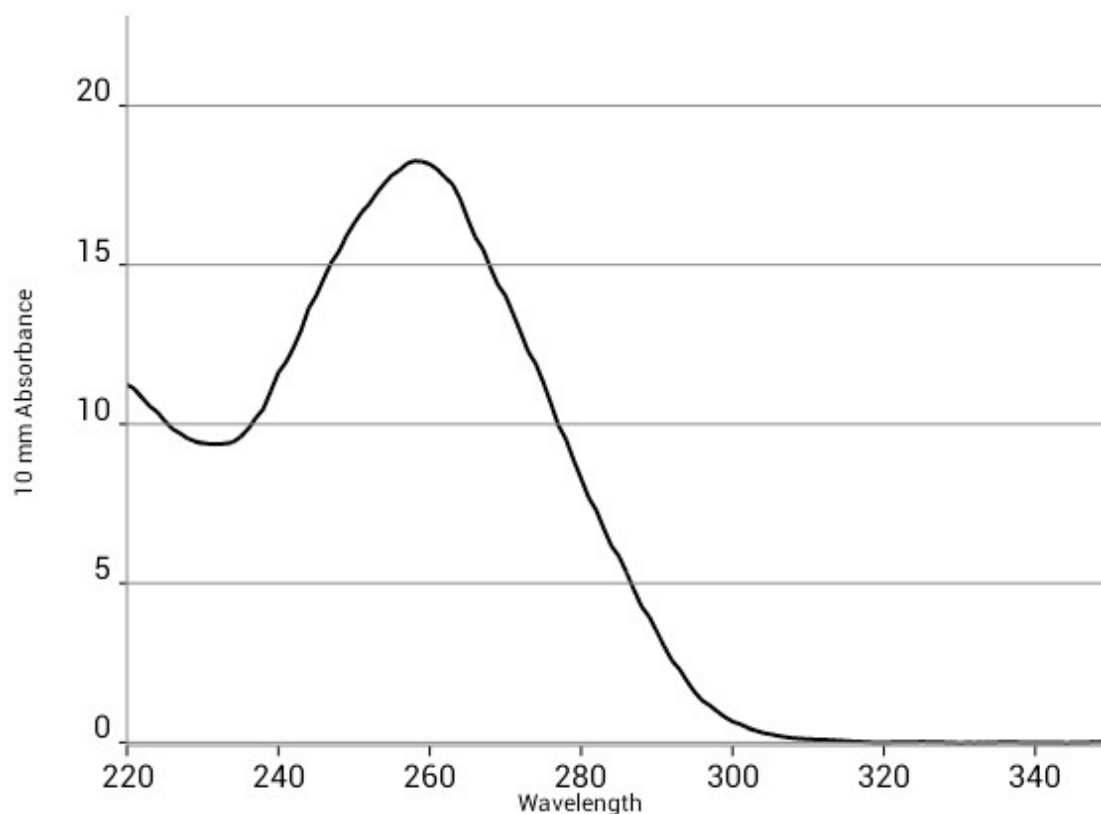
Složka	Množství
1% TRIS pufr	80 ml
Agarosa ultrapure	0,8 g
Ethidium bromid	2 μ l

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky

Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována ze 138 rostlin T0 generace a ze 139 rostlin T1 generace. Koncentrace izolované DNA se pohybovala od 60 do 1200 ng/ul. Například u rostliny T1 CP28, 1-3 byla naměřena koncentrace 908,158 ng/ul a čistota vzorku 260/230 byla 1,93 (Obrázek 10).



Obr. 10. Měření čistoty a koncentrace DNA izolované z rostliny T1 generace CP28, 1-3

5.1.1 Detekce transgenních rostlin v T0 generaci

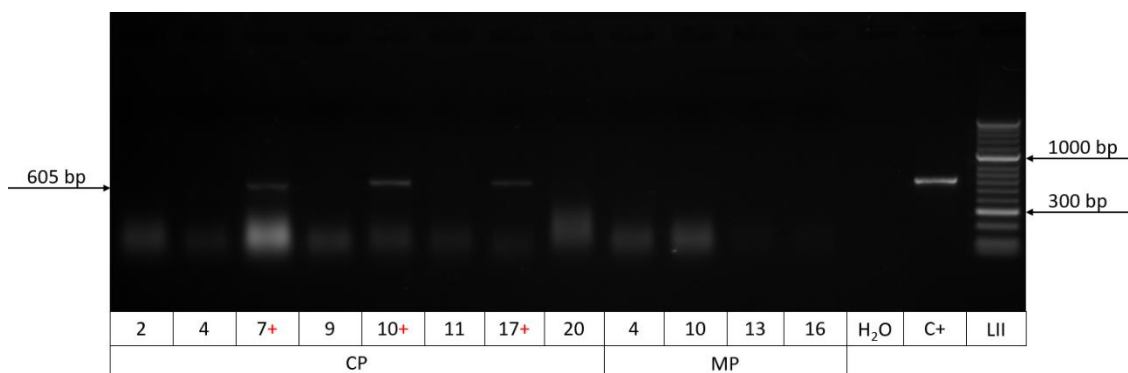
Pomocí metody PCR byl amplifikován úsek expresní kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA. Přítomnost úseku expresní kazety v testované rostlině byla určena pomocí PCR na základě elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu.

Přítomnost kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA byla celkem testována u 138 rostlin T0 generace. Přítomnost kazety byla potvrzena u 53 rostlin (38 %), u 85 rostlin přítomnost kazety nebyla prokázána.

Kazeta nesoucí U6 promotor a sgRNA/CP byla testována u 42 rostlin, přítomnost kazety byla potvrzena u 17 rostlin (40 %). Příklad PCR detekce amplikonu kazety sgRNA/CP u rostlin 7, 10 a 17 (Obrázek 11).

