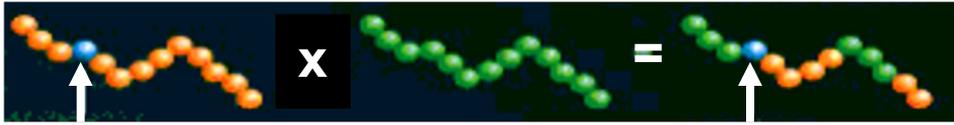


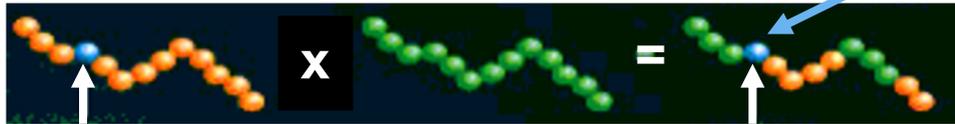
## • Pokusné stanice 1775, šlechtění 1865



- Kombinace genů - křížení,
- metoda výběr - fenotypu, - výnosových ukazatelů



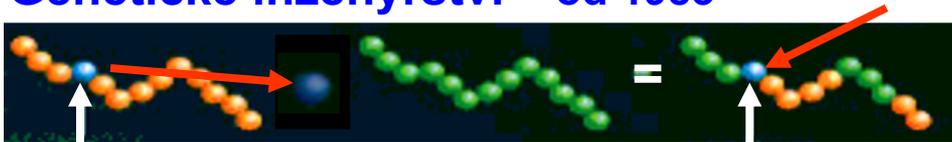
## • Moderní šlechtění od 1960



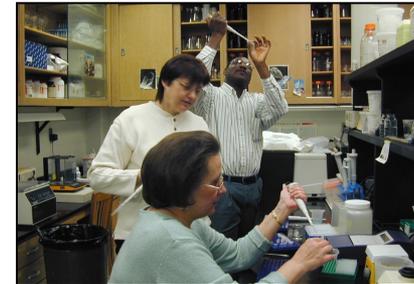
- Kombinace genů - křížení
- Mutagenéze, EMS, NaN<sub>3</sub>, x-ray
- *In vitro* kultury, androgenéze
- Výběr pomocí molekulárních markerů  
RFLP, RAPD, AFLP, SSR markery



## • Genetické inženýrství od 1983



- Technologie pro cílený přenos žádaného genu



# Molekulární biologie

## **Transgenoze Genetické modifikace**

**Ludmila Ohnoutková**

Laboratoř růstových regulátorů  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci  
& Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.



# Transgenoze – genetické modifikace

- Co vlastně geneticky modifikované organizmy jsou a jak se připravují?
- Co to jsou NGT?
- Praktické využití?
- Jaká jsou právní opatření při nakládání s nimi?

✓ **GMO**                      **Geneticky modifikované organizmy**

*Významově stejné označení :*

✓ **GM**                              **Genetická modifikace**  
**GM Crops, GM Plants**

✓ **Biotech**                      **Biotech Crops, Biotech Plants**

✓ **NGT**                              **New Genomic Techniques**  
**New Breeding Technologies**

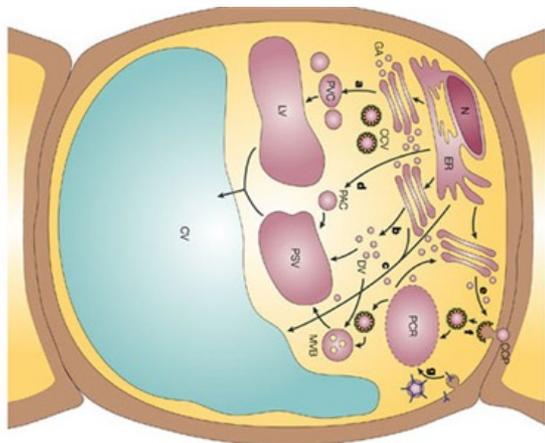
Nové techniky šlechtění

**New techniques in biotechnology**

Nové biotechnologické techniky

**Precision breeding**

# Interdisciplinární technologie



**Funkce  
a regulace  
exprese genů**

Šlechtění,  
genetické  
modifikace rostlin  
a mikroorganismů

Produkce  
užitečných  
bílkovin,  
molekulární  
farmaření

**DNA**

**Genomika**



**RNA**

**Transkriptomika**



**Bílkoviny**

**Proteomika**



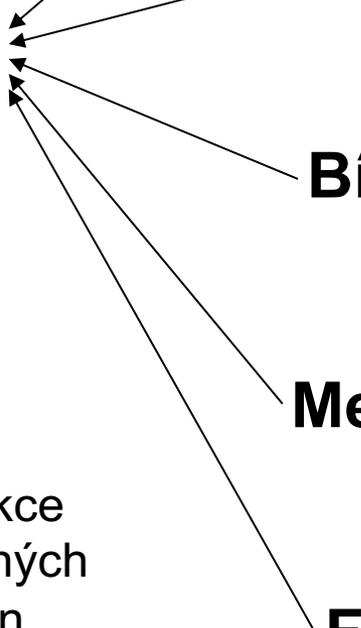
**Metabolity**

**Metabolomika**



**Fenotyp**

**Fenomika**



# Metody genového inženýrství

- *Rekombinantní technologie*
- *Transformace, Transgenoze rostlin*
- *Editace genů, gene-editing*



*Bakterie, kvasinky, houby, řasy, rostliny, zvířata*

- **Základní výzkum, studium funkce genů**
- **Aplikovaný výzkum, šlechtění**

# ✓ *Technologie rekombinantní DNA*

Obecné označení postupů, které umožňují vytvářet nové kombinace molekul DNA, které se v přirozeném stavu společně nevyskytují.

## Do genomu rostliny můžeme vnášet geny různého původu

### Ovlivnění metabolických drah rostliny

#### *Nutnost znalost syntetické dráhy*

- Databáze
- Vyklonovat
- Gene Synthesis Services by GeneArt®, <http://www.invitrogen.com>

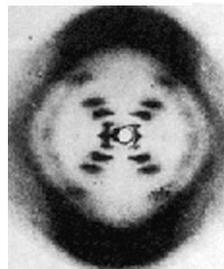
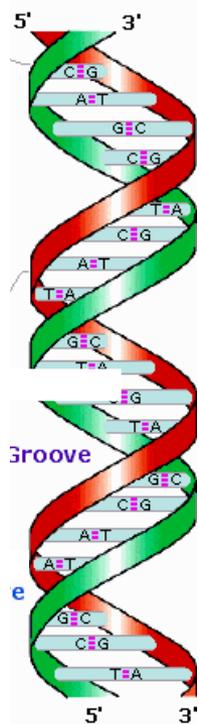
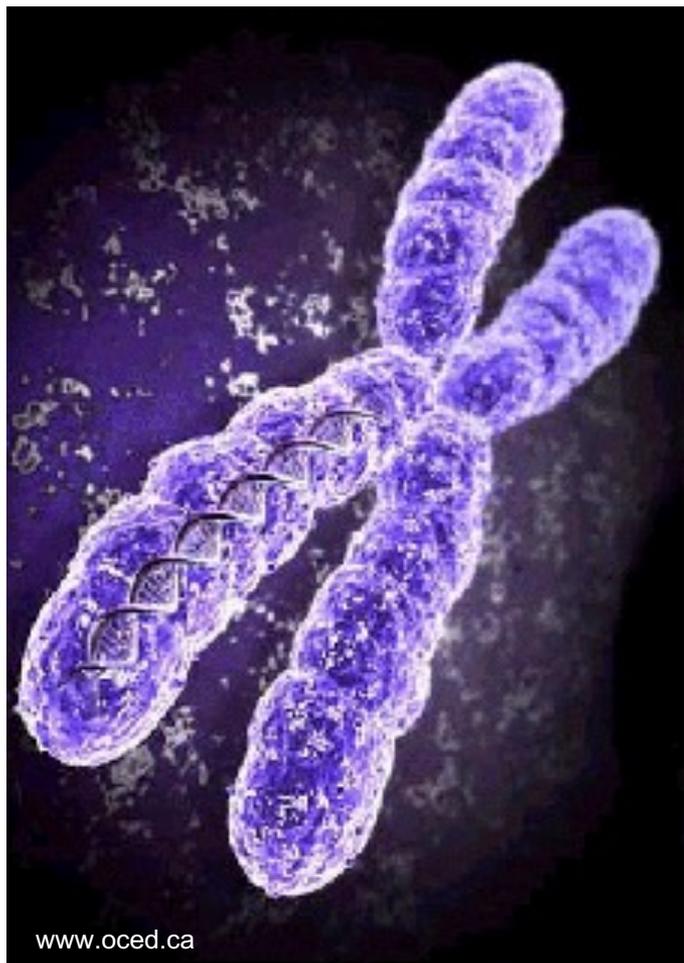
- Nad-exprese žádaného genu
- Umlčení genu
- Mutace genu, funkční části, promotoru



# Objev struktury DNA

23.4.1953 byl oznámen objev struktury DNA a její mechanismus

✓ největší objev 20. století



Francis Crick



James Watson



Maurice Wilkins



Rosalind Franklinová

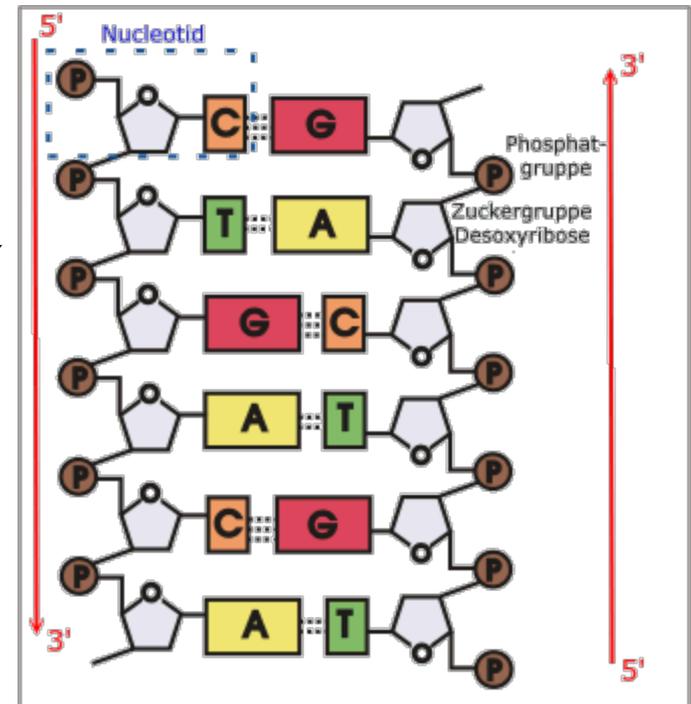
# DNA

- Deoxyribonukleová kyselina
- Deoxyribonucleic acid
- DNA je biologická makromolekula - polymer v podobě řetězce nukleotidů složených
  - z cukru deoxyribózy
  - fosfátové skupiny
  - a jedné ze čtyř nukleových bází

deriváty

*purinu* (Adenin, Guanin)

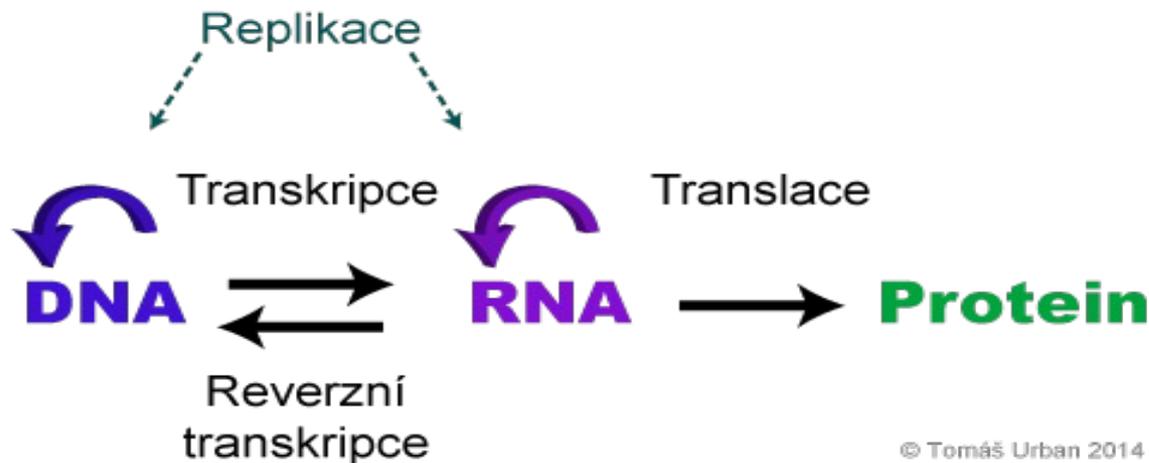
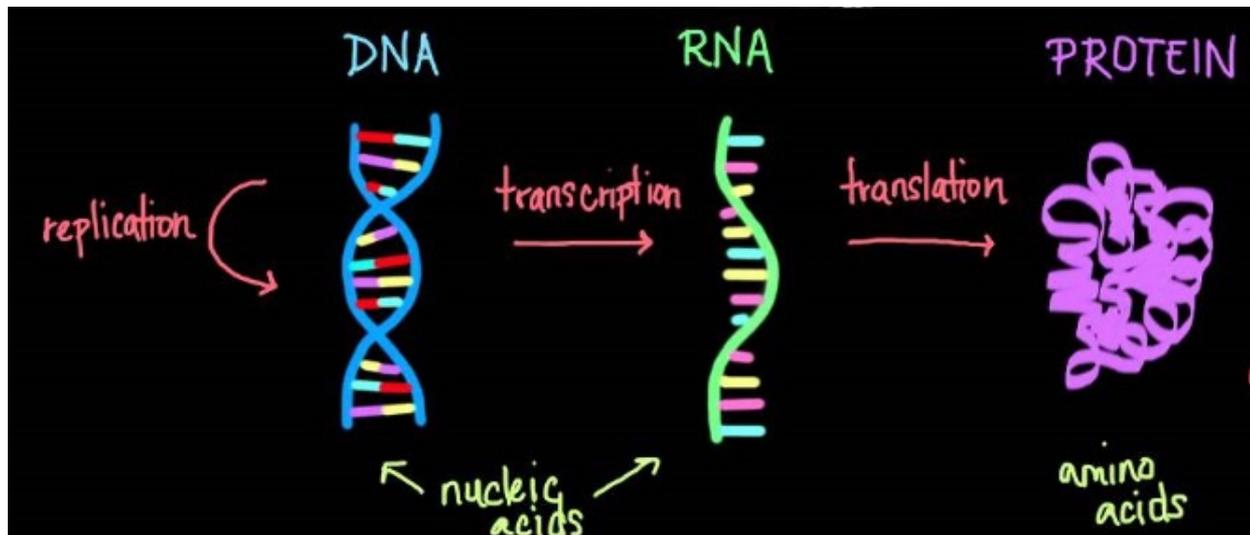
*pyrimidinu* (Cytosin, Thymin)



