

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Hana Synková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



# **Faktory ovlivňující transformaci ječmene**

**Bakalářská práce**

**Hana Synková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

**Vedoucí práce: Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama a že uvádím veškerou použitou literaturu.

Dne

Podpis.....

Ráda bych poděkovala své školitelce a vedoucí bakalářské práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi při vypracování této práce poskytla.

Rovněž bych chtěla poděkovat laborantce Janě Vaškové, Bc. za všestrannou pomoc a notnou dávku trpělivosti.

## Souhrn

Ječmen je hospodářsky významná obilnina rozšířená prakticky po celém světě. Spolu s dalšími plodinami podílejícími se na výživě lidstva je častým cílem genetických modifikací. Mezi obvyklé cíle transgenoze zemědělsky důležitých plodin patří vedle zvýšení nutriční hodnoty také snížení nákladů na jejich pěstování či posílení odolnosti vůči chorobám. Tato bakalářská práce se zabývá transformací ječmene a optimalizací *in vitro* podmínek.

V literární rešerši byly srovnány dvě základní metody transformace ječmene - transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* a transformace pomocí mikroprojektilového přenosu DNA. Na základě dostupné literatury byl vyhodnocen nejlepší typ explantátu užívaný pro transformaci a optimální složení kultivačních médií pro následnou regeneraci rostlin v *in vitro* podmínkách. Pozornost byla věnována zejména obsaženým rostlinným hormonům.

V experimentální části bakalářské práce byla prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* transformována nezralá zygotická embrya jarních odrůd ječmene Golden Promise a Atribut genem *dapA*, jehož exprese vede ke zvýšení obsahu lyzinu v zrně. Byla ověřena úspěšnost transformace odrůdy Golden Promise a vyloučena možnost transformace předvybrané české odrůdy Atribut dle stejného postupu. Na základě získaných výsledků byly navrženy změny, které mohou vést k úspěšné transformaci hospodářsky významných odrůd ječmene včetně odrůdy Atribut.

## Summary

Barley is an agriculture important cereal crop spread all over the world. Along with other crops involved in human nutrition, barley is a frequent target of genetic modification. Beside increasing the nutritional value, there are another goals of genetic modified crops. Transformation of cereal crops can be used for decreasing expenses on growing or evoking resistance to pathogens. The aim of my bachelor thesis was to become familiar with the issue of transformation of barley and optimizing *in vitro* conditions.

Two barley transformation systems, *Agrobacterium*-mediated and particle bombardment, were compared in a literary search. Based on the available literature, best type of explant and optimal composition of culture media for subsequent plant regeneration was found out. The attention was paid to plant hormones in the first place.

In an experimental part of this work, immature zygotic embryos of two spring genotypes Golden Promise and Atribut were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Gene *dapA* for increasing lysine in a grain was used. Successful transformation of the variety Golden Promise was confirmed meanwhile the possibility of transformation another variety Atribut was refused. Based on obtained results, changes that may lead to successful transformation of agriculture important barley varieties including Atribut were suggested.

# Obsah

Souhrn.....	4
Summary.....	5
1 Cíle práce.....	8
2 Úvod.....	9
3 <i>Hordeum vulgare</i> .....	10
3.1 Obecná charakteristika.....	10
3.2 Výskyt a význam.....	10
4 Transgenoze.....	11
4.1 Transgenní rostliny.....	12
4.1.1 Elektroporace.....	13
4.1.2 Mikroprojektilový přenos DNA.....	13
4.1.3 Transformace prostřednictvím <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	15
5 Systémy <i>in vitro</i> .....	17
5.1 Organogeneze.....	19
5.2 Embryogeneze.....	19
6 Růstové regulátory.....	20
6.1 Auxiny.....	20
6.2 Cytokininy.....	22
7 Materiál a metody.....	24
7.1 Rostlinný materiál.....	24
7.1.2 Kultivace rostlin.....	24
7.1.3 Složení kultivačních médií.....	24
7.2 Plazmidový konstrukt.....	26
7.3 Transformace prostřednictvím <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	26
7.3.1 Izolace nezralých embryí.....	26
7.3.2 Příprava suspenze <i>A. tumefaciens</i> a inokulace nezralých embryí.....	27
7.3.3 Selektce transformovaných rostlin.....	27
7.3.4 Regenerace transgenních rostlin.....	28
7.4 Izolace genomické DNA.....	29
7.5 Detekce transgenů pomocí PCR.....	29
8 Výsledky.....	31
8.1 Regenerace odrůd ječmene Golden Promise a Atribut v <i>in vitro</i> podmínkách.....	31
8.2 Transformace jarního ječmene pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	32
8.2.1 Detekce transgenních rostlin.....	33

9	Diskuze .....	35
10	Závěr .....	37
11	Seznam použitých zkratek .....	38
12	Seznam použité literatury .....	39



# 1 Cíle práce

- 1) Na základě dostupné literatury zjistit podíl faktorů ovlivňující úspěšnost transformace ječmene.
- 2) Testovat hospodářsky významné odrůdy ječmene, vyhodnotit jejich indukční a regenerační kapacitu.
- 3) Transformace hospodářsky významné odrůdy ječmene genem *dapA* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, zjistit možnost transformace.

## 2 Úvod

Ječmen (*Hordeum L.*) patří mezi nejstarší a nejvýznamnější zemědělské plodiny. První zmínky nacházíme již v čínské a indické mytologii. Archeologické důkazy svědčí o jeho výskytu v prehistorických dobách v Asii, Africe i Evropě. Četné archeologické nálezy z doby asi 500 let př. n. l. dokazují pěstování ječmene i na našem území. V současnosti se používá zejména ke krmným účelům (až 70 %) a důležitou roli hraje i ve výrobě sladu či náhražky kávy (melty). V ječmeni je přítomna řada důležitých látek, mimo jiné i vitamíny skupiny B a E. Právě díky své nutriční hodnotě a nepříliš vysokým nárokům se ječmen stal čtvrtou nejrozšířenější zemědělskou plodinou na světě, v České republice zaujímá dokonce druhé místo.

V dnešní době, kdy je naše planeta čím dál víc zalidňována a přirozených zdrojů potravy ubývá, jsou na zemědělství kladeny vysoké nároky, mezi něž patří i potřeba pěstovat co nejvýnosnější, nejodolnější a zároveň mnohostranně využitelné hospodářské plodiny. Jedním ze způsobů, jak takové rostliny získat je genetická modifikace. Ječmen je dobrou volbou pro celou řadu nejrůznějších genetických úprav vedoucích ke zvýšení jeho fitness. Bohužel jsou transformace ječmene jakožto obilniny dosud poněkud problematické. Důvodem je v první řadě menší vnímavost k bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, která se běžně používá pro transformaci dvouděložných rostlin, jelikož je jejich přirozeným patogenem. U rostlin jednoděložných však nevykazuje stejně vysokou efektivitu. Další komplikací je omezená indukční a regenerační kapacita obilnin. I tyto překážky se ovšem začíná dařit překonávat novou metodikou a inovovanými přístupy.

Prakticky transformovatelnou modelovou odrůdou ječmene je Golden Promise, který ovšem není z hlediska zemědělství příliš významný. Roste proto potřeba efektivně transformovat i další odrůdy, zejména krmné a sladovnické.

## 3 *Hordeum vulgare*

### 3.1 Obecná charakteristika

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednoděložná ozimá nebo jarní obilnina taxonomicky řazená do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jedná se o kulturní diploidní rostlinu ( $2n = 14$ ) klíčící 5 - 8 zárodečnými kořeny. Květenství je lichoklas složený z jednokvětých klásků přisedlých ve výkrojcích větvena po trojicích. Opylení je kleistogamické, uvnitř uzavřeného květu, s čímž souvisí velký počet vyhraněných forem u tohoto druhu (Vančurová a Kühn, 1966). Stéblo dosahuje výšky 80 až 130 cm a je tvořeno 4 - 8 články (internodii) oddělenými kolénky (nody). Listy ječmene jsou pravotočivé, umístěné ve dvou řadách nad sebou. Zrno se skládá ze tří částí: obalů, endospermu a embrya. U ječmene pěstovaného v našich oblastech má zrno světle žlutou barvu, může však být i oranžové, hnědé, fialové až modročerné (Zimolka a kol., 2006).

### 3.2 Výskyt a význam

Ječmen je považován za jednu z nejstarších hospodářských obilnin na světě a zároveň zaujímá čtvrté místo co do osevni plochy a výnosu. Mezi rozšířenější obilniny patří už jen pšenice, kukuřice a rýže. Vysoká míry adaptability je jednou z vlastností, jež umožnila ječmeni rozšířit se prakticky po celém světě - lze se s ním setkat v chladných oblastech Skandinávie stejně dobře jako v horském pásmu Střední Asie či v suchých oblastech Severní Afriky (Goedeke a kol., 2007). Světový výnos ječmene v r. 2007 činil okolo 137 milionů tun (UN Food and Agriculture Organization, FAO) a zajišťuje ječmeni význačné postavení v dnešním zemědělství (Hensel a kol., 2009). V České republice je jarní ječmen po ozimé pšenici druhou nejvýznamnější plodinou. V r. 2010 byl pěstován na výměře 388 925 ha a bylo sklizeno 1 584 456 tun zrna (Český statistický úřad, <http://www.czso.cz>).