Kazeta nesoucí U6 promotor a sgRNA/MP byla testována u 52 rostlin, přítomnost kazety byla detekována u 17 rostlin (33 %).

Kazeta nesoucí U6 promotor a sgRNA/Rep byla testována u 44 rostlin, přítomnost kazety byla detekována u 19 rostlinách (43 %) (Tabulka 9).



Obr. 11. Detekce amplikonu kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA/CP nebo sgRNA/MP o velikosti 605 bp, v 1% agarózovém gelu. Transgenní rostliny T0 CP, Transgenní rostliny T0 MP, DNA/RNA free voda, C+ transgenní rostlina, L2 HyperLader II Bionline, kat. č. (BIO-33039)

Tabulka 9. Detekce transgenních rostlin v T0 generaci

sgRNA	Testované rostliny	PCR+	PCR-	Pozitivní rostliny [%]
<i>CP</i>	42	17	25	40
<i>MP</i>	52	17	35	33
<i>Rep</i>	44	19	25	43
Celkem	138	53	85	38

5.1.2 *In vitro* kultivace zygotických embryí rostlin T1 generace

Pro urychlení vývoje T1 generace rostlin byla z obilek extirpována nezralá zygotická embrya, která byla následně kultivována na 1/2 MS médiu. V *in vitro* podmínkách bylo celkem kultivováno 296 embryí z 15 transgenních linií. Rostliny se během kultivace dobře vyvíjely (Obrázek 12), ojediněle se také vyskytly i albikátní rostliny (Obrázek 13). Celkem regenerovalo 296 rostlin T1 generace. Z toho 105 rostlin ze 4 transgenních linií nesoucí kazetu sgRNA/CP, 112 rostlin z 5 transgenních linií nesoucí kazetu sgRNA/MP a 79 rostlin z 6 transgenních linií nesoucí kazetu sgRNA/Rep (Tabulka 10). Přehled regenerovaných rostlin v jednotlivých transgenních liniích je uveden v Tabulce 11, 12, 13. Dobře vyvinuté rostliny, v růstové fázi 11, byly přesazeny do sadbovačů (Obrázek 14).

Tabulka 10. Regenerované rostliny T1 generace

sgRNA	Počet Transgenních linií	Počet regenerovaných rostlin
CP	4	105
MP	5	112
Rep	6	79
Celkem	15	296

Tabulka 11. Regenerované rostliny transgenních linií sgRNA/CP

Transgenní linie T0	Regenerované rostliny T1
CP27	12
CP28	4
CP50A	63
CP50B	26
celkem	105

Tabulka 12. Regenerované rostliny transgenních linií sgRNA/MP

Transgenní linie T0	Regenerované rostliny T1
MP34	8
MP36	26
MP41	9
MP43	28
MP53	41
celkem	112

Tabulka 13. Regenerované rostliny transgenních linií sgRNA/Rep

Transgenní linie T0	Regenerované rostliny T1
Rep26	19
Rep33	33
Rep38	6
Rep39	6
Rep43A	7
Rep43B	8
celkem	79



Obr. 12. Nezralá zygotická embrya z rostliny T0 generace MP53 kultivovaná na 1/2 MS médiu



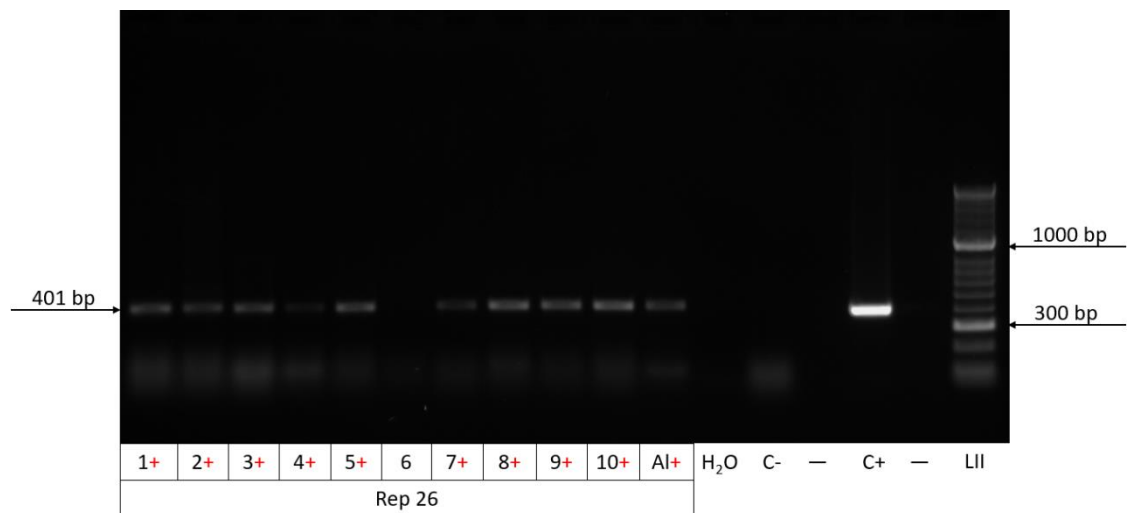
Obr. 13. Regenerované rostliny transgenní linie Rep33 T1 generace vykazující albinismus