# Centrální dogma molekulární biologie

1957, definoval Francis Crick, publikoval 1958

- popisuje cestu přenosu informace mezi biopolymery (DNA, RNA a proteiny)



# DNA polymerázy

1957, Arthur Kornberg, prokázal existenci *E.coli* polymerázy

➤ Objev umožnil syntézu DNA *in vitro*



*E.coli* však byly izolovány jen Pol I, II a III:

DNA polymeráza I - především opravuje DNA

DNA polymeráza II - především opravuje DNA

DNA polymeráza III - hlavní DNA polymeráza bakterií polymeráza

IV - méně významná

DNA polymeráza V - méně významná

Roger Kornberg

2006 – Nobelova cena za chemii, transkripce u eukaryotních organismů

## •Taq polymeráza

**1969**, Thomas Brock a Hudson Freeze objevili extrémní druh termofilní bakterie, kterou pojmenovali *Thermus aquaticus* v povodí dolního gejzíru v Yellowstone národním parku

**1976**, Alice Chien a John Trela z University of Cincinnati izolovali pojmenovanou Taq polymerázu, teplotní preferencí 75-80 C

**1988**, byla poprvé izolována a použita termostabilní DNA polymeráza v PCR

## •Reverzní transkriptázy

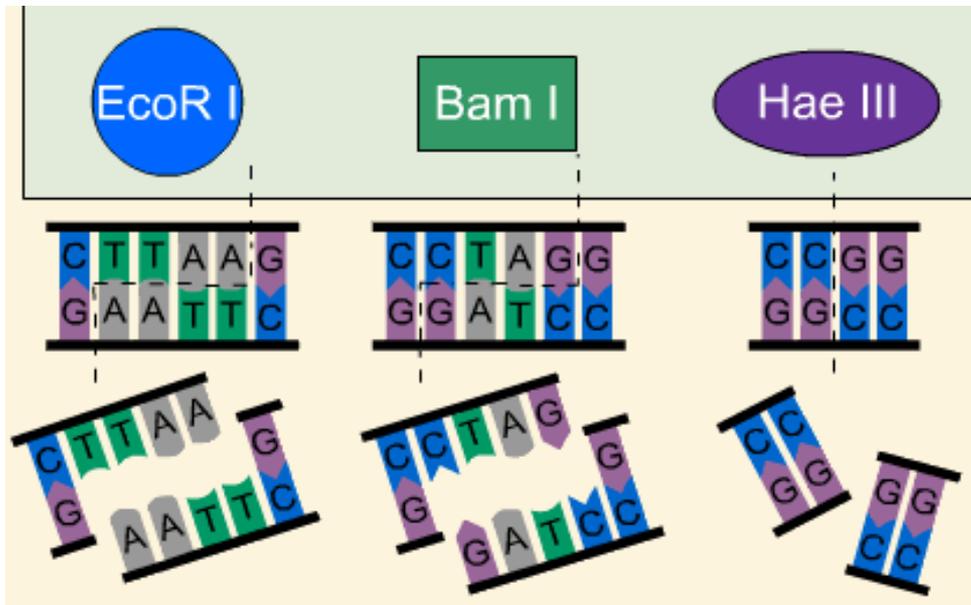
Objeven 1970, Howard Temin (David Baltimore) umožňující syntézu DNA podle RNA vzoru,

jde o výjimku z původního Crickova centrálního dogmatu, které konstatuje, že RNA vzniká na základě DNA a nikoliv naopak



## Restrikční enzymy

- Restrikční enzymy Typu II a III štěpí řetězce DNA na místech specifické sekvence
- Tyto enzymy rozpoznávají sekvence 4, 6 nebo více bází a štěpí je.
- Názvy těchto enzymů používají 3-písmenný kód (psaný kurzívou):  
 1. písmeno označuje rod, 2. a 3. písmeno druh organismu  
 např. *EcoRI* je první restrikční enzym nalezený v kmeni R bakterie *E.coli*.

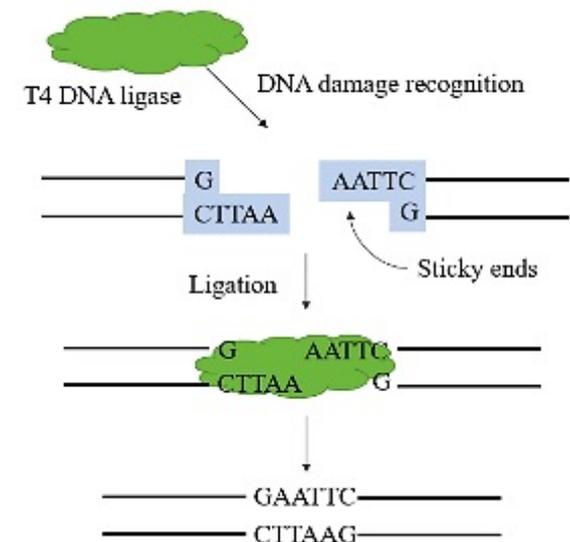
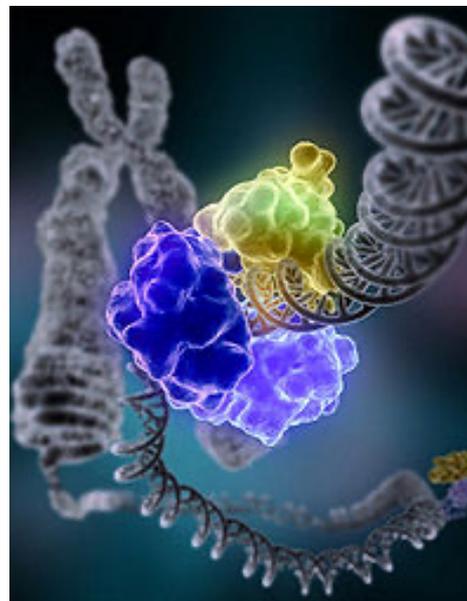


## T4 DNA LIGÁZA (objev 1967)

Meselson a Weigle 1961, Kellenberger *et al.* 1964, Young a Sinsheimer 1965 a Bode a Kaiser 1967

*T4 DNA ligáza* získaná z buněk *E. coli* infikovaných fágem T4.

- Katalyzuje formaci fosfodiesterové vazby mezi 5' fosfátem a 3' OH skupinou v DNA nebo RNA.
- Enzym opravuje jednořetězcové štěpy v DNA, RNA, nebo hybridních molekulách DNA/RNA. T
- Spojuje DNA fragmenty s kohesivními nebo tupými konci. Ke své činnosti vyžaduje jako kofaktor ATP.



➤ proces je označován jako **ligace**

# Vektory

1952, Joshua Lederberg, obdržel Nobelovu cenu 1958 za objev a popis konjugace u bakterií

- Molekula DNA, která slouží jako přenašeč genetické informace do buňky
- Obecně je tvořený vloženou sekvencí DNA a větší sekvencí DNA, které slouží jako nosná konstrukce.
- Používají pro přenos genetické informace do buňky s cílem pomnožení a exprese

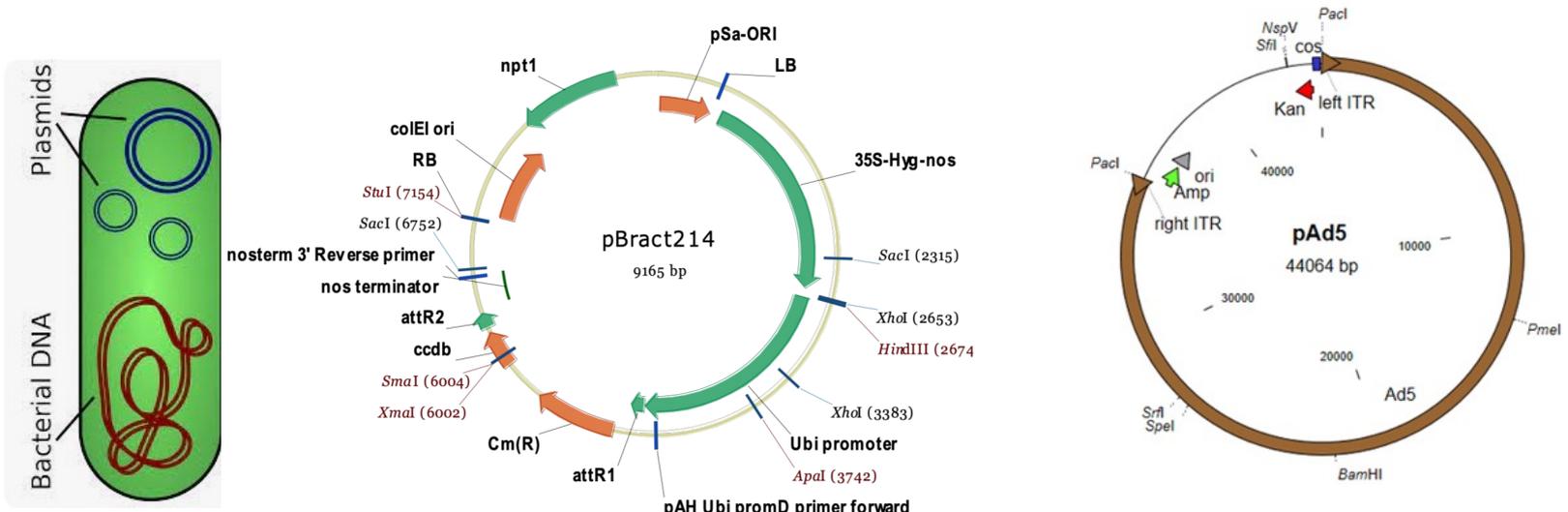
## Plasmidy, bakteriální, kvasinkové

molekuly s dvouvláknovou cirkulární DNA strukturou cílené části DNA.

## Virové vektory

jsou velmi často uměle konstruovány a obsahují modifikovanou DNA nebo RNA.

Jejich úpravy je zbavují vlastní infekčnosti, ale zachovávají si schopnost průniku a pomnožení v buňce.



# Rekombinantní technologie

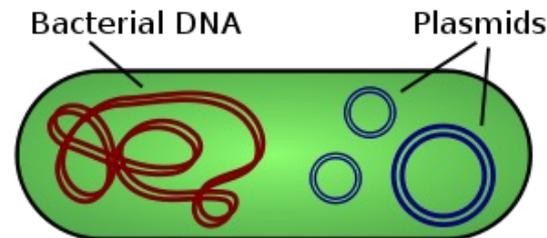
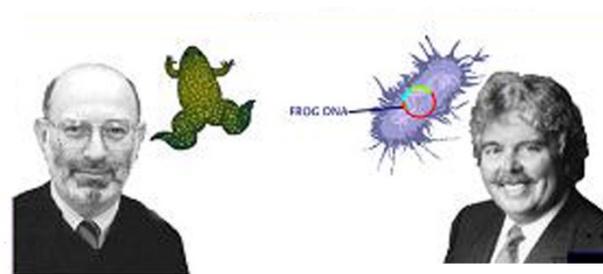
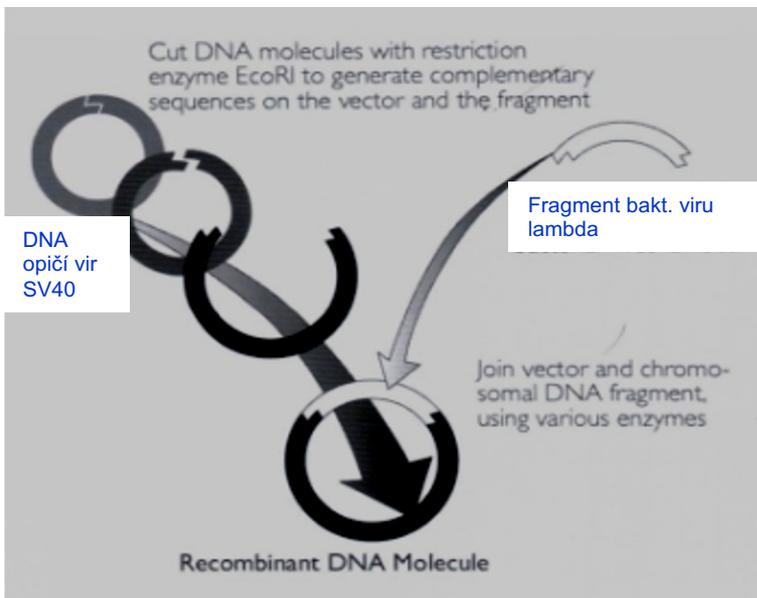
1972 Paul **Berg**, Waldemar **Gibertem**, Frederic **Sangerem**

