

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce
rostlinné

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Optimalizace metod tkáňových kultur řepky pro využití
techniky Crispr/Cas9

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Autor bakalářské práce: Bc. Jan Harenčák

České Budějovice, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Abstrakt

Transformace rostlin pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (podle nové nomenklatury *Rhizobium radiobacter*) je široce používaná metoda pro úpravu genomu u rostlin. Nicméně, různé odrůdy řepky olejky nemají vždy stejnou schopnost regenerace *in vitro*, která je pro transformaci klíčová. Tato práce se zabývá optimalizací regeneračního protokolu pro vybrané odrůdy řepky olejky. Z šesti testovaných odrůd úspěšně regenerovaly pouze dvě – Arabella a Obelix. Vytvořený protokol lze použít pro regeneraci bez transformace, ale je možné do něj implementovat i kroky, které transformaci pomocí *A. tumefaciens* umožňují.

Klíčová slova

Řepka olejka, *Brassica napus*, tkáňové kultury, nepřímá organogeneze, kalus, prýty, protokol

Summary

Plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens* bacteria (*Rhizobium radiobacter*, according to new nomenclature) is widely used method for plant genome editing. However, different oilseed rape varieties do not always have the same in vitro regeneration capacity, which is crucial for transformation. This work aims to optimize regeneration protocol for selected varieties of oilseed rape. Of the six varieties tested, only two regenerated successfully – Arabella and Obelix. The created protocol can be used for regeneration without transformation, but it is also possible to implement specific steps in it that enable transformation using *A. tumefaciens*.

Key words

Oilseed rape, *Brassica napus*, tissue culture, indirect organogenesis, callus, shoots, protocol

Obsah

1	Úvod	5
2	Literární rešerše	6
2.1	Řepka olejka	6
2.2	Tkáňové kultury	7
2.2.1	Media používaná pro rostlinné tkáňové kultury	8
2.2.2	Kultivační podmínky	8
2.2.3	Růstové hormony	9
2.3	Využití tkáňových kultur při výzkumu a šlechtění řepky olejky	11
2.3.1	Kalusové kultury	11
2.3.2	Nepřímá organogeneze	11
2.3.3	Somatická embryogeneze	12
2.3.4	Prašníkové kultury	13
2.3.5	Protoplastové kultury	14
2.4	CRISPR-Cas systémy	15
2.4.1	Funkce in natura	15
2.4.2	Klasifikace CRISPR-Cas systémů	18
2.4.3	Aplikace CRISPR-Cas systémů in vitro	19
2.4.4	Legislativa	22
3	Cíle a hypotézy diplomové práce	27
4	Materiál a metody	28
4.1	4.1. Použité odrůdy/genotypy	28
4.2	Sterilizace	28
4.3	Ošetření a výsev semen	29
4.4	Příprava a kultivace hypokotylových segmentů	30
4.5	Kultivace kalusu	31
4.6	Regenerace rostlin	32
4.7	Zakořeňování rostlin	33
4.8	Převod regenerantů do půdy	34
5	Výsledky	35
5.1	Protokol pro regeneraci řepky olejky in vitro	40
6	Diskuse	41
6.1	Sterilizace semen	41
6.2	Koncentrace H ⁺ iontů	42
6.3	Regenerace explantátů	42

6.4	Kontaminace	43
6.5	Transformace	44
7	Závěr.....	45
8	Bibliografie	46
9	Přílohy	57

1 Úvod

Řepka olejka je v ČR nejdůležitější olejnina (Baranyk, 2010). Kromě oleje pro potravinářské a technické využití je pěstována také pro výrobu biopaliv, nebo jako krmivo či v některých zemích jako zelenina (Snowdon, 2007). Konvenční šlechtění řepky olejky je zdoluhavý proces, náročný na energii a čas. Vyšlechtění nové odrůdy trvá u řepky obvykle 8 až 10 generací (Poulsen, 1996), u ostatních rostlin pak v rozmezí 5 až 15 cyklů pohlavního rozmnožování (Graman, 1998). Nicméně, s využitím genových manipulací je teoreticky možné snížit počet nebo délku šlechtitelských cyklů (Graman, 1998), nebo do genotypu záměrně vložit gen bez nežádoucího ovlivnění genotypu (Bhalla, 2008). Zpravidla se však metody genových manipulací u rostlin neobejdou bez techniky tkáňových kultur. Řepka olejka na metodu tkáňových kultur reaguje poměrně neochotně a výtěžnost transformovaných regenerantů je velmi nízká (Hu, 2019).

Hlavním cílem této práce je optimalizace protokolu pro regeneraci rostlin řepky olejky tak, aby do protokolu mohla být implementována technika transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Regenerace bude provedena cestou nepřímé organogeneze, a také bude posouzena vhodnost jednotlivých odrůd k samotné regeneraci.

2 Literární rešerše

2.1 Řepka olejka

Řepka olejka je alopolyloidní rostlina patřící do čeledi *Brassicaceae* (brukvovité). Nejspíše vznikla před 7500 lety (Chalhoub, 2014) mezidruhovým křížením mezi rostlinami *Brassica rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) a *Brassica oleracea* ($2n = 2x = 18$, CC) (Nagaharu, 1935). Výsledkem této spontánní hybridizace byl druh *Brassica napus* ($2n = 4x = 38$, AACC). Nejsou známy žádné divoké formy *B. napus* – její původ je dodnes nejasný (Lu, 2019).

B. napus je, kromě oleje, pěstována pro své hlíznaté (tuřín) a listnaté (krmná řepka a kadeřávek) formy. Ty se v závislosti na kultuře používají jako potraviny nebo jako krmivo pro zvířata (Allender, 2010).

Postupným šlechtěním byl markantně snížen podíl kyseliny erukové a alifatických glukosinolátů. Tyto látky jsou v řepkovém semeni nežádoucí, jelikož způsobují závažné zažívací potíže. Dále bylo šlechtěním docíleno zvýšení podílu žádoucích mastných kyselin, zvýšení výnosu a zlepšení rezistence rostlin vůči biotickým i abiotickým vlivům (Snowdon, 2007). Snížení obsahu glukosinolátů udělalo z řepky i poměrně široce využívané, na proteiny bohaté, hospodářské krmivo. Před snížením glukosinolátů byla biomasa využitelná maximálně pro hnojení (Hu, 2017).

Moderní metody šlechtění

Mezi nejdůležitější moderní metody šlechtění patří molekulární šlechtění. Zkoumá funkce jednotlivých genů – *B. napus* jich má anotovaných přes 100 000 (Hu, 2017). Funkční genomika pomáhá odhalit geny ovlivňující obsah olejů v semenech, regulaci fertility, odolnost vůči chorobám, škůdcům a abiotickému stresu, stejně jako efektivitu využití živin a odolnost proti pukání šešulí (Hu, 2017).

Šlechtění pomocí molekulárních markerů se dříve provádělo s využitím technik RFLP, SSR, AFLP, SRAP a TRAP. Dnes jsou tyto techniky pomalu nahrazovány metodami NGS (Next Generation Sequencing) s využitím jednonukleotidových polymorfismů (SNP markery) a GEM (gene expression-based) markerů (Hu, 2017). Pro zrychlení produkce moderních odrůd jsou však i dnes metody tkáňových kultur, nejen u řepky olejky, naprosto nepostradatelné.

2.2 Tkáňové kultury

Tkáňové kultury (kultury rostlinných explantátů *in vitro*) se zabývají růstem a množením buněk, tkání a orgánů rostlin na pevném nebo tekutém mediu v řízených aseptických podmínkách (Gaikwad, 2017). Medium dodává explantátům, nebo *in vitro* kulturám, všechny potřebné živiny, energii a vodu, aby mohly růst. Kontrolované podmínky růstu umožňují dodávat právě tolik světla a takovou teplotu, aby kultury rostly v optimálních podmínkách. Růst kultur a regenerace rostlin může být dále řízen pomocí růstových regulátorů (fytohormonů) – ty mohou být přírodní, ale často se používají i jejich syntetické verze (Phillips, 2019).

Aplikace tkáňových kultur v různých biologických studiích se neustále rozšiřuje. Jsou používány pro účely vědecké a komerční (Yancheva, 2017). Komerční část se častěji věnuje tzv. mikropropagaci – využití velmi rychlého namnožení rostlin z řízků, axilárních pupenů, ale i ze somatických embryí (Gamborg, 1995; Hussein, 2006).

Tkáňové kultury využívají izolované části rostlin (musí být sterilní), které následně rostou na uměle vytvořeném mediu, ve sterilních podmínkách. Jedná se obecně o velmi starou metodu, která je založena na speciální vlastnosti rostlinných buněk – totipotenci (Schleiden, 1838; Schwann, 1839). Schleiden a Schwann formulovali buněčnou teorii a společně s ní i teorii totipotence. Tato schopnost rostlinám umožňuje z jedné buňky regenerovat celou, dospělou, rozmnožování schopnou rostlinu.

Buněčná teorie vysvětluje pochody, které se uvnitř buňky odehrávají a stala se tak základním kamenem biologie (Tavassoli, 1980).

Za otce tkáňových kultur se považuje Gottlieb Haberlandt, který se v roce 1902 pokoušel kultivovat dvouděložné rostliny (Haberlandt, 2003). Buňky se kvůli nízkému množství růstových regulátorů v mediu vůbec nedělily, pokus se nezdařil. Haberlandt si také postupně začal uvědomovat potřebu sterilního prostředí. Až Hanning v roce 1904 dokázal úspěšně vypěstovat několik izolovaných rostlinných embryí (Hanning, 1904).

Po roce 1920 se metoda *in vitro* kultur začala významně zlepšovat. Byly objeveny auxiny a demonstrována schopnost rostlin regenerovat v celou rostlinu z nediferenciované tkáně (Gautheret, 1939; White, 1934).

Časem byla objevena spousta i dnes klíčových znalostí. Mezi takové patří objev bezvirové kořenové čepičky (White, 1934) a vrcholových meristémů u rostlin, nalezení kinetinu, který je dnes jeden z nejdůležitějších cytokininů (Miller, 1955). Dále byl pochopen vliv poměru auxinu a kinetinu na vývoj rostlinného kalusu a regeneraci rostlin (Skoog, 1957) a obecně je tato studie platná dodnes. V roce 1959 byl panem Bergmanem poprvé indukován růst rostlinných embryí z kalusu (Bergman, 1959). Ozdravováním rostlin technikou tkáňových kultur je dosaženo bezvirové rostliny, čehož jinak v přírodě není možné dosáhnout (Limasset, 1952; Morel, 1952; Quak, 1961). V roce 1962 bylo vytvořeno MS medium, pojmenované po jeho vynálezci – pánové Murashige a Skoog (Murashige a Skoog, 1962), je dodnes nejpoužívanější medium (Phillips, 2019). Rok 1974 přinesl objev rychlého namnožení rostlin, tzv. mikropropagace (Murashige, 1974).

2.2.1 Media používaná pro rostlinné tkáňové kultury

Nejpoužívanější medium je MS medium a jeho různé modifikace. Bylo použito v 82 % publikovaných pracích mezi lety 2011–2015 (Herman, 2015). Je běžně používané pro jednoděložné i dvouděložné rostliny. Vhodné je pro svůj vysoký obsah dusíku – ve formě nitrátových i amonných solí. Pro některé explantáty je toto medium nevhodné, kvůli vyššímu obsahu amonných iontů. Potom je možno použít medium B5, BDS, popřípadě BABI, které mají různě upravený podíl amonných, a vápenatých iontů. Pokud se nejedná o velmi specifické použití *in vitro* kultur, postačí media MS nebo BABI. Pro dřevnaté rostliny se používají média MMS, WPM nebo DKW (Phillips, 2019).

2.2.2 Kultivační podmínky

Většina laboratoří je vybavena růstovými místnostmi, které dovolují úpravu teploty, světelného režimu (fotoperioda, vlnová délka světla) a často i vlhkosti (Gamborg, 1995). Teplota bývá konstantní s odchylkou $\pm 1^\circ\text{C}$. Světelná intenzita mezi 50 až 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a fotoperiodou 16 hodin (8 h tma). Kultury je nutné pravidelně přenášet na čerstvé kultivační medium (pasážovat). Frekvence pasážování závisí na konkrétním druhu a kultivačních podmínkách, obvykle to bývá každé 3–4 týdny (Gamborg, 1995; Phillips, 2019).

2.2.3 Růstové hormony

Růstové hormony stimulují růst různých rostlinných tkání v závislosti na jejich poměru v použitém mediu. Existují přírodní a syntetické růstové hormony, běžně se používají obě varianty. Dělí se do několika skupin podle jejich účinku: auxiny, cytokininy, gibereliny, ethylen a v neposlední řadě kyselina abscisová. Nejčastěji se používají hormony ze skupiny auxinů a cytokininů. Při používání je potřeba mít na paměti, že syntetické analogy přírodních fytohormonů mají mnohem silnější efekt. Proto je potřeba použité množství vztahovat k účinnosti. Například: syntetický hormon 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4D) je až 1000 x silnější než přírodní auxiny (například indol-3-octová kyselina – IAA) (Phillips, 2019).

Auxiny

Nejčastěji používané auxiny jsou α -naftyloctová kyselina (NAA), indol-3-máselná kyselina (IBA), 2-4D a IAA. Jakýkoliv ze zmíněných auxinů může být použit pro stimulaci růstu kalusu, nebo proliferaci buněk (Phillips, 2019).

Cytokininy

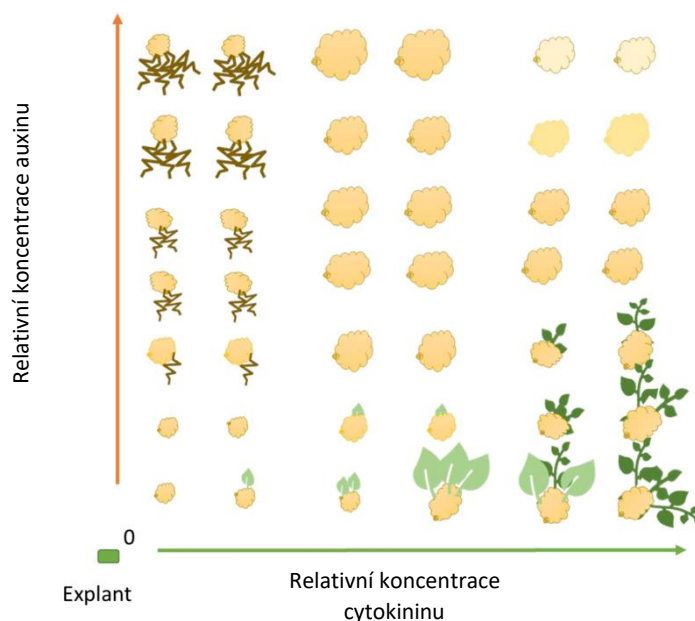
Nejpoužívanější cytokininy jsou: N⁶-benzyladenin (BA) a kinetin (KIN). Zeatin (ZEA) je přírodní cytokinin a oproti svým syntetickým funkčním analogům je značně méně chemicky stabilní (Phillips, 2019). Podle Hermana (2015) je v 89 % studií dostačující, pokud je v mediu upraven pouze poměr obsahu cytokininu a auxinu. Ostatní hormony není nutné do media přidávat.

AgNO₃

Dusičnan stříbrný (AgNO₃) je používán, jelikož dobře inhibuje produkci ethylenu (Ali, 2007) a tím nepřímo zlepšuje regeneraci rostlin (Uliaie, 2008). Ethylen inhibuje dělení buněk, syntézu DNA a růst kořenových a prýtových meristémů. Také je zodpovědný za inhibici růstu axilárních pupenů. Nicméně, stříbrné ionty se v rostlinné tkáni akumulují a jejich nadbytek způsobuje výrazné omezení růstu prýtvů (Roh, 2012).