Vedle hospodářské důležitosti figuruje ječmen díky svému diploidnímu charakteru ( $2n = 2x = 14$ ) také jako cenný modelový organismus pro obilniny s komplexnějším genomem, zejména pro hexaploidní pšenici ( $2n = 6x = 42$ ), (Bartlett a kol., 2008).

Velká část ozimého ječmene je díky vysokému obsahu proteinů (12 - 15 %) v zrna využívána jako krmivo pro hospodářská zvířata. Naproti tomu odrůdy dvouřadého jarního ječmene obsahující méně proteinů (9 %) a velké množství sacharidů (65 %) se typicky využívají k výrobě sladu. V některých částech světa slouží ječmen také jako významná potravina. Limitujícím faktorem nutriční hodnoty je nízký obsah aminokyselin, např. lyzinu a threoninu (Goedeke a kol., 2007). Právě zvýšení obsahu proteinogenních aminokyselin je častým cílem genetických modifikací ječmene.

Ječmen pěstovaný v České republice má své uplatnění zejména ve sladovnictví a jako velmi kvalitní krmivo, zvláště pro monogastrická zvířata. Oproti sladovnickému však krmivářské využití zaostává a očekává od výzkumu vědecky podložená pěstitelská doporučení. Současný výzkum přinesl rovněž řadu důkazů o významu ječmene pro zdravou lidskou výživu, což vede ke zvýšení poptávky po potravinářském ječmeni. Díky obsahu  $\beta$ -glukanů, antioxidantů a podílu vlákniny má ječmen hypocholesterolemický účinek, prokázány jsou rovněž jeho protizánětlivé a antiseptické účinky. Zvyšuje se také potřeba ječmene pro průmyslové využití, zejména k výrobě lihu, detergentů, škrobu, kosmetických a farmaceutických přípravků (Zimolka a kol., 2006).

## 4 Transgenozé

Transgenní organismy, pro širokou veřejnost známější pod pojmem geneticky modifikované organismy (GMO), jsou rostliny a živočichové, jejichž genetický materiál byl uměle pozměněn. V současné době je vytváření transgenních organismů v laboratořích rutinní záležitostí využívající technologie rekombinantní DNA a přenosu genů.

Pro vědce transgenní organismy skýtají široké pole působnosti v oblasti studia genů. Lze je využít ke zjišťování funkcí genů, k přípravě nových produktů nebo mohou posloužit např. jako buněčné modely pro studium dědičných onemocnění živočichů včetně člověka (Snustad a Simmons, 2009).

## 4.1 Transgenní rostliny

Transformace rostlin je významný prostředek pro základní i aplikovaný výzkum. Předmětem aplikovaného výzkumu je zejména zdokonalování hospodářsky významných plodin, mezi které patří v první řadě obilniny. Právě pro ty jsou v současné době vytvářeny stále nové postupy zajišťující vyšší efektivitu transformace.

Dle Procházka a kol. (1998) metody umožňující účinnou a rychlou modifikaci rostlinné DNA souhrnně označujeme jako genetické manipulace. Ty lze rozdělit z hlediska používaných metod na buněčné inženýrství, které pracuje s celými buňkami či izolovanými organelami, pomocí jejichž přenosu modifikuje genetickou informaci recipientního organismu a na vlastní genové inženýrství, které se zabývá vnášením klonovaných genů.

Důležitou vlastností rostlinných buněk je totipotence, totiž schopnost dát vznik všem typům buněk v organismu. Je dána zachováním úplné genetické informace a schopností ji exprimovat. Za exprimaci ve správný čas a na správném místě odpovídají vnitřní i vnější podmínky a také signální síť organismu. Pro genové inženýrství je totipotence obrovskou výhodou, neboť umožňuje regeneraci celé rostliny z jediné modifikované somatické buňky (Pavlová, 2005).

Transgenní rostliny mohou být získány několika různými postupy. Mezi nejpoužívanější metody patří elektroporace, mikroprojektilový přenos DNA a pravděpodobně nejrozšířenější transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* (Snustad a Simmons, 2009). Vzhledem ke skutečnosti, že *A. tumefaciens* patří mezi přirozené patogeny dvouděložných rostlin, byla posledně jmenovaná metoda v souvislosti s transformací ječmene jakožto jednoděložné rostliny dlouhou dobu opomíjena. Až Tingay a kol. (1997) způsobili zlom v této problematice, když jako první vypracovali protokol, podle něhož bylo možné získávat transgenní rostliny ječmene právě touto metodou. Podrobněji se jednotlivými, výše uvedenými metodami budu zabývat v následujících kapitolách.

Travella a kol. (2005) v rámci svého výzkumu srovnávali dvě základní metody transformace u ječmene - transformaci prostřednictvím *A. tumefaciens* a mikroprojektilový přenos DNA. Bylo zjištěno, že účinnost transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* je v porovnání s biolistikou dvojnásobná a také další

faktory zahrnující např. počet transgenních kopií, expresi či dědičnost jsou v případě transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* příznivější.

Dosud získané výsledky kultivace transgenních rostlin využitelných jako hospodářsky významné odrůdy neprokázaly žádné nebezpečí při velkoplošném uvolňování do přírody. V rámci základního výzkumu však byly získány i geneticky pozměněné rostliny, jejichž proteiny vznikající jako produkty některých transgenů byly toxické (Ondřej a Drobník, 2002). Včleňování transgenních rostlin do přírody je proto regulováno mnoha mezinárodními i národními právními předpisy zajišťujícími ochranu zdraví člověka, zvířat i životního prostředí.

#### **4.1.1 Elektroporace**

Elektroporace je speciální technika transformace, které spočívá ve vystavení buněk krátkým elektrickým impulsům indukujícím dočasnou tvorbu pórů v buněčné membráně. Těmito póry může DNA vstupovat do buňky. Obecně platí, že DNA je takto stimulovanými buňkami přijímána relativně snadno, hlavní bariéru zabraňující vstupu DNA do buňky tvoří buněčná stěna (není přítomna u živočišných buněk), kterou je nutné před samotnou elektroporací odstranit. K tomu jsou užívány specifické enzymy degradující buněčnou stěnu kvasinek, hub a rostlin, s jejichž pomocí lze za vhodných podmínek získat intaktní protoplasty. Po elektroporaci se protoplasty promývají, aby se degradativní enzymy odplavily a mohla se tak samovolně obnovit buněčná stěna transformovaných buněk (Brown, 2007).

Stejně jako v případě mikroprojektilového přenosu DNA se jedná o přímý přenos genů, nicméně je tato metoda levnější a snadněji zvládnutelná. Dle Ondřej a Drobník (2002) je jednou z hlavních nevýhod nízká účinnost. Konkrétně pro ječmen se tato metoda v praxi téměř nepoužívá.

#### **4.1.2 Mikroprojektilový přenos DNA**

Mikroprojektilový přenos DNA neboli biolistika je metoda, která spočívá v nastřelení exogenní DNA navázané na mikroskopických zlatých či wolframových částicích o velikosti 1 - 2 $\mu$ m do jader buněk prostřednictvím speciálního přístroje

využívajícího přetlaku helia. Pro mikroprojektilový přenos DNA se nejčastěji používá přístroj firmy BioRad PDS-1000/He (obr. 1). Důležitou podmínkou pro transformaci je umístění objektu ve vakuu, které je vytvořeno vývěvou (Harwood a Smedley, 2009). Nejčastěji je nastřelováno pletivo, které se umístí na médium vhodné pro kalogenezi a selekci transgenních pletiv. Konstrukt často obsahuje také reportérový gen *gus* (gen pro  $\beta$ -glukuronidázu), jehož expresi lze po určité době (např. 48 h po transformaci) snadno detekovat a kvantitativně stanovovat (Ondřej a Drobník, 2002).



Obr. 1: Genové dělo PDS-1000/He.  
(Foto autor)

Obrovskou nevýhodou je skutečnost, že zdaleka ne všechny mikroprojektily se dostanou do pletiva. Zjistilo se, že jen 7 až 10 % mikroprojektilů pronikne alespoň do epidermis. Buňky epidermis ovšem nemají schopnost vytvářet kalus a následně diferencovanou rostlinu, proto je potřeba, aby mikroprojektily pronikly až do mezofylu. Aby mohlo dojít k expresi vnášeného genu, musí být zasaženo buněčné jádro, nikoliv cytoplazma. Procento takto zasažených buněčných jader je velmi nízké (5 %) a i u tohoto malého procenta většina buněk do 48 h odumírá. Lze tedy tvrdit, že aby došlo k integraci požadovaného genu do genomu, je třeba, aby mikroprojektil vnikl do jádra a buňka tento zásah přežila (Ondřej a Drobník, 2002).

Přestože v současné době je preferována spíše transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, dříve byly biolisticke techniky mnohdy jediným způsobem,

jak transformovat některé rostlinné druhy, zvláště jednoděložné rostliny, které jsou podstatně méně vnímavé k *Agrobacterium*. Mikroprojektilový přenos DNA se tak stal první úspěšně aplikovanou metodou transformace vedoucí k zisku fertálních rostlin ječmene (Wan a Lemaux, 1994).