1980 Nobelova cena za chemii

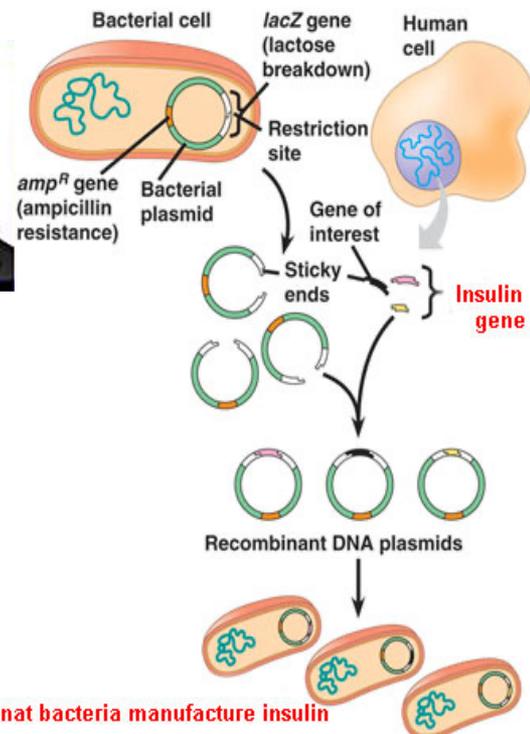
<https://www.youtube.com/watch?v=aA5fyWJh5S0>

1973 Herbert **Boyer** a Stanley **Cohen**

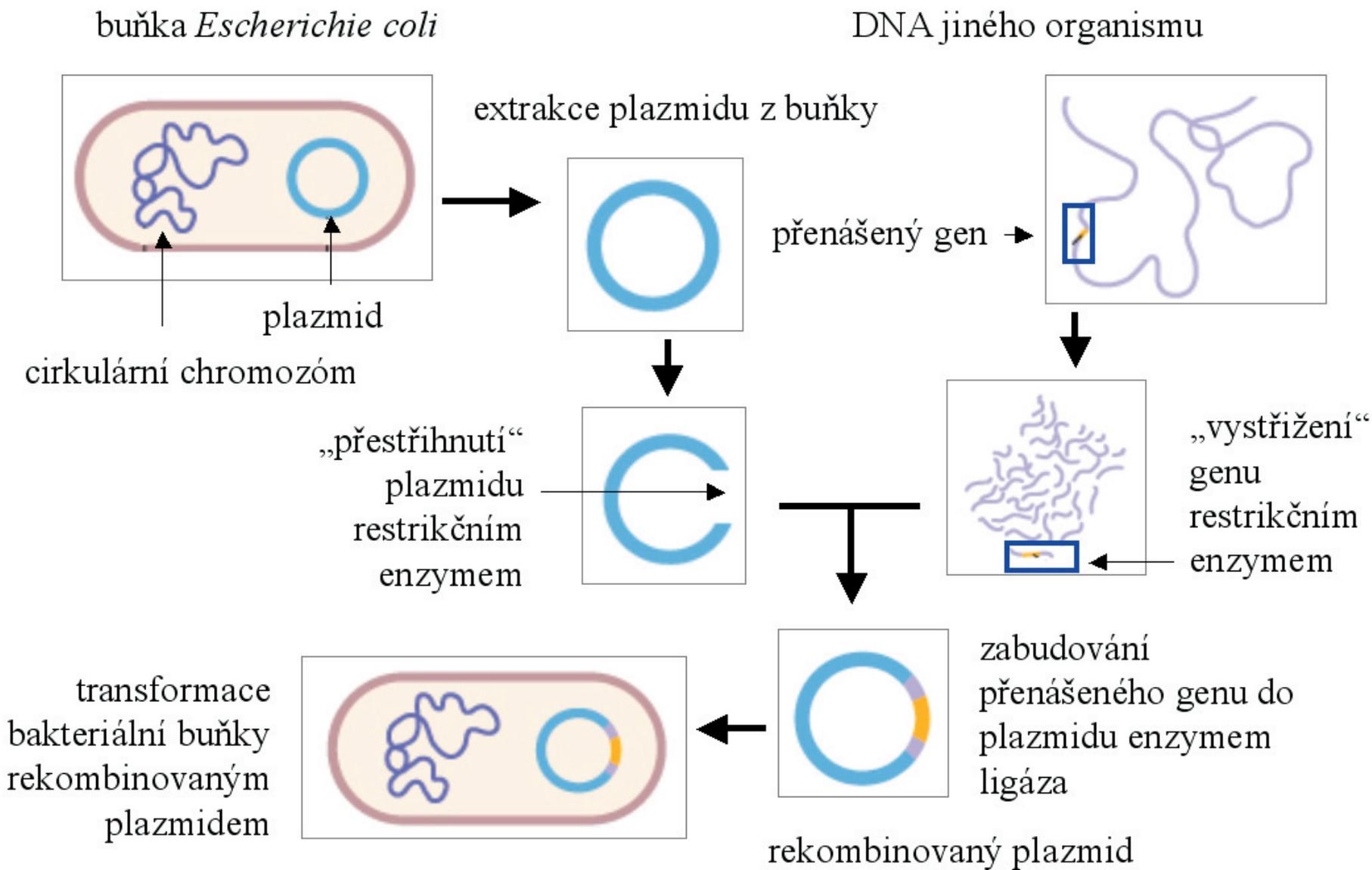
- Vytvořili první transgenní organismus vložením genů s antibiotikovou rezistencí do plasmidu bakterie *Escherichia coli*.
- Přenesli žabí ribozomální RNA do *E. coli*.



Bakterie byly prvním geneticky modifikovaným organismem.



# Rekombinantní technologie



# Rekombinantní klonovací systémy

## Gateway® Technology - Invitrogen

### The basics of Gateway® Reactions

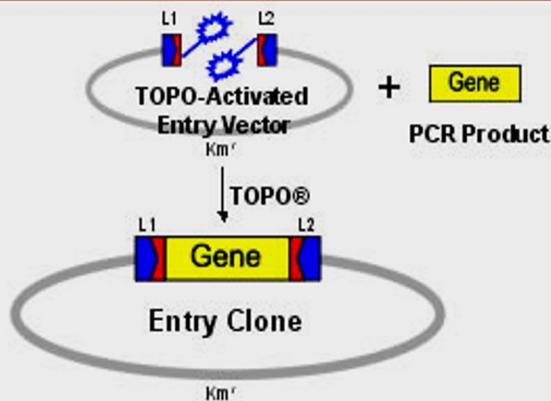
- **BP reaction**—to create a Gateway® entry clone
- **LR reaction**—to create a Gateway® expression clone

## Cre-lox recombination:

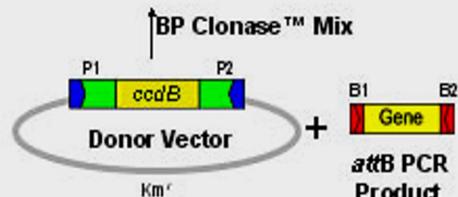
Cre-ative tools for plant biotechnology  
- marker free

### Cloning PCR Products into Entry Clones

Directional  
TOPO®  
Cloning

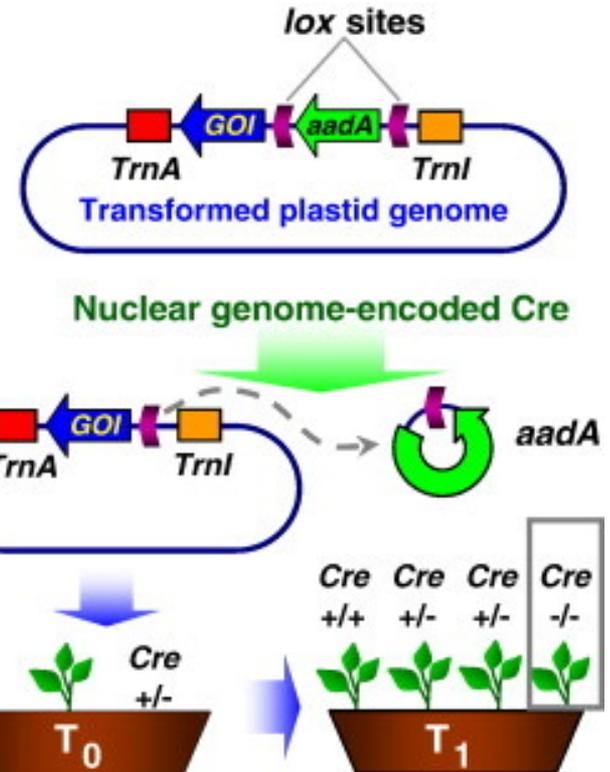


Recombination  
Cloning



*Bacteriophage lambda*, 1990

Invitrogen  
life technologies



*Bacteriophage P1*, 1992

# Co potřebujeme pro úspěšnou transformaci rostlin?



- *Vektor / Plazmid*
  - *Zájmové geny / GOI*
  - *Promotor*
  - *Selekční geny*
  - *Reportérové geny*
  - *Metodu přenosu*
- **Optimalizace metod pro jednotlivé druhy**  
- nízká efektivita transformace
- **Vývoj nových typů vektorů**



# Gen a jeho sekvence

## dapA

```

atgttcacgggaagtattgtcgcgattgttactccgatggatgaaaa
aggaatgtctgtcgggctagctgaaaaaactgattgattatcatg
tcgccagcggctacttcggcgcgatcgtttctgttggcaccactggcgag
tccgctacctaataatcatgacgaacatgctgatgtgggatgatgac
gctggatctggctgatgggcgcattccggtaattgccggaccggcgc
taacgctactgcggaagccattagcctgacgcagcgcgttcaatgaca
gtggatcgtcggctgcctgacggtaaccctactacaatcgtccgt
cgcaagaaggttgtatcagcatttcaaagccatcgtgagcatact
gacctgccgcaaattctgtataatgtgccgtcccgtactggctgcca
tctgtccccgaaacgggtggccgtctggcgaaagtaaaaaatat
tatcggaatcaagaggcaacagggaaacttaacgcgtgtaaaccaga
tcaaagagctggttcagatgattttgttctgctgagcggcgcgatga
tgcgagcgcgctggacttcatgcaattggcggtcatggggttattt
ccgttacgactaacgtcgcagcgcgtgatatggcccagatgtgcaa
ctggcagcagaagaacattttgccgaggcacgcgttattattcagcg
tctgatgccattacacaacaaactatttgcgaaccaatccaatcc
cggtgaaatgggcatgtaaggaactgggtcttggcgcaccgatac
gctgcgcctccaatgacaccaatcaccgacagtggtcgtgagacg
gtcagagcggcgcttaagcatgccggttctgctgtaa
    
```

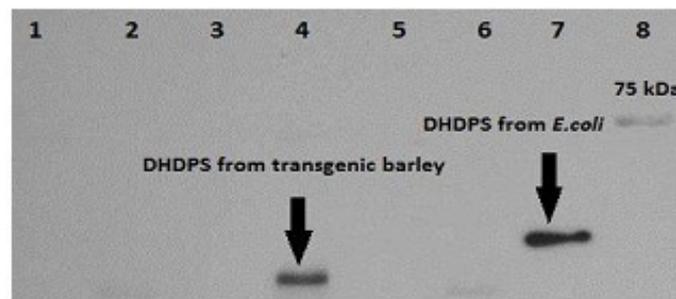


## Dokonalá znalost syntetické dráhy



dapA forward: CTG CAG GAT CCA TGT TCA CGG

dapA reverse: GAG CTC CCT AAA CTT TAC AGC





# GeneArt® Gene Synthesis

The GeneArt® Gene Synthesis service offers chemical synthesis, cloning, and sequence verification.

## GeneArt® TALs For Plant Engineering

## GeneArt® Site-Saturation Mutagenesis

## GeneArt® Subcloning & Express Cloning Service

Track your GeneArt® project with our improved GeneObserver™ online tracking system

My Projects **My GeneObserver™** News

Custom Gene Synthesis | Need help: ?