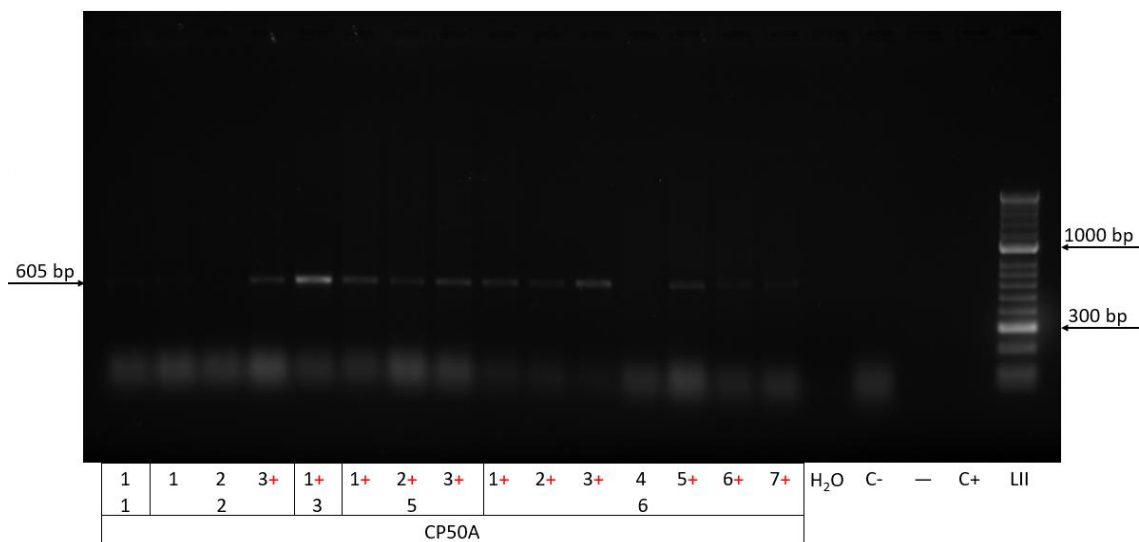
Obr. 14. Regenerované rostliny T1 generace přesazené do sadbovače

5.1.3 Detekce transgenních rostlin v T1 generaci

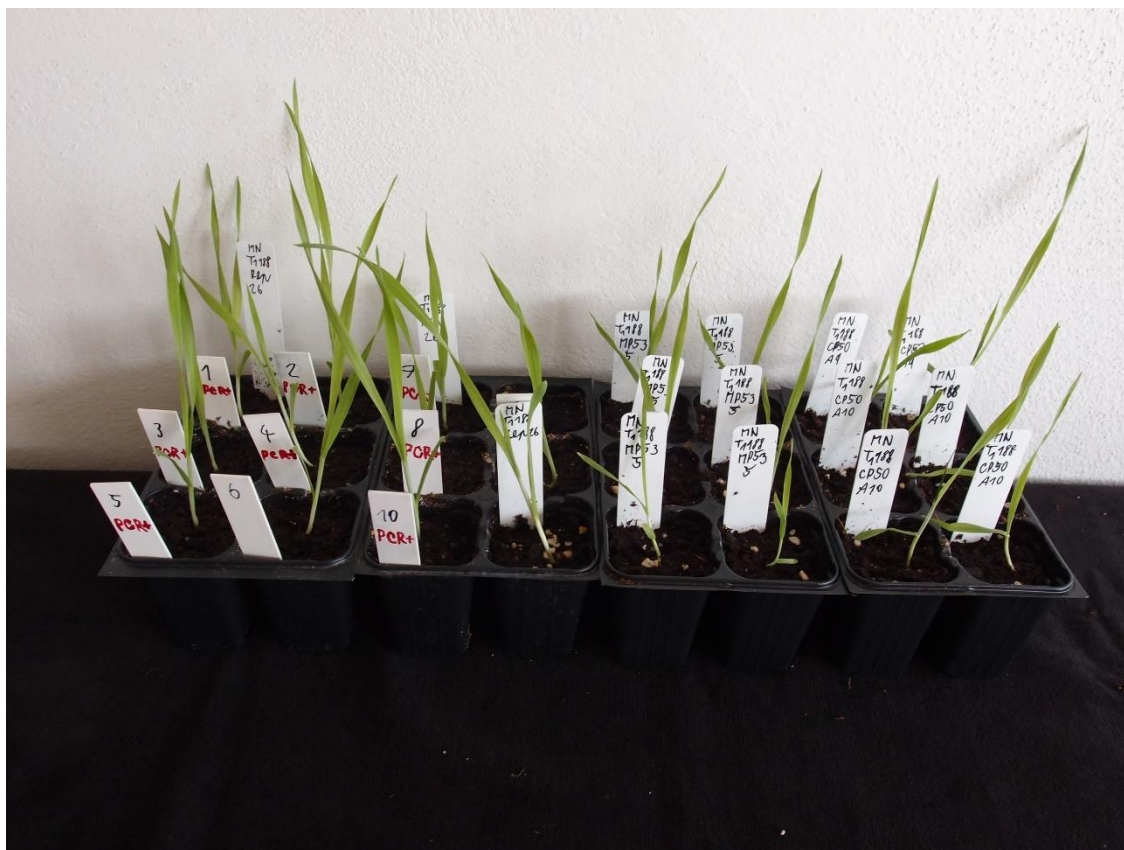
U 88 rostlin ze 13 transgenních linií T1 generace byla pomocí PCR ověřena přítomnost kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA. Pro detekci kazety byly použity dva různé druhy primerů. Primery PROTO CK 1 vykazovali velikost ampliconu 401 bp (Obrázek 15). Primery PROTO CK 2 vykazovali velikost ampliconu 605 bp (Obrázek 16). Rostliny T1 generace testované metodou PCR byly označeny štítkem s výsledkem detekce (Obrázek 17). U jedné rostliny T1 generace CP50A-3 se projevil zakrslý vzrůst (Obrázek 18).