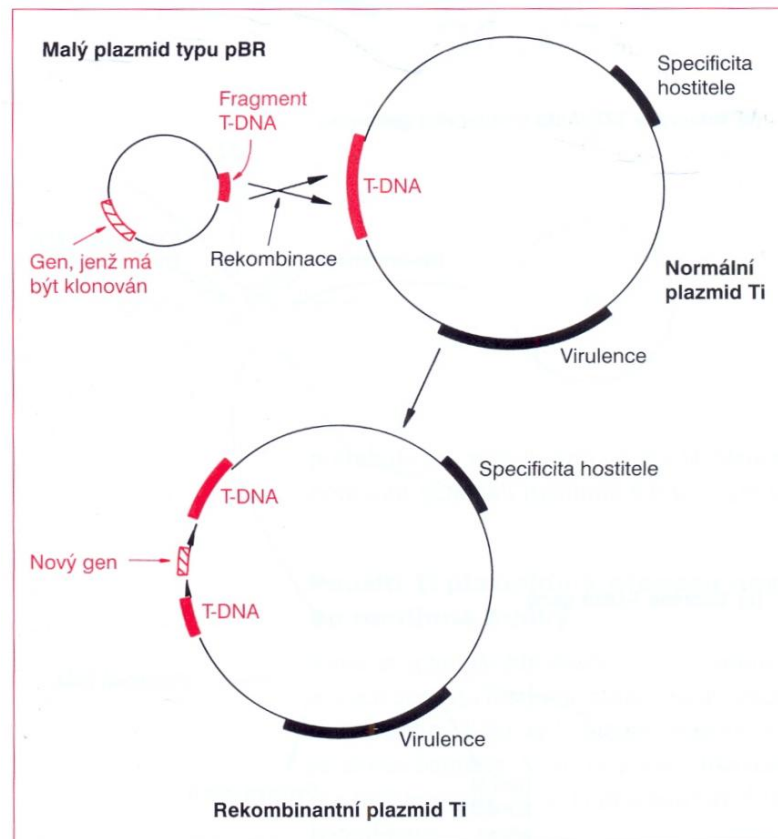
#### 4.1.3 Transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) je půdní gramnegativní bakterie z čeledi *Rhizobiaceae*, která je přirozeným patogenem dvouděložných rostlin, u nichž vyvolává tvorbu nádorů typu „crown gall“. Její infekčnost je podmíněna přítomností velkého *Ti* plazmidu (**T**umor **i**nducing), na kterém se nachází mnoho genů zodpovědných za virulenci a specifická oblast T-DNA (**T**ransferred **D**NA). T-DNA je schopna po infekci integrovat do rostlinné chromozomální DNA a následně se dále přenášet do dceřinných buněk (Procházka a kol., 1998). Segment T-DNA je dlouhý od 15 do 30 kb v závislosti na kmenu *Agrobacterium* a obsahuje geny pro syntézu auxinů a cytokininů, které jsou zodpovědné za nádorový růst a geny pro syntézu opinů zajišťující výživu infikující bakterie (Brown, 2007). Dle Snustad a Simmons (2009) dochází k integraci T-DNA v různých místech chromozomů, v některých případech dokonce k několikanásobnému začlenění T-DNA v téže buňce.

Původně se vědci domnívali, že stačí vložit požadované geny, kterými budou chtít rostlinu transformovat do T-DNA a o jejich integraci se již postará bakterie. Ukázalo se však, že *Ti* plazmid je příliš velký a tudíž nemá unikátní restriční místo. Proto byly vytvořeny dvě základní strategie umožňující začlenění nové DNA do plazmidu. První z nich je strategie binárního vektoru vycházející ze skutečnosti, že T-DNA nemusí být nutně fyzicky spojena se zbytkem *Ti* plazmidu. Při transformaci je možné použít systém dvou plazmidů sestávající z T-DNA na malé molekule a zbytku *Ti* plazmidu v běžné formě. T-DNA plazmid bude v tomto případě dostatečně malý, aby měl unikátní restriční místo. Pokud tedy bude v buňce *A. tumefaciens* současně přítomen malý plazmid nesoucí T-DNA a zbytek velkého *Ti* plazmidu, bude T-DNA přenesena do rostlinné chromozomální DNA prostřednictvím proteinů kódovaných geny, jež nese větší *Ti* plazmid. Druhým možným přístupem je strategie kointegrace (obr. 2), která spočívá ve vložení genu, jenž má být klonován do unikátního restričního místa na malém plazmidu pBR nebo podobném vektoru z *Escherichia coli* (*E. coli*),



který nese malý kousek T-DNA. Takový vektor je následně vnesen do buňky *A. tumefaciens* obsahující *Ti* plazmid. Na základě homologie dochází k přirozené rekombinaci a plazmid pBr se zájmovým genem může být integrován do T-DNA a s jejím zbytkem vnesen do rostlinného chromozomu (Brown, 2007).



Obr. 2: Mechanismus strategie kointegračního vektoru. Upraveno dle Brown, 2007.

Problém buněk při transformaci prostřednictvím *A. tumefaciens* se standardními molekulami T-DNA je přirozená tvorba nádorů. Tento problém byl vyřešen vytvořením „odzbrojeného“ *Ti* plazmidu. Jeho podstatou je delece genů, které zodpovídají za tvorbu nádorů. Za infekčnost je zodpovědná zejména virulentní oblast *Ti* plazmidu mimo T-DNA. Na druhou stranu delece těchto genů znesnadňuje identifikaci úspěšně transformovaných rostlin. Ideálním řešením je tedy mít vhodný markerový gen v oblasti T-DNA „odzbrojeného“ *Ti* plazmidu. Obvykle jím bývá gen rezistence vůči určité látce. Nejčastější selekční marker u rostlin je gen *kan<sup>r</sup>* odvozený z transpozonu Tn5 bakterie *E. coli*. Gen *kan<sup>r</sup>* kóduje enzym neomycin-fosfotransferázu typ II (NPTII), který fosforyluje antibiotikum kanamycin a tím ho inaktivuje. Bakteriální a rostlinné

promotorové sekvence a terminační signály transkripce jsou však odlišné, proto je nezbytné nahradit NPTII rostlinným promotorem a terminačními signály. Takto vytvořené konstrukty nazýváme chimérické selekční markerové geny (Snustad a Simmons, 2009).

O úspěšné transformaci ječmene prostřednictvím *A. tumefaciens* poprvé informoval Tingay a kol. (1997). Efektivita zabudování T-DNA do buněk obilnin byla zvýšena použitím super virulentního *Agrobacterium*, kmen AGL1. Modifikovaný postup transformace sestával z nastřelování povrchu štítků získaných z nezralých embryí zlatými mikročásticemi a jejich následnou inokulací kmenem AGL1. Nastřelování předcházející kokultivaci indukovalo buněčnou odpověď na poranění, kterou je sekrece fenolických látek typu acetosyringon, jež *Agrobacterium* při napadení rostlinné buňky rozeznává svými specifickými proteiny. V současnosti se pro zvýšení efektivity transformace namísto ostřelování štítků používá přímá aplikace acetosyringonu. Bartlett a kol. (2008) a Harwood a kol. (2009) však ve svých pokusech nepotvrdili závislost úspěšnosti transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* na použití acetosyringonu.

## 5 Systémy *in vitro*

Systémy *in vitro* jsou nesmírně důležité pro genové manipulace a transformaci rostlin. Díky kulturám *in vitro* lze účinně regulovat růst a vývoj rostlinných buněk, pletiv či orgánů ve sterilním prostředí. Izolované části rostlin kultivované *in vitro* jsou označovány jako explantáty nebo explantátové kultury.

Založení explantátové kultury spočívá v izolaci rostlinného materiálu za aseptických podmínek a jeho přenosu na kultivační (živné) médium, které umožňuje dělení buněk a růst explantátu. Kultivační médium obsahuje vodu a esenciální minerální živiny - soli makro- a mikroelementů. Dahleen (1995) prokázal důležitost mědi jakožto mikroelementu v médiích užívaných při transformaci ječmene. Média obsahující zvýšenou koncentraci mědi (5  $\mu$ M) vykazovala zvýšenou kvalitu kalusu a následnou regeneraci rostlin. Dále jsou dle charakteru explantátu, podmínek kultivace *in vitro* a záměru kultivace přidávány sacharidy, vitaminy (nejčastěji thiamin, pyridoxin, myo-inositol) a růstové látky - nejběžněji auxiny (IAA, NAA, 2,4-D) a cytokininy

(kinetin, BAP, *trans*-zeatin). Vliv mají i další regulovatelné faktory, mezi které řadíme zejména světlo a teplotu (Luštinec a Žárský, 2005). Hensel a kol. (2009) dosáhli v případě transformace nezralých embryí odrůdy Golden Promise efektivity transformace 20 - 86 % přidáním 0,8 g l<sup>-1</sup> L-cysteinu a 500 μM acetosyringonu do kokultivačních médií.

