

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Příprava konstruktů a transformace ječmene genem ze skupiny ABC transportérů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Iva Petrová

Studijní program:

N1501 Biologie

Studijní obor:

Fyziologie rostlin

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.

Termín odevzdání práce:

2017

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Iva Petrová
Název práce	Příprava konstruktů a transformace ječmene genem ze skupiny ABC transportérů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>ABC transportní proteiny jsou proteiny, které se podílejí na přenosu širokého spektra látek v rostlině. U <i>Arabidopsis thaliana</i> bylo doposud identifikováno 130 těchto transportérů, přibližně stejný počet byl popsán také u rýže. Jedním z posledních identifikovaných a studovaných transportérů, patřící do skupiny White-brown complexu, podskupiny G, je transportér AtWBC19 (původem z <i>Arabidopsis thaliana</i>) odpovědný za rezistenci vůči aminoglykosidovým antibiotikům. U ječmene byly identifikovány čtyři orthologní geny s vysokou homologií k <i>Atwbc19</i>.</p> <p>V rámci diplomové práce byla realizována klonovací strategie pro vnesení jednoho z těchto genů <i>Hvabc4</i> do expresního vektoru, vhodného pro transformaci ječmene. Byla provedena transformace ječmene odrůdy Golden Promise. Dále byla studována jeho selekční schopnost k vybraným aminoglykosidovým antibiotikům.</p>
Klíčová slova	ATP-vazebná kazeta transportéru, gen <i>Atwbc19</i> , transformace, ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>), orthology, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , transgenní rostliny
Počet stran	68
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Iva Petrová
Title of thesis	Preparation of construct and transformation of barley with gene belonging to ABC transporters
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>ABC transport proteins are proteins which take part in the transmission of a wide range of substances in the plant. For <i>Arabidopsis thaliana</i>, 130 of these transporters have been identified so far, which is approximately the same number as for rice. One of the last identified and studied transporters, which belong to the White-brown complex group, subfamily G, is the AtWBC19 transporter (originally from <i>Arabidopsis thaliana</i>) which is responsible for the aminoglycoside antibiotic resistance. Four orthologous genes with high homology to <i>Atwbc19</i> have been identified in barley.</p> <p>In this Master thesis, a cloning strategy was implemented for the insertion of one of these <i>Hvabc4</i> genes into an expression vector suitable for barley transformation. The transformation of spring barley of variety Golden Promise was carried out. Additionally, its selectivity towards aminoglycoside antibiotics was studied.</p>
Keywords	ATP-binding cassette transporter, <i>Atwbc19</i> gene, transformation, barley (<i>Hordeum vulgare</i>), orthologs, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , transgenic plants
Number of pages	68
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

Iva Petrová

Poděkování

Děkuji Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D., za vstřícnost, cenné rady a věcné připomínky při psaní diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Vlčkovi za metodickou pomoc při realizaci experimentů a Otovi Blahouškovi za technickou pomoc.

OBSAH

Seznam použitých zkratké.....	8
1 Úvod a cíle práce	10
1.1 Úvod do problematiky	10
1.2 Cíle práce.....	11
2 Přehled problematiky.....	12
2.1 ABC transportéry.....	12
2.1.1 ABC transportéry <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.1.2 ABCG transportéry v <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.1.3 Gen <i>Atwbc19</i>	19
2.1.3.1 Gen <i>Atwbc19</i> transformovaný do tabáku (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	20
2.1.3.2 Gen <i>Atwbc19</i> transformovaný do melounu (<i>Cucumis melo</i> L.)	21
2.1.3.3 Gen <i>Atwbc19</i> transformovaný do topolu (<i>Populus tremuloides</i> L.)	21
2.2 Orthologní geny.....	22
2.2.1 Orthologní geny pšenice	22
2.2.2 Gen <i>OsCYO1</i> orthologní k <i>AtCYO1</i>	23
2.2.3 Geny rýže důležité pro její respiraci	23
2.2.4 Gen <i>Hd1</i> ortholog k <i>Constans</i>	24
2.2.5 Geny <i>Hordeum vulgare</i> orthologní k <i>Atwbc19</i>	24
2.3 Transformace rostlin	26
2.3.1 Metody transformace	26
2.3.2 Transformace pomocí <i>Agrobacteria tumefaciens</i>	26
2.3.2.1 Kultivace explantátů v <i>in vitro</i> podmínkách.....	29
2.3.3 Geneticky modifikované rostliny	30
2.3.3.1 Selekcce a testování GM rostlin.....	31
2.3.4 Transformace ječmene.....	32
2.3.4.1 Transformace ječmene genem <i>Atwbc19</i>	33
3 Materiál a metody.....	34
3.1 Materiál	34
3.1.1 Biologický materiál	34
3.1.2 Gen <i>Hvabc4</i>	34
3.2 Metody	35
3.2.1 Klonovací strategie.....	35
3.2.1.1 Vložení zájmového genu <i>Hvabc4</i> do donorového vektoru pDonr207 ..	38
3.2.1.2 Transformace <i>Escherichia coli</i> vstupním (expresním) vektorem.....	39
3.2.1.3 Kontrolní restriční analýza	39
3.2.1.4 Linearizace vektoru pDonr207::Hvabc4.....	40