Obr. 15. Detekce ampliconu kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA/Rep o velikosti 401 bp, v 1% agarózovém gelu. Transgenní rostliny T1 Rep26 1-10, albikantní rostlina, DNA/RNA free voda, C- netransformovaná rostlina, C+ transgenní rostlina, L2 HypperLader II Bioline, kat. č. (BIO-33039)



Obr. 16. Detekce amplikonu kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA/CP o velikosti 605 bp, v 1% agarózovém gelu. Transgenní rostliny T1 CP50A 1 (1), 2 (1-3), 3 (1), 5 (1-3). 6 (1-7), DNA/RNA free voda, C- netransformovaná rostlina, C+ trasgenní rostlina, L2 HypperLader II Bionline, kat. č. (BIO-33039)



Obr. 17. Testované rostliny T1 generace v sadbovači



Obr. 18. Transgenní rostliny T1 generace linie CP50A, vlevo rostlina s normálním růstem a vývojem, vpravo rostlina CP50A-3 zakrslá, pomaleji rostoucí

Z 88 testovaných rostlin T1 generace byla přítomnost kazety nesoucí U6 promotor a sgRNA detekována u 40 rostlin (45 %), u 48 rostlin kazeta nebyla detekována (Tabulka 14).

Tabulka 14. Detekce kazety sgRNA v rostlinách T1 generace

sgRNA	Transgenní linie	Testované rostliny	PCR+	PCR-
<i>CP</i>	4	34	20	14
<i>MP</i>	4	28	7	21
<i>Rep</i>	5	26	13	13
Celkem	13	88	40	48

Přítomnost kazety sgRNA/CP byla testována u 34 rostlin T1 generace pocházejících ze 4 transgenních linií. Přítomnost kazety sgRNA/CP byla detekována u 20 rostlin (59 %); 14 rostlin nevykazovalo přítomnost kazety (Tabulka 15).

Tabulka 15. Detekce kazety s sgRNA pro gen *CP* v rostlinách T1 generace

Transgenní rostlina T0	Číslo klasu	PCR testované rostliny	PCR detekce		
			PCR+	PCR-	
CP27	1	1	1	0	
	2	2	0	2	
	3	1	0	1	
	4	6	2	4	
CP28	1	4	0	4	
CP50A	1	1	1	0	
	2	3	2	1	
	3	1	1	0	
	5	3	3	0	
	6	7	6	1	
	CP50B	1	5	4	1
Celkem	4	11	34	20	14

Přítomnosti kazety sgRNA/MP byla testována u 28 rostlin T1 generace pocházejících ze 4 transgenních linií. Přítomnost kazety sgRNA/MP byla detekována u 7 rostlin (25 %); 21 rostlin nevykazovalo přítomnost kazety (Tabulka 16).

Tabulka 16. Detekce kazety s sgRNA pro gen *MP* v rostlinách T1 generace

Transgenní rostlina T0	Číslo klasu	PCR testované rostliny	PCR detekce		
			PCR+	PCR-	
MP34	1	2	1	1	
	2	3	0	3	
MP41	1	5	0	5	
MP43	2	5	0	5	
MP53	2	1	0	1	
	3	4	1	3	
	4	4	1	3	
	5	2	2	0	
	6	2	2	0	
	Celkem	4	9	28	7

Přítomnost kazety sgRNA/Rep byla testována u 26 rostlin T1 generace pocházejících z 5 transgenních linií. Přítomnost kazety sgRNA/Rep byla pozitivně detekována ve 13 rostlinách (50 %); ve 13 rostlinách kazeta detekována nebyla (Tabulka 17).

Tabulka 17. Detekce kazety s sgRNA pro gen *Rep* v rostlinách T1 generace

Transgenní rostlina T0	Číslo klasu	PCR testované rostliny	PCR detekce		
			PCR+	PCR-	
Rep26	1	11	10	1	
Rep38	1	5	0	5	
Rep39	1	3	2	1	
	2	3	0	3	
Rep43A	1	2	1	1	
Rep43B	1	2	0	2	
Celkem	5	6	26	13	13

Na základě výsledků bakalářské práce bylo potvrzeno, že rostliny T0 generace, tak i rostliny T1 generace obsahují sgRNA, která je komplementární s úseky genů *WDV CP*, *MP* a *Rep*. Pomocí PCR byl detekován přenos všech tří typů expresních kazet sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep. U sgRNA/CP bylo v T1 generaci detekováno 20 pozitivních rostlin. U sgRNA/MP bylo v T1 generaci detekováno 7 pozitivních rostlin. U sgRNA/Rep bylo v T1 generaci detekováno 13 pozitivních rostlin.

5.2 Diskuze

Technologie úpravy genomu se v posledních pěti letech staly jedním z nejdůležitějších genetických nástrojů při navození rezistence k patogenům u vyšších rostlin. Pomocí technologie CRISPR/Cas9 se u modelových rostlin i u hospodářsky významných plodin testují možnosti vyvolání rezistence k virovým a bakteriálním chorobám. U tabáku a huseníčku jsou experimentální práce převážně zaměřeny na virové choroby; u plodin, jako je rýže, rajče, pšenice, citrusy jsou strategie zaměřeny na získání odolnosti vůči bakteriálním a houbovým chorobám (Borrelli *et al.*, 2018).

První dvě studie zabývající se využitím CRISPR/Cas9 zprostředkované rezistence proti geminivirům provedli v roce 2015 Ji *et al.* a Baltes *et al.* V roce 2015 Ji *et al.* transformoval pomocí *A. tumefaciens* rostliny tabáku a huseníčku CRISPR/Cas9 systémem cílícím na oblasti kódující obalový a replikační protein a na intergenní oblasti viru žluté zakrslosti fazolí. Baltes *et al.* v roce 2015 transformoval pomocí *A. tumefaciens* rostliny tabáku CRISPR/Cas9 systémem cílícím na replikační protein a dlouhou intergenní oblast viru těžké vrcholové kadeřavosti řepy.