Dle Procházka a kol. (1998) indukční a regenerační schopnost závisí vedle kultivačních podmínek také na vlastním explantátu, jehož vliv je dán:

- orgánem, ze kterého byl explantát izolován
- fyziologickým a ontogenetickým stádiem
- obdobím odběru explantátu
- kvalitou donorové rostliny
- genotypem
- orientací explantátu
- velikostí explantátu
- předchozím působením na donorovou rostlinu
- inokulační hustotou

V případě ječmene vykazují nejvyšší indukční a regenerační schopnost nezralá embrya, která se proto stala nejpoužívanějšími explantáty pro odvození kalusů a následnou regeneraci rostlin v *in vitro* podmínkách (Goedeke a kol., 2007). Úspěšné regenerace ječmene v *in vitro* podmínkách lze dosáhnout i použitím dalších explantátů: apikálních meristémů (Zhang a kol., 1999), prašníků (Kuhlmann a Foroughi-Wehr, 1989), izolovaných mikrospor (Mordhorst a kol., 1993) nebo protoplastů izolovaných ze zygot (Holm a kol., 1995).

Většinou je cílem kultivace *in vitro* získání kompletního jedince určitých vlastností. Regenerace v *in vitro* podmínkách lze dosáhnout dvěma základními způsoby - organogenezí nebo embryogenezí. Regenerace může být buď přímá - z kultivovaných buněk explantátu nebo nepřímá formou regenerace z vytvořeného kalusu. Kalus jakožto histologicky neorganizované pletivo se může začít tvořit během několika dnů na povrchu explantátu umístěného na vhodném médiu. Při pravidelném přenášení na čerstvé médium (pasážování) a při odstraňování odumřelých buněk může kalus růst až desítky let (Procházka a kol., 1998).

## 5.1 Organogeneze

Při regeneraci cestou organogeneze mohou vznikat v podstatě jakékoliv rostlinné orgány (kořen, prýt, list, květ) nebo jejich soubory, nikoliv však bezprostředně celistvá rostlina. K celistvé rostlině je možné dospět změnou kultivačních podmínek nebo přenesením do podmínek normálních. Organogenezi ovlivňuje především složení kultivačního média, zvláště přítomnost růstových látek. Již v r. 1957 Skoog a Miller zjistili, že převaha cytokininů nad auxiny způsobuje regeneraci prýtů, zatímco převaha auxinů nad cytokininy vede k regeneraci kořenů. Je-li koncentrace těchto rostlinných hormonů přibližně stejná, tvoří se kalus (Procházka a kol., 1998).

## 5.2 Embryogeneze

Luštinec a Žárský (2005) rozdělují embryogenezi podle původu explantátu na pylovou a somatickou. Somatická embryogeneze spočívá ve tvorbě somatických embryí neboli embryoidů, které se diferencují v kalusových a buněčných kulturách. Obdobně jako v případě zygotických embryí procházejí i embryoidy globulárním, srdčítým a torpédovým vývojovým stádiem a v řadě případů je z nich možné změnou kultivačních podmínek regenerovat celou rostlinu. Pavlová (2005) uvádí, že somatická embryogeneze byla poprvé popsána v 50. letech minulého století v suspenzní kultuře odvozené z kalusu, který se vytvořil na explantátech kořene mrkve. Mikrokalusy tvořené shluky buněk byly pěstovány v tekutém médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Po určité době byly tyto mikrokalusy přeneseny do média bez 2,4-D a následně byla na jejich povrchu pozorována tvorba somatických embryí.

V případě pylové embryogeneze probíhá regenerace rostlin z kultur izolovaných nezralých pylových zrn, přičemž výsledkem mohou být haploidní nebo dihaploidní rostliny, které jsou významným experimentálním materiálem pro šlechtění rostlin (Luštinec a Žárský, 2005).

## 6 Růstové regulátory

Růstové regulátory jsou látky regulující růstové a vývojové procesy u rostlin. Poprvé poukázal na jejich existenci německý botanik Julius von Sachs (1832 - 1897), který je popsal jako chemické signály, pomocí kterých jednotlivé orgány rostlin komunikují.

Pod pojmem růstové regulátory rozumíme jak látky přirozené, tak i látky synteticky připravované. Dříve byly děleny také na látky růst stimuluující a látky růst inhibující. Řada pokusů v pozdější době však dokázala, že látka, která se v určité koncentraci chová jako stimuluující, má v odlišné koncentraci inhibiční účinek. Dále bylo zjištěno, že i stáří, fyziologický stav rostliny a genotyp ovlivňují účinek regulační látky (Procházka a kol., 1998).

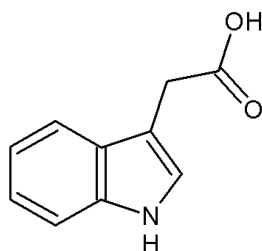
V rámci přirozených růstových regulátorů rozlišujeme rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou. Mezi fytohormony klasicky řadíme těchto pět skupin látek: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou a etylen. Tyto skupiny hormonů jsou účinné ve velmi nízkých koncentracích ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  mol/l). Ostatní látky s regulační aktivitou jsou účinné až při mnohonásobně vyšších koncentracích a řadíme sem zejména fenolické látky, brassinosteroidy, polyaminy, kyselinu jasmonovou a oligosacharidy (Luštinec a Žárský, 2005).

V průběhu procesu transformace a následné regenerace ječmene jsou užívána indukční, transientní a regenerační média. Složení těchto médií a zejména obsah jednotlivých hormonů v nich zásadně ovlivňují úspěšnost transformace. Z výše uvedených rostlinných hormonů se jedná zejména o auxiny a cytokininy. O těchto dvou skupinách fytohormonů se tedy budu zmiňovat v dalších kapitolách.

### 6.1 Auxiny

Auxiny byly objeveny ve 20. letech minulého století na základě schopnosti stimulovat prodlužovací růst. Primárním přirozeným auxinem je kyselina indolyl-3-octová (IAA), (obr. 3). Dalšími strukturně podobnými látkami auxinového typu jsou kyselina indolyl-3-máselná (IBA) a kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA). Jiným

přirozeným auxinem je méně aktivní kyselina fenylactová, která se ovšem nevyskytuje u všech druhů rostlin (Pavlová, 2005).

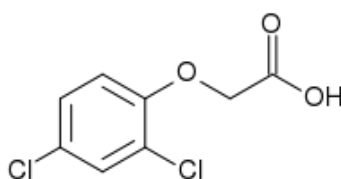


Obr. 3: Kyselina indolyl-3-octová.

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:IAAII.png>

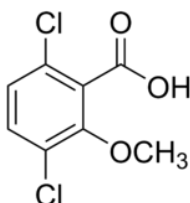
Na fyziologické úrovni auxiny regulují mnoho růstových a vývojových procesů. Významně se podílejí na stimulaci prodlužovacího růstu, buněčného dělení a buněčné diferenciace, přičemž je nesmírně důležitá jejich interakce s cytokininy. Stimulují také např. tvorbu adventivních kořenů, podílejí se na apikální dominanci a působí v procesech vedoucích k opadu listů, květů a plodů (Luštinec a Žárský, 2005).

V praxi se do živných médií při kultivaci *in vitro* používají chemicky stálější syntetické auxiny, které rostlinou nejsou metabolizovány tak rychle jako IAA. Ve vyšších koncentracích jsou často užívány také jako herbicidy (Taiz a Zeiger, 2006). Mezi nejznámější syntetické auxiny patří kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), (obr. 4), kyselina 3,6-dichloro-2-methoxybenzoová (dicamba), (obr. 5), kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA) a picloram (Procházka a kol., 1998).



Obr. 4: Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D).

[http://en.wikipedia.org/wiki/2,4-Dichlorophenoxyacetic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/2,4-Dichlorophenoxyacetic_acid)



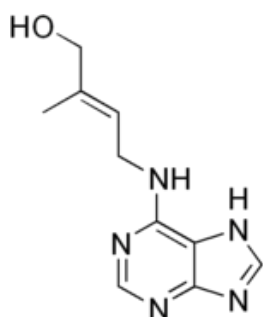
Obr. 5: Kyselina 3,6-dichloro-2-methoxybenzoová (dicamba).

<http://en.wikipedia.org/wiki/Dicamba>

Bartlett a kol. (2008) a Harwood a kol. (2009) zjistili, že transformace ječmene prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* vykazuje nejvyšší účinnost při kultivaci na indukčním a selekčním médiu obsahujícím 2,5 mg l<sup>-1</sup> dicamba a následný přenos na médium transienční obsahující 2,5 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D.

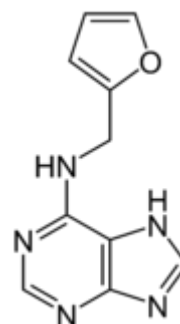
## 6.2 Cytokininy

První cytokininy byly objeveny v 50. letech na základě schopnosti vyvolávat dělení buněk. Jedná se o N6 substituované deriváty adeninu. Základní přirozený cytokinin je zeatin (obr. 6), který byl poprvé izolován z nezralého endospermu kukuřice. Jedním z klíčových syntetických cytokininů je kinetin (6-furfurylaminopurin), (obr. 7) primárně izolovaný z DNA sledího spermatu v laboratoři F. Skooga v USA (Luštinec a Žárský, 2005).



Obr. 6: Zeatin.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Zeatin>



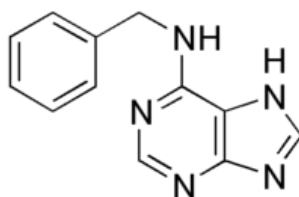
Obr. 7: Kinetin (6-furfurylaminopurin).