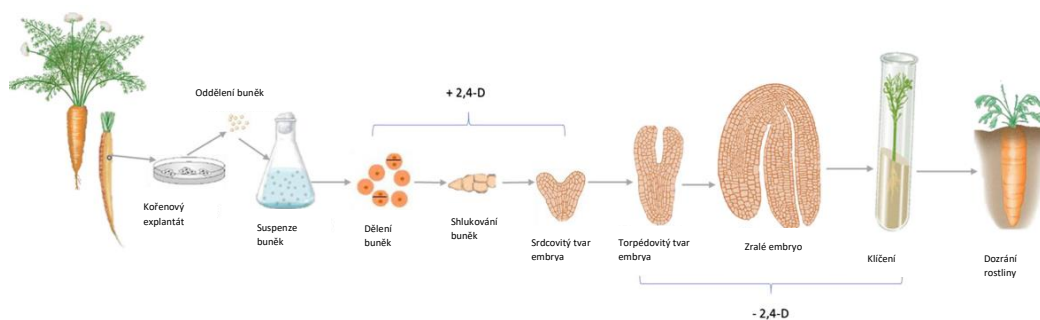
Vzájemné působení auxinu a cytokininu

Na Obrázek 1 jsou znázorněny účinky auxinu a cytokininu na rostlinnou tkáň v různých koncentracích tak, jak ji interpretovali v roce 1957 Skoog a Miller. Tento systém je běžně uznáván i dnes (Skoog a Miller, 1957; Phillips, 2019). Vyšší relativní koncentrace auxinů vede k diferenciaci kořenů, zatímco vyšší relativní koncentrace cytokininů indukuje růst prýtlů. Pokud jsou si relativní koncentrace obou fytohormonů rovny, formuje se kalus.



Obrázek 1: Formace různých typů tkání v závislosti na poměru relativních koncentrací cytokininů a auxinů (Phillips, 2019).

Nedlouho po objevu vlivu koncentrace fytohormonů na explantát (Skoog a Miller, 1957) bylo zjištěno, že vysoké koncentrace syntetického hormonu 2,4-D formují namísto kořenů celé embryo. Toto „umělé“ embryo podléhá stejným vývojovým stádiím jako vývoj zygotického embrya (Reinert, 1958). Vyvíjí se ale ze somatických buněk, proto se tomuto procesu říká somatická embryogeneze – znázorněna na Obrázek 2.



Obrázek 2: Somatická embryogeneze u mrkve (Phillips, 2019).

2.3 Využití tkáňových kultur při výzkumu a šlechtění

řepky olejky

Řepka olejka je intenzivně studovaná plodina, u které našlo uplatnění spousta technik rostlinných tkáňových kultur. Každá technika se používá pro jiný účel, od zkoumání vlivu různých faktorů na rostlinu, po genetické úpravy, či haploidizaci genomu.

2.3.1 Kalusové kultury

Stěžejní metoda tkáňových kultur jsou kalusové kultury. Jedná se o indukci růstu kalusu, což je nediferenciované a neorganizované rostlinné pletivo, respektive masa buněk. Je možné jej indukovat z téměř jakékoliv rostlinné tkáně. Nejúčinněji se kalus začne tvořit v kolmém řezu na stonku nebo kořenu (Bhatia, 2015). Růst kalusu je iniciován na speciálním, obvykle gelovém mediu (Bhatia, 2015). U rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že různé typy kalusů mají různé profily genové exprese (Iwase, 2011).

Kalusových kultur je u řepky olejky běžně využíváno (Chandler, 1987; Akasaka-Kennedy, 2005; Jonoubi, 2005; Benincasa, 2013; Iwase, 2018; Nasir, 2019).

2.3.2 Nepřímá organogeneze

Tvorba rostlinných orgánů, kde jeden z mezikroků je tvorba kalusu, se nazývá nepřímá organogeneze. Tato metoda nezaručuje genetickou stabilitu, ale je vhodná pro selekci somaklonálních variant požadovaných charakteristik a také pro masové množení rostlin. Regenerace rostlin prostřednictvím kalusu se využívá i pro tvorbu transgenních rostlin. Možnosti transformace jsou dvě – genetická transformace kalusu a následná regenerace rostliny, nebo transformace původní rostlinné tkáně a její následné použití pro indukci kalusu a regeneraci v celou rostlinu (Bhatia, 2015).

Organogeneze je tvorba rostlinných orgánů – prýtlů a kořenů. Je závislá na poměru auxinů a cytokininů v mediu a na schopnosti rostlinné tkáně na fytohormony reagovat. Organogeneze má 3 hlavní fáze. V první fázi se původní buňky stávají kompetentními, ve druhé fázi diferencují. Třetí fáze zahrnuje morfogenezi – ta už probíhá nezávisle na stimulaci fytohormony z media (Bhatia, 2015).

Schopnost regenerace řepky olejky nepřímou organogenezí je silně závislá na genotypu, respektive odrůdě (Burbulis, 2009). Burbulis v roce 2009 zkoumal několik

různých genotypů řepky olejky. Některé dosahují úspěšnosti regenerace až 34 % a jiné genotypy neregenerují vůbec, bez ohledu na použité medium.

Nepřímá organogeneze se běžně používá (Moghaieb, 2006; Ali, 2007; Munir, 2008; Burbulis, 2008; Burbulis, 2009; Knecht, 2011; Knecht, 2011; Attaya, 2017), navíc i jako metoda pro genetické modifikace řepky olejky (De Block, 1989; Kohno-Murase, 1994; Karim Zarhloul, 2006; Moghaieb, 2006; Karim Zarhloul, 2006; Braatz, 2017), některé i s pomocí pokročilých transformačních metod (CRISPR, ZFN, TALEN) a bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Yancheva, 2017).

2.3.3 Somatická embryogeneze

Pro indukci růstu embrya je zapotřebí navození signálu pouze jedním hormonem, ve většině případů se jedná o hormon 2,4-D (auxin). Cytokinin není zpravidla vůbec zapotřebí pro navození somatické embryogeneze, avšak některé druhy jednoděložných rostlin potřebují mírné dávky cytokininů. Problém nastává v tom, že vysoké dávky auxinů inhibují následný vývoj embrya v dospělou rostlinu. Proto je potřeba vzniklé embryo pasážovat do media, které neobsahuje žádné fytohormony. Pro indukci somatického embrya je zpravidla zapotřebí jednoho signálu (auxin), kdežto somatická organogeneze potřebuje signály dva. Jeden pro růst prýtlů, druhý pro zakořenění prýtlů (Phillips, 1995; Phillips, 2019).

U řepky olejky není somatická embryogeneze příliš často se vyskytující technika, ale prováděna je (Shu, 1991; Raemakers, 1995; Turgut, 1998; Majd, 2006; Zeynali, 2010; Ardebili, 2011). Častěji se vyskytuje sekundární somatická embryogeneze – primární embrya se vyvíjí z epidermálních buněk hypokotylu a z buněk těchto embryí regenerují další somatická embrya (Graman, 1998).

Somatická embryogeneze je u řepky olejky navozena kultivací kotyledonálních nebo hypokotylových řízků na ½ MS mediu s různým poměrem fytohormonů. Bylo zjištěno, že existuje několik proměnných, které ovlivňují účinnost embryogeneze. Nejvýznamnějším faktorem je genotyp rostliny – existují velké rozdíly v indukci embryogeneze napříč odrůdami. Dalším faktorem je použitý výchozí materiál – z hypokotylu rostly embrya s lepší účinností (Zeynali, 2010; Majd, 2006).

2.3.4 Prašníkové kultury

Technika prašníkových kultur využívá prašníky asepticky odebrané z rostlinného květu v přesně daném vývojovém stadiu. Získaná rostlina má genom pouze po otci (vzniká z pylových zrn) (Corral-Martínez, 2020). Rostliny se vyvíjejí z mikrospor, kterým je hormonálně pozměněn vývoj z gametofytické vývojové dráhy na embryogenezi (Seguí-Simarro, 2010). Toho je dosaženo odebráním prašníků ve velmi specifické vývojové fázi (Seguí-Simarro, 2008a) a následným stressovým ošetřením (Shariatpanahi, 2006). Regenerované rostliny mohou zůstat haploidní, nebo se z nich stávají dihaploidi – spontánně, či s pomocí metod pro duplikaci genomu (např. kolchicin) (Seguí-Simarro, 2008b). Modelovými rostlinami pro techniku prašníkových kultur jsou *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum*, ale i *Brassica napus* (Corral-Martínez, 2020). U řepky se prašníkové kultury provádí běžně už poměrně dlouho dobu (Lichter, 1981; Lichter, 1982; El-Hennawy, 2016; Sood, 2019; Corral-Martínez, 2020).

Mikrosporové kultury

Z prašníků mohou být izolované mikrospory pro techniku mikrosporových kultur, pomocí které se tvoří dihaploidní rostliny. Tvorba dihaploidů procesem konvenčního šlechtění trvá zhruba 8–9 let, tvorbou dihaploidů *in vitro* je možné je získat během 10–18 měsíců, v závislosti na konkrétní rostlině. Tvorba dihaploidních linií pomocí mikrosporových kultur je popsána v metodice produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé (Vyvadilová, 2008).

Pylová embryogeneze

Embryogeneze byla také úspěšně navozena krátkodobým (až 45 minut, $c \leq 45$ mg/l) vystavením pylových zrn řepky olejky vysokým koncentracím fytohormonu 2,4-D (Ardebili, 2011).

2.3.5 Protoplastové kultury

Rostlinné protoplasty jsou získávány kontrolovaným enzymatickým štěpením, které odstraní buněčnou stěnu rostlinné buňky, bez poškození buněčné membrány (Sahab, 2019). Z jediného protoplastu je teoreticky možné pomocí tkáňových kultur vypěstovat dospělou, rozmnožování schopnou rostlinu (Sahab, 2019), avšak úroveň regenerace rostlin z protoplastů je velmi nízká (Graman, 1998). Protoplasty je možné získat z různých rostlinných tkání – listů, stonků, kořenů, prašníků, pylu, okvětních lístků apod. Protoplastové kultury jsou vhodné pro základní výzkum, ale i pro genetické úpravy rostlin. U řepky olejky je výzkum protoplastových kultur velmi pokročilý, díky její velmi dobré odpovědi na metody tkáňových kultur (Sahab, 2019). Protoplastové kultury jsou používány pro genetickou úpravu, například technikou CRISPR (Murovec, 2018; Sahab, 2019) nebo například splynutí protoplastů – tzv. protoplastová fúze (Kao, 1991; Kang, 2017).

Protoplastová fúze umožňuje vnitrodruhové a mezidruhové křížení (překonání rostlinné inkompability) přenos extranukleárních genetických elementů – například mitochondriální DNA, chloroplasty, cytoplazma. U řepky olejky je pomocí protoplastových kultur vyvinut speciální systém samčí sterility (El-Esawi, 2016).

Embryo rescue

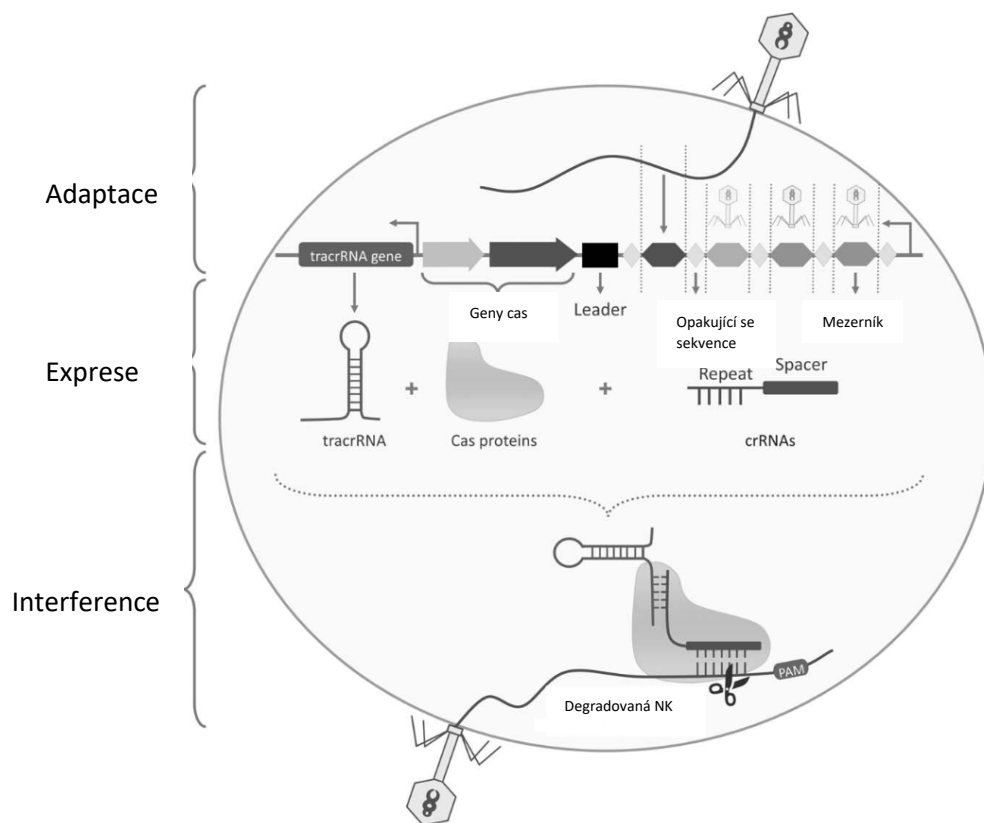
Metoda embryo rescue se u řepky používá k rozšíření genetické variability při šlechtění. V České republice byla vyvinuta certifikovaná metodika pro tvorbu resyntetizované řepky olejky (Klíma, 2018). K tomu se využívá vzdálená hybridizace genotypů brukve řepáku (řepice vodnice – mateřská komponenta) a brukve olejně (kadeřávka, zelí, kapusta – otcovská komponenta) (Klíma, 2018).

2.4 CRISPR-Cas systémy

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) a přidružené proteiny, které se souhrnně označují jako CRISPR-Cas systém jsou původně součástí adaptivní imunity mnoha bakterií a většiny archeobakterií (kolem 50, respektive 90 %) proti exogenním elementům (Sternberg, 2016). Narozdíl od systémů restriktivně-modifikačního je systém CRISPR-Cas velmi specifický, adaptivní a děditelný. Tuto imunitu bakterie získávají začleňováním krátkých fragmentů cizí DNA do lokusu CRISPR. Transkripty tohoto lokusu se poté spojují s Cas proteiny (kódované na stejném lokusu) a degradují transkriptu podobné nukleové kyseliny (Lohrasbi, 2019).

2.4.1 Funkce *in natura*

CRISPR-Cas systém je lokus, který je tvořen sérií opakujících se motivů (repetic) délka motivu obvykle 23–55 bázových párů), které jsou od sebe oddělovány unikátními mezeríky (spacers; 21–72 bp). Tomu předchází oblast bohatá na A a T báze (tzv. leader neboli zaváděcí sekvence), obsahující promotor (Obrázek 3). Zpravidla jsou v blízkosti ještě geny pro Cas proteiny (Van der Oost, 2014).



Obrázek 3: Struktura a funkce systému CRISPR-Cas (Lohrasbi, 2019).

Sekvence a délka jednotlivých repetit je v celém CRISPR lokusu vysoce konzervována, ale velmi se liší mezi jednotlivými CRISPR systémy – ať už ve stejném organismu, nebo napříč jinými prokaryoty (Lohrasbi, 2019). Ve stejném genomu může být přítomno více CRISPR-Cas systémů. Nejvíce bylo zaznamenáno u bakterie *Methanocaldococcus jannaschii* - 18 různých CRISPR lokusů (Grissa, 2007; Lohrasbi, 2019).

Gen *CAS* kóduje Cas nukleázu, jejíž substrát je dvouvláknová DNA (dsDNA). Pokud je u Cas přítomna tzv. guiding RNA (gRNA), dokáže Cas nukleáza rozpoznat specifické místo na dsDNA, které je homologní k sekvenci gRNA. Po rozpoznání je dsDNA sevřena Cas nukleázou a je vytvořen dvouvláknový zlom (Liu, 2015; Broeders, 2020). Sekvence gRNA je homologní k některému z mezerníků do genomu integrovaných, ne však k repetitím (Liu, 2015).

Mechanismus účinku CRISPR-Cas systémů se obecně se dělí do 3 hlavních kroků: adaptace, exprese a interference.

Adaptace

Cas protein se sám přichytí k cizorodé DNA – za tzv. PAM sekvencí (protospacer adjacent motif) a po přichycení vystřihne část cizí nukleové kyseliny (Makarova, 2020).

PAM je 2 až 6 bp dlouhá sekvence DNA, následuje ihned za místem přichycení nukleázy Cas (Shah, 2013). PAM je místo, které se vyskytuje na cizí DNA (respektive RNA; Obrázek 3). Nevyskytuje se na genomu bakteriálním. Cas nukleáza se na místo nepřichytí, pokud není následováno sekvencí PAM (Sternberg, 2014), tímto mechanismem je zabráněno tomu, aby bakterie štěpila vlastní DNA (Mali, 2013).