Do současné doby není mnoho vědeckých prací týkajících se vyvolání rezistence vůči WDV u ječmene a pšenice pomocí NBT. Pouze v roce 2019 byla publikována jediná práce zabývající se možností vytvoření rezistence vůči WDV u ječme a pšenice pomocí CRISPR/Cas. Kis *et al.* publikoval v roce 2019 výsledky studie zabývající se vytvořením rezistence proti WDV v rostlinách ječmene pomocí systému CRISPR/Cas9. Součástí práce je lokalizace potenciálních cílových míst v genomu WDV přiléhajících k PAM motivu. Pro vytvoření rezistence k rozdílným kmenům WDV byly použity konzervativní oblasti genomů dvou pšeničných a dvou ječmenných kmenů WDV. Byla zvolena 4 cílová místa, která *in silico* nevykazovala mimocílovou aktivitu. K ověření aktivity *in vivo* byl vytvořen sensorický systém vložením cílové sekvence sgRNA obsahující PAM motiv za start kodon reportérového genu červeného fluorescenčního proteinu *Discosoma sp.* (discosoma red fluorescent protein – dsRED). Tyto sensorické konstrukty byly naklonovány do binárních vektorů (pKSE401) obsahující 35S promotorem řízenou expresní kazetu pro Cas9 a transformovány do *A. tumefaciens*. Aktivita jednotlivých sgRNA se projevila

inhibicí exprese dsRED v odpovídajícím sensorickém konstrukt. *In vivo* sensorický systém potvrdil aktivitu všech čtyř sgRNA. Následně byl zkonstruován binární konstrukt nesoucí čtyři vybrané sgRNA řízené třemi rozdílnými promotory WDVGuide4-Guard a Cas9 nukleázu řízenou kukuřičným Ubi1 promotorem za využití stejného vektorového systému. Navržený systém CRISPR/Cas9 byl transformován pomocí *A. tumefaciens* do ječmene. Bylo získáno 20 rostlin ze 4 transgenních calusů WDVGuide4-Guard (1-4). Přítomnost kazety nesoucí sgRNA byla ověřena pomocí PCR a sekvenování. Transformované rostliny nevykazovaly žádné fenotypové odchylky. V růstové fázi 3-4 listů byly transgenní a kontrolní rostliny infikovány WDV prostřednictvím kříšů. Žádná z transgenních rostlin T0 generace během růstu nevykazovala symptomy napadení WDV. V rostlinách transgenních linií WDVGuide4-Guard 1, 3, a 4 nebyla detekována přítomnost WDV. Rostliny transgenní linie WDVGuide4-Guard 2 vykazovali přes akumulaci virové DNA a RNA produktů efektivní toleranci proti viru. V T1 generaci transgenní linie WDVGuide4-Guard 2 nebyl WDV detekován v 7 z 10 dceřiných linií. Dceřiná linie 2.1 nevykazovala i přes přítomnost WDV žádné fenotypové změny. Dceřiné linie 2.5 a 2.10 vykazovaly střední a těžké symptomy napadení WDV. Ze čtyř zvolených sgRNA byla pomocí reverzní transkripce PCR (reverse transcription PCR – RT-PCR) potvrzena exprese sgRNA WDV1, sgRNA WDV2 a sgRNA WDV4. Během studie nebyla v rostlinách detekována exprese sgRNA WDV3. Sekvenování genomu WDV odhalilo změny pouze v cílovém místě sgRNA WDV2. Rezistence a tolerance rostlin proto byla způsobena sgRNA WDV2, která měla jako jediná prokazatelnou aktivitu v cílové sekvenci.

Na rozdíl od práce Kis *et al.*, 2019 byly v bakalářské práci do buněk jarního ječmene již nesoucích Cas9 nukleázu vloženy kazety nesoucí jediný U6 promotor a tři rozdílné sgRNA (sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep). Cas9 nukleáza a sgRNA byly do rostlinných buněk vloženy postupně pro získání vyšší pravděpodobnosti úspěchu transformace. Na rozdíl od práce Kis *et al.*, 2019 každá kazeta nesla pouze jednu sgRNA, což umožňuje snadné ověření účinnosti rezistence poskytované danou sgRNA.

Pomocí PCR byly u rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise v T0 a T1 generaci potvrzeny vložené kazety sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep.

Byl potvrzen přenos transformovaných úseků z T0 do T1 generace z více transgenních událostí.

Dalším krokem bude ověření exprese jednotlivých kazet sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep metodou RT-PCR a provedení sekvenování. Rezistence rostlin vůči WDV bude ověřena křískem polním přenášečím WDV. Testování rezistence ječmene proti WDV bude probíhat ve skleníku VÚRV, v. v. i. na oddělení virologie.

6 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na hospodářsky významný patogen WDV napadající obiloviny a na systém CRISPR/Cas. Součástí teoretické části je také charakteristika a využití ječmene, transformace rostlinných buněk pomocí *A. tumefaciens* a právním statutem GMO.

V experimentální části bakalářské práce byly v T0 a T1 generaci rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise detekovány tři expresní kazety sgRNA/CP, sgRNA/MP, sgRNA/Rep, které nesou sgRNA komplementární s úseky genů WDV *CP*, *MP*, *Rep*. Získání rostlin T1 generace bylo urychleno kultivací zygotických embryí v *in vitro* podmínkách z obilek pozitivních T0 rostlin. V T1 generaci byly detekovány transgenní rostliny pro každý ze tří typů sgRNA z více transgenních rostlin T0 generace. Ze získaných dat byla následně vyhodnocena úspěšnost přenosu jednotlivých kazet.

Rostliny jarního ječmene s pozitivní detekcí expresní kazety budou podrobeny dalšímu výzkumu, budou využity metody molekulární biologie, RT-PCR, pro detekci exprese sgRNA a sekvenování. Rezistence rostlin proti WDV bude ověřena ve skleníku VÚRV v. v. i. prostřednictvím kříška polního přenášejícího WDV.