<http://en.wikipedia.org/wiki/Kinetin>

Fyziologické efekty cytokininů jsou rozmanité. Bylo dokázáno, že hladina zeatinu je v mitóze a v G1 fázi buněčného cyklu zvýšená, což naznačuje zásadní význam cytokininů pro dělení buněk. Cytokininy také stimulují vývoj úžlabních pupenů a snižují apikální dominanci. Zpomalují odbourávání chlorofylu, snižují oxidaci membránových lipidů a stabilizují tylakoidy, čímž přispívají k oddálení senescence. Dále ovlivňují diferenciaci vodivých pletiv kořenu a zvětšují plochu listů stimulací objemového růstu buněk (Pavlová, 2005).

V praxi jsou cytokininy důležitou složkou živných kultivačních médií. Nejčastěji se užívá synteticky připravovaný kinetin nebo BAP (benzylaminopurin), (obr. 8).

Cytokininy nachází uplatnění také v zahradnictví, kde slouží k indukci větvení stonků (Luštinec a Žárský, 2005).



Obr. 8: BAP (benzylaminopurin).

<http://en.wikipedia.org/wiki/6-Benzylaminopurine>

Dle Bartlett a kol. (2008) a Harwood a kol. (2009) vykazují při transformaci ječmene prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* nejvyšší efektivitu transientní média obsahující 0,1 mg l<sup>-1</sup> BAP.



## 7 Materiál a metody

### 7.1 Rostlinný materiál

K transformacím a následné regeneraci rostlin byla použita nezralá zygotická embrya *Hordeum vulgare* L., odrůdy Golden Promise a Atribut.

Golden Promise je starší odrůda jarního dvouřadého ječmene, která byla vyšlechtěna v r. 1956 v Anglii. Ve světě je díky své vysoké regenerační schopnosti *in vitro* používána jako modelová odrůda pro transformaci.

Atribut je česká polopozdní odrůda nízkého typu s výběrovou jakostí zrna. Jedná se o odrůdu, která je vhodná zejména do oblastí pěstování sladovnického ječmene, není vhodná pro sušší oblasti. Vyznačuje se výbornou odolností proti *Blumeria graminis* a dobrou odolností proti listovým skvrnitostem. Je středně odolná proti poléhání.

#### 7.1.2 Kultivace rostlin

Rostliny ječmene byly v případě testování indukční a regenerační kapacity stejně jako v případě transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* pěstovány v *in vitro* podmínkách na třech různých kultivačních médiích (kalus indukující, transientní, regenerační).

Během selekčních stádií bylo ke všem médiím přidáváno 50 mg l<sup>-1</sup> antibiotika hygromycin B a 160 mg l<sup>-1</sup> antibiotika Timentin.

Pasážování rostlin probíhalo sterilně ve flow boxu v pravidelných intervalech.

#### 7.1.3 Složení kultivačních médií

##### 1) Kalus indukující médium

MS médium* (Duchefa M0221)	4,3 g l <sup>-1</sup>
maltóza	30 g l <sup>-1</sup>
kasein hydrolyzát	1 g l <sup>-1</sup>
myo-inositol	350 mg l <sup>-1</sup>

prolin	690 mg l <sup>-1</sup>
thiamin HCl	1 mg l <sup>-1</sup>
dicamba	2,5 mg l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	1,25 mg l <sup>-1</sup>
phytagel	3,5 g l <sup>-1</sup>

pH = 5,8

### 2) Transientní médium

MS* médium (Duchefa M0238)	2,7 g l <sup>-1</sup>
maltóza	20 g l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165 mg l <sup>-1</sup>
glutamin	750 mg l <sup>-1</sup>
myo-inositol	100 mg l <sup>-1</sup>
thiamin HCl	0,4 mg l <sup>-1</sup>
2,4-D (Duchefa)	2,5 mg l <sup>-1</sup>
BAP (Duchefa)	0,1 mg l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	1,25 mg l <sup>-1</sup>
phytagel	3,5 g l <sup>-1</sup>

pH = 5,8

### 3) Regenerační médium

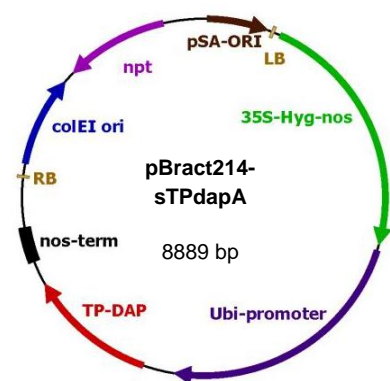
MS* médium (Duchefa M0238)	2,7 g l <sup>-1</sup>
maltóza	20 g l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165 mg l <sup>-1</sup>
glutamin	750 mg l <sup>-1</sup>
myo-inositol	100 mg l <sup>-1</sup>
thiamin HCl	0,4 mg l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	1,25 mg l <sup>-1</sup>
phytagel	3,5 g l <sup>-1</sup>

pH = 5,8

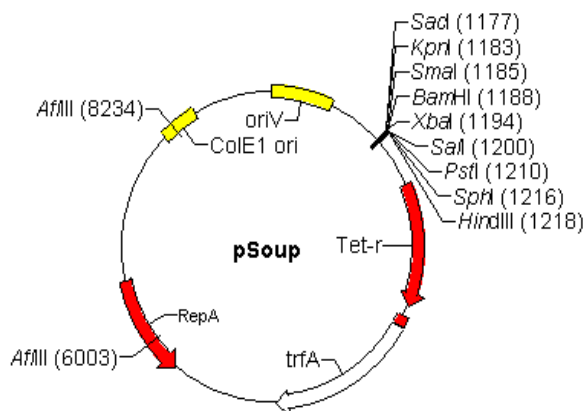
\* Do všech kultivačních médií bylo použito odpovídající MS médium připravené firmou Duchefa dle Murashige a Skooge (1962).

## 7.2 Plazmidový konstrukt

Pro transformaci byl použit vektor pBract214::sTPdapA (obr. 9), jehož kazeta sTPdapA byla uměle připravena. Před gen *dapA*, jehož exprese vede ke zvýšení obsahu proteinogenní aminokyseliny lyzinu v zrna byl naklonován úsek 144 bp z transientního peptidu malé podjednotky Rubisco (*Hordeum vulgare* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit, Genbank U43493). Vektor byl elektroporací transformován do kompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens* (kmen AGL1) společně s pomocným plazmidem pSoup (obr. 10) nesoucím geny virulence. Jako selekční marker byl použit gen *hpt*, který poskytuje rezistenci vůči antibiotiku hygromycin.



Obr. 9: Vektorová mapa pBract214::sTPdapA.



Obr. 10: Vektorová mapa pSoup.

## 7.3 Transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

### 7.3.1 Izolace nezralých embryí

Donorové rostliny odrůd Golden Promise a Atribut byly postupně vysévány ve skleníku v období března a dubna 2010. Rostliny byly pěstovány ve směsi zeminy a substrátu pro dopěstování (Rašelina Soběslav) v zahradních kontejnerech 25 x 25 cm. Rostliny byly pravidelně přihnojovány 0,25% roztokem Vegafloru a ošetřovány postřikem proti běžným chorobám. Teplota ve fytotronu byla 16°C den/12°C noc. Osvětlení bylo zajištěno výbojkami SHC (400W) a RVL-X (400W) v poměru 1 : 1.

Ječné klasy byly sesbírány, když průměr nezralých zygotických embryí dosáhl 1 - 2 mm. Zrna byla opatrně vyjmuta z klasů a zbavena osin, aniž by došlo k poškození

pláště. Zrna izolovaná z klasů byla sterilizována sérií jednotlivých promývání: 70% ethanolem po dobu 2 min., propláchnuta sterilní vodou, 6% NaClO po dobu 4 min. a závěrem propláchnuta 4krát sterilní vodou.

Nezralá zygotická embrya byla extirpována pod binokulární lupou ve flow boxu za přísně sterilních podmínek. Pomocí pinzet a skalpelu bylo odstraněno koleoptile a štítek embrya byl umístěn na kalus indukující médium, kde byl kultivován přes noc.

### **7.3.2 Příprava suspenze *A. tumefaciens* a inokulace nezralých embryí**

Kultura *Agrobacterium tumefaciens* pro transformaci extirpovaných zygotických embryí byla připravena přidáním standardní bakteriální suspenze do 10 ml sterilního tekutého MG/L média a následnou inkubací na třepače při 180 rpm přes noc.

Po jednom dni kultivace byly explantáty na kalus indukujícím médiu zakápnuty malým množstvím připravené suspenze *Agrobacterium tumefaciens* (OD 0,6 - 0,8). Explantáty byly přeneseny na čerstvé kalus indukující médium a kultivovány ve tmě při 26°C po dobu tří dnů.