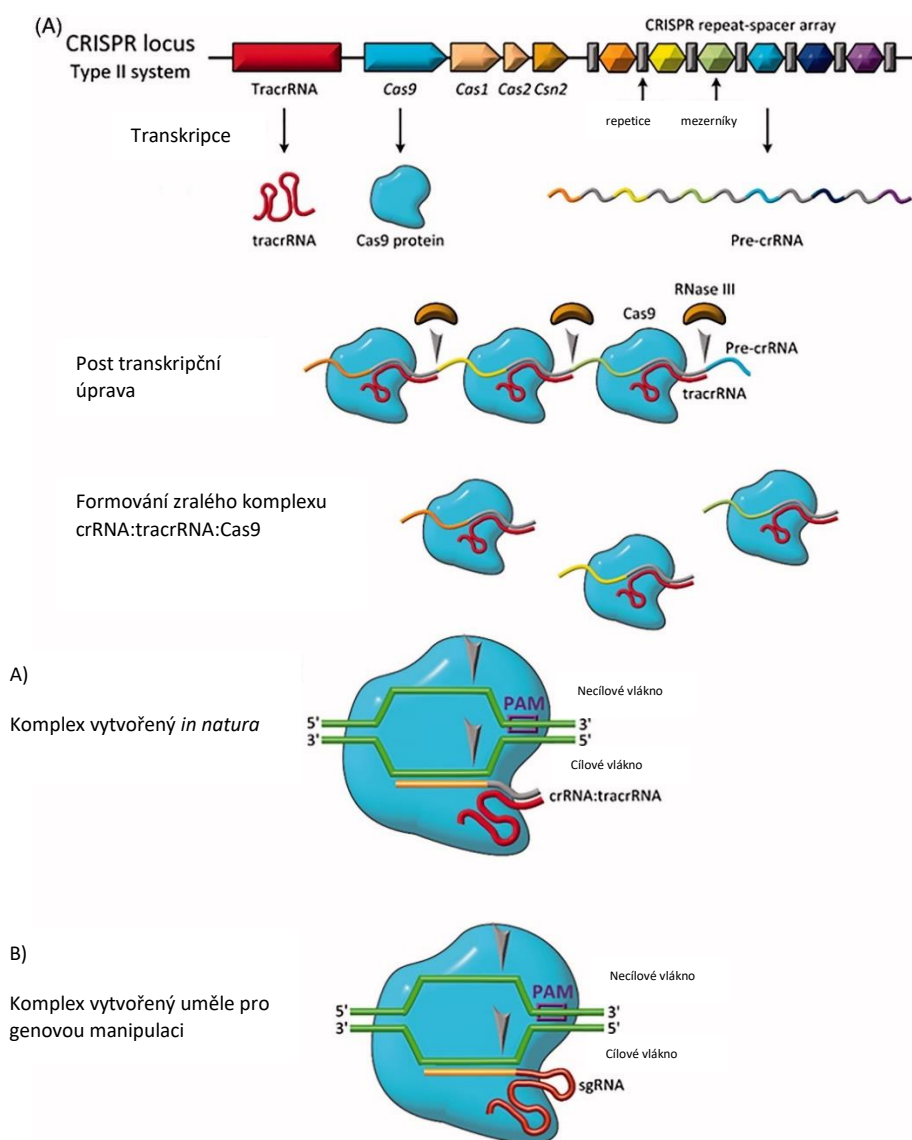
Následně je vyštěpená část inkorporována do lokusu CRISPR v genomu bakterie jako mezerník. Tím je zajištěna imunitní odpověď při opětovném setkání prokaryotní buňky s patogenem, respektive cizí DNA. Některé CRISPR-Cas systémy dokážou mezerník do CRISPR lokusu vložit pomocí reverzní transkriptázy (ta je také kódována CRISPR lokusem). Děje se tak u některých bakterií, pokud je vetřelec RNA vir (Makarova, 2020).

Exprese

Obvykle je celý CRISPR lokus exprimován jako jediný transkript, tzv. pre-CRISPR RNA (pre-crRNA). Ten je dále zpracován na menší CRISPR RNA (crRNA). Každá crRNA obsahuje právě jednu mezeríkovou sekvenci a její doprovodnou repetici (Obrázek 4). V závislosti na typu CRISPR-Cas systému může být pre-CRISPR RNA upravována pomocí různých Cas proteinů, nebo nativními RNázami buňky (Makarova, 2020)

Interference

V poslední fázi je využita upravená crRNA pro navedení Cas nukleázy k cizorodé DNA, popřípadě RNA (vir, plazmid). Cizí molekula nukleové kyseliny je po navedení Cas nukleázy rozštěpena a inaktivována (Makarova, 2020).



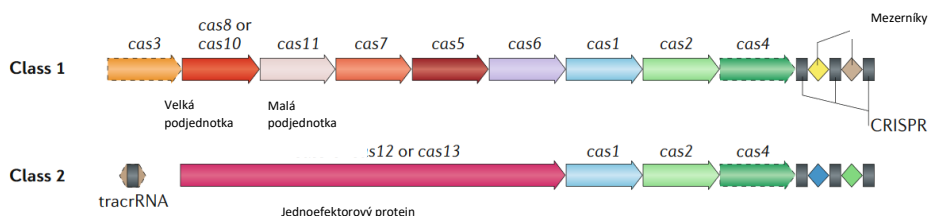
Obrázek 4: Funkce CRISPR-Cas systému v živé buňce a při editaci genomu (Lino, 2018).

2.4.2 Klasifikace CRISPR-Cas systémů

V současnosti se jsou CRISPR-Cas systémy děleny do dvou hlavních tříd a v nich jsou děleny na 6 různých typů a na dalších 33 podtypů (Makarova, 2020). Hlavní odlišností mezi první a druhou třídou spočívá v různém složení a počtu proteinů, které jsou do procesu adaptace, exprese a interference zapojeny (Obrázek 5).

Třídy

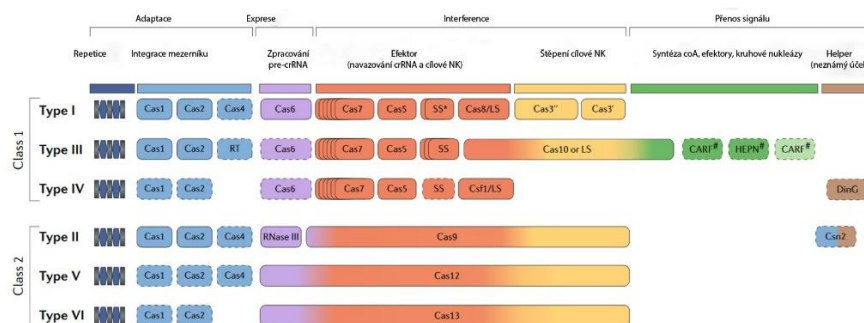
Systémy první třídy obsahují ve svém lokusu více menších genů, které jsou postupně translatovány v proteinové podjednotky. Tyto podjednotky poté tvoří crRNA připojovací komplex. Ten se uplatňuje v připojení a degradaci cizí DNA. Druhá třída CRISPR-Cas systému obsahuje jeden gen (*cas9*, *cas12*, nebo *cas13*). Tento multidoménový crRNA připojovací protein je poté funkčním analogem proteinových podjednotek 1. třídy (Makarova, 2020).



Obrázek 5: Třídy CRISPR-Cas systémů (Makarova, 2020).

Typy

Systémy CRISPR-Cas se dále dělí na celkem 6 typů, podle složení jejich funkčních modulů. Na obrázku 6 jsou zobrazeny typické vazby mezi genetickou, strukturální a funkční organizací každého ze šesti typů. Hvězdička zobrazuje malou podjednotku (SS), která je nejspíše sloučena s velkou podjednotkou (LS) v systému typu 1. Křížek (#) zobrazuje zatím málo prozkoumané části mechanismu, které jsou nejspíše součástí signálních drah. Podjednotky ohraničené přerušovanou čarou mohou být u některých podtypů vynechány zcela, popřípadě jsou postradatelné (Makarova, 2020).



Obrázek 6: Organizace jednotlivých typů CRISPR-Cas systémů (Makarova, 2020).

2.4.3 Aplikace CRISPR-Cas systémů *in vitro*

Od svého objevení byly tyto techniky použity v mnoha různých odvětvích biologie – genotypizace, editace genomu, regulace exprese, úpravy RNA a podobně. V dnešní době se už používají pro léčbu genetických poruch u zvířat, pomáhají ve šlechtění zvířat a rostlin, usnadňují hledání nových antibiotik a v blízké budoucnosti by mohly být použity pro léčbu lidí (Lohrasbi, 2019; Broeders, 2020).

V porovnání s ostatními technikami genového inženýrství (ZFNs, TALENs) je původní metoda CRISPR-Cas9 (pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*) méně přesná a fyzická velikost celé molekuly, kterou je potřeba dopravit na místo štěpení, je relativně větší (Fernández, 2017; Guha, 2017). Další modifikace tohoto přístupu ale celkovou spolehlivost a přesnost zlepšují a přinášejí nové možnosti úpravy organismů (Ran, 2013a; Zhang, 2016). S pomocí dalších, specifických funkčních efektorových domén je možné ovlivňovat i účinnost transkripce, epigenetické modifikace či genovou expresi. Navíc je možné použít tento systém i pro značení DNA (Lohrasbi, 2019).

Naváděcí RNA (gRNA)

Cas9 je jednoproteinová endonukleáza schopná interagovat s RNA. Tyto RNA se nazývají naváděcí RNA (gRNA) a navádí endonukleázu na místo, kde má proběhnout štěpení v genomu. Pro endonukleázu Cas9 je gRNA složena ze dvou částí. Skládá se z CRISPR RNA (crRNA) a trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA). Část gRNA, nazývaná crRNA, obsahuje úsek mezerníku (spacer), který je zodpovědný za specifitu. Sekvence crRNA je ta, která dopraví nukleázu na místo, které chceme štěpit. Druhá část gRNA – tracrRNA je částečně komplementární s crRNA a je zodpovědná za navázání Cas9 nukleázy na ribonukleový komplex. Mnoho aplikací systému CRISPR-Cas9 pro genové úpravy si vystačí pouze s jedním vláknem RNA, tzv. sgRNA (Obrázek 4, dole). Jde o spojení crRNA a tracrRNA v jeden cca 100 bázových párů dlouhý celek (Robb, 2019; Broeders, 2020).

Editace genomu

Pro editaci genomu je nutné navrhnout správnou sekvenci naváděcí RNA (guideRNA, gRNA). Jejím úkolem je dovést Cas nukleázu na místo štěpení. Návrh gRNA (respektive sgRNA, Obrázek 4) lze provést pomocí online nástrojů, které dokážou odhadnout účinnost modifikace, hrozbu nespecifického štěpení a existenci PAM, který je pro navázání nukleázy klíčový (Ran, 2013a).

Vytvořená gRNA musí být dopravena do buňky. Podle typu transformované tkáně je možné vybírat z několika způsobů. Vložení jako PCR amplikon obsahující expresní kazety nebo pomocí sgRNA-expresního plazmidu (Ran, 2013b).

Další možností, která se využívá především u rostlinných tkání, je transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Pro to je nutné navrhnout CRISPR-Cas9 vektory. Ty jsou vloženy do bakterie *A. tumefaciens* pomocí elektroporace (2,5 kV / 9 minut). Po elektroporaci následuje kultivace v LB médiu. Když OD600 dosáhne hodnoty 1,6-2, je odebráno 500 µl pro infekci hypokotylů (Zhang, 2019).

Dalším krokem je klonální izolace buněčných linií. Tu je možné provádět pomocí metody FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), nebo pomocí sériového ředění. Po izolaci se nechá každá buňka dělit individuálně, aby vzniklo více na sobě nezávislých buněčných linií. Každá linie má právě jednoho transformovaného předka (Ran, 2013b).

Konečně je na řadě tzv. funkční test. NHEJ (Non-Homologous End Joining) obvykle způsobuje inserce a delece. Pro zjištění, jestli byl na místo inkorporován správný plazmid, nebo PCR amplikon (správnost transformace), je možné využít sekvenování, popřípadě SURVEYOR nukleázy, které po denaturaci opětovné renaturaci DNA štěpí v místech, kde DNA není komplementární (Ran, 2013b).

Ne všechny alely musejí být nutně transformovány. Může dojít k tvorbě heterozygotní mutace (jen jeden homologní chromozom), bialelické mutace (oba homologní chromozomy, ale každý nese jinou mutaci) nebo homozygotní mutaci (oba homologní chromozomy nesou stejnou mutaci) (Elorriaga, 2018).

Při využití HDR (Homology-Directed Repair) přístupu může být produkt detekován pomocí sekvenování, nebo například RFLP (Ran, 2013b).

Regulace genové exprese

Existují modifikace proteinu Cas9, které umožňují regulovat genovou expresi. Použitím Cas9 bez schopnosti štěpit DNA (dCas9) je možné navazovat dCas9 na DNA, ale neštěpit ji (Dominguez, 2016). Spojením dCas9 s umělou sgRNA je vytvořen komplex dCas9:sgRNA, který blokuje funkci RNA polymerázy a tím zabráňuje elongaci transkripce. Tento komplex také dokáže blokovat iniciaci transkripce tím, že narušuje navazování transkripčních faktorů (Bikard, 2013; Larson, 2013).

Zemědělství a průmysl

Mnoho průmyslových odvětví, které ve výrobě používají živé organismy, mohou s úspěchem systém CRISPR-Cas9 také využívat. Například v mlékárenském a vinařském průmyslu může pomáhat v boji proti bakteriofágům, kteří dokážou zdecimovat celé mlékárenské i vinařské kultury (Sturino, 2006; Lohrasbi, 2019).

První komerční využití našla metoda CRISPR-Cas9 právě v mlékárenství – posílení imunity bakteriálních kultur používaných pro výrobu sýrů a jogurtů (Barrangou, 2012). Vývoj v průmyslu bude nejspíše směřovat k modifikaci bakterií, kvasinek a plísní schopných produkovat biopaliva a biomateriály (Ryan, 2014).

V zemědělství je systém CRISPR-Cas9 využíván u komerčních a modelových rostlin pro zvýšení výnosů, zlepšení odolnosti vůči suchu, zlepšení růstu rostlin v místech se sníženým obsahem živin v půdě a v neposlední řadě také pro zlepšení nutriční hodnoty potravin (Ricroch, 2016).

Léčba nemocí

Využití systému CRISPR-Cas9 pro úpravu savčího genomu je intenzivně diskutované téma. Díky této technice je teoreticky možné léčit i lidské genetické vady a nemoci (Doudna, 2014). Několik na sobě nezávislých studií úspěšně odstranily mutaci v genu pro protein dystrophin u myši. Mutace v tomto genu způsobuje Duchenneovu muskulární dystrofii (Tabebordbar, 2016; Nelson, 2016; Phimister, 2016; Nelson, 2019).

CRISPR-Cas9 byl úspěšně použit pro léčbu šedého zákalu u myši (Wu, 2015), navození Parkinsonovy choroby u prasat pro jejich využití jako modelový organismus s touto chorobou (Yang, 2016). Nebo například tvorba alelických p53 mutantů u opic – modelové organismy pro výzkum rakoviny (Chen, 2016)

Největší překážkou pro použití u lidí je stále ještě malá přesnost a poměrně vysoký podíl off-target zásahů do genomu. Navíc musí mít metoda minimální toxicitu pro organismus a je důležité zvážit i imunitní odpověď upravovaného organismu (Broeders, 2020).

Antibakteriální a antivirotické použití CRISPR-Cas9

Někdy mezi lety 2017 a 2018 začal v Číně experiment s geneticky upravenými dětmi. Pomocí CRISPR-Cas9 bylo upraveno 13 lidských embryí. Modifikace spočívala v deleci 32 bázových párů genu CCR5 (po transformaci označován jako CCR5 Δ 32), což mělo mít za následek doživotní odolnost proti onemocnění AIDS. Upravená embrya byla přenesena celkem do pěti náhradních matek, z nichž 2 otěhotněly a jen jedna porodila – neidentická dvojčata. Problém nastal v tom, že obě děti mají chimérické buňky. Některé buňky v jejich těle transformované jsou, jiné nikoliv. Další problém je fakt, že se stále přesně neví, co tato delece může způsobit (Greely, 2019).

Antivirotické terapie fungují už se starší metodou genového inženýrství – Zinc Fingers (ZFN) – pomáhala v boji proti HIV. ZFN jsou v současnosti nahrazovány systémem CRISPR-Cas9. Ten dokáže buňku ochránit před infekcí virem a zabránit replikaci viru v již napadené buňce (Price, 2015). Studie se zabývají virem HIV, žloutenkou typu B, C a herpesvirem (Dong, 2015; Price, 2015; Van Diemen, 2016; Kaminski, 2016).