3.2.1.5	Vložení zájmového genu do destinačního vektoru pBract214AS.....	40
3.2.2	Transformace <i>Agrobacteria tumefaciens</i> vektorem pBract214AS::Hvabc4.	42
3.2.3	Transformace rostlinného materiálu	43
3.2.4	Izolace genomové DNA.....	44
3.2.5	Polymerázová řetězová reakce	45
4	Výsledky.....	47
4.1	Indukce kalusů u transgenních a netransgenních embryí.....	47
4.1.1	Indukce kalusů u transgenních embryí	47
4.1.2	Indukce kalusů u netransgenních embryí	48
4.1.3	Regenerace transgenních rostlin.....	49
4.1.3.1	PCR analýza a detekce transgenu	53
4.1.3.2	Závislost účinku selekce k detekovanému genu <i>Hvabc4</i>	54
4.1.4	Regenerace netransgenních rostlin.....	54
5	Diskuze	58
6	Závěr.....	61
	Seznam použité literatury	62

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

35 S promotor	– CaMV 35S promotor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
<i>A. thaliana</i>	– huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>A. tumefaciens</i>	– <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	– kyselina abscisová
ABC transportér	– ATP-vazebná kazeta (ABC) transportéru
AGL1	– kmen bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AOH	– ABC1 homolog (ABC1 homolog)
ATB Gen	– aminoglykosidové antibiotikum geneticin
ATH	– ABC2 homolog (ABC2 homolog)
ATM	– ABC transportér mitochondrie (ABC transporter of the mitochondria)
ATP	– adenosintrifosfát
<i>bar</i>	– reportérový gen - bialaphos resistance
bp	– párů bází
Bt	– rostliny rezistentní vůči hmyzu, vložen gen z <i>Bacillus thuringiensis</i>
CI	– kalus indukční médium
CO	– protein CONSTANS
DH5 α	– kmen bakterie <i>Escherichia coli</i>
DNA	– deoxyribonukleová kyselina
DR	– protein disulfid reduktasa
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
GM	– genetické modifikování
<i>gus</i>	– reportérový beta-glucuronidasový gen
<i>HindIII, NcoI, PstI, SacI</i>	– restrikční enzymy
<i>hpt</i>	– gen kódující hygromycin fosfotransferasu
HT	– rostliny tolerantní k herbicidu (herbicide tolerance)
<i>Hvabc4</i>	– zájmový nasyntetizovaný gen – v databázi označen AK_363603 (MLOC_66404.1)
Hyg	– antibiotikum hygromycin
Kan	– aminoglykosidové antibiotikum kanamycin
Kontrolní C- embrya	– netransformovaná kontrolní embrya
Kontrolní C embrya	– transformovaná kontrolní embrya bez selekce
LB	– Lennox-Broth, médium pro kultivaci bakterií