### **7.3.3 Selektce transformovaných rostlin**

#### Selekce 1

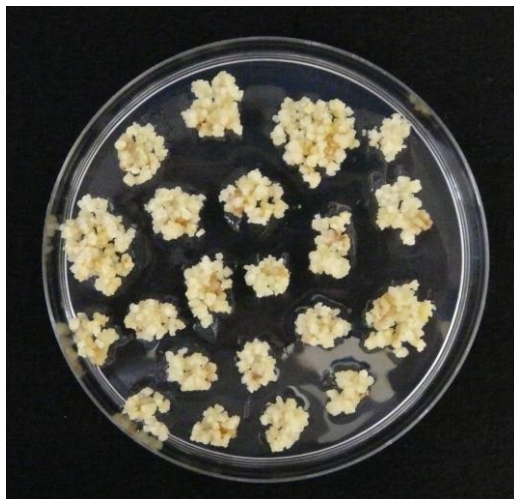
Po třídní kokultivaci byly primární explantáty přeneseny na čerstvé kalus indukující médium obsahující antibiotika hygromycin B jako selektivní složku a Timentin pro odstranění *Agrobacterium*. Explantáty byly kultivovány ve tmě při 26°C po dobu dvou týdnů.

#### Selekce 2

Na povrchu explantátů se po dvou týdnech začal vytvářet embryogenní kalus, který byl přenesen na nové selekční médium a kultivován stejně jako v případě *Selekce 1*.

#### Selekce 3

Po dalších dvou týdnech byly explantáty naposledy pasážovány na selekční médium a kultivovány ve tmě (viz *Selekce 1*), (obr. 11).



Obr. 11: Kalusy transformované odrůdy Golden Promise po šestitýdenní kultivaci. (Foto autor)

### 7.3.4 Regenerace transgenních rostlin

Po dvoutýdenní kultivaci na transientním médiu byly vyselektované kalusy pasážovány na regenerační médium (bez růstových regulátorů) v hlubokých Petriho miskách (obr. 12). Kalusy byly kultivovány v místnosti s 16hodinovou světelnou periodou při 23°C. Regenerované rostliny byly přeneseny nejprve do sadbovacích válečků JIFFY a následně přesazeny do zeminy. Po přibližně třech týdnech byla izolována DNA a provedena PCR ověřující úspěšnost transformace na úrovni DNA.



Obr. 12: Transformovaná regenerující rostlina odrůdy Golden Promise připravená k přenosu do sadbovacího válečku JIFFY. (Foto autor)

## 7.4 Izolace genomické DNA

Izolace genomické DNA z mladých listů rostlin byla provedena dle Edwards a kol. (1991) a upravena pro podmínky Laboratoře rostlinných biotechnologií na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

1. Nastříhaný rostlinný materiál byl v mikrozkuvkách typu Eppendorf macerován v tekutém dusíku při pokojové teplotě po dobu 15 s.
2. Do mikrozkuvek bylo přidáno 400  $\mu$ l EB pufru\*, směs byla krátce podrcena a 5 s vortexována.
3. Směs se nechala působit po dobu 1 hod.
4. Mikrozkuvky byly centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 2 min. a následně bylo do nových mikrozkuvek odebráno 300  $\mu$ l supernatantu.
5. Supernatant byl smíchán s 300  $\mu$ l izopropanolu a opatrným opakovaným převrácením mikrozkuvek byla vysrážena DNA.
6. Mikrozkuvky byly centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 min. v chlazené centrifuze a následně byl ve flow boxu odstraněn supernatant.
7. K peletu v mikrozkuvkách bylo přidáno 300  $\mu$ l 75% ethanolu, mikrozkuvky byly centrifugovány při 5 000 rpm po dobu 5 min. a supernatant byl odsán pipetou.
8. Pelet se nechal přibližně 30 min vysychat.
9. Pelet byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l destilované vody a mikrozkuvky byly uloženy do chladu (4°C).

\* EB pufr (100 ml pufru: 20 ml 1M Tris HCl (pH 7,5), 5 ml 5M NaCl, 5 ml 0,5M EDTA, 500  $\mu$ l zvlášť připraveného SDS, doplněno dd H<sub>2</sub>O na 100 ml)

## 7.5 Detekce transgenů pomocí PCR

Pro PCR byl použit premix REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich R2523-100RXN).

1. Dle tab. 1 byl do mikrozkuvky typu Eppendorf namíchán PCR mix pro příslušný počet vzorků. Mix byl krátce vortexován a stočen na stolní minicentrifuze.

Tab. 1: PCR mix.

Reagent Mix	Mix 1x	Vzorky
dd H <sub>2</sub> O	5,0 µl	16,0 µl
RedyMix	10,0 µl	
primer F	0,5 µl	
primer R	0,5 µl	
templátová DNA		4,0 µl
Celkem		20,0 µl

2. Do PCR mikrozkušavek umístěných v ledové tříšti bylo pipetováno 16 µl PCR mixu a 4 µl vzorku (templátové DNA), takže výsledný objem v každé PCR mikrozkušavce činil 20 µl.
3. PCR mikrozkušavky byly jemně zvortexovány, krátce stočeny na stolní minicentrifuze a vloženy do příslušně naprogramovaného termocykléru.

Teplotní profil PCR pro detekci genu *sTPdapA*:

Aktivační denaturace	95°C	3 min
	95°C	1 min
Počet cyklů: 35	62°C	1 min
	72°C	1 min
Terminální elongace	72°C	5 min

Teplotní profil PCR pro detekci selekčního genu *hpt*:

Aktivační denaturace	95°C	3 min
	95°C	1 min
Počet cyklů: 35	62°C	1 min
	72°C	1 min
Terminální elongace	72°C	5 min

4. Smícháním agarózy SERVA (cat. no. 11404) s TAE pufr<sup>\*</sup>, rozvařením v mikrovlnné troubě a následným přidáním fluorescenčního barviva ethidium bromid byl připraven 1% agarózový gel pro detekci PCR produktu pomocí elektroforetické separace.
5. Gel byl po ukončení elektroforetické separace PCR produktu umístěn do UV transluminátoru (program GeneSnap, SYNGENE) a byl odečten výsledek.

\* TAE pufr (50krát zásobní roztok: 242 g Tris base, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5M EDTA, doplněno dd H<sub>2</sub>O na 1 l, pH upraveno na 8,5)

## 8 Výsledky

### 8.1 Regenerace odrůd ječmene Golden Promise a Atribut v *in vitro* podmínkách

Nezralá zygotická embrya odrůd Golden Promise a Atribut byla izolována postupem uvedeným v metodice (str. 26 - 27). Extirpovaná embrya a z nich odvozené kalusy byly pasážovány ve čtrnáctidenních intervalech na čerstvé kalus indukující (3x), transientní a následně regenerační médium. Obě sledované odrůdy vykazovaly různý stupeň regenerace (tab. 2).

Tab. 2: Regenerace rostlin odrůd Golden Promise a Atribut.

Odrůda	Počet izolovaných embryí	Celkový počet regenerovaných rostlin	Počet regenerovaných rostlin/embryo
Golden Promise	270	486	1,8
Atribut	210	126	0,6
	90	99	1,1

V případě odrůdy Golden Promise z celkového počtu 270 zygotických embryí regenerovalo 486 rostlin. U odrůdy Atribut bylo v první etapě extirpováno 210 nezralých zygotických embryí. Oproti odrůdě Golden Promise odvozené kalusy vytvářely na transientním a následném regeneračním médiu mohutné kořeny na úkor nadzemních částí. Regenerace obou odrůd probíhala ve stejnou dobu a za stejných podmínek.

V druhé etapě bylo extirpováno celkem 90 nezralých zygotických embryí odrůdy Atribut. Regenerace rostlin z kalusů odvozených od těchto embryí probíhala dle stejné metodiky jako první etapa s výjimkou odlišného poměr auxinů a cytokininů (původní BAP nahrazen kinetinem) v transientním médiu (tab. 3). V této etapě regenerovalo 99 rostlin odrůdy Atribut.

Tab. 3: Upravený poměr fytohormonů v transientním médiu.

	auxiny	cytokininy	
	2,4-D	BAP	kinetin
původní médium	2,5 mg l <sup>-1</sup>	0,1 mg l <sup>-1</sup>	-
upravené médium	<b>0,5 mg l<sup>-1</sup></b>	-	<b>1,5 mg l<sup>-1</sup></b>