### Status of your orders

Last update 14-Oct-2014; all dates are shown in Central European Time

Project Name	Project ID	Start Date	Items on Schedule	Project Schedule			
▶ Alpha	2014AAAAAP	13-Oct-2014	1 of 1	✓			
▶ Bravo	2014AAAAAP	10-Oct-2014	1 of 1	✓			
▼ Charlie	2014AAAAEP	10-Oct-2014	2 of 2	✓			
▼ Construct Name	Service Type	Construct ID	Dependent on	Due Date ?	New Due Date ?	Process Information	In Time
▼ Ant	GeneSyn	14AAAAAP		13-Oct-2014		Oligo synthesis	✓
Fragment assembly		Fragment fusion	Quality control				

Select your language

- English
- French
- Italian
- Japanese
- Spanish

Optimized

The requested sequence contains following motifs. Highlighted motifs have to be eliminated before ordering. Project ID: 5353

Type	Position	Length	Result
Pattern Plant: poly(A)-site (03) (hidden)	222	5	AAGAA
Pattern Plant: poly(A)-site (03) (hidden)	612	5	AAGAA

```

M A P T V M A S S A T S V A P F O G
GGATCCATGGCACCAACTGTGATGGCTTCTAGCGCCACTTCTGTTGCTCCATTCCAGGGC
L K S T A G L P V S R R S N A S S A S V
CTCAAGTCTACTGCTGGCCTTCTGTTCACGCCGCTCAAACGCTTCATCTGCCTCCGG
S N G G R I R C M Q M F T G S I V A I V
TCCAACGGCGGGAGGATTGCTGCATGCAAATGTCACCGGCTCAATCGTTGCTATCGTG
T P M D E K G N V C R A S L K K L I D Y
ACCCCTATGGACGAGAGGGCAATGTGTGCCGGGATCATTGAAGAAGCTTATCGACTAC
H V A S G T S A I V S V G T T G E S A T
CACGTGGCATCTGGCACTTCGGCTATTGTGTCTGTGGGACTACTGGGAGTCTGCTACA
L N H D E H A D V V M M T L D L A D G R
CTCAACCATGACGAGCAGCCGATGTTGTGATGATGACCCCTGATCTTGCCGACGGGAGA
I P V I A G T G A N A T A E A I S L T Q

```

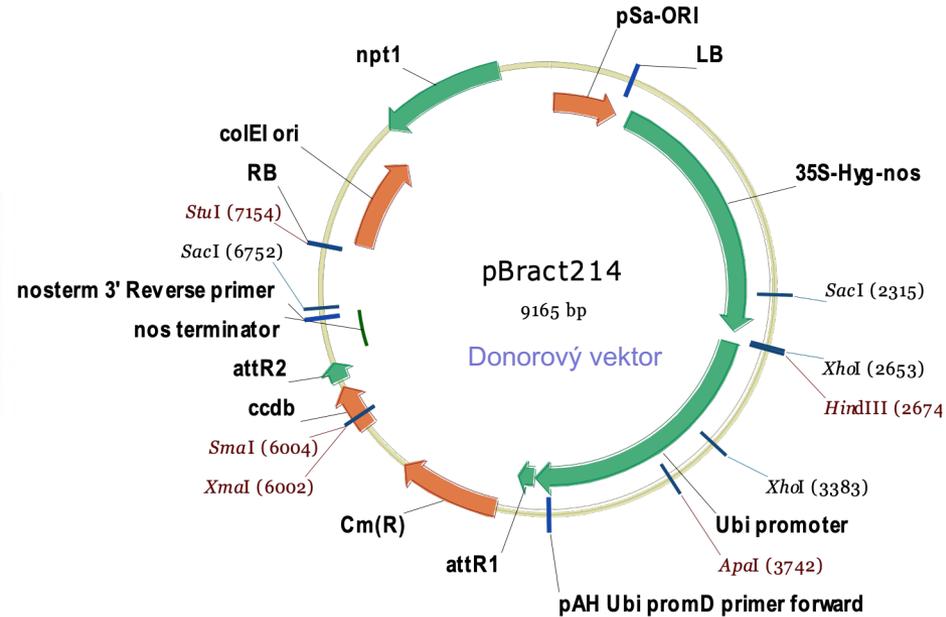
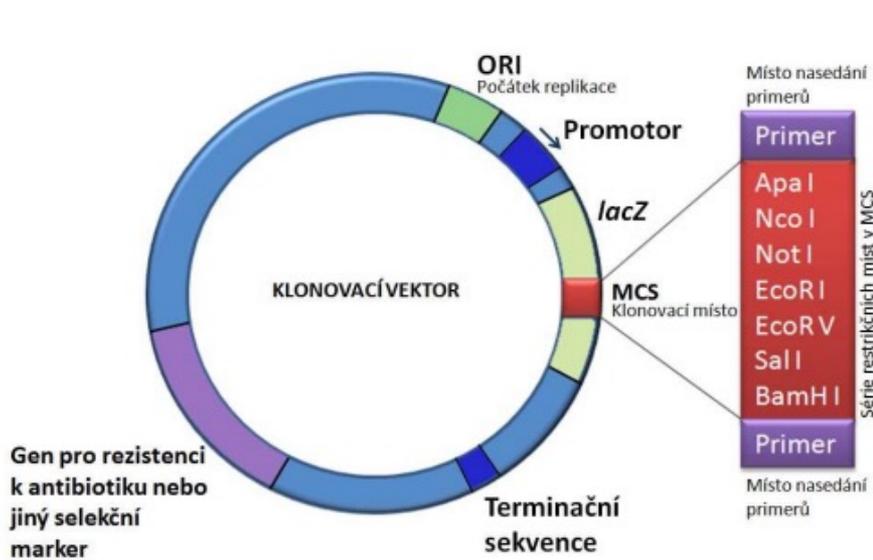


# Konstrukce transgenních rostlin - expresní systém

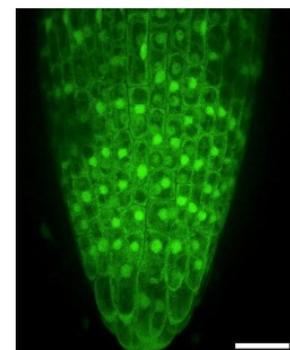
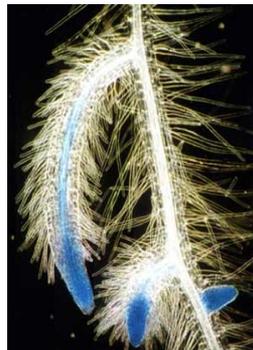
## ❖ DNA konstrukt



## ❖ Klonování

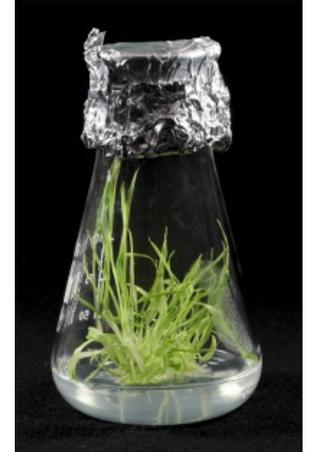
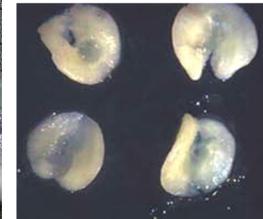
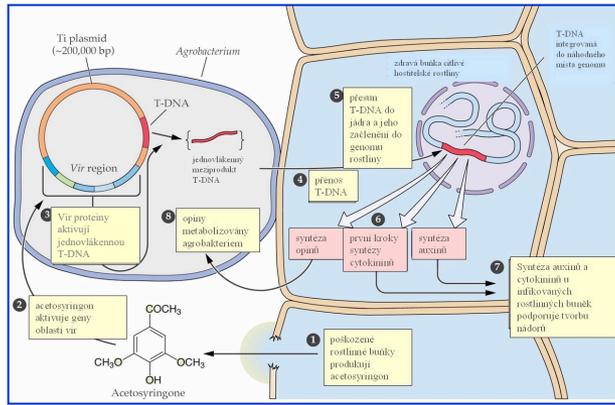


- Selekční geny
- Reportérové geny

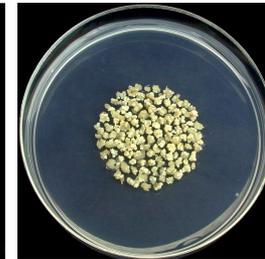
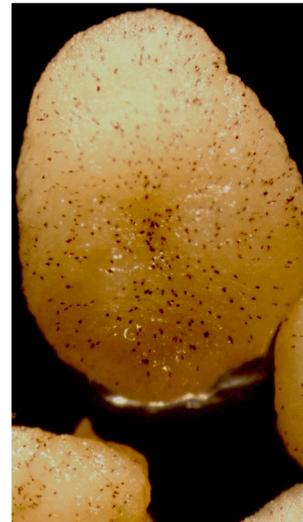


# Metody transformace

## Pomocí *Agrobacterium tumefaciens*



## Pomocí mikroprojektilového přenosu DNA, genové dělo



# Metody transformace

„Kmotra rostlinných biotechnologií“ Mary-Dell Chilton

V roce 1977 objevila přenos části plasmidu *Agrobacterium tumefaciens* do DNA rostlin.  
2002 cenu Benjamina Franklina

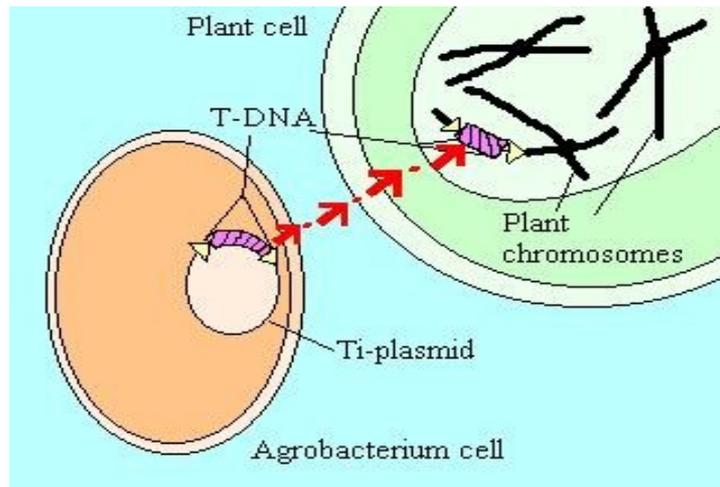
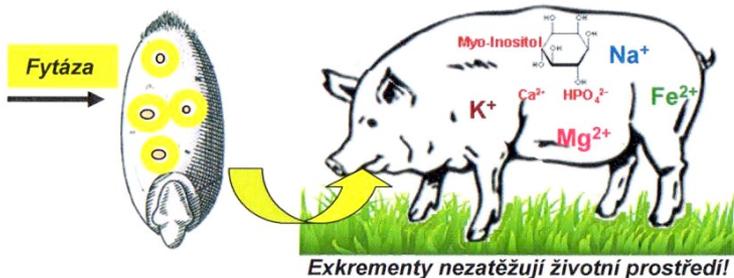
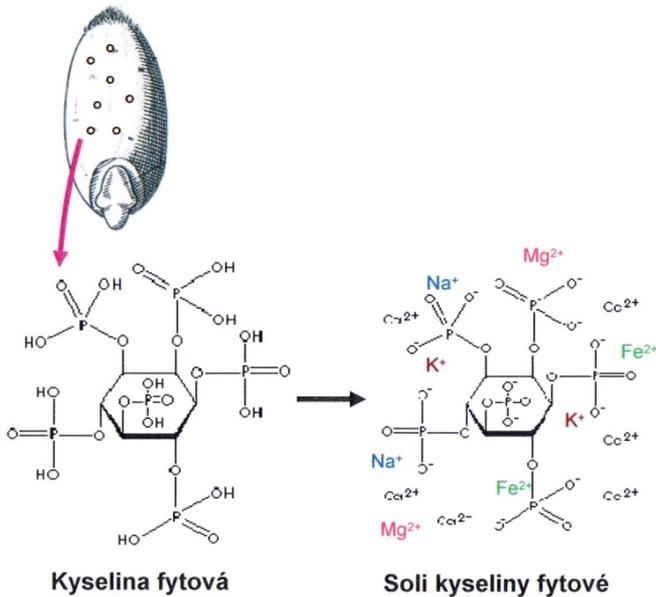


Foto Greg deDeugd

Mary-Dell Chilton of Syngenta at RTP, 2013

# Transgenní linie ječmene nadprodukcující heterologní fytasu v zrně SCLW-GP-PHYA

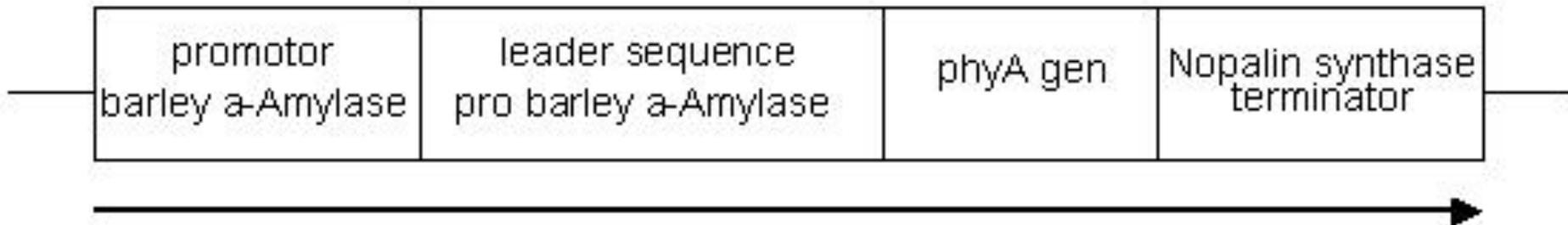


## Z *Aspergillus niger* byl izolován gen (*phyA*)

podmiňující zvýšení vytváření enzymů umožňujících rozklad fytátů a tím zvýšení využití fosforu a zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  aj.

- pAMFIT (prof. C. Fogher, Katolická Universita v Piacenze, Itálie)

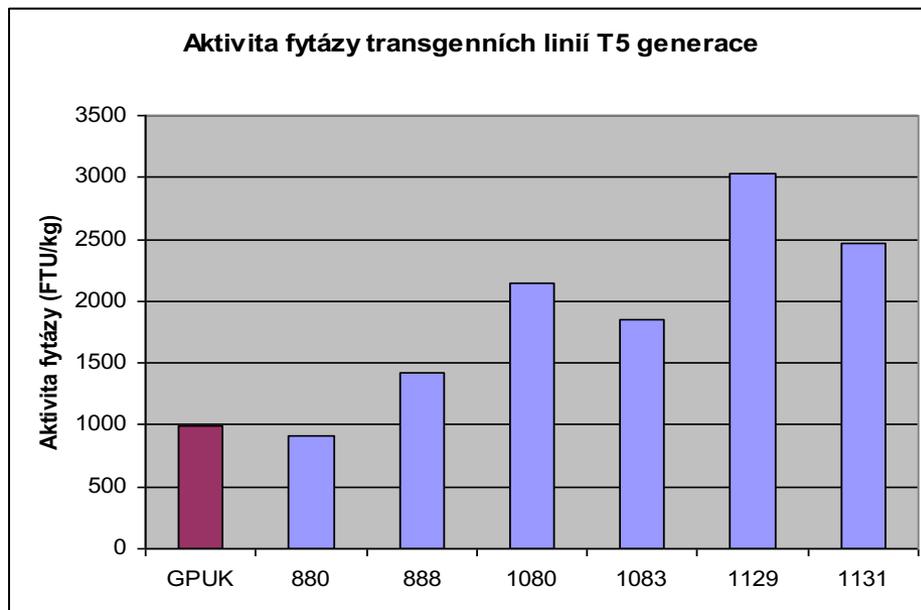
*Orientace funkční části plazmidu:*



## • Měření aktivity fytasy

Spektrometricky, molybdenan/vanadičnanová metoda.