2.4.4 Legislativa

Inovace metod genového inženýrství u rostlin, ale i dalších organismů s sebou nese otázky, zdali existuje adekvátní judikatura, která by této neustále se rozvíjející oblasti vědy dávala hranice.

Momentálně není legislativa ošetřující geneticky upravené plodiny celosvětově sjednocená. Většina zemí, které již moderní techniky produkce GMO plodin diskutovaly, dodržují definici LMO (Living Modified Organism), která je uvedena v Cartagenském protokolu o biologické bezpečnosti (Jorasch, 2020). Tento protokol byl doposud ratifikován 172 státy světa, včetně Evropské unie. Česká republika protokol ratifikovala 11. září 2003 (CBD, 2020).

Co se týče výzkumu a šlechtění geneticky modifikovaných plodin, jsou země Evropské unie poměrně konzervativní, Částečně to může být kvůli legislativě řešící otázku šlechtění GMO plodin. V Asijských zemích bylo vydáno 53 % veškerých publikací řešících problematiku šlechtění GMO, v severní Americe 34 % a v Evropě pouhých 13 % (Jorasch, 2020).

Většina zemí, včetně zemí EU, má regulační zákony orientované na proces výroby a pěstování GMO. Naopak v zemích jako například USA a Kanada jsou regulační zákony nastaveny až podle konečných produktů GMO (Eckerstorfer, 2019).

Legislativa GMO

Geneticky modifikované organismy představují pro mnoho zemí politicky velmi náročný úkol. Technologie genového inženýrství se nikdy předtím nerozvíjely takovou rychlostí jako dnes. V různých zemích se zákazníci, politici a nevládní organizace snaží zamezit rozšiřování GMO, jelikož je vidí jako hrozbu pro biodiverzitu a lidské zdraví. Také tvrdí, že mohou způsobit zánik malého zemědělství na venkově a že představují riziko vzniku monopolů mezi firmami, které se zabývají výrobou osevního materiálu. Někteří je odmítají z důvodů etických. V jiných zemích na ně farmáři, politici i vědci pohlížejí jako na možnost zachování ekonomické a environmentální udržitelnosti, která by dokázala zajistit potraviny pro celý svět (Wesseler, 2019).

Evropská unie

Právní rámec GMO Evropské unie se zaměřuje na (European Commission, 2020):

- Ochranu lidského a zvířecího zdraví a ochranu prostředí zavedením nejvyšších možných opatření, před kterými musí nový GMO projít, než je možné jej nabídnout na trh.
- Zavedení harmonizovaných postupů pro posouzení rizik a pro povolení GMO, které jsou maximálně účinné, časově omezené a transparentní.
- Zavedení značení veškerých GMO, které jsou na trhu. Široká veřejnost a profesionálové díky tomu mohou učinit informované rozhodnutí při nákupu.
- Zavedení zpětné dohledatelnosti GMO na trhu již umístěných.

Právní rámce potom upravují následující zákony, což jsou zároveň stavební kameny Evropské legislativy (EUR – Lex, 2020).

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/18/ES ze dne 12. března 2001 o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí (EUR – Lex, 2020)
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 ze dne 22. září 2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech (EUR – Lex, 2020)

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/412 ze dne 11. března 2015, kterou se mění směrnice 2001/18/ES, pokud jde o možnost členských států omezit či zakázat pěstování geneticky modifikovaných organismů (GMO) na svém území (EUR – Lex, 2020)
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z geneticky modifikovaných organismů (EUR – Lex, 2020)
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/41/ES ze dne 6. května 2009 o uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy (EUR – Lex, 2020)

Dne 25. července 2018 rozhodoval Soudní dvůr Evropské unie, zdali by se měly na rostliny modifikované moderními metodami vztahovat stejně přísné regulace (Směrnice 18/2001/EC), nebo jestli na ně platí výjimka (Callaway, 2018).

Rozsudek zní: Organismy získané technikami, které modifikují genetický kód jakýmkoliv jiným přístupem, než přírodním patří mezi GMO. Výjimku získaly techniky mutagenese, které byly už dříve mnohokrát použity a je tedy u nich časem prověřená bezpečnost (Broll, 2019).

Regulace GMO v EU rozlišuje mezi schválením pro dovoz a schválením pro pěstování. Historicky je schvalování GMO pro dovoz velmi pomalé a způsobuje na trhu problémy. Předpokládá se, že v budoucnu vznikne asynchronie, jejíž příčinou bude zavádění nově vzniklých GMO ve světě a neschopnost EU se tomuto trendu přizpůsobit a schvalovat tyto nové GMO (Wesseler, 2019).

V EU jsou dvě úrovně, na kterých mohou být GMO schváleny.

- Jako potraviny nebo krmivo které je z GMO vyrobeno či GMO obsahuje (směrnice 1823 / 2003) – týká se však pouze dovozu, ne pěstování.
- Pro úmyslné vyšetí do životního prostředí, což zahrnuje růst rostliny v zemích Evropské unie. Popřípadě import rostlinného materiálu, který je schopný samostatného růstu a množení (směrnice 2001/18).

Potraviny a krmiva z GMO odvozené, nebo obsahující více než 0,9 % hmotnosti schváleného GMO musí být značené a dohledatelné. Díky tomuto systému mají

zákazníci na trhu v EU možnost učinit informované rozhodnutí při výběru zboží. Produkty ze zvířat krmených GMO krmivem značené být nemusí (Wessler, 2019).

V EU je momentálně povolena jen 1 GM odrůda – Bt kukuřice (MON810) vyvinutá společností Monsanto v 90. letech.

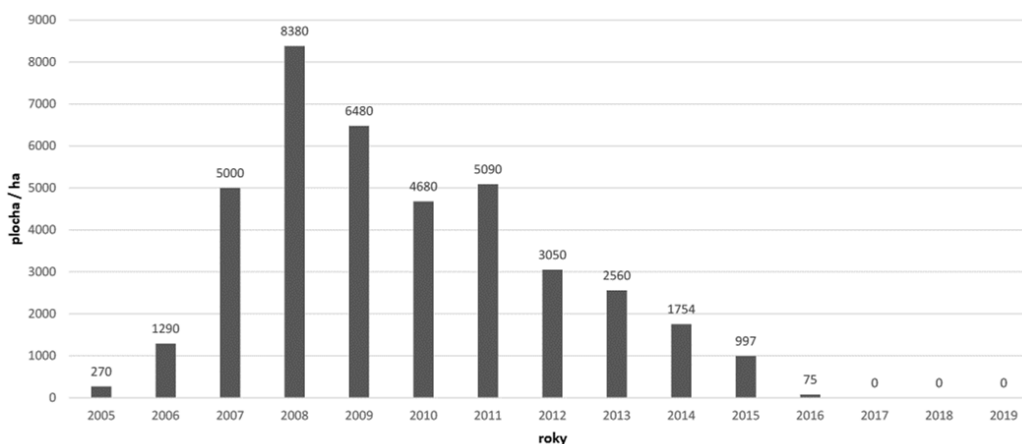
Schvalovací proces GMO v EU

1. Podání žádosti výrobcem, dodání potřebných informací.
2. Příslušné vnitrostátní orgány (zpravidla státy EU) zhodnotí enviromentální rizika a předají žádost EFSA.
 - Zveřejní žádost široké veřejnosti a informují o ni ostatní členské státy EU.
 - EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) může od výrobce požadovat doložení dodatečných informací o výrobku.
3. Evropský úřad pro bezpečnost potravin hodnotí rizika pro lidské a zvířecí zdraví. Pokud je záměr výrobce rostlinu na území EU i pěstovat, hodnotí EFSA i rizika pro životní prostředí. Následně vypracuje odborný posudek (má na to 6 měsíců od podání žádosti členským státem).
 - Veškeré informace EFSA zveřejňuje široké veřejnosti a poskytuje ostatním členským státům EU.
 - Joint research centre (JCR) je výzkumné centrum Evropské unie, které poskytuje objektivní názor na řešenou problematiku z laboratorní oblasti.
4. Evropská komise vydává návrh rozhodnutí do 3 měsíců od vydání odborného posudku EFSA.
5. Státní výbor pro potravinový řetězec a zdraví zvířat (SCoFCAH) posoudí návrh rozhodnutí Evropské komise hlasováním kvalifikovanou většinou. V případě, že návrh získá dostatečný počet hlasů, je schválen. Pokud hlasováním neprojde, postupuje se na krok 6.
6. Evropská komise pozmění návrh a předloží ho k hlasování SCoFCAH (2 měsíce), popřípadě může originální návrh předložit Odvolacímu výboru (AM) (1 měsíc).

- AM může podpořit návrh Evropské komise – GMO je schváleno,
- Nebo nevyjádří žádný názor. Potom rozhodne Evropská komise, zda bude GMO schváleno,
- Poslední možnost je, že je GMO zamítnuto Odvolací komisí, a tedy nemůže být na území EU použito (Wesseler, 2019)

Často se však stává, že členské státy EU zakážou pěstování GMO, které jsou k pěstování Evropskou unií povolené. Tak mohou učinit na základě ochranné doložky směrnice 2001/18 (článek 23). Ta dovoluje členským státům zakázat povolené GMO, pokud představují riziko pro zdraví člověka, nebo pro životní prostředí (výsledky dodatečných studií apod.). Navíc, stále větší počet členských států zakazuje pěstování Bt kukuřice, i přesto, že to je nejspíše v rozporu se směrnicí 2002/18 a nařízením 1829/2003 (Wesseler, 2019)

Navzdory tomu, že Bt kukuřice nemá mezi členskými státy velké sympatie, byla v roce 2016 pěstována čtyřmi státy. Českou republikou (75 ha), Portugalskem (7069 ha), Slovenskem (112 ha) a Španělskem (129 081 ha). Dohromady 136 337 hektarů osevni plochy (0,06 % celkové osevni plochy). To však bylo pro ČR prozatím naposledy, co se na jejím území GM kukuřice pěstovala (Obrázek 7). Pěstování GMO má velký potenciál, kterému v rozvinutí brání momentálně velmi přísná legislativa (Wesseler, 2019).



Obrázek 7: Plochy kukuřice MON 810 (Bt kukuřice) v letech 2005–2019 (MZP, 2020).

3 Cíle a hypotézy diplomové práce

Cíle

- 1) Vytvořit a optimalizovat reprodukovatelný protokol pro regeneraci některých odrůd řepky olejky.
- 2) Umožnit inkorporaci metody CRISPR do optimalizovaného protokolu.
- 3) Vyhodnotit účinnost regenerace u jednotlivých odrůd řepky olejky.

Hypotéza

- 1) Některá z doporučených odrůd bude mít dobrou reakci na vytvořený regenerační protokol

4 Materiál a metody

4.1 4.1. Použité odrůdy/genotypy

Pro pokus bylo vytipováno celkem šest odrůd rostliny řepky olejky, jmenovitě: Arabella, Cadeli, Ladoga, Lohana, Mirage a Obelix. Tyto odrůdy byly vybrány po konzultaci s pracovníky z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni (VÚRV) a doktorem Klímou. V minulosti tyto genotypy prokázaly velmi dobrou embryogenní schopnost, dobře reagovaly na podmínky *in vitro* kultivace a jsou také používané v našich šlechtitelských programech. V minulosti se u těchto odrůd využívala jenom metoda embryogeneze *in vitro*, proto je regenerace nepřímou organogenezí u těchto odrůd metodická novinka.

4.2 Sterilizace

Nádobí

Media a nádobí bylo klávkováno 15 minut při teplotě 121 °C. Nádobí, které není možné sterilizovat autoklávkem bylo sterilizováno pomocí NaClO a teplem v horkovzdušné troubě (Singh, 2018).

Sterilizace hormonů

Ačkoliv je možné některé použité rostlinné hormony (2,4-D, IAA) sterilizovat v autoklávu (Sigma Aldrich, 2020), byly všechny použité hormony, MES, AgNO₃ a antibiotika sterilizovány pomocí dvojitého 0,2 µm filtru.

4.3 Ošetření a výsev semen

Povrchová sterilizace semen

Před výsevem byla semena sterilizována pomocí dvou různých chemikálií, pro určení šetrnější, ale zároveň účinnější metody. Byly použity roztoky ethanolu ($c = 75\%$ objemových) (Bates, 2017) a chlornanu sodného (Savo – $c = 20\%$ objemových) (Bhalla, 2008; Bates, 2017), respektive roztoku chloridu rtuťnatého (HgCl_2 ; $c = 1,5\%$ hmotnostních) (Zheng, 2019).

Máčení probíhalo následovně, v laminárním boxu:

- roztok ethanolu - 1 minuta
- Roztok NaClO – 20 minut, respektive HgCl_2 – 13 minut
- Sterilní H_2O – 3 x 5 minut

Sterilizace probíhala ve sterilní kádince, semena s roztokem (vodou) byly každých 30 vteřin promíchána sterilním míchátkem.

Sterilizovaná semena byla vyseta na sterilní medium M0, do kterého nebyly přidány žádné rostlinné hormony. Na medium bylo vyséváno po ± 20 semenech. Pro získání etiolovaných rostlin probíhal růst při teplotě $24\text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě. Kultivace probíhala po dobu 5–6 dní, nebo do délky většiny hypokotylů $\pm 7\text{ cm}$ (Obrázek 88) (Knecht, 2011).

Složení média M0

- $\frac{1}{2}$ MS
- 8,5 g / 1 l Agar



Obrázek 8: Hypokotily ve správné délce ($\pm 7\text{ cm}$), připravené na řezání (foto: J. Harenčák).

4.4 Příprava a kultivace hypokotylových segmentů

Když délka etiolizovaných hypokotylů dosáhla zhruba 7 cm, byly jednotlivé hypokotyly nařezány na krátké segmenty (8–10 mm). Řez nelze provádět šikmo. Pro co nejvyšší účinnost regenerace musí být řez proveden jedním tahem a musí být kolmý k hypokotylu. Doporučuji častější výměnných skalpelových nástavců, aby zůstala čepel co nejostřejší.

Transfekce hypokotylů

Transfekce probíhá pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která do rostlinných buněk přenese požadovaný vektor. Hypokotyly jsou na 30 minut vloženy do 50 ml tekutého DM media, které obsahuje bakterie s vektorem. Infekce probíhá při pokojové teplotě. S intervalem 5 minut je medium s bakteriemi a hypokotyly promícháno.

Složení DM media

- MS
- 30 g / l Sacharóza
- 100 μ M Acetosyringone
- pH = 5,8

Po infekci (i pokud se infekce neprovádí) jsou hypokotyly osušeny na sterilním filtračním papíře a následně pasážovány na kokultivační medium M1. Toto medium obsahuje fytohormony kinetin a 2,4-D, které indukují růst kalusu. Přidaný acetosyringone zvyšuje virulenci *A. tumefaciens* (Nakano, 2017). Na M1 zůstanou hypokotyly 2 dny, při 24 °C a ve tmě.

Složení M1

- | | | |
|----------------------|--|-------------------------------------|
| - MS | | - 100 μ M Acetosyringone (pokud |
| - 30 g / l Sacharóza | | byla provedena infekce |
| - 18 g / l Manitol | | - pH = 5,8 |
| - 1 mg / l 2,4-D | | |
| - 0,3 mg / l Kinetin | | |
| - 8,5 g / l Agar | | |

4.5 Kultivace kalusu

Následně byly hypokotyly pasážovány na M2 selekční medium. V případě prováděné transformace je medium obohacené o ATB kanamycin a carbenicillin pro eradikaci *A. tumefaciens* a další růst kalusu. Navíc je do media přidán i AgNO₃, který výrazně zlepšuje účinnost regenerace u řepky (De Block, 1989; Uliiaie, 2008).

Složení M2

- MS
- 30 g / l Sacharóza
- 18 g / l Manitol
- 1 mg / l 2,4-D
- 0,3 mg / l Kinetin
- 20 mg / l AgNO₃
- 8,5 g / l Agar
- 25 mg / l Kanamycin, hygromycin, nebo glyfosfát
- 250 mg / l Carbenicillin
- pH = 5,8

Na M2 mediu (Obrázek 9) byly hypokotyly kultivovány 3 týdny, dokud nebyl dobře viditelný kalus na řezu. Kultivace probíhala ve tmě při 24 °C.



Obrázek 9: Medium M2 s nařezanými hypokotyly (foto: J. Harenčák).