7 ZDROJE

7.1 Seznam použité literatury

- Abt I., Souquet M., Angot G., Mabon R., Dallot S., Thébaud G., Jacquot E. (2020) Functional transcomplementation between wheat dwarf virus strains in wheat and barley. *Viruses* **12**, 34. doi.org/10.3390/v12010034
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* **513**, 569-573.
- Barrangou R. (2013) CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. **4**, 267-278.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712.
- Bassett A. R. (2017) Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models. *Mamm. Genome* **28**, 348-364.
- Baltes N. J., Hummel A. W., Konecna E., Cegan R., Bruns A. N., Bisaro D. M., Voytas D. F. (2015) Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nat. Plants* **1**, 15145. doi: 10.1038/nplants.2015.145
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N. J., Nekrasov V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, **32**, 76–84. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.007
- Borrelli V. M. G., Brambilla V., Rogowsky P., Marocco A., Lanubile A. (2018) The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. *Front. Plant Sci.* **9**, 1245. doi: 10.3389/fpls.2018.01245
- Braut V., Uzest M., Monsion B., Jacquot E., Blanc S. (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biol.* **333**, 524–538.
- Brouns S. J. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J. H., Snijders A. P. L., Dickman M. J., Makarova K. S., Koonin E. V., van der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**, 960-964.
- Burstein D., Sun C. L, Brown C. T., Sharon I., Anantharaman K., Probst A. J., Thomas B. C., Banfield J. F. (2016) CRISPR-Cas viral defence systems. *Nat. Commun.* **7**, 1-8.
- Deltcheva E., Chylinsk, K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602-607.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. **19**, 1349.
- Eid A., Mahfouz M. M. (2016) Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp. Mol. Med.* **48**, e256. doi:10.1038/emm.2016.111

Eisenberg S., Griffith J., Kornberg A., (1977) ϕ X174 Cistron A Protein is a Multifunctional Enzyme in DNA Replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 3198-3202.

Ekzayez A. M., Kumari S. G., Ismail I. (2011) First Report of Wheat dwarf virus and Its Vector (*Psammotettix provincialis*) Affecting Wheat and Barley Crops in Syria. *Plant Dis.* **95**, 76.
doi: 10.1094/PDIS-09-10-0628

European Parliament, Council of the European Union (2001) Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the Deliberate release into the Environment of Genetically Modified Organisms and Repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official J. L* **106**, 1-39.

Forster B. P. (2002) Mutation genetics of salt tolerance in barley: an assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica*. **120**,317-328.

Fuchs E., Mehner S., Manurung B., Grüntzig M. Strain-spectrum of Wheat dwarf virus (WDV) in Saxony-Anhalt. In Proceedings of the Fifth Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Taormina-Giardini Naxos, Italy, 18–22 September 2000; pp. 213-215.

Gafni Y. (2003) Tomato yellow leaf curl virus, the intracellular dynamics of a plant DNA virus. *Mol Plant Pathol.* **4**, 9-15.

Garneau J. E., Dupuis M-É., Villion M., Romero D. A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A. H., Moineau S., (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67-71.

Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E2579-E2586.

Gutierrez C. (1999) Geminivirus DNA, replication. *Cell Mol Life Sci.* **56**, 313-29.

Hahn F., Nekrasov V. (2019). CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Reports* **38**, 437–441.

Hanley-Bowdoin L., Bejarano E. R., Robertson D., Mansoor S. (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol.* **11**, 777-788.

Hanley-Bowdoin L., Settlage S. B., Orozco B. M., Nagar S., Robertson D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **35**, 105-140.

Harwood W. A., Bartlett J. G., Alves S. C., Perry M., Smedley M. A., Leyl N., Snape J. W. (2009) Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Technique. *Methods in Molecular Biology* **478**, 137-147.
doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_9

Hermans, P. W. M., van Soolingen D., Bik E. M., de Haas P. E. W., Dale J. W., van Embden J. D. A., (1991) The insertion element IS987 from *M. bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* **59**, 2695-2705.

Hofer J. M. I., Dekker E. L., Reynolds H. V., Woolston C. J., Cox B. S., Mullineaux P.M. (1992) Coordinate regulation of replication and virion sense gene expression in wheat dwarf virus. *Plant Cell* **4**, 213-223.

Horsch R. B., Rogers S. G., Fraley R. T. (1985) Transgenic Plants, Cold Spring Harb. *Symp. Quant. Biol.* **50**, 433-437.

- Horvath P., Romero D. A., Coûté-Monvoisin A. C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R., (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1401-1412.
- Chandler M., de la Cruz F., Dyda F., Hickman A. B., Moncalian G., Ton-Hoang B. (2013) Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 525-538.
- Chilton M. D., Saiki R. K., Yadav N., Gordon M. P., Quétier F. (1980) T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown-gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 4060-4064.
- Chyou T. Y., Brown C. M. (2019) Prediction and diversity of tracrRNAs from type II CRISPR-Cas systems. *RNA Biol.* **16**, 423-434.
- Ilyina T. V., Koonin E. V., (1992) Residues 126-of VirD2. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3279-3285.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol* **169**, 5429-5433.
- Jansen R., Embden J. D. A. V., Gaastra W., Schouls L. M., (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in procaryotes, *Mol. Microbiol.* **43**, 1565-1575.
- Ji X., Zhang H., Zhang Y., Wang Y., Gao C. (2015) Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nat. Plants* **1**, 15144.
doi: 10.1038/nplants.2015.144
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Lavarone A. T. Charpentier E., Nogales E., Doudna J. A. (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, **343**, 1247997.
doi: 10.1126/science.1247997
- Kapooria R. G., Ndunguru J. (2004) Occurrence of viruses in irrigated wheat in Zambia. *EPPO Bull.* **34**, 413-419.
- Kapusi E. Corcuera-Gómez M., Melnik S., Stoger E. (2017) Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Front. Plant Sci* **8**, 540.
doi: 10.3389/fpls.2017.00540
- Kis A., Hamar É., Tholt G., Bán R., Havelda, Z. (2019). Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal* **17**, 1004-1006.
- Klompe S. E., Sternberg S. H. (2018) Harnessing a billion years of exploitation of CRISPR-Cas immune systems. *CRISPR J.* **1**, 141-158.
- Klompe S. E., Vo P. L. H., Halpin-Healy T. S., Sternberg S. H., (2019). Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature* **571**, 219-225.
- Köklü G., Ramsell J.N., Kvarnheden A. (2007) The complete genome sequence for a turkish isolate of Wheat dwarf virus (WDV) from barley confirms the presence of two distinct WDV strains. *Virus Genes* **34**, 359-366.