MDR	– homolog multirezistence (multidrug resistance)
MRP	– asociovaný protein mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance-associated protein)
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
NAP	– speciální ABC protein (non-intrinsic ABC protein)
NBD	– nukleotid vázající doména ABC transportéru (nucleotide-binding domain)
NBF	– nukleotid vázající záhyb (nucleotide-binding fold)
Neo	– aminoglykosidové antibiotikum neomycin
<i>nptII</i>	– gen pro enzym neomycin fosfotransferasu II
P. miska	– Petriho miska
pBract214AS, pDonr207, pSoup	– názvy plazmidů/vektorů
PCR	– polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pDNA	– plazmidová DNA
P	– pravděpodobnost
PDR	– homolog pleiotropní lékové rezistence (pleiotropic drug resistance)
PMP	– peroxisomální membránový protein (peroxisomal membrane protein)
Primer F	– přední (forward) primer
Primer R	– obrácený (reverse) primer
Rif	– baktericidní antibiotikum rifampicin
RM	– regenerační médium
SD	– směrodatná odchylka
TAP	– transportér spojený s antigením zpracováním homologů (transporter associated with antigen processing)
T-DNA	– transferová DNA (transferred DNA)
Tet	– bakteriostatické antibiotikum tetracyklin
Tim	– antibiotikum Timentin
Ti-plazmid	– plazmid vyvolávající nádor (tumor inducing plasmid)
TM	– přechodné (transientní) médium
TMD	– transmembránová doména ABC transportéru (transmembrane domain)
Ubi promotor	– ubiquitinový promotor
WBC	– bílo hnědé komplexy homologů (white-brown complex homolog)

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

1.1 Úvod do problematiky

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednou z nejstarších a nejvýznamnějších zemědělských plodin. Podle počtu osevních ploch je v současné době čtvrtou nejrozšířenější obilovinou na Zemi a druhou nejdůležitější pěstovanou obilovinou v ČR. V dnešní době se ječmen využívá hlavně v zemědělství jako velmi kvalitní jadrné krmivo pro monogastrická zvířata (Zimolka a kol., 2006). Nejvyšší část produkce (zejména jarní ječmen) se používá ve sladovnictví při výrobě piva. Důležitou surovinou je i v průmyslu při výrobě detergentů, lihu, škrobu a přípravků pro farmaceutický a kosmetický průmysl.

Vzhledem k předpokládanému růstu populace na Zemi (v roce 2050 teoretický nárůst na devět miliard, Matsuda a kol., 2016) se navyšují požadavky na produkci potravin, zejména obilovin. Modifikace ječmene je jednou z možností, jak docílit zvýšených výnosů, zlepšení nutričních hodnot a jak dosáhnout lepší odolnosti rostliny vůči chorobám, škůdcům a patogenům. Šlechtitelé se také snaží zároveň snížit nároky rostlin na pěstování, na vodu, zejména z důvodu klimatických změn.

Proces šlechtění rostlin může být zefektivněn používáním metod genetického inženýrství. Pomocí rekombinantní technologie, transformace jsou do genomu rostliny cíleně vnášeny geny metabolických drah pocházející z různých organismů. Geneticky modifikované rostliny obsahující zájmové geny, se vyznačují novými žádanými vlastnostmi.

Nedílnou součástí expresních vektorů používaných pro vnášení zájmových genů jsou selekční geny (markery), které umožňují přednostní růst transgenního kalusu a následnou regeneraci rostlin. V současné době jsou všechny selekční geny bakteriálního původu. Nejpoužívanější z nich je gen kódující enzym neomycin fosfotransferasu II (*nptII*), který poskytuje rostlině rezistenci na aminoglykosidová antibiotika, např. kanamycin. Používání selekčních genů bakteriálního původu je z hlediska laické veřejnosti a ekologických aktivistů kritizováno. Důvodem jsou obavy z horizontálního šíření genů vykazující rezistenci k antibiotikům, obavy o lidské zdraví či životní prostředí.

V roce 2005 byl v genomu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* odrůdy Columbia identifikován gen *Atwbc19*, jehož protein u dvouděložných rostlin vykazuje rezistenci k aminoglykosidovému antibiotiku (kanamycinu). Předpokládá se, že by tento gen mohl v budoucnu nahradit bakteriální selekční geny.