4.6 Regenerace rostlin

Explantáty, které po 3 týdnech iniciovaly růst kalusu, byly pasážovány do regeneračního media M3 (zeatin + IAA). Pasážování do nového M3 media probíhalo každé 2 týdny do regenerace rostlin (Obrázek 10). Kultivace probíhala ve fytotronu při 24 °C, 70 % vlhkosti, fotoperiodou 16 h světlo / 8 h tma (Knecht, 2011).

Složení M3

- MS
- 10 g / l Glukóza
- 0,25 g / l Xylóza
- 0,6 g / l MES
- 2 mg / l Zeatin
- 0,1 mg / l IAA
- 8,5 g / l Agar
- 25 mg / l Kanamycin, nebo glyfosfát
- 250 mg / l Carbenicillin
- pH = 5,8



Obrázek 10: Prýty na mediu M3 (foto: J. Harenčák).

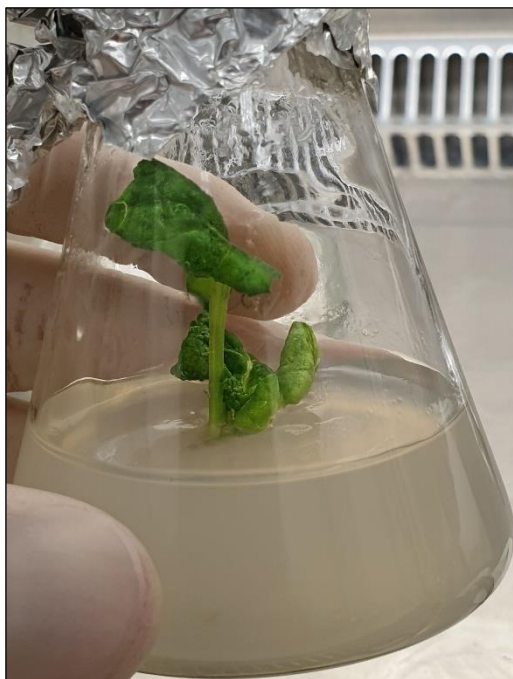
4.7 Zakořeňování rostlin

Po regeneraci rostlinek na mediu M3 je nutné iniciovat růst kořenů. Toho se dosáhne pomocí media M4 bez fytohormonů.

Rostlinkám byl odstraněn zbytek kalusu a byly vpíchnuty do media M4 (Obrázek 1111). Zakořeňování trvá zhruba 3 týdny, poté byly rostlinky přeneseny do sadbovačů se substrátem. Kultivace probíhala ve fytotronu při 24 °C, 70 % vlhkosti, fotoperiodou 16 h světlo / 8 h tma.

Složení M4

- MS
- 10 g / l Sacharóza
- 8,5 g / l Agar
- pH = 5,8



Obrázek 11: Zakořeňovací medium s explantátem (foto: J. Harenčák).

4.8 Převod regenerantů do půdy

Jako substrát byl použit substrát „PROFÍK – Propařovaný substrát pro výsev a množení“ od firmy Forestina (Obrázek 1212). Rostliny s dobře vyvinutým kořenovým systémem byly (v nesterilních podmínkách) vyjmuty z kultivačního media. Následně byl jejich kořenový systém opláchnut sterilní vodou, aby se odstranily veškeré zbytky media na kořenech. Po opláchnutí byly rostliny vloženy do důlku v mírně udusaném substrátu a zakryty přebytečným substrátem. Kultivace probíhala zprvu v plastovém boxu, který zaručoval 100 % relativní vlhkost. Po 3 dnech bylo víko plastového boxu pozvolna otevíráno – zhruba 0,5 cm / den po dobu prvních 3 dnů, později 3 cm / den do úplného otevření. Růst probíhal opět ve fytotronu při 24 °C, s postupným snižováním vlhkosti a fotoperioda byla nastavena na 16 / 8.



Obrázek 12: Substrát použitý pro přenos explantátů ze sterilního prostředí do sadbovačů (foto: Jan Harenčák).

5 Výsledky

Pokus byl proveden ve dvou nezávislých opakováních. Konec druhého opakování bohužel provázela technická závada na fytotronu, který jejím následkem nedokázal udržovat podmínky potřebné ke správnému růstu explantátů.

Rostliny byly regenerovány z více než 1500 hypokotylových řízků (± 250 řízků / 1 odrůda). Během pokusu docházelo k odstraňování kalusů, které výrazně ztmavly, iniciovaly růst kořenů na regeneračním mediu a těch, které po dlouhou dobu (více než 4 pasážování na regenerační medium) neiniciovaly růst prýtů. Také zpravidla nebylo možné zachránit kontaminované explantáty.

Ošetření semen a klíčení v *in vitro* podmínkách

Semena rostlin byla před vysetím na medium M0 sterilizována. Byla ozkoušena sterilizace pomocí NaClO a HgCl₂. Obě metody způsobovaly u některých odrůd snížení klíčivosti. Odrůdy Arabella a Obelix neměly téměř žádnou negativní reakci na metodu sterilizace – při použití NaClO i HgCl₂.

Prvotní fází celého pokusu bylo napěstování etiolovaných hypokotylů. Bylo zkoušeno pěstování v uzavíratelných sklenicích (Obrázek 13) a falkonkách, které výškou přesně odpovídaly požadované délce hypokotylů (Obrázek 14). Lehčí a účinnější práce byla s hypokotyly napěstovanými ve falkonkách. Po napěstování bylo jednoduše možné pomocí sterilní pinzety extrahovat veškeré hypokotyly z falkonky naráz, v jednom celistvém svazku. Ze svazku hypokotylů bylo možné jednoduše odříznout část s přichyceným mediem a část s děložními lístky. Zbylé hypokotyly se přidrží sterilní pinzetou a ostrým skalpelem se nakrájí na krátké segmenty. Krájení bylo prováděno na sterilní Petriho misce, ta byla pro každý soubor hypokotylů z jedné falkonky použita nová.



Obrázek 13 a 14: Pěstování ve sklenici (vlevo) a ve falkonce (vpravo) (foto: J. Harenčák)

Kultivace hypokotylů a kalusů

Media byla vždy čerstvá, připravovaná těsně před jejich použitím. Zamezilo se tak nechtěné degradaci některých komponent, ke které by mohlo postupem času dojít.

Veškeré hormony byly sterilizovány pomocí filtrování skrz 0,2 μm filtr. Filtrování probíhalo v co největším objemu naráz. Sterilní hormony byly uskladněny ve falkonkách, v podmínkách doporučených výrobcem. Před každým použitím sterilního hormonu vyjmutého z lednice je nutné ošetřit falkonku sterilizačním roztokem (75 % ethanol, popř. Sterilium). Zanedbání sterilizace falkonky vede k nežádoucí kontaminaci media.

Do media M2 byl přidán dusičnan stříbrný AgNO_3 . Jeho přítomnost výrazně zvýšila podíl zelených kalusů (Obrázek 15 a 16).



Obrázek 15: M2 medium bez přídavku AgNO_3 (foto: Jan Harenčák)

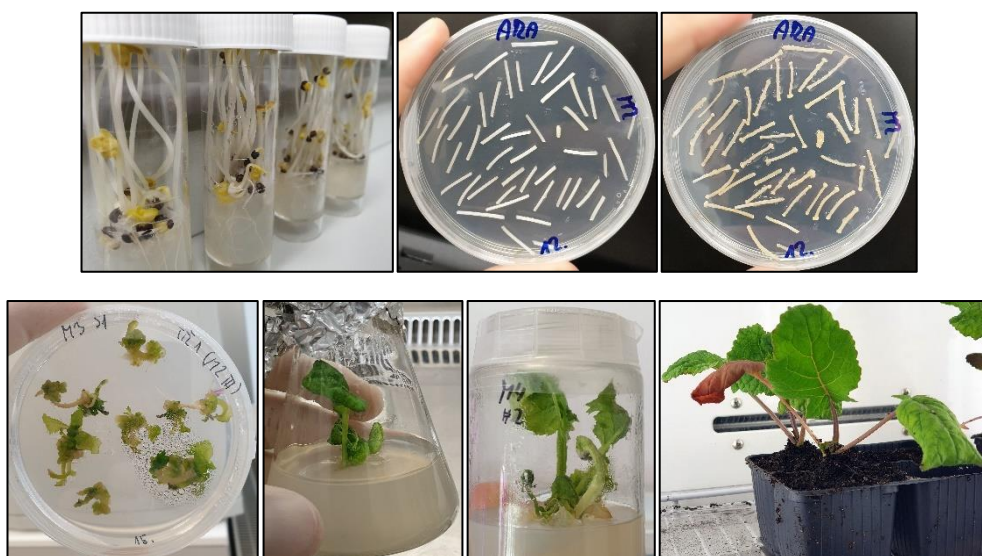


Obrázek 16: M2 medium s přídavkem AgNO_3 (foto: Jan Harenčák)

Pro pasážování bylo nutné vybrat správný nástroj. Ozkoušeno bylo několik velikostí pinzet. Pro co nejpřesnější manipulaci s kalusy (nesmí docházet k ruptuře hypokotylu) se jako nejlepší osvědčila hladká pinzeta s délkou cca 120 mm a tlustou špičkou. Pro manipulaci s prýty byly použity pinzety o délce odpovídající hloubce kultivační nádoby.

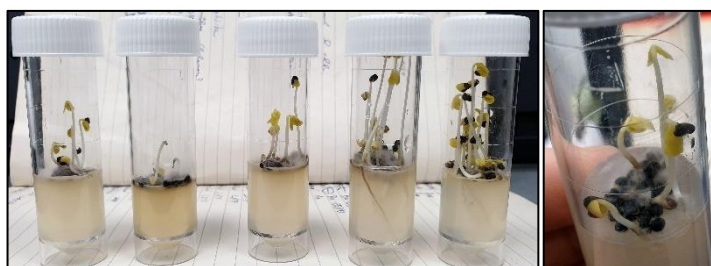
Hodnocení regenerační schopnosti použitých odrůd a získání regenerovaných rostlin

Odrůda Arabella se vyznačuje relativně silným hypokotylem (Obrázek 16), dobrou odolností vůči použitým sterilizačním chemikáliím a v porovnání s ostatními odrůdami dobrou regenerační schopností (Obrázky 16-22). Spolu s odrůdou Obelix byla jediná, u které se podařilo regenerovat z kalusů rostliny a převést je do půdy (Obrázek 22). Z celkem 250 hypokotylových řízků této odrůdy bylo získáno 49 prýtů a po jejich zakořenění bylo 5 rostlin úspěšně převedeno do *ex vitro* podmínek.



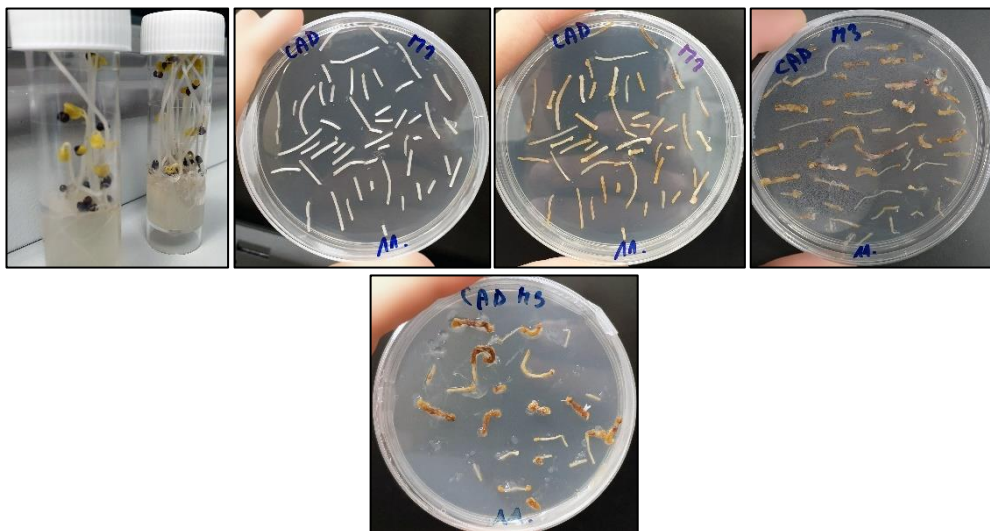
Obrázky 16 až 22: Regenerace *in vitro* odrůdy Arabella. Obrázky jsou seřazeny chronologicky tak, jak za sebou postupovaly jednotlivé kroky regenerace (foto: Jan Harenčák).

Mezi semeny odrůdy Ladoga se vždy vyskytovalo minimálně jedno, které kontaminovalo celou klíčící sadu na mediu M0 (Obrázek 23). Proto nebylo možné s touto odrůdou dále pracovat a dopěstovat do fáze cca 7 cm dlouhých hypokotylů. Při nižším výsevu by byla práce neefektivní a bylo by zapotřebí spousta laboratorního materiálu.



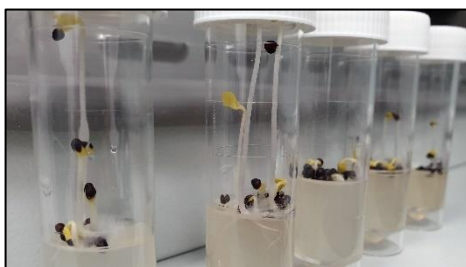
Obrázky 23 a 24: Regenerace *in vitro* odrůdy Ladoga. Obrázky jsou seřazeny chronologicky tak, jak za sebou postupovaly jednotlivé kroky regenerace (foto: Jan Harenčák).

Odrůda Cadelli byla částečně kontaminována na půdě M0, což je nejspíše následek výskytu endofytních mikroorganismů v semenech. Hypokotyly neochotně tvořily kalus a nezřídka na mediu vysychaly (Obrázek 27 a 28). Také velmi zřídka tvořily prýty (Obrázek 29). Regeneranti často postrádali zelené barvivo. Obecně se dá říct, že tato odrůda má velmi špatnou reakci na regeneraci *in vitro*.



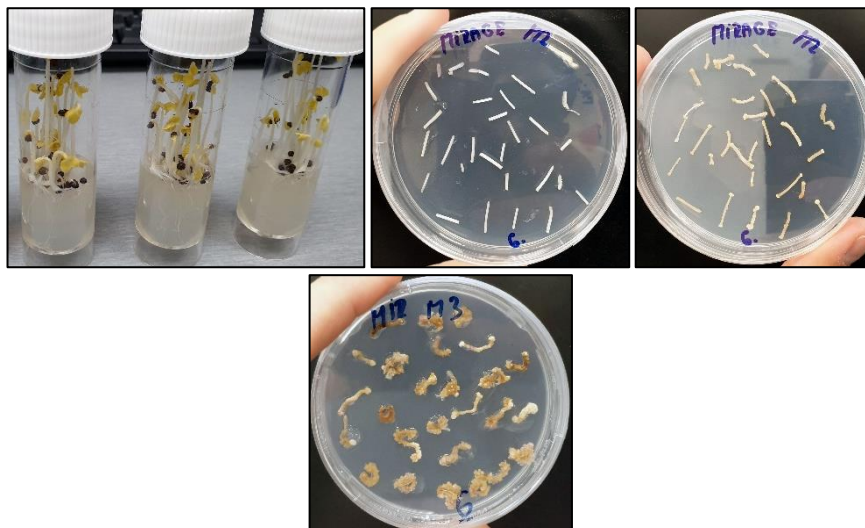
Obrázky 25 až 29: Regenerace *in vitro* odrůdy Cadeli. Obrázky jsou seřazeny chronologicky tak, jak za sebou postupovaly jednotlivé kroky regenerace (foto: Jan Harenčák).

Odrůdu Lohana se nepodařilo dopěstovat do fáze 7 cm hypokotylů, jelikož měla velmi silnou negativní reakci na metodu sterilizace. Klíčila velmi zpomaleně, až vůbec. Po 5 dnech kdy už docházelo k řezání hypokotylů ostatních odrůd, nezapočala u Lohany ani fáze líčení. Kontrola bez ošetření sterilizační chemií ukázala, že rostliny byly jinak schopné klíčit velmi dobře (klíčivost až 95 % po 5 dnech). Regenerace byla proto neúspěšná.



Obrázek 30: Regenerace *in vitro* odrůdy Lohana (foto: Jan Harenčák).

Odrůda Mirage byla sterilizací mírně ovlivněna – její hypokotyly byly slabší, rychlost růstu byla relativně nižší a klíčivost částečně snížena. Celkově neměla žádnou, až velmi nízkou reakci na regeneraci *in vitro*. V regeneračním mediu často tvořila kořínky přímo z kalusu a prýty postrádaly zelené barvivo, proto se z 250 hypokotylových řízků této odrůdy nepodařilo zregenerovat ani jednu rostlinu.