- Koonin E. V., Makarova, K. S., (2018) Discovery of oligonucleotide signaling mediated by CRISPR-associated polymerases solves two puzzles but leaves an enigma. *ACS Chem. Biol.* **13**, 309-312.
- Koonin E. V., Makarova K. S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. Land. B Biol. Sci.* **374**, 20180087.
doi: 10.1098/rstb.2018.0087
- Labereke N. V., Engler G., Holster J., Elsacker S. V., Zaenen J., Schilperoort R. A., Schell J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169-170.
- Lapidot M., Legg J. P., Wintermantel W. M., Polston J. E. (2014) Management of whitefly-transmitted viruses in open-field production systems. *Adv Virus Res.* **90**, 147-206.
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Ostergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* **16**, 258.
doi: 10.1186/s13059-015-0826-7
- Lindblad M., Areno P. (2002) Temporal and spatial population dynamics of *Psammotettix alienus*, a vector of wheat dwarf virus. *Int. J. Pest Manag.* **48**, 233–238.
- Lindsten K., Vacke J. (1991) A possible barley adapted strain of wheat dwarf virus (WDV). *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **26**, 175-180.
- Liu L., Li X., Wang J., Wang M., Chen P., Yin M., Li J., Sheng G., Wang Y. (2017) Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities. *Cell* **168**, 121-134.
- Lovendahl K. M., Hayward A. N., Gordon W. R., (2017) Sequence-Directed Covalent Protein-DNA Linkages in a Single Step Using HUH-Tags *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 7030-7035.
- Makarova K. S., Aravind L., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2011) Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct* **6**, 38.
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalina S. A., Wolf Y. I., Koonin E. V., (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7.
- Makarova K. S., Wolf Y. I., Iranzo J., Shmakov S. A., Alkhnbashi O. S., Brouns S. J. J., Charpentier E., Cheng D., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Scott D., Shah S. A., Siksnys V., Terns M. P., Venclovas Č., White M. F., Yakunin A. F., Yan W., Zhang F., Garrett R. A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., Koonin E. V. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 67-83
- Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2018) Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: where from here? *CRISPR J.* **1**, 325-336.
- Manurung B., Witsack W., Mehner S., Gruntzig M., Fuchs E. (2005) Studies on biology and population dynamics of the leafhopper *Psammotettix alienus* Dahlb. (*Homoptera: Auchenorrhyncha*) as vector of Wheat dwarf virus (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. *J. Plant Dis. Protect.* **112**, 497-507.
- Marraffini L. A., Sontheimer E. J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *staphylococci* by targeting DNA. *Science* **322**, 1843-1845.

- Mojica F. J. M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E., (2005) Intervening sequences of regularly spaced procaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174-182.
- Mojica F. J. M., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* **36**, 244-246.
- Mojica F. J. M., Garrett R. A. (2012) Discovery and Seminar Developments in the CRISPR Field. In *CRISPR-Cas Systems*, R. Barrangou and J. van der Oost, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-31.
- Mojica F. J. M., Ferrer C., Juez G., Rodríguez-Valera F. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax vulcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* **17**, 85-93.
- Mojica F. J. M., Juez G., Rodríguez-Valera F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* **9**, 613-621.
- Mullineaux P. M., Guérineau F., Accotto G. P. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 7259-7265.
- Najar A., Makkouk K. M., Boudhir H., Kumari S. G., Zarouk R., Bessai R., Othman F. B., (2000) Viral diseases of cultivated legume and cereal crops in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* **39**, 423-432.
- Nakata A., Amemura M., Makino K. (1989) Unusual nucleotide arrangement with repeated sequence in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol* **171**, 3553-3556.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J. D. G., Kamoun S. (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* **31**, 691-693.
- Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konermann S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**, 935-949.
- Nygren J., Shad N., Kvarnheden A., Westerbergh A. (2015) Variation in susceptibility to wheat dwarf virus among wild and domesticated wheat. *PLoS ONE*, **10**, e0121580. doi: 10.1371/journal.pone.0121580
- Özcan A., Pausch P., Linden A., Wulf A., Schühle K., Heider J., Urlaub H., Heimerl T., Bange G., Randau L. (2019) Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nat. Microbiol.* **19**, 89-96.
- Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9275-9282.
- Shah S. A., Alkhnabashi O. S., Behler J., Han W., She Q., Hess W. R., Garrett R. A., Backofen R. (2019) Comprehensive search for accessory proteins encoded with archaea and bacterial type III CRISPR-cas gene cassettes reveals 39 new cas gene families. *RNA Biol.* **16**, 530-542.
- Shmakov S. A., Makarova K. S., Wolf Y. I., Severinov K. V., Koonin E. V. (2018) Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, E5307-E5316.
- Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Makarova K. S., Wolf Y. I., Severinov K., Zhang F., Koonin E. V. (2017) Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 169-182.