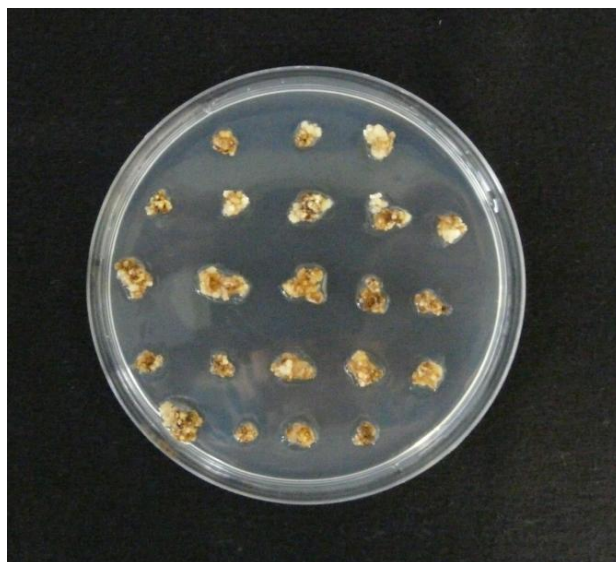


## 8.2 Transformace jarního ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

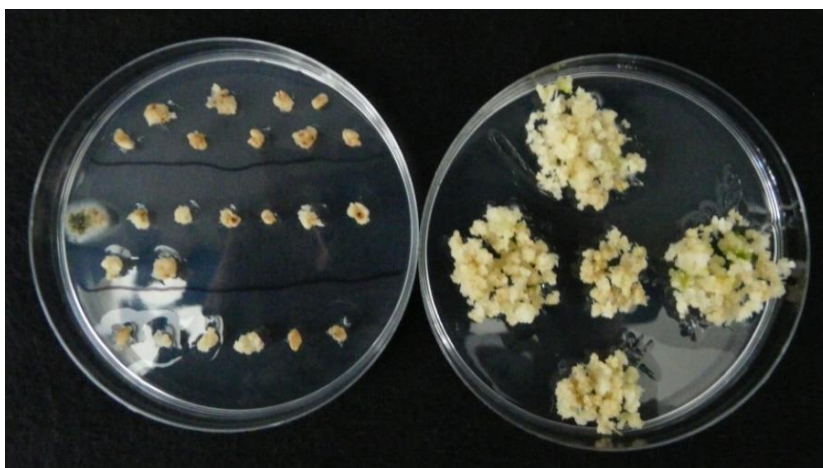
Zygotická embrya odrůd Golden Promise a Atribut byla druhý den po extirpaci transformována upravenými bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* (kmen AGL1) nesoucími plazmidový konstrukt pBract214::sTPdapA a pomocný plazmid pSoup. Pomocí *A. tumefaciens* bylo transformováno celkem 90 extirpovaných embryí odrůdy Golden Promise a 150 embryí odrůdy Atribut (tab. 4). Již po čtrnáctidenní kultivaci byl pozorován výrazný rozdíl mezi indukcí kalusu. U odrůdy Atribut se kalus prakticky netvořil (obr. 13, 14). Z kalusů odvozených od zygotických embryí odrůdy Golden Promise regenerovalo 11 rostlin, v případě odrůdy Atribut neregenerovala žádná rostlina.

Tab. 4: Transformace embryí a regenerace rostlin odrůd Golden Promise a Atribut.

Odrůda	Vektor	Počet transformovaných embryí	Celkový počet regenerovaných rostlin	Počet regenerovaných rostlin/embryo
Golden Promise	pBract214::sTPdapA	90	11	0,12
Atribut	pBract214::sTPdapA	150	0	0



Obr. 13: Transformovaná embrya odrůdy Atribut po čtyřtýdenní kultivaci. (Foto autor)

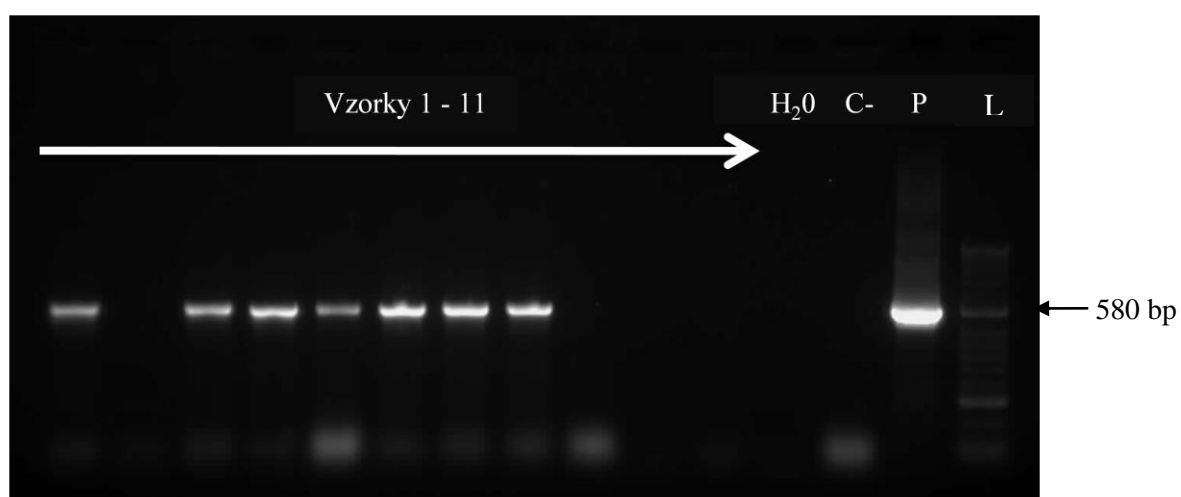


Obr. 14: Srovnání transformovaných a netransformovaných embryí odrůdy Atribut po sedmitýdenní kultivaci. (Foto autor)

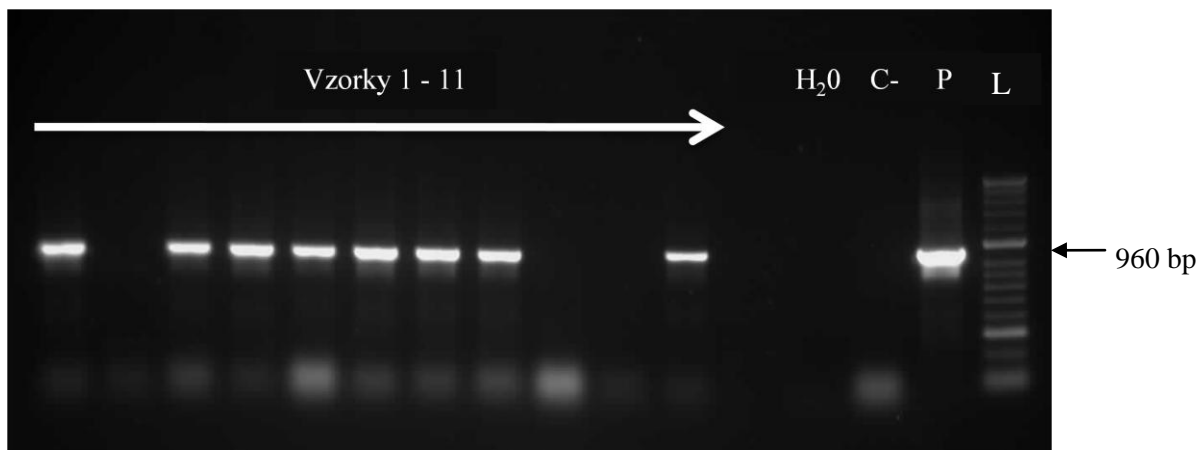
### 8.2.1 Detekce transgenních rostlin

U regenerovaných rostlin odrůdy Golden Promise bylo provedeno testování potencionálně transgenních rostlin na úrovni DNA. Pomocí PCR byla hodnocena přítomnost zájmového genu *dapA* (velikost fragmentu genu byla 580 bp) a selekčního genu *hpt* (velikost fragmentu genu byla 960 bp).

Z 11 analyzovaných rostlin odrůdy Golden Promise 7 rostlin vykazovalo přítomnost transgenu *dapA* (obr. 15) a 8 rostlin vykazovalo přítomnost selekčního genu *hpt* (obr. 16).



Obr. 15: PCR analýza genu *dapA* u regenerovaných rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise. C- (negativní kontrola), P (plazmid, pozitivní kontrola), L (DNA Hyper Ladder II, Bioline).



Obr. 16: PCR analýza selekčního genu *hpt* u regenerovaných rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise. C- (negativní kontrola), P (plazmid, pozitivní kontrola), L (DNA Hyper Ladder II, Bioline).

## 9 Diskuze

Jarní ječmen je po ozimé pšenici druhou nejvýznamnější plodinou v České republice. V současnosti se v našem hospodářství uplatňuje zejména jako krmivo pro monogastriční zvířata. Nízký obsah aminokyselin však limituje nutriční hodnotu ječmene. Cílem této bakalářské práce bylo ověřit indukci kalusu a regenerační kapacitu hospodářsky významné české odrůdy Atribut a zjistit možnost transformace této odrůdy genem *dapA*, jehož exprese vede ke zvýšení obsahu lyzinu v zrna. Na základě publikovaného srovnání výsledků efektivity transformace (Travella a kol., 2005) byla pro mou bakalářskou práci vybrána metoda transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*.

Pro transformaci, indukci kalusů a následnou regeneraci rostlin byla použita nezralá zygotická embrya, která dle Goedeke a kol. (2007) představují nejlepší typ explantátu pro regeneraci rostlin v *in vitro* podmínkách. Odrůda Atribut byla předvybrána na základě předešlého testování indukční a regenerační schopnosti *in vitro* u českých odrůd jarního ječmene popsaného v práci Šerhantové a kol. (2004). Šerhantová a kol. (2004) v rámci svého pokusu získali vyšší počet regenerovaných rostlin na jedno embryo (2,09 u odrůdy Atribut, 2,7 u odrůdy Golden Promise), než bylo získáno v experimentech mé bakalářské práce (1,1 u odrůdy Atribut a 1,8 u odrůdy Golden Promise). Jak je uvedeno v kapitole 5 (Systémy *in vitro*) na indukci kalusu a regeneraci rostlin má vliv více faktorů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je genotyp. Tvorbu kalusu a regeneraci rostlin zcela určitě ovlivňují také podmínky pěstování donorových rostlin, biotické a abiotické stresy během pěstování a v neposlední řadě i roční období, ve kterém jsou rostliny pěstovány. Dle výsledků bakalářské práce je zřejmé, že tyto faktory výrazně ovlivnily počet konečných regenerantů.