Obrázky 31 až 34: Regenerace *in vitro* odrůdy Mirage. Obrázky jsou seřazeny chronologicky tak, jak za sebou postupovaly jednotlivé kroky regenerace (foto: Jan Harenčák).

Odrůda Obelix byla regenerována úspěšně. Klíčivost nebyla sterilizací výrazně snížena, hypokotyly dosahovaly optimální délky a tloušťky. Po sterilizaci se na M0 neprojevovaly žádné endofytické mikroorganismy. Prýty tvořila zelené, bez častého výskytu růstu kořínků z kalusu. Z celkem 250 hypokotylových řízků této odrůdy bylo získáno 18 prýtů a z nich úspěšně regenerovány 3 rostliny.



Obrázky 35 až 42: Regenerace *in vitro* odrůdy Obelix. Obrázky jsou seřazeny chronologicky tak, jak za sebou postupovaly jednotlivé kroky regenerace (foto: Jan Harenčák).

5.1 Protokol pro regeneraci řepky olejky in vitro

1. Příprava semen

Semena máčet v ethanolu (75 %) 1 minutu, poté v roztoku NaClO (20 %) 20 minut. Nakonec máčet v čisté sterilní vodě 3x na 5 minut. Semena v (kterémkoliv) roztoku promíchávat každých 30 vteřin. Po sterilizaci vysít na M0 (½ MS; 8,5 g agar / 1 l). Kultivovat ve tmě při 24 °C 5–6 dní.

2. Infekce hypokotylů (možno přeskočit)

Etiolované hypokotyly nařezat kolmým řezem na segmenty (8–10 mm). Smíchat s 50 ml *A. tumefaciens* v tekutém DM mediu (MS; 30 g / 1 sacharóza; 100 µM acetosyringone; pH = 5,8; OD = ~ 2). Kultivovat 30 minut, míchat každých 5 minut.

3. Přenos hypokotylů

Lehce usušit hypokotyly na filtračním papíře. Usušené pasážovat na medium M1 (MS; 30 g / 1 sacharóza; 18 g / 1 manitol; 1 mg / 1 2,4-D; 0,3 mg / kinetin; 8,5 g / 1 agar; 100 µM acetosyringone; pH = 5,8). Acetosyringone přidat jen pokud byl proveden 2. krok. Kultivovat 2 dny t = 24 °C, ve tmě.

4. Přenos na selekční medium

Pasážovat hypokotyly z M1 na M2 MS; 30 g / 1 sacharóza; 18 g / 1 manitol; 1 mg / 2,4-D; 0,3 mg / kinetin; 20 mg / 1 AgNO₃; 8,5 g / 1 agar; 25 mg / 1 kanamycin, nebo hygromycin, nebo glyfosfát; 250 mg / 1 carbenicillin; pH = 5,8). Kultivovat 3 týdny, t = 24 °C ve tmě, dokud nebude na řezu dobře patrný kalus.

5. Přenos na regenerační medium

Hypokotyly, kde je dobře vidět kalus, pasážovat na medium M3 (MS; 10 g / 1 glukóza; 0,25 g / 1 xylóza; 0,6 g / 1 MES; 2 mg / 1 zeatin; 0,1 mg / 1 IAA; 8,5 g / 1 agar; 25 mg / 1 kanamycin, nebo hygromycin, nebo glyfosfát; pH = 5,8). Na čerstvé medium pasážovat každé 2 týdny, do zregenerování rostlinek. Kultivovat při 24 °C, 70 % vlhkosti, fotoperioda = 16 h světlo, 8 h tma.

6. Přenos na zakořeňovací medium

Odstranit z rostlinek zbytek kalusu a zapíchnout do media M4 (MS; 10 g / 1 sacharóza; 8,5 g / 1 agar; pH = 5,8). Kultivovat 3 týdny, t = 24 °C, vlhkost = 70 %, fotoperioda = 16 h světlo, 8 h tma. Po zakořeňování přenést do sadbovačů se substrátem. Zpočátku udržovat 100 % vlhkost, poté postupně snižovat, fotoperioda = 16 h světlo, 8 h tma.

6 Diskuse

Pokusem byla zjištěna poměrně vysoká závislost schopnosti regenerace rostlin z hypokotylů kultivovaných *in vitro* na použité odrůdě. Ze šesti vybraných odrůd se podařilo získat regeneranty a úspěšně je převést do půdy pouze u dvou odrůd: Arabella a Obelix. U ostatních odrůd se během kultivace vyskytly problémy, které se nepodařilo odstranit. Jako největší problém vnímám silnou kontaminaci semen a výskyt endofytních mikroorganismů (plísni) uvnitř semen odrůdy Ladoga, ale i u odrůdy Cadeli.

6.1 Sterilizace semen

Byly použity dvě techniky sterilizace semen – pomocí NaClO (Savo) a HgCl₂ (chlorid rtuťnatý). Savo dosahuje nízké sterilizační účinnosti u vysoce kontaminovaných semen pšenice a bavlny (Barampuram, 2014). Toto se projevilo i v případě experimentů prováděných v této diplomové práci, a proto byl použit chlorid rtuťnatý – se stejným výsledkem jako u Sava. Povrchová sterilizace nebyla dostatečná a semena byla i po provedené sterilizaci infikována řadou hub a bakterií. To se projevilo zvýšenou kontaminací klíčnicích rostlin pěstovaných *in vitro*. Možnost pro odstranění tohoto problému může být použití jiné sterilizační techniky, například pomocí miconazole (Tynan, 1993), PPM (Paul, 2001), nebo H₂O₂ (Opricá, 2011). Jedno z možných řešení pro získání neinfikovaného osiva je dopěstování rostlin v izolátorech, ve skleníku. Popřípadě použití osiva dihaploidních linií, opět z izolátoru, tak aby byl minimalizovaný výskyt hub a bakterií v osivu.

Účinnost sterilizačních činidel v použitých koncentracích je téměř shodná. Otázkou však zůstává, jak bezpečné jsou tyto chemikálie pro laboranta. Savo pro tyto účely hodnotím jako lepší možnost. Jedná se o běžně dostupnou chemikálii. Její výhodou oproti chloridu rtuťnatému je zejména velmi nízká nebezpečnost. Naopak, chlorid rtuťnatý dokáže způsobit vážné podráždění kůže a dýchacích cest (Perna, 2007). Navíc poškozují ledviny a centrální nervovou soustavu. Do organismu proniká inhalací par roztoku, požitím nebo absorpcí kůží (Perna, 2007). Jeho dalším mínusem je i negativní ovlivnění vývoje rostlin *in vitro* (Singh, 2018). Naproti tomu chlornan sodný (komerčně známý jako Savo), je celosvětově běžně používaná a také relativně bezpečná chemikálie (Bruch, 2006). Chlorid rtuťnatý jako sterilizační činidlo je podle

mého názoru až příliš nebezpečná látka, která neúměrně zvyšuje riziko práce. Avšak přináší srovnatelné výsledky jako Savo.

Další možností sterilizace semen je ošetření nízkoteplotním plazmatem, které bylo na semenech řepky olejky již použito. Další optimalizace této metody navíc slibuje eradikaci téměř všech mikroorganismů semene (Kolářová, 2020). Velkou výhodou této metody je zlepšení klíčivosti a často i vyšší výnos u rostlin, jejichž semena byla touto metodou ošetřena (Puligundla, 2017).

6.2 Koncentrace H^+ iontů

Hodnota pH media byla vždy upravena na 5,8 a to před sterilizací v autoklávu a po dokonalém rozpuštění veškerých pevných komponent. Nerozpuštěné látky mohou pH později výrazně ovlivnit (Msogoya, 2008). Sterilizace agarového média v autoklávu zpravidla pH výrazně snižuje. Při špatné úpravě této hodnoty se stává, že po sterilizaci agarové medium neztuhne (Msogoya, 2008). Pro úpravu pH byl použit roztok NaOH, respektive HCl (Murashige a Skoog, 1962).

6.3 Regenerace explantátů

U každé odrůdy byl v některé z fází regenerace *in vitro* zaznamenán výskyt prýtů úplně nebo částečně postrádajících chlorofyl (Příloha 1, b)Příloha 1: . Takové rostliny už dále nereagovaly na regeneraci. Chlorofyl deficientní prýty se často vyskytovaly na jednom mediu společně s normálně se vyvíjejícími prýty. Bylo zjištěno, že klíčící rostliny řepky olejky vystavené antibiotiku kanamycin nejsou schopny syntetizovat chlorofyl (Li, 2010) a u fazolí byl potvrzen zastavený vývoj chloroplastů (Wolf, 1977). Možné řešení by bylo použít pro selekci jiné antibiotikum, například hygromycin B, který nebrání syntéze chlorofylu (Harrison, 2006). Jedno z doporučených řešení je přidat do media dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) až do koncentrace 300 mg / l. Toto řešení je uváděno pouze v odborné diskusi na ResearchGate (Karpova, 2018). Dále může být tento jev například způsobován kolísáním teplot během růstu. To je však v tomto pokusu nepravděpodobné, jelikož explantáty byly kultivovány ve fytotronu, který zajišťuje konstantní teplotu, vlhkost a fotoperiodu.

Některé z dřívějších studií tvrdí, že je možné vytvořit protokol pro regeneraci řepky olejky tak, aby nebyl závislý na konkrétní odrůdě – aby fungoval na větší množství různých odrůd se stejnou účinností (De Block, 1989). Tohoto univerzálního protokolu

dosáhl De Block (1989) jenom díky přidavku AgNO_3 do media. Dusičnan stříbrný je podle něj základní prerekvizita pro tvorbu univerzálního protokolu. To je částečně v rozporu s tvrzením, že závislost regenerační schopnosti je silně ovlivněná genotypem (Burbulis, 2009; Attaya, 2017). Burbulis (2009) ve své práci také zmiňuje, že mimo jiné, je také potřeba tvořit hormonálně optimalizovaný protokol pro každou odrůdu zvlášť. Tedy, že každá odrůda řepky olejky reaguje na metodu *in vitro* nepřímé organogeneze jinak, navíc ještě v závislosti na druhu explantátu (hypokotyl, děložní lístky, stonek...). Knecht (2011) ve své práci použil thiosíran stříbrný (STS) a díky němu regenerovalo až 97 % explantátů (při $\text{C}_{2,4\text{-D}} = 1 \text{ mg} / \text{l}$ pak 57 %; bez STS 0 až pár desítek %). Tato látka se spolu s dusičnanem stříbrným používá v metodách tkáňových kultur jako inhibitor produkce ethylenu (Roh, 2012). V této diplomové práci byl jako inhibitor ethylenu použit dusičnan stříbrný. Nebylo sice dosaženo takto vysoké úspěšnosti, ovšem jeho přítomnost byla patrně velmi důležitá. Kalusy na Petriho miskách obsahující AgNO_3 tvořily znatelně zelenější kalusy (viz obrázky 15 a 16) a frekvence regenerace prýtlů u nich byla vyšší.

Byl také zaznamenán výskyt explantátů hnědé, až černé barvy. Nejčastěji se černání projevovalo na mediu M1 a M2. To je u tkáňových kultur poměrně častý jev. Je způsoben oxidací fenolických látek ve tkáni, které se uvolňují zejména z místa řezu (Singh, 2018). Výskyt zoxidovaných fenolických látek má za následek neschopnost explantátu přijímat živiny z media, což nakonec vede k zastavení metabolismu a jeho nekrotizaci (Ahmad, 2013). Přídavek antioxidantu (kyselina askorbová) do media sníží výskyt hnědých a černých explantátů.

6.4 Kontaminace

Několikrát bylo nutné řešit výskyt kontaminace u zakořeňujících rostlin (Příloha 2) na mediu M4. Jedná se o poslední krok, po kterém následuje přenos do substrátu. Navzdory obecnému dogmatu kontaminované rostliny nezachraňovat, jsem se rozhodl pro opak. Rostliny byly ze zakořeňovacího media odstraněny, důkladně omyty sterilní vodou a vloženy do substrátu. Jejich vývoj probíhal zcela normálně. Nebyl použit ethanol, jelikož hrozí usmrcení rostliny (Singh, 2018). Také jsem se rozhodl nevyužít metody s použitím antibiotik, ani metodu celkového odstranění kontaminovaného místa (Rayaprolu, 2015). Kontaminované byly i některé Petriho misky, v různých stádiích regeneračního procesu. Nejčastěji se jednalo o běžné kontaminanty

z prostředí. Na jednotlivých Petriho miskách bylo zhruba po 20 řízcích. Díky tomu bylo jednoduše možné kontaminací nezasažené hypokotyly pasážovat na čerstvé médium a pokračovat v regeneraci (Příloha 3). Ani zde nebylo zapotřebí využít metod které popisuje Rayaprolu (2015).

6.5 Transformace

Tato práce se primárně zabývá tvorbou protokolu, do kterého lze implementovat krok zajišťující genetickou transformaci rostliny pomocí *Agrobacterium tumefaciens* ve spojení se systémem CRISPR-Cas. Transformace je možné docílit aplikováním části protokolu s názvem „Transfekce hypokotylů“, který se nachází na straně 30 této práce. Vynecháním části „Transfekce hypokotylů“ lze získat regeneranty řepky olejky bez cílených změn v genetickém kódu.

7 Závěr

Protokol pro *in vitro* regeneraci řepky olejky byl úspěšně vytvořen, avšak reprodukovatelný pouze na odrůdách řepky olejky Arabella a Obelix. U zbylých čtyř odrůd nebylo z různých důvodů regeneraci provést nebo dokončit.

Je možné jej použít společně s metodou pro úpravy genetické informace CRISPR-Cas9, prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* jako přenašeče vektoru.

Dosažená účinnost regenerace byla u odrůdy Arabella 5 rostlin ze 49 prýtů které vyrašily z 250 hypokotylových řízků. U odrůdy Obelix pak 3 rostliny z celkových 18 prýtů, které vyrašily z 250 hypokotylových řízků.

Úspěšně se podařilo vytvořit protokol, pomocí kterého byly získány regenerované rostliny alespoň u jedné odrůdy řepky olejky.

8 Bibliografie

AHMAD, Ishtiaq, Tanveer HUSSAIN, Irgan ASHRAF, Muhammad NAFEES, Muhammad RAFAY a Muhammad IQBAL, 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. **13**(4), 539-547.

AKASAKA-KENNEDY, Yoko, Hidefumi YOSHIDA a Yoshihito TAKAHATA, 2005. Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO₃ and genotype. *Plant Cell Reports*. **24**(11), 649-654. DOI: 10.1007/s00299-005-0010-8. ISSN 0721-7714.

ALI, Hazrat, Zahir ALI, Haidar ALI, Sultan MEHMOOD a Wiquar ALI, 2007. In vitro regeneration of *Brassica napus* L., cultivars (STAR, CYCLONE and WESTAR) from hypocotyls and cotyledonary leaves. *Pakistan Journal of Botany*. **39**(4), 1251-1256.

ALLENDER, Charlotte a Graham KING, 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* [online]. **10**(1) [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1186/1471-2229-10-54. Dostupné z: <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-10-54>

ARDEBILI, S., M. SHARIATPANAH, R. AMIRI, M. EMAMIFAR, M. OROOJLOO, G. NEMATZADEH, S. NOORI a E. HEBERLE-BORS, 2011. Effect of 2,4-D as a novel inducer of embryogenesis in microspores of *Brassica napus* L. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. **47**(3), 114-122. DOI: 10.17221/4/2011-CJGPB. ISSN 12121975.

ATTAYA, Ahmed, Eman EL-SARAG, B. MEKKI a Aya IBRAHIM, 2017. In vitro regulation and enhancement of organogenesis in six canola (*Brassica napus*, L.) genotypes. *Zagazig Journal of Agricultural Research*. **44**(4), 1203-1215. DOI: 10.21608/zjar.2017.52912. ISSN 1110-0338.

BARAMPURAM, Shyam, George ALLEN a Sergei KRASNYANSKI, 2014. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. **118**(1), 179-185. DOI: 10.1007/s11240-014-0472-x. ISSN 0167-6857.

BARANYK, Petr, 2010. *Olejníny*. Praha: Profi Press. ISBN 978-80-8672-638-0.

BARRANGOU, Rodolphe a Philippe HORVATH, 2012. CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science and Technology*. **3**(1), 143-162. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101134. ISSN 1941-1413.