Během inkubace se uvolňuje anorganický fosfát, inkubace je zastavena přidáním molybdovanadátového činidla, měření při vlnové délce 415 nm.



Jedna fytasová jednotka (FTU) je definována jako množství enzymu, které uvolní 1  $\mu\text{mol}$  fosfátu za minutu z 0,0054 mol/l roztoku fytátu sodného za podmínek reakce (37°C, pH 5,5).

Linie vykazující zvýšenou aktivitu fytasy označené **SCLW-GP-PHYA** byly v roce 2011 na základě povolení MŽP č.j.: 42029/ENV/11 uvedeny do životního prostředí.

Maroparcelkové pokusy byly realizovány ve spolupráci AGRA GROUP a.s. v Lukavci u Pacova.

### Cíl polních pokusů:

- Ověření přenosu a stability transgenu
- Zhodnocení rozdílů exprese transgenu *phyA* a aktivity fytasy u jednotlivých linií
- Sledování fenologických a výnosové charakteristiky v podmínkách polního pěstování.



Ministerstvo životního prostředí

#### ODESÍLATEL:

Ing. Karel Bláha, CSc.  
ředitel odboru environmentálních rizik  
Ministerstvo životního prostředí  
Vršovická 65  
100 10 Praha 10

#### ADRESÁT:

Vážená paní  
doc. RNDr. Eva Zažímalová, CSc.  
ředitelka ÚEB AV ČR, v. v. i.  
Ústav experimentální botaniky  
AV ČR, v. v. i.,  
Rozvojová 263  
165 02 Praha 6 - Lysolaje

V Praze dne 23. května 2011  
Č.j.: 42029/ENV/11  
K č.j.: 13194/ENV/11  
Vyřizuje: Ing. Routa  
Tel.: 267122554

#### Rozhodnutí

Ministerstvo životního prostředí jako správní úřad příslušný podle § 5 zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů, (dále jen „zákon“) a § 10 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, ve znění pozdějších předpisů,

#### rozhodlo

podle § 5 odst. 8 zákona ve věci žádosti Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., se sídlem Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, o uvedení geneticky modifikovaného jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou produkcí enzymu fytasy v zrně do životního prostředí takto:

Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Rozvojová 263

165 02 Praha 6

se uděluje povolení

k uvádění

geneticky modifikovaného jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou produkcí enzymu fytasy v zrně do životního prostředí.



# 2025: Field trials, T3 generation, Olomouc

## Decision of the Czech Ministry of Environment in 2025 No. MZP/2025/750/1238

Ministerstvo životního prostředí

Odbor environmentálních rizik  
a ekologických škod  
Vršovická 1442/65  
100 10 Praha 10

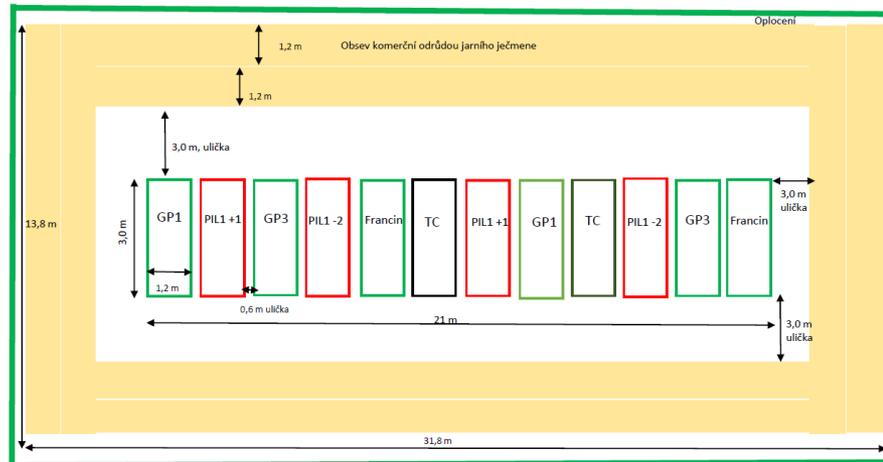
Praha dne 26. března 2025  
Č. j.: MZP/2025/750/1239  
Sp. zn.: ZN/MZP/2025/750/29  
Vyřizuje: Ing. Hana Jiráková, Ph.D.  
Tel.: 267 122 470  
E-mail: [hana.jirakova@mzp.gov.cz](mailto:hana.jirakova@mzp.gov.cz)

Vážený pan  
**RNDr. Jan Martinec, CSc.**  
ředitel  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.  
Rozvojevá 263  
165 02 Praha 6 - Lysolaje

**Rozhodnutí o oprávnění k uvádění GMO do životního prostředí v rámci polního pokusu s jarním ječmenem TL-GP-PIL 1**

## Objective of the Field Trials

- Confirmation of the stability of two homozygous lines, *Hvpil1 +1* and *Hvpil1 -2*.
- Verification of agronomic characteristics and phenological observations, especially plant height and associated internode length.
- Yield and grain quality indicators will also be evaluated.



# 2025: Field trials, T3 generation, Olomouc

Utility model TL-GP-PIL1

April 8, 2025



June 25, 2025



Harvest - August 15, 2025





# First field trial with gene-edited barley in the EU

Drahomír Letev<sup>1</sup>, Tomáš Vičko<sup>1</sup>, Michaela Mikulaščíková<sup>1</sup>, Radoslav Kopma<sup>2</sup>, Peter Heiden<sup>1</sup>, Ludmila Ohnoutková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Growth Regulators, Palacký University in Olomouc & Institute of Experimental Botany of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.

<sup>2</sup>Department of Chemical Biology, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

## Background

Plant growth is strongly regulated by light, with phytochromes acting as key photoreceptors for red/far-red light. Their downstream partners, Phytochrome Interacting Factors (PIFs), are transcription factors that integrate light and hormonal signals to control elongation growth.

In rice *Oryza sativa*, Phytochrome Interacting factor 1 (PIL1) transcription factor regulates internode elongation via cell-wall related genes and induces morphological changes in response to drought. In barley (*Hordeum vulgare*), the role of the HvPIL1 ortholog remains elusive. Using CRISPR/Cas9 technology, a spring barley cultivar, Golden Promise, was recently gene-edited, inducing a targeted mutation in the HvPIL1 gene. Obtained homozygous non-transgenic lines showed reduced height in the greenhouse conditions, providing a useful model to study the function of HvPIL1 in barley.

Barley is the fourth most cultivated cereal worldwide, but its yield is threatened by lodging. Since plant height reflects both genetic regulation and environmental conditions, understanding HvPIL1 function is important for uncovering light-dependent growth regulation in cereals and may support strategies for crop improvement. Identifying new alleles responsible for semi-dwarf phenotype can broaden the spectrum of available traits that can be exploited in breeding new varieties with increased environmental stress resilience.

## Material and Methods

### Barley Transformation

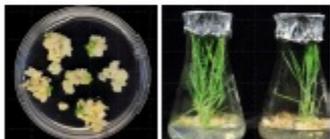
#### 2023: Cloning expression vector TP302

- CRISPR/Cas9 system was designed to introduce mutations in the HvPIL1 gene
- Specific guide RNA targeted the second exon in the protein-coding sequence



#### 2023: Transformation, selection, regeneration

- Immature embryos of spring barley cv. Golden Promise were transformed using *Agrobacterium tumefaciens*
- Transgenic cells were selected on hygromycin, and regenerated plants were genotyped



Genotyping T0 generation



Homozygous transgenic mutant

### Objective of the Field Trials

- Confirmation of the stability of two homozygous lines, HvPIL1 +1 and HvPIL1 -2.
- Verification of agronomic characteristics and phenological observations, especially plant height and associated internode length.
- Yield and grain quality indicators will also be evaluated.

## Results

### 2024: Screening of T1, T2 generations

#### > Sequence alignment of mutant lines



#### > Genotyping Cas9 transgene in the T2 generation



#### ✓ Mutant HvPIL1: Transgene-free, homozygous plants

#### > Phenotyping plants from greenhouse



- Growth differences: PIL1 mutants showed reduced internode elongation and overall shorter culms.

### 2025: Field trials T1 generation Olomouc

#### Utility model TL-QP-PIL1

Decision of the Czech Ministry of Environment in 2025, No. MZP/0225/750/1238



### Acknowledgements

The work is funded within the TRNGAC project CZ.02/19/016/0001/0000000

GREEN FOR GOOD VE

1 - 4 September, 2025, Olomouc, Czech Republic



# Barley ABC transporters involved in abiotic stress response

Jiří Dudaš, Ludmila Ohnoutková, Adéla Kněžínková, Tomáš Vičko

Laboratory of Growth Regulators, Palacký University in Olomouc & Institute of Experimental Botany of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Šlechtitelská 27, Olomouc, Czech Republic

## Background

ABC transporters facilitate active transport across biological membranes in both prokaryotic and eukaryotic cells, enabling cellular interaction with their surroundings. In spring barley, orthologous genes corresponding to those in rice, which are known to be significantly involved in abiotic stress response and the regulation of physiological development, have been identified. To investigate the function of the HvABC5 gene in spring barley, a selected region of this gene was targeted for mutagenesis using the CRISPR/Cas9 system. *Agrobacterium tumefaciens* was used for transformation with vectors encoding the Cas9 and specific gRNA sequences, which were designed to induce mutations in the target region of HvABC5. Edits were achieved at two distinct target sites using two different vectors. Mutant plants were genotyped via PCR and Sanger sequencing, and in the T0 generation, plants with the Cas9 transgene and mutations in HvABC5 were identified. Single-nucleotide insertions were the most frequently observed mutations, and one plant exhibited an eleven-nucleotide deletion. In the following T1 generation, stable mutant lines, which were homozygous and lacked the Cas9 transgene, were selected for further phenotypic and plant hormone analysis. The ability of these homozygous mutant non-transgenic T2 generation barley lines to form a suberin layer in a root under stress conditions, as well as the regulation of stomata closure, will be investigated.

## Material and Methods

### Cloning expression vector

- Two expression vectors were prepared for the transformation of spring barley cv. Golden Promise.
- Expression of the Cas9 gene was under the control of the maize ubiquitin promoter.
- Two gRNA sequences, targeting different positions in the HvABC5 gene were designed.
- Both vectors also carried GFP-GFP (Growth regulator factor - GFP (interacting like factor)) fusion gene.
- Vectors contain the selection gene *hyg* (hygromycin phosphotransferase) under *Neimycin* ubiquitin promoter.

### HvABC5 (2385 bp)



### Target sites shown in the HvABC5 gene

### Barley transformation, selection, regeneration

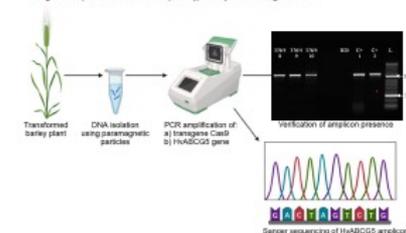
- Immature embryos of spring barley cv. Golden Promise were transformed using *Agrobacterium*-mediated transformation.
- Selection was performed for 5 weeks on medium containing 50 mg/L of hygromycin B.
- Regenerated plants were screened by PCR to identify transgenic plants carrying the Cas9 transgene.



Transformation of spring barley cv. Golden Promise. (A) Regenerating transgenic plants growing in the cultivation chamber (B) Transforms of the T0 generation were grown in the greenhouse

### Genotyping scheme

- Transformed plants of the T0 generation were screened for the presence of transgene Cas9 and a particular mutation in the HvABC5 target sequence. Genotyping involved DNA isolation, PCR, and Sanger sequencing.
- Transgene-free plants were selected for phenotypic analysis in the T2 generation.

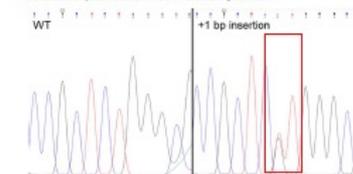


## Results

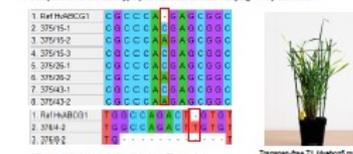
### > Transformation efficiency

T0	Expression vector	Number of transformed embryos	Number of regenerated T0 plants	Number of Cas9 positive plants	PCR Cas9 Positive plants [%]	Transformation efficiency [%]
375	002-GFP-Cas9-Prim-003-3	207	68	34	35.3	6.7
376	002-GFP-Cas9-Prim-004-4	202	65	28	41.5	5.9

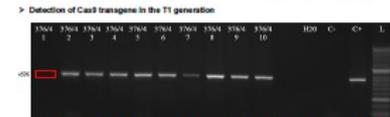
### > Detection of a specific mutation in the HvABC5, T0 generation



### > Comparison of the wild-type plant and the mutant carrying +1 bp insertion



### Alignment of wild-type plant and obtained T0 mutants



### > Detection of Cas9 transgene in the T1 generation

- Genotyping of plants T0 generation transformed with vector 375 has shown 12 plants, of 24 with the present transgene Cas9, which had the HvABC5 gene mutated. In contrast, the deletion of mutation in plants transformed with vector 376 identified 0 mutants.
- In the T1 generation, 50 mutant barley plants were genotyped. Insertion mutants were the most represented types of mutants; 44 +1 bp insertion mutants were obtained. Deletion of 11 nucleotides was detected in two plants.
- HvABC5 mutants lacking the Cas9 transgene will be subjected to phenotypic analysis.

## Conclusion

- We have precisely mutated the HvABC5 gene in spring barley cv. Golden Promise.
- Two homozygous abc5 mutant barley plants without the transgene Cas9 were obtained.

### Acknowledgements

The work is funded within the TRNGAC project CZ.02/19/016/0001/0000000

GREEN FOR GOOD VE

1 - 4 September, 2025, Olomouc, Czech Republic

# Zájmové geny (GOI)

I.