V genomu ječmene se vyskytují specifické ATP-vazebné kazety transportérů (ABC transportérů), které mohou být orthologní ke genu *Atwbc19*. ABC transportéry jsou proteiny prostupující membránou buněk a plní různou transportní funkci. Exprese a funkce genů ABC transportérů je zkoumána u různých druhů rostlin pomocí metod molekulární biologie.

1.2 Cíle práce

Mezi cíle diplomové práce patří:

- vypracovat literární rešerši zaměřenou na ABC rostlinné transportéry
- naklonovat zájmový gen *Hvabc4* do expresního vektoru pBract214AS
- realizovat navrženou klonovací strategii, transformovat jarní ječmen odrůd Golden Promise pomocí *Agrobacteria tumefaciens*
- ověřit funkčnost genu integrovaného do genomu ječmene na selekčních médiích obsahujících antibiotika (geneticin a neomycin) ve dvou různých koncentracích
- pomocí PCR ověřit přítomnost transgenů.

2 PŘEHLED PROBLEMATIKY

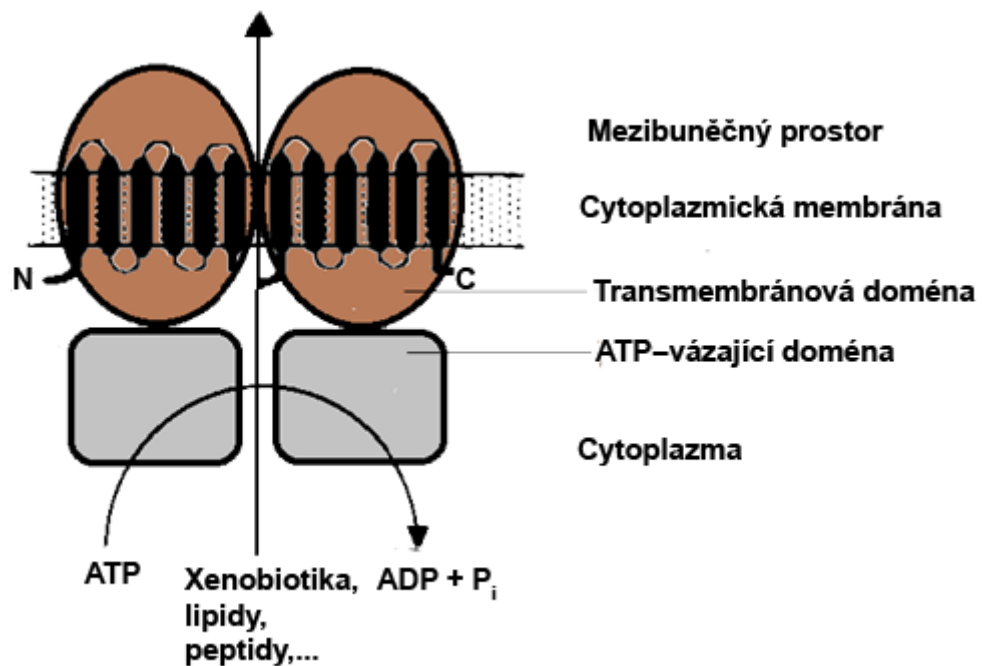
2.1 ABC transportéry

ATP-vazebné kazety transportérů (ABC transportéry) jsou transmembránové proteiny nacházející se v celé řadě živých organismů (Higgins, 1992; Rea, 2007; Kang a kol., 2011). Účastní se vazby a poté i aktivního transportu různých látek a substrátů přes biologické membrány s využitím energie z hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP) vlivem změny konformace proteinu. Každý ABC transportér je relativně specifický pro daný substrát. Charakterizovány byly ABC transportéry typické pro aminokyseliny, cukry, anorganické ionty, polysacharidy, peptidy a proteiny. Některé ABC transportéry fungují jako dopravní systémy (import) a hromadí substrát v buňce, zatímco jiné přepravují substrát z buňky (export). Doposud nebyl identifikován ABC transportér pro čerpání substrátů v obou směrech.