BATES, Ruth, Melanie CRAZE a Emma WALLINGTON, 2017. Agrobacterium -Mediated Transformation of Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Current Protocols in Plant Biology*. **2**(4), 287-298. DOI: 10.1002/cppb.20060.

BENINCASA, Paolo, Roberta PACE, Muriel QUINET a Stanley LUTTS, 2013. Effect of salinity and priming on seedling growth in rapeseed (*Brassica napus* var *oleifera* Del.). *Acta Scientiarum. Agronomy*. **35**(4), 479-486. DOI: 10.4025/actasciagron.v35i4.17655. ISSN 1807-8621.

BERGMAN, L., 1959. Symposia of the Society for Experimental Biology. *Nature*. **184**, 648-649.

BHALLA, Prem a Mohan SINGH, 2008. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature Protocols*. **3**(2), 181-189. DOI: 10.1038/nprot.2007.527. ISSN 1754-2189.

BHATIA, Saurabh a Tanmoy BERA, 2015. Somatic Embryogenesis and Organogenesis. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* [online]. Elsevier, s. 209-230 [cit. 2020-02-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802221-4.00006-6. ISBN 9780128022214.

BIKARD, David, Wenyan JIANG, Poulami SAMAI, Ann HOCHSCHILD, Feng ZHANG a Luciano MARRAFFINI, 2013. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*. **41**(15), 7429-7437. DOI: 10.1093/nar/gkt520. ISSN 1362-4962.

BRAATZ, Janina, Hans-Joachim HARLOFF, Martin MASCHER, Nils STEIN, Axel HIMMELBACH a Christian JUNG, 2017. CRISPR-Cas9 Targeted Mutagenesis Leads to Simultaneous Modification of Different Homoeologous Gene Copies in Polyploid Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Plant Physiology*. **174**(2), 935-942. DOI: 10.1104/pp.17.00426. ISSN 0032-0889.

BROEDERS, Mike, Pablo HERRERO-HERNANDEZ, Martijn ERNST, Ans VAN DER PLOEG a W.W.M. PIJNAPPEL, 2020. Sharpening the Molecular Scissors: Advances in Gene-Editing Technology. *IScience*. **23**(1). DOI: 10.1016/j.isci.2019.100789. ISSN 25890042.

BROLL, Hermann, Albert BRAEUNING a Alfonso LAMPEN, 2019. European Court of Justice decision for genome editing: Consequences on food/feed risk assessment and detection. *Food Control*. **104**, 288-291. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.05.002. ISSN 09567135.

BRUCH, Mary, 2006. Toxicity and Safety of Topical Sodium Hypochlorite. RONCO, C. a G.J. MISHKIN, ed., C. RONCO, G.J. MISHKIN. *Disinfection by Sodium Hypochlorite: Dialysis Applications*. Basel: KARGER, s. 24-38. Contributions to Nephrology. DOI: 10.1159/000096812. ISBN 3-8055-8193-9.

BURBULIS, Natalija, Aušra BLINSTREUBIENĖ, Ramunė KUPRIENĖ, Vaida JONYTIEN, Rytis RUGIENIUS a Gražina STANIENĖ, 2009. In vitro regeneration of *Brassica napus* L. shoots from hypocotyls and stem segments. *Zemdirbyste-Agriculture*. **96**(3), 176-185. ISSN 1392-3196.

BURBULIS, Natalija, Ramunė KUPRIENĖ a Aušra BLINSTRUBIENĖ, 2008. Callus induction and plant regeneration from somatic tissue in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biologija*. **54**(4), 258-263. ISSN 1392-0146.

CALLAWAY, Ewen, 2018. CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. *Nature*. **560**(7716), 16-16. DOI: 10.1038/d41586-018-05814-6. ISSN 0028-0836.

CBD, , 2020. Convention on Biological Diversity: List of Parties. *Convention on Biological diversity* [online]. Canada [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://www.cbd.int/information/parties.shtml#tab=1>

CORRAL-MARTÍNEZ, Patricia, Carolina CAMACHO-FERNÁNDEZ a Jose SEGUÍ-SIMARRO, 2020. Isolated Microspore Culture in *Brassica napus*. BAYER, Martin. *Plant Embryogenesis* [online]. New York, NY: Springer US, s. 269-282 [cit. 2020-03-05]. ISBN 978-1-0716-0341-3.

DE BLOCK, Marc, Dirk DE BROUWER a Paul TENNING, 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* Using *Agrobacterium tumefaciens* and the Expression of the bar and neo Genes in the Transgenic Plants. *Plant Physiology*. **91**(2), 694-701. DOI: 10.1104/pp.91.2.694. ISSN 0032-0889.

DOMINGUEZ, Antonia, Wendell LIM a Lei QI, 2016. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **17**(1), 5-15. DOI: 10.1038/nrm.2015.2. ISSN 1471-0072.

DONG, Chunsheng, Liang QU, Haoyi WANG, Lin WEI, Yuansu DONG a Sidong XIONG, 2015. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Research*. **118**, 110-117. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015. ISSN 01663542.

DOUDNA, Jennifer a Emmanuelle CHARPENTIER, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* [online]. **346**(6213). DOI: 10.1126/science.1258096. ISSN 0036-8075.

ECKERSTORFER, Michael, Margret ENGELHARD, Andreas HEISSENBERGER, Samson SIMON a Hanka TEICHMANN, 2019. Plants Developed by New Genetic Modification Techniques—Comparison of Existing Regulatory Frameworks in the EU and Non-EU Countries. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **7**. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00026. ISSN 2296-4185.

EL-ESAWI, Mohamed, 2016. Somatic Hybridization and Microspore Culture in Brassica Improvement. ANIS, Mohammad a Naseem AHMAD, ed., Mohammad ANIS, Naseem AHMAD. *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Singapore: Springer Singapore, s. 599-609. DOI: 10.1007/978-981-10-1917-3_26. ISBN 978-981-10-1916-6.

EL-HENNAWY, M., E. ZAAZAA, M. AL-ASHKAR a A. HAWASH, 2016. Combining Ability of Callus Induction and Plant Regeneration in Canola (*Brassica napus* L.) Anther Culture. *Middle East Journal of Agriculture*. **5**(4), 422-429.

ELORRIAGA, Estefania, Amy KLOCKO, Cathleen MA a Steven STRAUSS, 2018. Variation in Mutation Spectra Among CRISPR/Cas9 Mutagenized Poplars. *Frontiers in Plant Science*. **9**. DOI: 10.3389/fpls.2018.00594. ISSN 1664-462X.

European Commission [online], 2020. Evropská unie [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/>

FERNÁNDEZ, Almudena, Santiago JOSA a Lluís MONTOLIU, 2017. A history of genome editing in mammals. *Mammalian Genome*. **28**(7-8), 237-246. DOI: 10.1007/s00335-017-9699-2. ISSN 0938-8990.

GAIKWAD, A., S. SINGH a R. GILHOTRA, 2017. Plant tissue culture - a review. *SGVU Journal of Pharmaceutical Research & Education*. **2**(1), 217-220.

GAMBORG, Oluf a Gregory PHILLIPS, ed., 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1007/978-3-642-79048-5. ISBN 978-3-642-48974-7.

GAUTHERET, R., 1939. Ur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie*. **208**, 118-120.

GRAMAN, J. a V. ČURN, 1998. *Šlechtění rostlin: obecná část*. České Budějovice.. Skripta. ZF, JU.

GREELY, Henry, 2019. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'*. *Journal of Law and the Biosciences*. **6**(1), 111-183. DOI: 10.1093/jlb/lz010. ISSN 2053-9711.

GRISSA, Ibtissem, Gilles VERGNAUD a Christine POURCEL, 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. **8**(172). DOI: 10.1186/1471-2105-8-172. ISSN 14712105.

GUHA, T. a D. EDGELL, 2017. Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. *International Journal of Molecular Sciences*. **18**(12). DOI: 10.3390/ijms18122565. ISSN 1422-0067.

HABERLANDT, G., 2003. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. LAIMER, Margit a Waltraud RÜCKER, ed., Margit LAIMER, Waltraud RÜCKER. *Plant Tissue Culture* [online]. Vienna: Springer Vienna, s. 1-24 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1007/978-3-7091-6040-4_1. ISBN 978-3-211-83839-6.

HANNING, E., 1904. Über die kultur von Cruciferen, Embryonen auserhalb des Embryosachs. *Botanische Zeitung*. **62**, 45-80.

HARRISON, Samuel, Ellie MOTT, Kate PARSLEY, Sue ASPINALL, John GRAY a Amanda COTTAGE, 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*. **2**(19). DOI: 10.1186/1746-4811-2-19.

HERMAN, Edwin, 2015. *Recent advances in plant tissue culture: Mediaand techniques for growth, regeneration and storage: 2011 - 2015*. 22. Shrub Oak, NY: Agritech Consultants Inc.

HU, Die, Andrew BENT, Xilin HOU a Ying LI, 2019. Agrobacterium-mediated vacuum infiltration and floral dip transformation of rapid-cycling *Brassica rapa*. *BMC Plant Biology*. **19**(1). DOI: 10.1186/s12870-019-1843-6. ISSN 1471-2229.

HU, Qiong, Wei HUA, Yan YIN et al., 2017. Rapeseed research and production in China. *The Crop Journal*. **5**(2), 127-135. DOI: 10.1016/j.cj.2016.06.005. ISSN 22145141.

HUSSEIN, Sobri, Rusli IBRAHIM a Anna KIONG, 2006. Somatic Embryogenesis: An Alternative Method for in vitro Micropropagation. *Iranian Journal of Biotechnology*. **4**(3), 156-161.

CHALHOUB, B., F. DENOEUDE, S. LIU et al., 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*. **345**(6199), 950-953. DOI: 10.1126/science.1253435. ISSN 0036-8075.

CHANDLER, Stephen a Trevor THORPE, 1987. Characterization of Growth, Water Relations, and Proline Accumulation in Sodium Sulfate Tolerant Callus of *Brassica napus* L. cv Westar (Canola). *Plant Physiology*. **84**(1), 106-111. DOI: 10.1104/pp.84.1.106. ISSN 0032-0889.

CHEN, Y., Y. NIU a W. JI, 2016. Genome editing in nonhuman primates: approach to generating human disease models. *Journal of Internal Medicine*. **280**(3), 246-251. DOI: 10.1111/joim.12469. ISSN 09546820.

IWASE, Akira, Kento MITA, David FAVERO et al., 2018. WIND1 induces dynamic metabolomic reprogramming during regeneration in *Brassica napus*. *Developmental Biology* [online]. **442**(1), 40-52 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.07.006. ISSN 00121606.

IWASE, Akira, Nobutaka MITSUDA, Tomotsugu KOYAMA et al., 2011. The AP2/ERF Transcription Factor WIND1 Controls Cell Dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*. **21**(6), 508-514. DOI: 10.1016/j.cub.2011.02.020. ISSN 09609822.

JONOUBI, P., A. MOUSAVI, A. MAJD, A.H. SALMANIAN, M. JALALI JAVARAN a J. DANESHIAN, 2005. Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biologia Plantarum*. **49**(2), 175-180. DOI: 10.1007/s10535-005-5180-2. ISSN 0006-3134.

JORASCH, Petra, 2020. Will the EU stay out of step with science and the rest of the world on plant breeding innovation?. *Plant Cell Reports*. **39**(1), 163-167. DOI: 10.1007/s00299-019-02482-2. ISSN 0721-7714.

KAMINSKI, R, R BELLA, C YIN et al., 2016. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Therapy*. **23**(8-9), 690-695. DOI: 10.1038/gt.2016.41. ISSN 0969-7128.

KANG, Lei, Pengfei LI, Aifan WANG, Xianhong GE a Zaiyun LI, 2017. A Novel Cytoplasmic Male Sterility in *Brassica napus* (inap CMS) with Carpelloid Stamens via Protoplast Fusion with Chinese Woad. *Frontiers in Plant Science*. **8**. DOI: 10.3389/fpls.2017.00529. ISSN 1664-462X.

KAO, H.M., G.G. BROWN, G. SCOLES a G. SÉGUIN-SWARTZ, 1991. Ogura cytoplasmic male sterility and triazine tolerant *Brassica napus* cv. Westar produced by protoplast fusion. *Plant Science*. **75**(1), 63-72. DOI: 10.1016/0168-9452(91)90010-6. ISSN 01689452.

KARIM ZARHLOUL, M., Christof STOLL, Wilfried LÜHS, Alexandra SYRING-EHEMANN, Ludger HAUSMANN, Reinhard TÖPFER a Wolfgang FRIEDT, 2006. Breeding high-stearic oilseed rape (*Brassica napus*) with high- and low-erucic background using optimised promoter-gene constructs. *Molecular Breeding*. **18**(3), 241-251. DOI: 10.1007/s11032-006-9032-3. ISSN 1380-3743.

KARPOVA, Oxana, 2018. Odborná diskuze na platformě Research Gate: Agrobacterium mediated transformation in *Brassica napus*. Pink color shoots with/without agrobacterium infection. Possible reason? *ResearchGate* [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/post/Agrobacterium_mediated_transformation_in_Brassica_napus_Pink_color_shoots_with_without_agrobacterium_infection_Possible_reason

KLÍMA, Miroslav, Alois HILGERT-DELGADO, Tereza ULVROVÁ, Pavla BRYXOVÁ, Pavel VÍTÁMVÁS, Ilja PRÁŠIL a Klára KOSOVÁ, 2018. *Resyntéza řepky olejky z brukve řepáku a brukve zelné*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ISBN 978-80-7427-283-7.

KNECHT, K., G. YANG, Y.B. QIN, W. ZHOU a D. CAI, 2011. A two-step protocol for shoot regeneration from hypocotyl explants of oilseed rape and its application for Agrobacterium-mediated transformation. *Biologia Plantarum* [online]. **55**(1), 21-26.

KOHNO-MURASE, Junko, Makoto MURASE, Hiroaki ICHIKAWA a Jun IMAMURA, 1994. Effects of an antisense napin gene on seed storage compounds in transgenic *Brassica napus* seeds. *Plant Molecular Biology*. **26**(4), 1115-1124. DOI: 10.1007/BF00040693. ISSN 0167-4412.

KOLÁŘOVÁ, Johana, 2020. *Detekce patogenů zemědělských plodin pomocí metagenomické analýzy* [online]. České Budějovice [cit. 2020-06-16]. Diplomová práce. ZF, JU. Vedoucí práce Jozová Eva, Ing. Ph.D.

LARSON, Matthew, Luke GILBERT, Xiaowo WANG, Wendell LIM, Jonathan WEISSMAN a Lei QI, 2013. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*. **8**(11), 2180-2196. DOI: 10.1038/nprot.2013.132. ISSN 1754-2189.

LICHTER, Robert, 1981. Anther Culture of *Brassica napus* in a Liquid Culture Medium. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. **103**(3), 229-237. DOI: 10.1016/S0044-328X(81)80155-9. ISSN 0044328X.

LICHTER, Robert, 1982. Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. **105**(5), 427-434. DOI: 10.1016/S0044-328X(82)80040-8. ISSN 0044328X.

LI, Juan, Xiaoli TAN, Fuge ZHU a Jingjing GUO, 2010. A Rapid and Simple Method for *Brassica Napus* Floral-Dip Transformation and Selection of Transgenic Plantlets. *International Journal of Biology*. **2**(1). DOI: 10.5539/ijb.v2n1p127. ISSN 1916-968X.

LINO, Christopher A., Jason C. HARPER, James P. CARNEY a Jerilyn A. TIMLIN, 2018. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery* [online]. **25**(1), 1234-1257. DOI: 10.1080/10717544.2018.1474964. ISSN 1071-7544.

LIMASSET, P. a P. CORNUET, 1952. Recherche du virus de la masoïque du tabac (Marmor tabaciHolmes) dans les méristèmes des plantes infectées. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. **228**, 1971–1972.

LIU, Bin, Huifen XU, Jiangfang MIAO et al., 2015. CRISPR/Cas: A Faster and More Efficient Gene Editing System. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **15**(3), 1946-1959. DOI: 10.1166/jnn.2015.9832. ISSN 15334880.

LOHRASBI, Vahid, Neda SHIRMOHAMMADLOU, Aidin JAHANSHAHI a Shabnam RAZAVI, 2019. Overview development and applications of CRISPR–Cas systems after a decade of research with a glance at anti-CRISPR proteins. *Reviews in Medical Microbiology*. **30**(1), 47-55. DOI: 10.1097/MRM.000000000000153. ISSN 0954-139X.