- Tolerance k herbicidům, např. glyphosátu
  - Rezistence ke škůdcům, např. Bt kukuřice
- 

II.

- Rezistence k houbovým patogenům (fuzáriím, rzím)
  - Rezistence k virovým chorobám (BYDV, WDV)
  - Tolerance vůči biotickým a abiotickým stresům:  
    zasolení, sucho, nadbytek vody
  - Zlepšení agronomických i nutričních vlastností  
    aminokyselin a vitamínů (beta-karoten)  
    zvýšení gluteninu, glutaminu, beta glukanů
  - Zvýšení produkce a složení biomasy pro výrobu biopaliv
  - Produkce látek pro výrobu biodegradovatelných plastů
  - Schopnost fytoremediace
- 

III.

- Produkce užitečných bílkovin, protilátek, vakcín, hormonů
- molekulární farmaření

- Kam vkládáme gen?
- Dědičnost transgenů ?



# Nové biotechnologické metody



## NGT - New Genomic Techniques

Skupina metod specificky řízených nukleas - Site-Directed Nucleases, SDN techniky:

- Meganukleasy Scel
- Programovatelné nukleasy

Zinkové prsty (ZNF)

TALENy

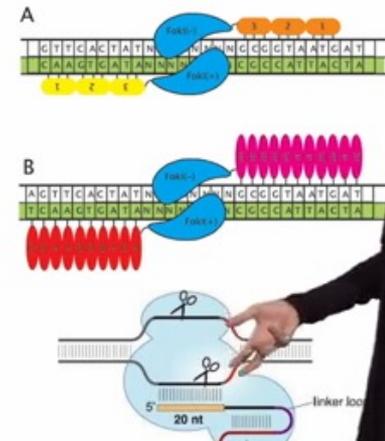
a systém CRISPR

### Genome targeting technologies

Zinc Finger Nuclease (ZFN)  
3+ ZF modules, 3 bp each  
x2 for specificity  
fused to a nuclease

TAL Effector Nuclease (TALEN)  
10+ TAL modules, 1 bp each  
x2 for specificity  
fused to a nuclease

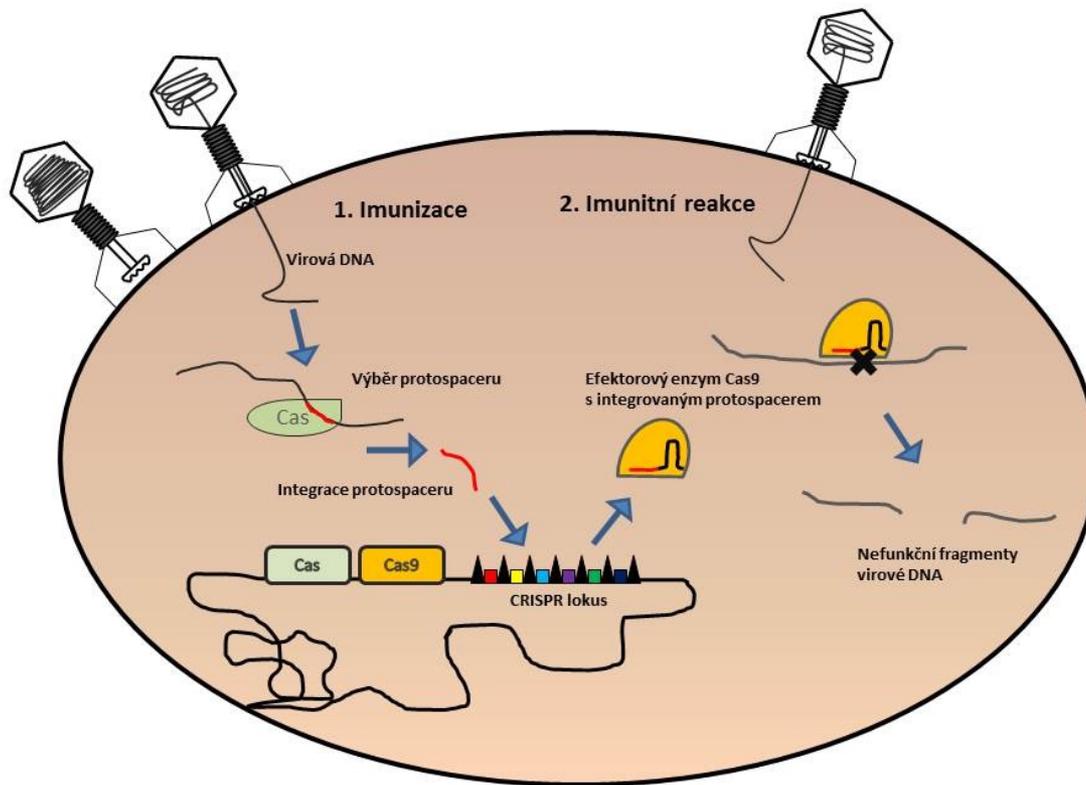
CRISPR/Cas9  
1 targeting RNA  
bound by a nuclease



Jannifer Doudna

- **Cílené editování genomu pomocí nukleas, poskytuje rychlou a přesnou změnu genomů:**
  - knock-out, vytvářet rostliny s vyblokovánými geny
  - knock-in, vnášet nové sekvence do genomu
- ✓ **Technologie s vysokým potenciálem uplatnění v základním, aplikovaném výzkumu a ve šlechtění rostlin.**

# Mechanismus bakteriální rezistence imunitní systém CRISPR/Cas



## Dvojfázový princip obrany

Schopnost začlenit pomocí **enzymu Cas** části virové DNA do svého genomu.

Krátké **repetice** nukleotidů virové DNA obsahující krátké segmenty exogenní DNA, **spacer** DNA – mezeríky.

Repetice a spacerové přepisované úseky jsou a jsou zpracovány na malé CRISPR RNAs (crRNAs), naváděcí, cílové sekvenace  
- **protospacery**.

# CRISPR

**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**  
**seskupené pravidelně se střídající palindromické opakování**

- shluky s nahromaděnými pravidelně rozmístěnými krátkými úseky nukleotidů

Imunitní systému bakterií proti bakteriálním virům a plasmidům, vyskytují se u 40 % genomů bakterií a 90 % genomů archea

## Cas

CRISPR associated protein

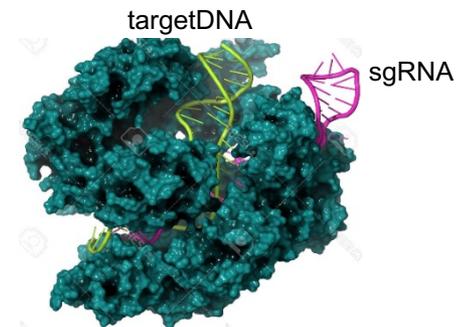
- jsou schopné degradovat virovou DNA

RNA-DNA enzym, který je spojený s CRISPR

Jsou syntetizovány po vniknutí virové DNA do bakterie, do sebe integrují molekulu crRNA, získanou z vlastního CRISPR lokusu.

**Cas9** (protein 9imunitní systém bakterie *Streptococcus pyogenes*.)

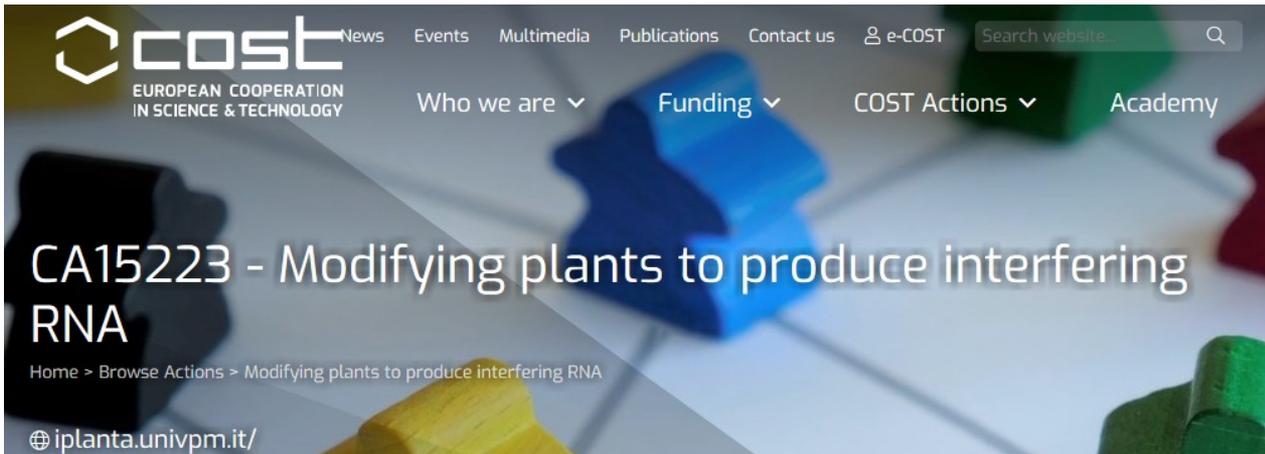
**Cas3, Cas 12a, Cas12b**



<https://www.123rf.com/photo>

# Využití

- **Základní výzkum**
- **Medicína, genová terapie**
- **Farmaceutický průmysl, produkce proteinů, vakcín**
- **Zemědělství**
- **Průmysl**



The screenshot shows the top navigation bar of the COST website. The logo 'cost' is on the left, with 'EUROPEAN COOPERATION IN SCIENCE & TECHNOLOGY' below it. To the right are links for 'News', 'Events', 'Multimedia', 'Publications', 'Contact us', and 'e-COST'. A search bar is on the far right. Below the navigation bar are dropdown menus for 'Who we are', 'Funding', 'COST Actions', and 'Academy'. The main banner features the text 'CA15223 - Modifying plants to produce interfering RNA' and a breadcrumb trail 'Home > Browse Actions > Modifying plants to produce interfering RNA'. The website URL 'iplanta.univpm.it/' is at the bottom left.



The screenshot shows a banner for action CA18111. The text reads 'CA18111 - Genome editing in plants - a technology with transformative potential'. Below the title is a breadcrumb trail 'Home > Browse Actions > Genome editing in plants - a technology with transformative potential'. The website URL 'plantgenomeediting.eu' is at the bottom left.