Rostlinná buňka je velmi bohatá na ABC proteiny. V rostlinách se nachází více jak sto ABC proteinů, což je vyšší počet než u jiných organismů (Kang a kol., 2011). Vyskytují se v různých membránách: v plazmatické membráně, membránách chloroplastů, mitochondrií, peroxizomů i tonoplastu vakuoly. Jejich možnou funkcí je regulace iontových kanálů nebo funkce ATP dependentní pumpy (Higgins, 1992). Dodnes ovšem nejsou všechny ABC transportéry zcela prozkoumány.

Původně byl těmto transportérům přisuzován pouze přenos toxických látek přes buněčné membrány, tedy funkce detoxikace buňky (Rea, 2007). Později byly objeveny i další důležité funkce, kterých se v rostlinné buňce účastní: polárního transportu auxinu, importu alkaloidů, tkáňové pigmentaci, regulaci průduchů, odolnosti proti chorobám, lipidového katabolismu, odolnosti vůči antibiotikům, transportu kovů, akumulaci fytátu v semenech, transportu hormonů a kyseliny abscisové (ABA). Jedná se tedy o funkce důležité pro růst orgánů, výživu a vývoj rostliny, poskytující odpověď na abiotický stres, zajišťující odolnost proti patogenům a sloužící k interakci s prostředím (Kang a kol., 2011). Pravděpodobná funkce těchto transportérů se dá u rostlin předpovědět na základě jejich podčeledi, ovšem existuje mnoho těch jejichž funkce se od předpokladů liší (Rea, 2007).

ABC transportéry se skládají ze čtyř hlavních proteinových podjednotek; dvou transmembránových domén ve formě několika hydrofobních 4 - 6 α -helix šroubovic (TMD, transmembrane domains), lokalizovaných v membráně, a dvou periferních vysoce konzervativních nukleotid vázajících domén (NBD, nucleotide-binding domains), nacházejících se v cytoplasmě (Higgins, 1992; Matsuda a kol., 2016). Tyto domény se spolupodílí na aktivním transportu a hydrolýze ATP (Obr. 1). Zatímco TMD je odpovědná za vazbu a dopravu látek, důležitost NBD spočívá v hromadění energie z hydrolýzy ATP a v konformační změně TMD.



Obr. 1. Struktura typického ABC transportéru. Transportér je složený ze dvou transmembránových domén (každá složena ze šesti ve smyčkách složených α -helix hydrofobních sekvencí) vázajících se v membráně a dvou ATP, (nukleotid) vazebných domén, tedy nukleotid vázajících domén umístěných v cytoplazmě. Export látek je umožněn hydrolýzou ATP (upraveno podle Higgins, 1992).

U některých organismů může mít ABC transportér více domén, které slouží k regulaci či k jiným specifickým funkcím (Higgins, 1992; Rea, 2007). Některé transportéry obsahují místo NBD nukleotid vázající záhyby (NBF, nucleotide-binding folds), které zahrnují přibližně dvě stě zbytků aminokyselin a obsahují tři definující sekvenční motivy aminokyselin. Jedná se o dva krátké motivy Walker A box (GX₄GK[ST]), Walker B box ((hydrofobní)₄[DE]) a o ABC motiv umístěný mezi dvěma Walker poli. ABC motiv bývá také často označován jako C ([LIVMFY]S[SG]G₃[RKA][LIVMYA]-X[LIVFM][AG], znám spíše pod názvem LSSG). Samotné sestavení těchto motivů se liší u daných variant ABC transportérů.

Rostlinné ABC proteiny jsou rozděleny do 13 skupin na základě velikosti proteinu (plná, full a polovina, half nebo čtvrtina, quarter molekula), orientace (vpřed, forward nebo vzad, reverse), přítomnosti či nepřítomnosti charakteristické transmembránové oblasti, nebo spojovací oblasti a celkové sekvenční podobnosti (S'anches-Fern'andez a kol., 2001).