- Schilperoort R. A., Veldstra H., Warnaar S. O., Mulder G., Cohen J. A. (1967) Formation of complexes between DNA isolated from tobacco crown gall tumours and RNA complementary to *Agrobacterium tumefaciens* DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 523-525.
- Schubert J., Habekuss A., Kazmaier K., Jeske H. (2007) Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany--diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. *Virus Res.* **127**, 61-70.
- Siksnyš V., Gasiunas G., Karvelis T. (2012) RNA-directed DNA cleavage by the Cas9-crRNA complex from CRISPR3/Cas immune system of *Streptococcus thermophilus*. U.S. Provisional Patent Application 61/613,373, filed March 20, 2012; later published as US2015/0045546 (pending).
- SKLÁDAL, Vladimír et al. *Sladovnický ječmen. 2, zcela přepracované vydání*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1967. ISBN 07-014-67-04/29.
- Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. (2008) CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 181-186.
- Sprink, T. Eriksson D., Schiemann J., Hartung F. (2016) Regulatory hurdles for genome editing - process vs. product based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep.* **35**, 1493-1506.
- Sternberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, **507**, 62-67.
- Tholt G., Kis A., Medzihradzky A., Szita E., Toth Z., Havelda Z. Samu F. (2018) Could vectors' fear of predators reduce the spread of plant diseases? *Sci. Rep.* **8**, 8705.
doi: 10.1038/s41598-018-27103-y
- Vacke J., (1961) Wheat Dwarf Virus Disease *Biol.Plant.* **3**, 228-233.
- van Erp P.B., Bloomer G., Wilkinson R. Wiedenheft, B. (2015) The history and market impact of CRISPR RNA-guided nucleases. *Curr. Opin. Virol.* **12**, 85-90.
- Venclovas C. (2016) Structure of Csm2 elucidates the relationship between small subunits of CRISPR-Cas effector complexes. *FEBS Lett.* **590**, 1521-1529.
- Von Bothmer R., Van Hintum T., Knupffer H., Sato K.: Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*). Developments in Plant Genetics and Breeding 7. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 2003. ISBN 0-444-505857
- Voytas D.F. (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **64**, 327-350.
- Wendt T., Holme I., Dockter C., Preuß A., Thomas W., Druka A., Waugh R., Hansson M., Braumann I. (2016) HvDep1 Is a positive regulator of culm elongation and grain size in barley and impacts yield in an environment-dependent manner. *PLoS ONE*.**11**, e0168924.
doi: 10.1371/journal.pone.0168924
- Willcox, G.(2005) The distribution, natural habitats and availability of wild cereals in relation to their domestications in the Near East: multiple events, multiple centres. *Vegetation History and Archaeobotany* **14**, 534-541.
- Wright A. V., Nunez J. K., Doudna J. A. (2016) Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell* **164**, 29-44.
- Xie J., Wang X., Liu Y., Peng Y., Zhou G. (2007) First report of the occurrence of wheat dwarf virus in wheat in China. *Plant Dis.* **91**, 111.
doi: 10.1094/pd-91-0111b

Zhang X., Zhou G. H., Wang X. F. (2010) Detection of wheat dwarf virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (*Psammotettix alienus* Dahlb.) by real-time PCR. *J. Virol. Methods* **169**, 416-419.

ZIMOLKA, Josef et al. *Ječmen – formy a užitkové směry v České republice*. Praha: Profi Press, 2006. ISBN 80-86726-18-5.

Zong Y., Wang Y., Li C., Zhang R., Chen K., Ran Y., Qiu J. L., Wang D., Gao C. (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **35**, 438-440.

7.2 Další zdroje

Confédération Paysanne and Others v. Premier Ministre and Ministre de L'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Judgment of the Court of Justice of 25 July 2018. Case C-528/16. ECLI:EU:C:2018:583.

Dostupné z:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1590471867015&uri=CELEX:62016CJ0528>

Český statistický úřad [online]. Osevní plochy zemědělských plodin k 31.5. Praha: Český statistický úřad, 2020 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02A&z=T&f=TABULKA&skupId=346&katalog=30840&pvo=ZEM02A&evo=v533 ! ZEM02A-2019 1>

Ministerstvo životního prostředí [online]. Stanovisko ČK GMO k novým genovým technikám – zinkové prsty 3 a podobné techniky využívající cílených nukleáz. Praha: Ministerstvo životního prostředí, c2008-2019 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z:

[https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/\\$FILE/oeres-stanovisko_CKGMO_nove_techiky_ZnF3-20130722.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/$FILE/oeres-stanovisko_CKGMO_nove_techiky_ZnF3-20130722.pdf)

Ministerstvo životního prostředí [online]. Stanovisko ČK GMO k novým genovým technikám: cisgeneze a intrageneze. Praha: Ministerstvo životního prostředí, c2008-2019 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/\\$FILE/oeres_nove_techiky_cisgeneze_20151005.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoviska_ck_gmo/$FILE/oeres_nove_techiky_cisgeneze_20151005.pdf)

Ministerstvo životního prostředí [online]. Zákon 78/2004 Sb. Praha: Ministerstvo životního prostředí, c2008-2019 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/538509B51D97A94FC125690B00263A23/%24file/Z%2078_2004.pdf

(https://bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace1/Moderni_biotechnologie_WEB.pdf)

(Tisková zpráva: <http://www.avcr.cz/cs/vyhledavani/index.html?query=GMO>)

[https://Geminiviridae ~ ViralZone \(expasy.org\)/109](https://Geminiviridae ~ ViralZone (expasy.org)/109)

<https://truehopperswp.com/species/psamnotettix-alienus #image-1>

<https://truehopperswp.com/species/psamnotettix-alienus #image-2>