# GENETICKÉ MODIFIKACE VE SVĚTĚ

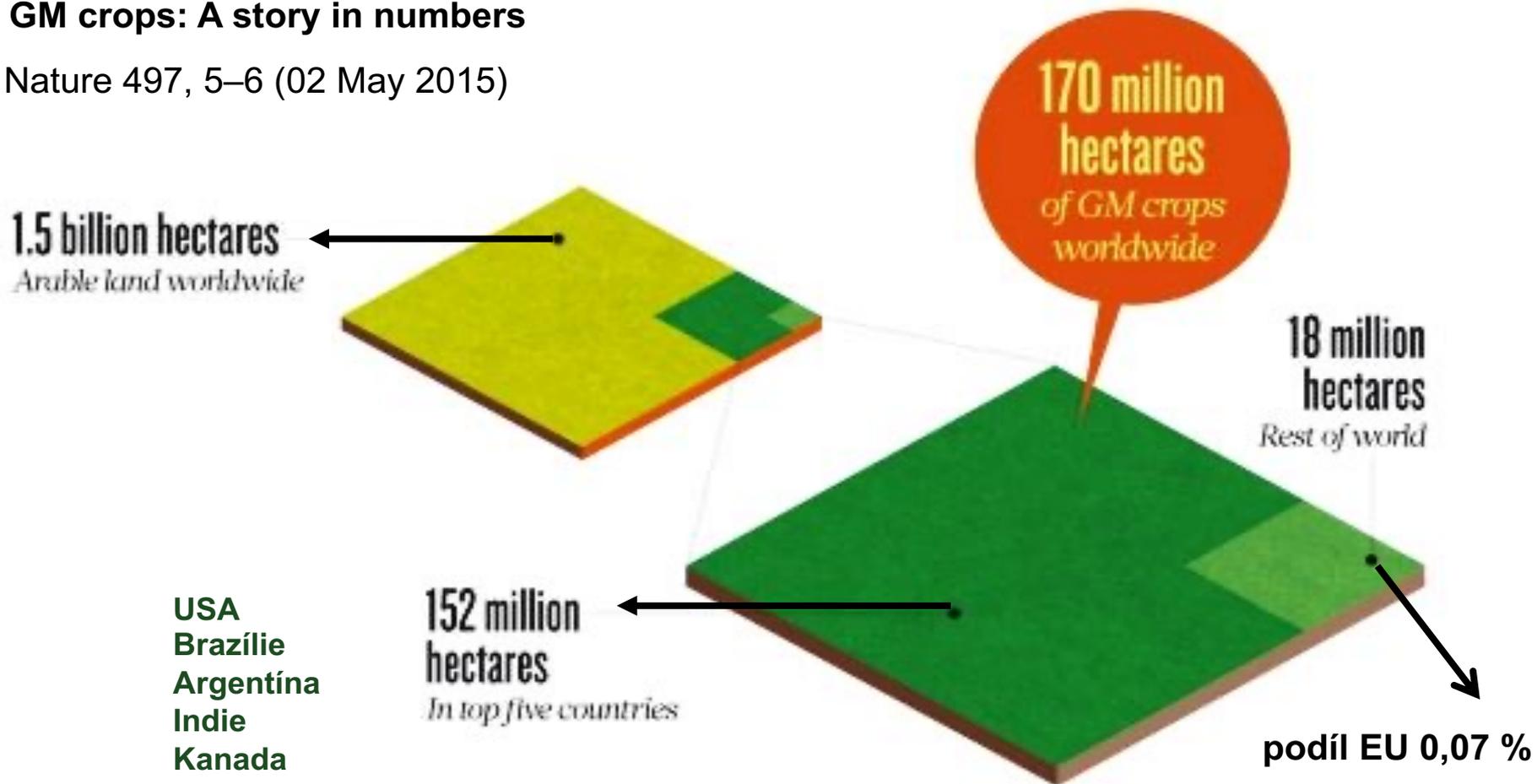


# Celosvětová produkce GM plodin v roce 2020: 190 mil. ha

Nature|News Feature

**GM crops: A story in numbers**

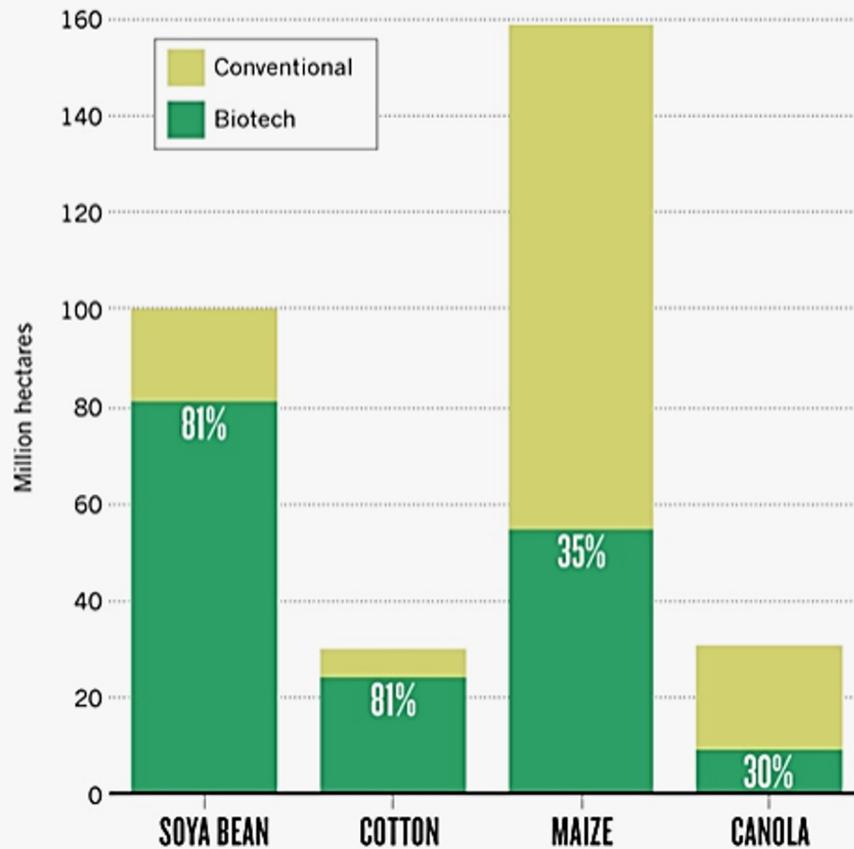
Nature 497, 5–6 (02 May 2015)



# Celosvětová produkce GM plodin

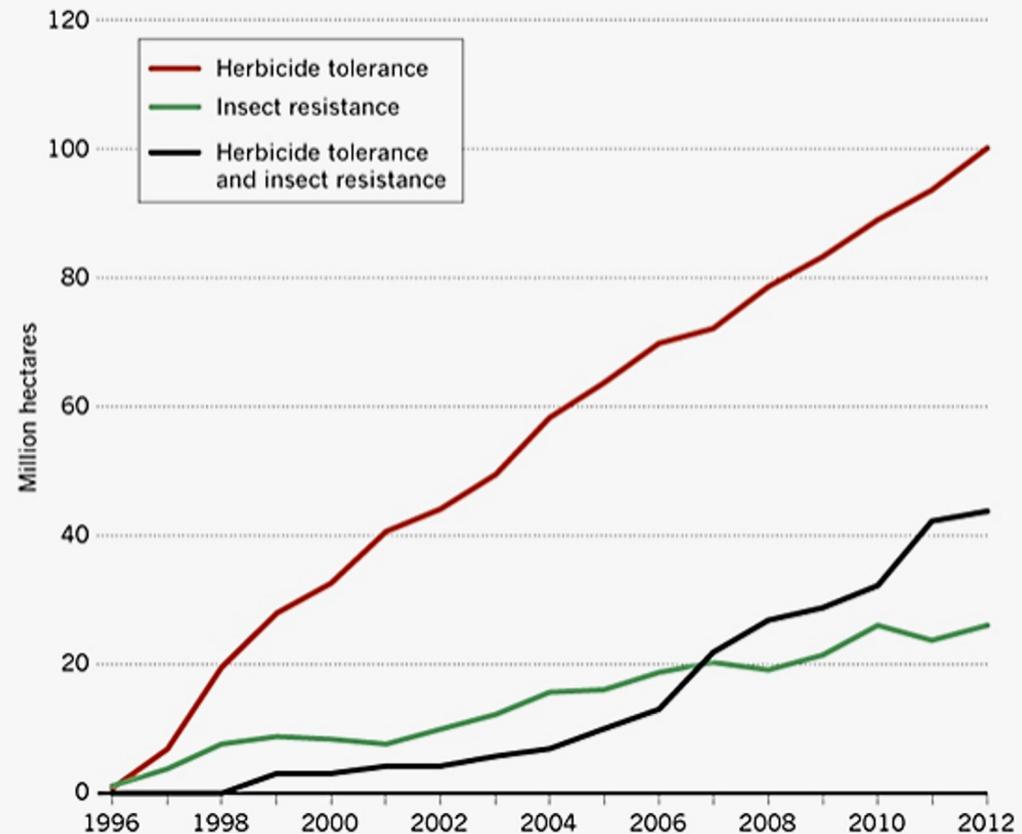
## Popular crops

GM soya bean, maize (corn), cotton and canola crops accounted for nearly all GM crops grown in 2012.



## Popular traits

Of some 30 traits that are currently engineered into plants for commercial use, the most popular are those that confer herbicide tolerance, insect resistance or both 'stacked' traits.



# Základní právní předpisy v oblasti v EU a ČR

## GMO v EU: **Princip předběžné opatrnosti**



Nakládat s GMO a genetickými produkty lze jen na základě oprávnění podle právních předpisů tak, aby byla zajištěna ochrana zdraví člověka a zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti.

- Zákon o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb. ve znění zákona č. 346/2005 Sb.
- ES 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech
- ES 18030/2003 o sledovatelnosti a označení geneticky modifikovaných organismů a sledovatelnosti potravin
- Potvrzení o oprávnění nakládání s GMO (MŽP)
  - v uzavřeném prostředí
- Povolení k uvádění (MŽP)
  - uvolnění do životního prostředí
  - uvolnění do oběhu

# Definice GMO



- **Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je organismus (kromě člověka) schopný rozmnožování, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací provedenou některým z technických postupů stanovených zákonem.**
- **Rekombinantní techniky**, připravené mimo organismus a přenesené vektorem do organismu příjemce a jeho následným začleněním do organismu příjemce, ve kterém se normálně nevyskytuje, ale ve kterém je schopen dalšího množení.
- **Přímý přenos NK**, jakýmkoli způsobem mimo organismus přímo do organismu příjemce, mikroinjekce, biolistické metody,
- **Techniky buněčné fúze, včetně transformace protoplastů,**

# Rozhodnutí Soudního dvora EU ze dne 25. července 2018

Jazyk dokumentu :  ECLI:EU:C:2018:583

Tisk 

ROZSUDEK SOUDNÍHO DVORA (velkého senátu)  
<http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?jsessionid=E0D4A987E8AB76AEF61C5A6D98536BB7?text=&docid=204387&pageId=0&doclang=cs&mode=lst&dir=&occ=first&part=1&cid=262792>

„Řízení o předběžné otázce – Záměrné uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí – Mutageneze – Směrnice 2001/18/ES – Články 2 a 3 – Přílohy I A a I B – Pojem ‚geneticky modifikovaný organismus‘ – Dlouho používané techniky/metody genetické modifikace, které jsou považovány za bezpečné – Nové techniky/metody mutageneze – Nepříznivé účinky na lidské zdraví a životní prostředí – Prostor členských států pro uvážení při provádění směrnice – Směrnice 2002/53/ES – Společný katalog odrůd druhů zemědělských rostlin – Odrůdy rostlin odolných proti herbicidům – Článek 4 – Způsobilost geneticky modifikovaných odrůd získaných mutagenezí pro zápis do společného katalogu – Požadavky v oblasti ochrany lidského zdraví a životního prostředí – Výjimka“

## Organismy získané řízenou mutagenezí jsou GMO

- SD rozhodl, že organismy získané novými technikami mutageneze (editací genů, technikami jako je CRISPR aj.) mohou představovat obdobné riziko jako použití transgenoze, a že tudíž výsledné organismy spadají pod předpisy o GMO.
- To znamená, že nakládání s nimi musí být povoleno na základě hodnocení rizika, po uvedení na trh musí být označovány atd.

*Z působnosti směrnice o GMO vyňaty organismy získané „tradičními“, dlouhodobě používanými postupy mutageneze pomocí radiace nebo chemických látek.*

# Legislativa GMO v EU a ČR



Ministerstvo životního prostředí



> příroda a krajina

🏠 > Témata > Rizika pro životní prostředí

## Témata

Ochrana ovzduší
Voda
Odpadové hospodářství
Příroda a krajina
Ochrana klimatu a energetika
<b>Rizika pro životní prostředí</b>
Geneticky modifikované organismy (GMO)
Havárie
Staré ekologické zátěže
Chemické látky
Stav životního prostředí
Environmentální politika a nástroje
Finanční fondy pro životní prostředí

## Rizika pro životní prostředí

Specifická rizika pro životní prostředí (rizika environmentální) jsou zabezpečována v gesci odbor environmentálních rizik a ekologických škod (OEREŠ). Jedná se o environmentální rizika v oblasti chemických látek, závažných průmyslových havárií s nimi spojených a v oblasti nakládání s geneticky modifikovanými organismy (GMO). OEREŠ vytváří celostátní koncepce prevence škod v těchto oblastech, vytváří systémy hodnocení těchto rizik a navrhuje indikátory jejich sledování a zajišťuje výkon specializované státní správy vyplývající z příslušných zákonů.

Rovněž zabezpečuje v oblastech své působnosti aktivity, vyplývající z členství v mezinárodních organizacích (UNEP, OECD - chemický program a pracovní skupiny pro prevenci průmyslových havárií, biotechnologie a nanomateriály) a z ratifikovaných mezinárodních úmluv (Rotterdamská úmluva, Helsinská úmluva o přeshraničních účincích průmyslových havárií, Cartagenský protokol (PDF, 2 MB) o biologické bezpečnosti, Stockholmská úmluva o persistentních organických polutantech).

Staré ekologické zátěže a kontaminovaná místa v České republice jsou průběžně řešeny Ministerstvem životního prostředí ve spolupráci s dalšími resorty. Ročně jsou tak realizovány průzkumné práce a nápravná opatření na desítkách lokalit. Za danou oblast je gestorem odbor environmentálních rizik a ekologických škod (OEREŠ).



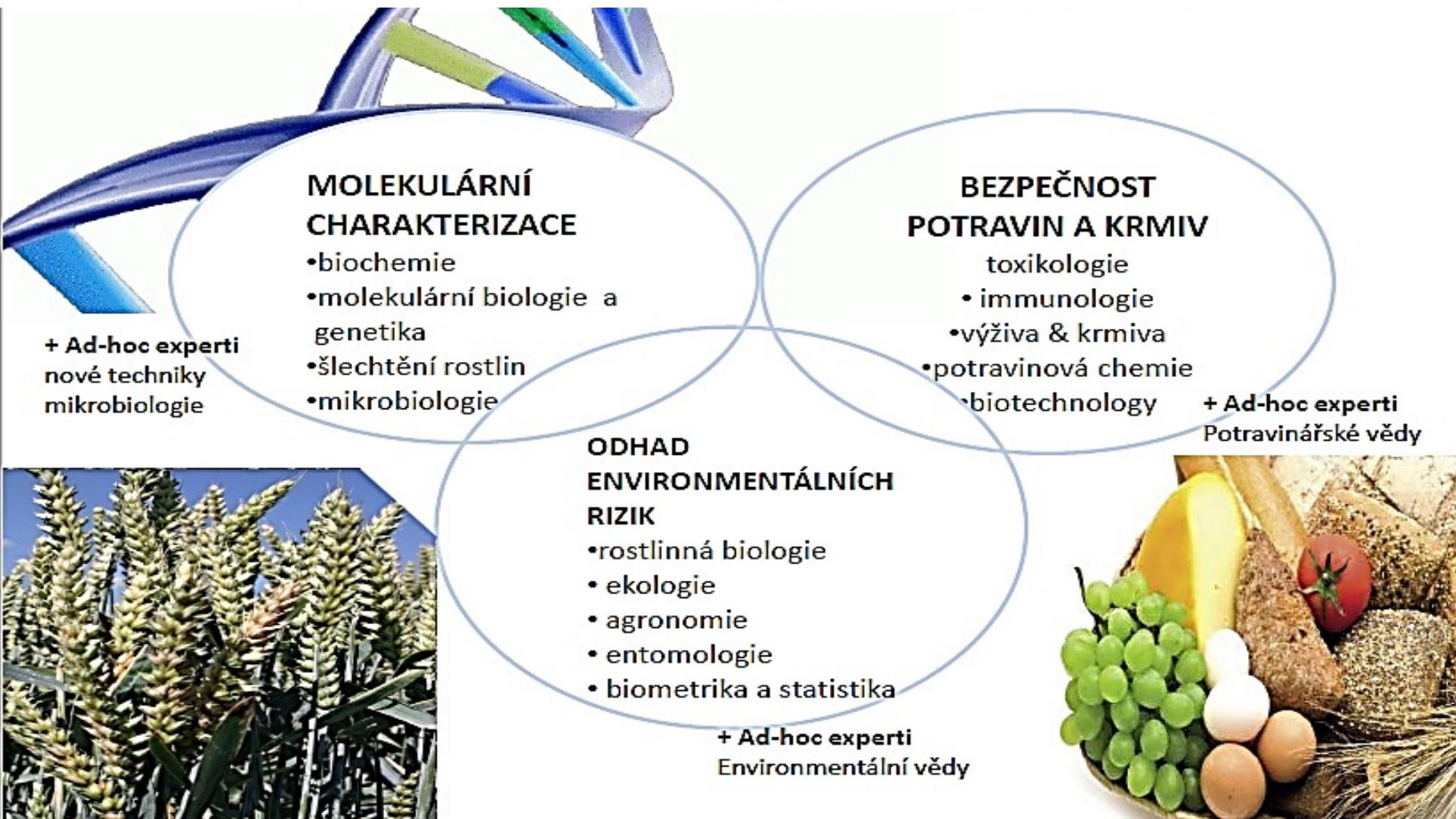
# OBCHOD A SCHVALOVÁNÍ GMO V EU



Odborné posouzení žádostí provádí

## Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA)

- za ČR Vědecký výbor pro GM potraviny a krmiva



## Používání GM potravin a krmiv v EU

- Potraviny se vyskytují velice zřídka
- Dovoz GM krmiva (2021)

Sója: 13 milionů tun, 20 modifikací  
22 milionů tun sójových pokrutin a výrobků  
Kukuřice: 2,5 milionů tun, 31 povolení pro GM kukuřici  
Řepka: 2 milionů tun řepky, 4 povolení  
Bavlník: 0,1 milionů tun bavlny, 1/2019



GM sója představuje 81 % světové produkce, kukuřice 35 %, řepka 30 %.