Transformací pomocí *Agrobacterium tumefaciens* byl již dříve úspěšně modifikován genom modelové odrůdy Golden Promise (Tingay a kol., 1997; Travella a kol., 2005; Shrawat a kol., 2007; Bartlett a kol., 2008; Hensel a kol., 2009; Harwood a kol., 2009), což potvrzují i výsledky této bakalářské práce. Efektivita transformace u odrůdy Golden Promise, která dosahovala až 86 % (Hensel a kol., 2009) je důležitým faktorem z hlediska základního výzkumu, po zemědělské stránce však odrůda Golden Promise nemá praktický význam.

Extirpovaná zygotická embrya byla inokulována bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, kmenem AGL1. Kmen AGL1 byl úspěšně použit při transformacích ječmene odrůdy Golden Promise popsaných v publikacích Travella a kol. (2005) a Bartlett a kol. (2008). Průměrná efektivita transformace v práci publikované Bartlett a kol. (2008) činila 25 % při použití kmene AGL1 obsahujícího vektory pBract215, pBract216 nebo pBract217.

Výsledky bakalářské práce ukazují, že významnou roli při transformaci prostřednictvím *A. tumefaciens* má odlišná vnímavost jednotlivých odrůd ječmene k infekci. Nejsou známy žádné publikace zabývající se možným toxickým vlivem *A. tumefaciens* na různé odrůdy ječmene. Z výsledků této bakalářské práce vyplývá, že inokulace nezralých zygotických embryí odrůdy Atribut suspenzí *A. tumefaciens* vedla k zastavení indukce kalusu. Oproti inokulovaným embryím, netransformovaná embrya vytvářela kalusy, z nichž byly posléze regenerovány celé rostliny. V případě zygotických embryí odrůdy Golden Promise transformovaných dle stejné metodiky jako embrya odrůdy Atribut byly získány transgenní rostliny v souladu s dosud publikovanými pracemi.

Na základě této bakalářské práce navrhuji zjistit možnost transformace nezralých zygotických embryí odrůdy Atribut pomocí jiného kmene *Agrobacterium tumefaciens*. Jako nejvhodnější volba se jeví kmen LBA4404, prostřednictvím kterého byla v minulosti úspěšně transformována zygotická embrya odrůdy Golden Promise (Shrawat a kol., 2007; Hensel a kol., 2009). Při transformacích popsaných v této bakalářské práci nebyl do kokultivačních médií na základě výsledků Bartlett a kol. (2008) a Harwood a kol. (2009) přidáván acetosyringon. Vzhledem k nepříznivým výsledkům transformace v případě odrůdy Atribut navrhuji v dalších pokusech přidat dle Hensel a kol. (2009) 500  $\mu\text{M}$  acetosyringonu do kokultivačních médií.

Na základě konzultace se šlechtiteli doporučuji pokračovat ve vyhledávání vhodných nových odrůd a novošlechtění, které budou vykazovat dostatečnou, případně srovnatelnou regenerační schopnost jako odrůda Golden Promise. Důležitou součástí experimentů musí být ověření vnímavosti izolovaného pletiva k *A. tumefaciens* a to ke dvěma nepoužívanějším kmenům AGL1 a LBA4404.

## 10 Závěr

V praxi se ke genetickým modifikacím ječmene využívá metoda transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* nebo transformace pomocí mikroprojektilového přenosu DNA. Transformace prostřednictvím *Agrobacterium* vykazuje vyšší transformační efektivitu a vede k zisku většího počtu fertálních transgenních rostlin. Pro genetické transformace jsou nezbytné optimalizované *in vitro* systémy umožňující indukci kalusů a následnou regeneraci transgenních rostlin. Klíčovou roli hraje složení kultivačních médií, zejména obsažené fytohormony (auxiny, cytokininy). Nezralá zygotická embrya jsou nejčastěji používaným typem explantátu pro indukci somatických embryí a kalusů a následnou regeneraci transgenních rostlin u ječmene.

V experimentální části bakalářské práce byla transformována nezralá zygotická embrya dvou odrůd jarního ječmene genem *dapA*. Zygotická embrya modelové odrůdy Golden Promise a předvybrané české odrůdy Atribut byla transformována pomocí *Agrobacterium tumefaciens* dle stejného postupu. Zatímco transformace odrůdy Golden Promise vedla k zisku transgenních rostlin, jejichž pozitivita byla ověřena na úrovni DNA pomocí PCR, transformovaná zygotická embrya odrůdy Atribut téměř nevytvářela kalus a nebyla schopna regenerovat v celistvé rostliny. Ze získaných výsledků vyplývá, že kritickým faktorem při transformaci pomocí *Agrobacterium* je odlišná vnímavost jednotlivých odrůd k infekci.

## 11 Seznam použitých zkratek

2,4-D - kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

*A. tumefaciens* - *Agrobacterium tumefaciens*

BAP - benzylaminopurin

cat. no. - catalog number, katalogové číslo

*dapA* - gen kódující dihydropikolinátsyntázu

ddH<sub>2</sub>O - destilovaná voda

DNA - deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

*E. coli* - *Escherichia coli*

EB pufr - elution buffer, eluční pufr

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová

GMO - geneticky modifikovaný organismus

*gus* - gen kódující  $\beta$ -glukoronidázu

*hpt* - gen kódující hygromycintransferázu

IAA - kyselina indolyl-3-octová

IBA - kyselina indolyl-3-máselná

*kan<sup>r</sup>* - gen kódující neomycin-fosfotransferázu typ II

kb - kilobase, tisíc párů nukleotidů

NAA - kyselina  $\alpha$ -naftyloctová

např. - například

OD - optical density, optická denzita

PCR - polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

SDS - dodecylsírán sodný

TAE pufr - Tris-acetate-EDTA buffer, Tris-acetát-EDTA pufr

T-DNA - transferred DNA, transferová DNA

*Ti* plazmid - tumor inducing plasmid, plazmid vyvolávající nádor

## 12 Seznam použité literatury

- Bartlett, J. G., Alves, S. C., Smedley, M., Snape, J. W., Harwood, W. A. (2008): High throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4.
- Brown, T. A. (2007): Klonování genů a analýza DNA: Úvod, 389 s. Univerzita Palackého, Olomouc, ISBN 978-80-244-1719-6.
- Dahleen, L. S. (1995): Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 267-269.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349.
- Goedeke, S., Hensel, G., Kapusi, E., Gahrtz, M., Kumlehn, J. (2007): Transgenic Barley in Fundamental Research and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal*: 104 - 117.
- Harwood, W. A., Bartlett, J. G., Alves, S. C., Perry, M., Smedley, M. A., Leyland, N., Snape, J. W. (2009): Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. V: Jones, H. D., Shewry, P. R., (ed.): *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*, vol. 478. Humana Press, ISBN 978-1-59745-379-0.
- Harwood, W. A., Smedley, M. A. (2009): Barley transformation using biolistic techniques. V: Jones, H. D., Shewry, P. R., (ed.): *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*, vol. 478. Humana Press, ISBN 978-1-59745-379-0.
- Hensel, G., Kastner, Ch., Oleszczuk, S., Riechen, J., Kumlehn, J. (2009): *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, Triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics* 2009.
- Holm, P. B., Knudsen, S., Mouritzen, P., Negri, D., Olsen, F. L., Roué, C. (1995): Regeneration of the barley zygote in ovule culture. *Sexual Plant Reproduction* 8: 49 - 59.
- Kuhlmann, U., Foroughi-Wehr, B. (1989): Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Reports* 8: 78 - 81.



- Luštinec, J., Žárský, V. (2005): Úvod do fyziologie vyšších rostlin, 261 s.. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-0563-5.
- Mordhorst, A. P., Loerz, H. (1993): Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *Journal of Plant Physiology* 142: 485 - 492.
- Murashige, T., Skooge, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assai with Tobago tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Ondřej, M., Drobník, J. (2002): *Transgenoze rostlin*, 316 s. Academia, Praha, ISBN 80-200-0958-2.
- Pavlová, L. (2005): *Fyziologie rostlin*, 253 s. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-0985-1.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*, 484 s. Academia, Praha, ISBN 80-200-0586-2.
- Shrawat, A. K., Becker, D., Lörz, H. (2007): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 172: 281-290.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2009): *Genetika*, 864 s. Masarykova Univerzita, ISBN 978-80-210-4852-2.
- Šerhantová, V., Ehrenbergerová, J., Ohnoutková, L. (2004): Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. *Plant Soil Environment* 50: 456 - 462.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010): *Plant Physiology, Fifth Edition*, 782 s. Sinauer Associates, Inc., ISBN 978-0-87893-866-7.
- Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettell, R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* 11: 1369-1376.
- Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W., Harwood, W. A. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports* 23: 780-789.
- Vančurová, R., Kühn, F. (1966): *Zemědělská botanika* 3, 437 s. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Wan, Y., Lemaux, P. G. (1994): Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37-48.

- Zhang, S., Cho, M. J., Koprek, T., Yun, R., Bregitzer, P., Lemaux P. G. (1999): Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Reports* 18: 959 - 966.
- Zimolka, J. a kol. (2006): Ječmen - formy a užitkové směry v ČR, 200 s. Profi Press, s. r. o., Praha, ISBN 80-86726-18-5.