LU, Kun, Lijuan WEI, Xiaolong LI et al., 2019. Whole-genome resequencing reveals Brassica napus origin and genetic loci involved in its improvement. *Nature Communications* [online]. **10**(1) [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1038/s41467-019-09134-9. ISSN 2041-1723.

MAJD, A., F. CHAMANDOOSTI, S. MEHRABIA a M. SHEIDAI, 2006. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Brassica napus L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **9**(4), 729-734. DOI: 10.3923/pjbs.2006.729.734. ISSN 10288880.

MAKAROVA, Kira, Yuri WOLF, Jaime IRANZO et al., 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. **18**(2), 67-83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x. ISSN 1740-1526.

MALI, Prashant, Kevin ESVELT a George CHURCH, 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods* [online]. **10**(10), 957-963. DOI: 10.1038/nmeth.2649. ISSN 1548-7091.

MILLER, Carlos, Folke SKOOG, Francis OKUMURA, Malcolm VON SALTZA a F. STRONG, 1955. Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **77**(9), 2662-2663 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1021/ja01614a108. ISSN 0002-7863.

MOGHAIEB, Reda, Mohamed EL-AWADY, Rabab EL MERGAWY, Sawsan YOUSSEF a Ahmed EL-SHARKAWY, 2006. A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (Brassica napus L.). *African Journal of Biotechnology*. **5**(2), 143-148.

MOREL, G. a C. MARTIN, 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. **235**, 1324–1313.

MSOGOYA, T., A. MAERERE, Y. NZOGELA a P. KUSLOWA, 2008. Changes in acidity of plant growth media during heat sterilisation. *Journal of Applied Biosciences*. **10**, 488-490.

MUNIR, Muhammad, Hamid RASHID, Muhammad RAUF, Zubeda CHAUDHRY a M. BUKHARI, 2008. Callus formation and plantlets regeneration from hypocotyl of Brassica napus by using different media combinations. *Pakistan Journal of Botany* [online]. **40**(1), 309-315.

MURASHIGE, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol*. **25**, 135–166.

MURASHIGE, Toshio a Folke SKOOG, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**(3), 473-497.

MUROVEC, Jana, Katja GUČEK, Borut BOHANEK, Monika AVBELJ a Roman JERALA, 2018. DNA-Free Genome Editing of Brassica oleracea and B. rapa Protoplasts Using CRISPR–Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Frontiers in Plant Science*. **9**. DOI: 10.3389/fpls.2018.01594. ISSN 1664-462X.

MZP, , 2020. Plochy kukuřice MON 810 v ČR v letech 2005 - 2019. In: *Geneticky modifikované organismy (GMO): Aktuální informace a publikace* [online]. Praha: Ministerstvo životního prostředí [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/\\$FILE/OERES-Plochy_MON810-20190711.pdf.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/$FILE/OERES-Plochy_MON810-20190711.pdf.pdf)

NAGAHARU, U. a N. NAGAHARU, 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*. **7**, 389-452.

NAKANO, Yoshihiro, 2017. Effect of Acetosyringone on *iAgrobacterium/i*-mediated Transformation of *iEustoma grandiflorum/i* Leaf Disks. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*. **51**(4), 351-355. DOI: 10.6090/jarq.51.351. ISSN 0021-3551.

NASIR, Bareera, Humera RAZZAQ a M. TAHIR, 2019. Development of best screening method at seedling stage under drought stress for Brassica napus L. *Big Data In Agriculture* [online]. **1**(1), 11-14. DOI: 10.26480/bda.01.2019.11.14. ISSN 26827786.

NELSON, C., C. HAKIM, D. OUSTEROUT et al., 2016. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. **351**(6271), 403-407. DOI: 10.1126/science.aad5143. ISSN 0036-8075.

NELSON, Christopher, Yaoying WU, Matthew GEMBERLING et al., 2019. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nature Medicine*. **25**(3), 427-432. DOI: 10.1038/s41591-019-0344-3. ISSN 1078-8956.

OPRICĂ, L., Z. OLTEANU, E. TRUȚĂ a G. VOICHIȚA, 2011. Early biochemical responses of Brassica napus var Exagone seed germination at salt treatment. *Genetică și Biologie Moleculară*. **12**(4), 95-102.

PAUL, Anna-Lisa, Charles SEMER, Thomas KUCHARÉK a Robert FERL, 2001. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic arabisopsis plants for a Space Shuttle flight experiment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **55**(4), 480-485. DOI: 10.1007/s002530000521. ISSN 0175-7598.

PERNA, G., M. LASTELLA, M. LASALVIA, E. MEZZENGA a V. CAPOZZI, 2007. Raman spectroscopy and atomic force microscopy study of cellular damage in human keratinocytes treated with HgCl₂. *Journal of Molecular Structure*. **834-836**, 182-187. DOI: 10.1016/j.molstruc.2006.12.014. ISSN 00222860.

PHILLIPS, Gregory a Martina GARDA, 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. **55**(3), 242-257. DOI: 10.1007/s11627-019-09983-5. ISSN 1054-5476.

PHILLIPS, Gregory, John HUBSTENBERGER a Elizabeth HANSEN, 1995. Plant Regeneration from Callus and Cell Suspension Cultures by Somatic Embryogenesis. GAMBORG, Oluf a Gregory PHILLIPS. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 81-90. ISBN 978-3-642-48974-7.

PHIMISTER, Elizabeth a Michele CALOS, 2016. The CRISPR Way to Think about Duchenne's. *New England Journal of Medicine*. **374**(17), 1684-1686. DOI: 10.1056/NEJMcibr1601383. ISSN 0028-4793.

POULSEN, G., 1996. Genetic transformation of Brassica. *Plant Breeding*. **115**(4), 209-225. ISSN 0179-9541.

PRICE, Aryn, Timothy SAMPSON, Hannah RATNER, Arash GRAKOUÏ a David WEISS, 2015. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **112**(19), 6164-6169. DOI: 10.1073/pnas.1422340112. ISSN 0027-8424.

- PULIGUNDLA, Pradeep, Je-Wook KIM a Chulkyoon MOK, 2017. Effect of corona discharge plasma jet treatment on decontamination and sprouting of rapeseed (*Brassica napus* L.) seeds. *Food Control* [online]. **71**, 376-382. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.07.021.
- QUAK, F., 1961. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plant. *Advances in Horticultural Science*. **1**, 144-148.
- RAEMAKERS, C., E. JACOBSEN a R. VISSER, 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*. **81**(1), 93-107. DOI: 10.1007/BF00022463. ISSN 0014-2336.
- RAN, F. Ann, Patrick D. HSU, Chie-Yu LIN et al., 2013a. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*. **154**(6), 1380-1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021. ISSN 00928674.
- RAN, F, Patrick HSU, Jason WRIGHT, Vineeta AGARWALA, David SCOTT a Feng ZHANG, 2013b. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. **8**(11), 2281-2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143. ISSN 1754-2189.
- RAYAPROLU, S., G. MATHIAN a G. RANJITHA, 2015. Can in vitro contaminated culture be revived: A case study with contaminated cultures of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Current Biotica*. **9**, 285-288.
- REINERT, J., 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaft*. **45**, 344-345.
- RICROCH, Agnès a Marie-Cécile HÉNARD-DAMAVE, 2016. Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*. **36**(4), 1-16. DOI: 10.3109/07388551.2015.1004521. ISSN 0738-8551.
- ROBB, G., 2019. Genome Editing with CRISPR-Cas: An Overview. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. **19**(1). DOI: 10.1002/cpet.36. ISSN 1948-3430.
- ROH, Kyung-Hee, Bo-Kyung KWAK, Jong-Bum KIM, Kyeong-Ryeol LEE, Hyun-Uk KIM a Sun-Hee KIM, 2012. The influence of silver thiosulfate and thidiazuron on shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica napus*. *Journal of Plant Biotechnology*. **39**(3), 133-139. DOI: 10.5010/JPB.2012.39.3.133. ISSN 1229-2818.
- RYAN, Owen, Jeffrey SKERKER, Matthew MAURER et al., 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *ELife*. **3**. DOI: 10.7554/eLife.03703. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://elifesciences.org/articles/03703>
- SAHAB, Sareena, Matthew HAYDEN, John MASON a German SPANGENBERG, 2019. Mesophyll Protoplasts and PEG-Mediated Transfections: Transient Assays and Generation of Stable Transgenic Canola Plants. KUMAR, Sandeep, Pierluigi BARONE a Michelle SMITH, ed., Sandeep KUMAR, Pierluigi BARONE, Michelle SMITH. *Transgenic Plants*. New York, NY: Springer New York, s. 131-152. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-4939-8778-8_10. ISBN 978-1-4939-8777-1.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. a F. NUEZ, 2008b. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenetic and Genome Research*. **120**(3-4), 358-369. DOI: 10.1159/000121085. ISSN 1424-859X.
- SEGUÍ-SIMARRO, José, 2010. Androgenesis Revisited. *The Botanical Review*. **76**(3), 377-404. DOI: 10.1007/s12229-010-9056-6. ISSN 0006-8101.
- SEGUÍ-SIMARRO, José a Fernando NUEZ, 2008a. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. **134**(1), 1-12. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01113.x. ISSN 00319317.

SHAH, Shiraz, Susanne ERDMANN, Francisco MOJICA a Roger GARRETT, 2013. Protospacer recognition motifs. *RNA Biology*. **10**(5), 891-899. DOI: 10.4161/rna.23764. ISSN 1547-6286.

SHARIATPANAHI, Mehran, Ugur BAL, Erwin HEBERLE-BORS a Alisher TOURAEV, 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. **127**(4), 519-534. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00675.x. ISSN 0031-9317.

SHU, W. a C. LOH, 1991. Secondary embryogenesis from thin cell layers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *New Phytologist*. **119**(3), 427-432. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00043.x. ISSN 0028-646X.

SCHLEIDEN, Matthias, 1838. Beiträge zur Phytogenesis. MÜLLER, Johannes. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*. Berlin: Verlag von Veit & Comp, s. 137-176.

SCHWANN, Théodore, 1839. *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen*. Berlin: Sander.

SIGMA ALDRICH, , 2020. *Growth Regulators – Plant Tissue Culture: Protocol* [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html>

SINGH, Chinnappan, 2018. Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*. **11**(4), 165-172. DOI: 10.3923/ajbs.2018.165.172. ISSN 19963351.

SKOOG, F. a C. MILLER, 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured in Vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. **11**, 118-130.

SNOWDON, R., W. LÜHS a W. FRIEDT, 2007. *Oilseeds*. Berlin, Heidelberg: Springer, s. 55-103. ISBN 13 978-3-540-34387-5.

SOOD, Sheetal a Vedna KUMARI, 2019. Efficient Callus Induction through Anther Culture in Cultivars of *Brassica campestris* var. Brown Sarson. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **8**(5), 1003-1012. DOI: 10.20546/ijcmas.2019.805.118. ISSN 23197692.

STERNBERG, Samuel H., Hagen RICHTER, Emmanuelle CHARPENTIER a Udi QIMRON, 2016. Adaptation in CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*. **61**(6), 797-808. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.01.030. ISSN 10972765.

STERNBERG, Samuel, Sy REDDING, Martin JINEK, Eric GREENE a Jennifer DOUDNA, 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* [online]. **507**(7490), 62-67. DOI: 10.1038/nature13011. ISSN 0028-0836.

STURINO, Joseph a Todd KLAENHAMMER, 2006. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nature Reviews Microbiology*. **4**(5), 395-404. DOI: 10.1038/nrmicro1393. ISSN 1740-1526.

TABEBORDBAR, M., K. ZHU, J. CHENG et al., 2016. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. **351**(6271), 407-411. DOI: 10.1126/science.aad5177. ISSN 0036-8075.

TAVASSOLI, Mosa, 1980. The cell theory: a foundation to the edifice of biology. *The American Journal of Pathology*. **98**(1), 44.

TURGUT, K., M. BARGHCHI a R. SCOTT, 1998. Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding*. **117**(5), 503-504. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1998.tb01984.x. ISSN 0179-9541.

TYNAN, J., A. CONNER, R. MACKNIGHT a R. POULTER, 1993. Miconazole: An effective antifungal agent for plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **32**(3), 293-301. DOI: 10.1007/BF00042292. ISSN 0167-6857.

ULIAIE, E., M. FARSI, B. GHREYAZIE a J. IMANI, 2008. Effects of Genotype and AgNO₃ on Shoot Regeneration in Winter Cultivars of Rapeseed (*Brassica napus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **11**(16), 2040-2043. ISSN 1028-8880.

VAN DER OOST, John, Edze WESTRA, Ryan JACKSON a Blake WIEDENHEFT, 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. **12**(7), 479-492. DOI: 10.1038/nrmicro3279. ISSN 1740-1526.

VAN DIEMEN, Ferdy, Elisabeth KRUSE, Marjolein HOOYKAAS et al., 2016. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections. *PLOS Pathogens*. **12**(6). DOI: 10.1371/journal.ppat.1005701. ISSN 1553-7374.

VYVADILOVÁ, Miroslava, Miroslav KLÍMA a Vratislav KUČERA, 2008. *Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-87011-80-5.

WESSELER, Justus a Nicholas KALAITZANDONAKES, 2019. Present and Future EU GMO Policy. DRIES, Liesbeth, Wim HEIJMAN, Roel JONGENEEL, Kai PURNHAGEN a Justus WESSELER, ed., Liesbeth DRIES, Wim HEIJMAN, Roel JONGENEEL, Kai PURNHAGEN, Justus WESSELER. *EU Bioeconomy Economics and Policies: Volume II*. Cham: Springer International Publishing, s. 245-256. Palgrave Advances in Bioeconomy: Economics and Policies. DOI: 10.1007/978-3-030-28642-2_13. ISBN 978-3-030-28641-5.

WHITE, Philip, 1934. Potentially Unlimited Growth of Excised Tomato Root Tips in a Liquid Medium. *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, **9**(3), 585-600.

WOLF, Frederick, 1977. Effects of chemical agents in inhibition of chlorophyll synthesis and chloroplast development in higher plants. *The Botanical Review*. **43**(4), 395-424. DOI: 10.1007/BF02860841. ISSN 0006-8101.

WU, Yuxuan, Hai ZHOU, Xiaoying FAN et al., 2015. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Research*. **25**(1), 67-79. DOI: 10.1038/cr.2014.160. ISSN 1001-0602.

YANG, Weili, Zhuchi TU, Qiang SUN a Xiao-Jiang LI, 2016. CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. **9**. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00030. ISSN 1662-5099.

YANCHEVA, Svetla a Violeta KONDAKOVA, 2017. Plant Tissue Culture Technology: Present and Future Development. MERILLON, Jean-Michel a Kishan Gopal RAMAWAT, ed., Jean-Michel MERILLON, Kishan RAMAWAT. *Sweeteners* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 1-26. Reference Series in Phytochemistry. ISBN 978-3-319-26478-3.

ZEYNALI, Mohammad, Bahram ZANJANI, Mohammad AMIRI a Shahla AGHAJARI, 2010. Influence of genotype and plant growth regulator on somatic embryogenesis in rapeseed (*Brassica napus* L.). *African journal of biotechnology*. **9**(26), 4050-4055.

ZHANG, Jian-Hua, Poorni ADIKARAM, Mritunjay PANDEY, Allison GENIS a William SIMONDS, 2016. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered*. **7**(3), 166-174. DOI: 10.1080/21655979.2016.1189039. ISSN 2165-5979.

ZHANG, Kai, Liluo NIE, Qiqi CHENG et al., 2019. Effective editing for lysophosphatidic acid acyltransferase 2/5 in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) using CRISPR-Cas9 system. *Biotechnology for Biofuels*. **12**(1). DOI: 10.1186/s13068-019-1567-8. ISSN 1754-6834.

ZHENG, Ming, Liang ZHANG, Min TANG et al., 2019. Knockout of two Bna MAX 1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Biotechnology Journal*. **18**(3), 644-654. DOI: 10.1111/pbi.13228. ISSN 1467-7644.

9 Přílohy

Příloha 1: Výskyt prýtů bez chlorofylu

A – Správně se vyvíjející prýt

B – Prýt, s porušenou syntézou chlorofylu, pravděpodobně způsobeno antibiotikem kanamycin



Příloha 1: Prýty bez chlorofylu (foto: Jan Harenčák).

Příloha 2: Kontaminovaná a následně zachráněná rostlina



Příloha 2: Kontaminovaná rostlina (foto: Jan Harenčák).

Příloha 3: Kontaminované medium

Výběr A nebyl pasážován

Výběr B pasážován byl



Příloha 3: Kontaminované medium (foto: Jan Harenčák).