# GMO databáze

Ministerstvo životního prostředí



## Geneticky modifikované organismy (GMO)

[http://www.mzp.cz/cz/geneticky\\_modifikovane\\_organismy](http://www.mzp.cz/cz/geneticky_modifikovane_organismy)

## GMO- geneticky modifikované organismy

<http://eagri.cz/public/web/mze/zemedelstvi/gmo-geneticky-modifikovane-organismy>



## EFSA – GMO, Genetically Modified Organisms

<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/gmo.htm?wtr1=01>



## GMO-Compass

<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>

US Food and Drug Administration (FDA) <http://www.fda.gov/>  
Databases of US and International Field Tests of GMOs  
Database of International Commercialized GMOs



GM Plants
Alfalfa
Argentine Canola
Bean
Carnation
Chicory
Cotton
Creeping Bentgrass
Flax
Maize
Melon
Papaya
Petunia
Plum
Polish canola
Poplar
Potato
Rice
Rose
Soybean
Squash
Sugar Beet
Sugarcane
Sweet pepper
Tobacco
Tomato
Wheat

## GM Approval Database

ISAAA presents an easy to use database of Biotech/GM crop approvals for various biotechnology stakeholders. It features the Biotech/GM crop events and traits that have been approved for commercialization and planting and/or for import for food and feed use with a short description of the crop and the trait. Entries in the database were sourced principally from Biotechnology Clearing House of approving countries and from country regulatory websites. We invite corrections, additions/deletions, and suggestions for the improvement of the database. Contact us at [gmapproval@isaaa.org](mailto:gmapproval@isaaa.org) or fill out our [feedback form](#).

Jump to an Event:

**Advanced Search (Beta)**

Crop

Commercial Trait

Developer

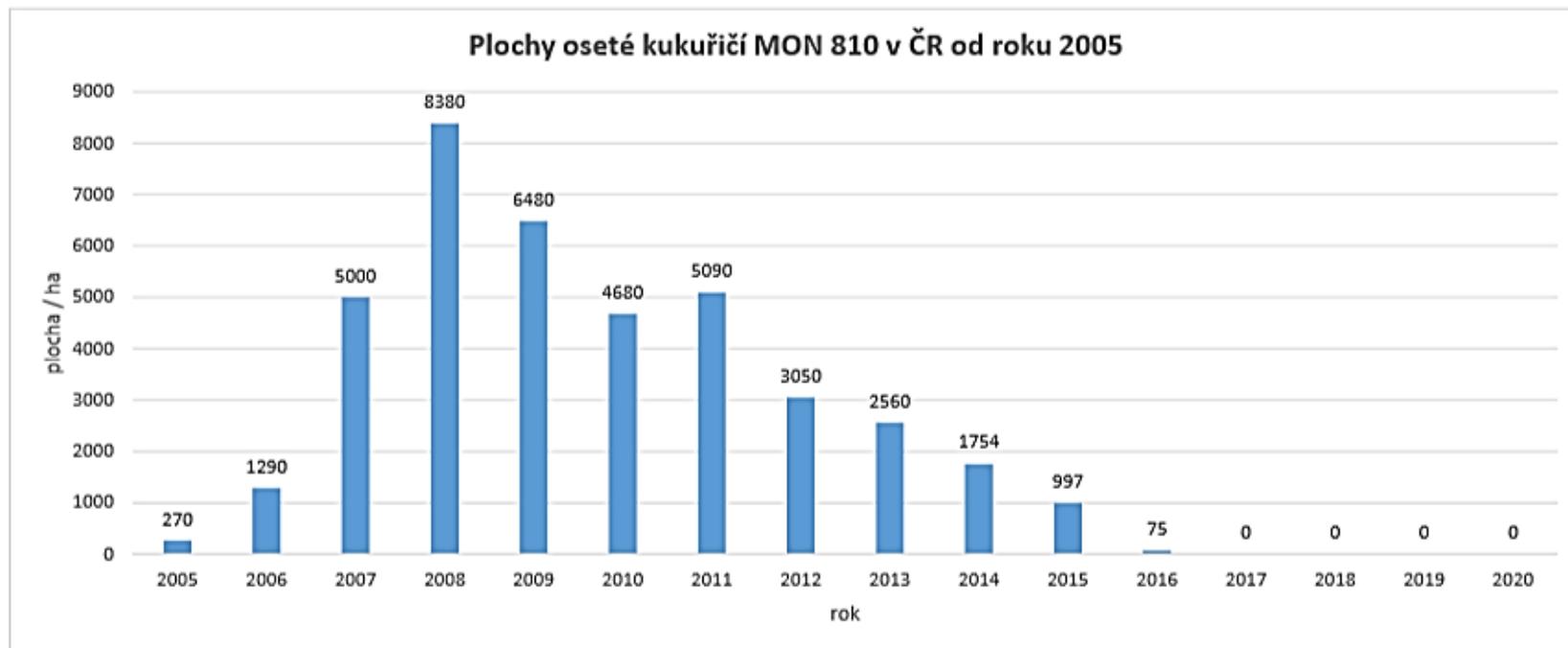
Country

Type of Approval

### Quick Links:

Display events by commercial trait	Display events by developer
<ul style="list-style-type: none"> <li><a href="#">Abiotic Stress Tolerance</a></li> <li><a href="#">Disease Resistance</a></li> <li><a href="#">Herbicide Tolerance</a></li> <li><a href="#">Insect Resistance</a></li> <li><a href="#">Modified Product Quality</a></li> <li><a href="#">Pollination control system</a></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><a href="#">Agricultural Biotech Research Institute (Iran)</a></li> <li><a href="#">Agritope Inc. (USA)</a></li> <li><a href="#">BASF</a></li> <li><a href="#">Bayer CropScience (including fully and partly owned companies)</a></li> <li><a href="#">Bayer CropScience and MS Technologies LLC</a></li> <li><a href="#">Beijing University</a></li> <li><a href="#">Bejo Zaden BV (Netherlands)</a></li> <li><a href="#">Central Institute for Cotton Research and University</a></li> </ul>
Display events by GM trait	

# Plochy GM rostlin v ČR, 2020



Aktualizováno 8. července 2020

## Polní pokusy 2023

<b>Ječmen jarní</b> (Úsovsko a.s., farma Mohelnice)	ječmen jarní produkující peptid LL37	1600 m <sup>2</sup>	200 m <sup>2</sup>
---	---	---------------------	--------------------

# Označovat se musí GMO produkty a výrobky ve všech státech EU

- Podle zákona o potravinách z roku 2002 je značení potravin obsahující neživé GMO **povinné**.
- Na obalu výrobku musí být podle vyhlášky 24/2001 **uvedeno označení:**

„geneticky modifikováno“

„obsahuje geneticky modifikovaný organismus“

„vyrobena z geneticky modifikované ...“

- ✓ Všechny produkty z GMO, nebo obsahující GMO
- ✓ Produkty vyrobené z GMO např. mouka, olej, apod.
- GM potraviny živočišného původu se v EU nevyskytují



Marketingové sdělení výrobců potravin.

# EU, respektuje právo spotřebitele na informace, zajišťuje označování a sledovatelnost GMO !

- ✓ Produkty, které obsahují **více než 0,9 %** geneticky modifikovaných složek, musí být nutně označeny "**obsahující GMO**„.
- ✓ Produkty klasického a ekologického zemědělství **do 0,9 %** jsou příměsi GMO tolerovány (technické nevyhnutelné příměsi).
- ✓ Pokud nejsou GMO schválené „do oběhu“ tak **nesmí obsahovat žádné GMO**.



English

Food, Farming, Fisheries

Food Safety

Home | Animals | Food | Plants | Horizontal topics

Home > Plants > Genetically Modified Organisms > GMO register

GMO register

[GMO register \(europa.eu\)](https://europa.eu/gmo-register)

This search engine covers the [Community register of GM food and feed \(Regulation \(EC\) 1829/2003\)](#) and the GM products withdrawn from the market.

For example, if you search in [the register](#) for authorised GM cotton, you will get a list of all authorised GM cottons and their description.

GMOs authorised under Directive 2001/18/EC, for example GM carnations, can be [found here](#).



Genetically Modified Organisms

## EU Register of authorised GMOs

Search the register for products containing GMOs e.g. if you type 'cotton', you will get a list of all products containing cotton in their description...

This search covers the EU GMOs register (Regulation EC 1829/2003) and the products subject to EC decisions on withdrawal from the market.

Keyword(s)

Registered / Withdrawn

Registered

Category

maize



BIOTRIN je nezisková organizace vytvořená vědeckými pracovníky pro šíření informací o moderních biotechnologiích. Je tu pro vaši informaci a jako fórum vašich názorů.

ÚVOD

O BIOTRINU



EN

KNIHOVNA NBT ORGANISMŮ

SLOVNÍK



HLEDAT

ČLÁNKY TEMATICKY

KNIHOVNA NBT

ORGANISMŮ

FILMY A VIDEO

LABORATOŘE

PRO ŠKOLY

PUBLIKACE

ZÁKONY ČR A GMO

ZAJÍMAVÉ STRÁNKY

BIOTRIN, z.s. Vám pravidelně přináší aktuální informace ze světa biotechnologií. Pokud máte zájem o **odběr těchto novinek** a jejich zaslání na Váš email, klikněte, prosím **ZDE**. Z odběru novinek se lze kdykoliv odhlásit.

## Geneticky modifikované bakterie detekující nádorovou DNA

Rakovina ve svých mnoha podobách je bohužel stále jedním z převažujících důvodů předčasného úmrtí. Pokrok v její prevenci a zlepšení diagnostiky slibuje nový výzkum, který...  
více



Věda a výzkum - NBT

13.11.2023

## Nově schválené geneticky modifikované rostliny v Nizozemsku nejsou rizikem pro životní prostředí

Jedním z častých argumentů proti geneticky modifikovaným (GM) rostlinám je riziko pro životní prostředí v dané oblasti a vznik změn v místním ekosystému. Tyto obavy se u nově...  
více



## Knihovna NBT organismů

<a href="#">avokádo (plod hruškovce)</a>	snížené hnědnutí dužiny plodu	CRISPR/Cas9
<a href="#">okurka</a>	zvýšená tvorba plodů	CRISPR/Cas9
<a href="#">pampeliška</a>	zvětšení kořenové biomasy, zvýšený výnos inulinu i přírodního kaučuku	CRISPR/Cas9
<a href="#">petúnie</a>	delší doba květu	CRISPR/Cas9
<a href="#">rajče plané</a>	zlepšený růst, více květů, větší plody, větší obsah lykopenu	CRISPR/Cas9
<a href="#">prase</a>	odolnost vůči virové chorobě - PRRS (reprodukční a respirační syndrom prasat)	CRISPR/Cas9
<a href="#">prase</a>	delece epitopů $\alpha$ -Gal a Neu5Gc, snížení humorální bariéry pro xenotransplantace	zinkové prsty
<a href="#">pražman japonský</a>	zvýšený růst svaloviny	CRISPR/Cas9
<a href="#">pšenice</a>	odolnost proti houbové chorobě	TALEN
<a href="#">pšenice</a>	delší klidové období semen	CRISPR/Cas9
<a href="#">rajče</a>	změněná barva plodu	CRISPR/Cas9
<a href="#">rajče</a>	zvýšený obsah zdraví prospěšné GABA	CRISPR/Cas9
<a href="#">rajče</a>	usnadnění sklizně	CRISPR/Cas9
<a href="#">řepka</a>	tolerance k herbicidům (sulfonylmočoviny a imidazolinu)	mutagenese pomocí oligonukleotidů
<a href="#">řepka</a>	tolerance k herbicidům (imidazolinu)	mutagenese pomocí oligonukleotidů
<a href="#">řepka</a>	zvýšená pevnost šesti	CRISPR/Cas9
<a href="#">řepka</a>	zvýšená odolnost proti hnilobě stonku	CRISPR/Cas9

# Důvody pro nižší produkci GM plodin v EU

Evropský spotřebitel nemá rád GM plodiny

- Etické, filosofické, politické a psychologické důvody
- Masivní negativní kampaně různých organizací – „kult GMO“
- Problematika GMO se obtížně vysvětluje, snadno se s ní straší

Laura De Francesko:

**„ Je to pouze rozhodnutí veřejnosti, sociální a politické,  
nikoliv vědecké“.**