Rea (2007) popisuje různé typy transportérů. Full-transportéry jsou dohromady spojeny čtyřmi doménami polypeptidů, dvěma TMD a dvěma NBD. Patří sem homology multirezistence (MDR, multidrug resistance), asociované proteiny mnohočetné lékové rezistence (MRP, multidrug resistance-associated protein), homology pleiotropní lékové

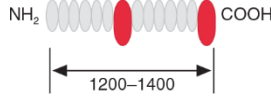
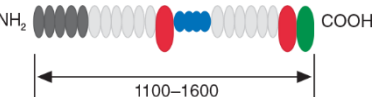
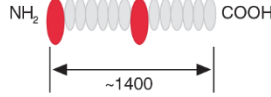
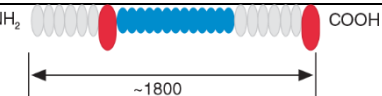
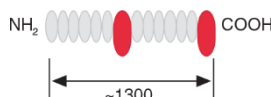
rezistence (PDR, pleiotropic drug resistance), peroxisomální membránové proteiny (PMP, peroxisomal membrane protein) a homolog ABC1 (AOH, ABC1 homolog).

Dalším typem transportéru je half-transportér. Half-transportéry se spojují do polypeptidu pouze dvěma doménami, jednou TMD a jednou NBD (Verrier a kol., 2008). Pro správnou funkci pumpy musí tvořit homodimery nebo heterodimery (Rea, 2007). Patří sem bílo-hnědé komplexy homologů (WBC, white-brown complex homolog), ABC2 homology (ATH, ABC2 homolog), ABC transportéry mitochondrií (ATM, ABC transporter of the mitochondria) a transportér spojený s antigenním zpracováním homologů (TAP, transporter associated with antigen processing), speciální ABC proteiny (NAP, non-intrinsic ABC protein).

Posledním typem transportéru, který popisuje Rea (2007), je quarter-transportér, což je kvartérní protein. Nejčastěji se nachází v bakteriích.

Pro membránové a transportní proteiny byl vytvořen klasifikační multipodjednotkový systém, zahrnující údaje o třídě transportéru, substrátové specifitě a fylogenezi (Tab. 1; 2). Skládá se z 56 prokaryotických a 11 eukaryotických podjednotek (S'anches-Fern'andez a kol., 2001).

Tab. 1. Organizace domén ABC full-transportérů do skupin. Jsou uvedeny i příklady zástupců, u kterých byla určena lokalizace a funkce v rostlinné buňce. Jednotlivé oblasti domény jsou barevně označeny takto: červeně NBF 1 a 2, tmavě šedě TMD, světle šedě TMD 1 a 2, modře linker (L) doména, zeleně C-koncové prodloužení (upraveno podle S'anches-Fern'andez a kol., 2001; Rea, 2007)

Skupina	Doména	Protein	Lokalizace	Funkce / Aktivita
MDR Homolog multirezistence (Multidrug resistance)		AtPGP1	Plazmatická membrána	Export auxinu
		AtMDR1	Plazmatická membrána	Export auxinu
		AtPGP4	Plazmatická membrána	Export auxinu
		BR2	Plazmatická membrána	Export auxinu
		DWF3	Plazmatická membrána	Export auxinu
		CjMDR1	Plazmatická membrána	Import berberinu
MRD Asociovaný protein mnohočetné lékové rezistence (Multidrug resistance- associated protein)		AtMRP1	Membrána vakuoly	Transport GS-konjugátů, glukuronidu a kyseliny listové
		AtMRP2	Membrána vakuoly	Transport GS-konjugátů glukuronidu a katabolitů chlorofylu
		AtMRP3	Membrána vakuoly	Transport GS-konjugátů a katabolitů chlorofylu
		AtMRP4	Plazmatická membrána	Transport GS-konjugátů, kyseliny listové; regulace průduchů
		AtMRP5	Plazmatická membrána	Regulace průduchů
		ZmMRP3	Membrána vakuoly	Transport antokyanů
		ZmMRP4	Membrána vakuoly	Transport antokyanů
PDR Homolog pleiotropní lékové rezistence (Pleiotropic drug resistance)		AtPDR12	Neznámá	Tolerance k olovu
		NpPDR1	Plazmatická membrána	Export sclareolu a odolnost vůči <i>Botrytis cinerea</i>
		SpTUR2	Plazmatická membrána	Export sclareolu
AOH Homolog ABC1 (ABC1 homolog)		AtAOH1	Neznámá	Neznámá
PMP Peroxisomální membránový protein (Peroxisomal membrane protein)		AtPMP2	Membrána peroxisomu	Peroxisomální vychytávání kyseliny indolylmásečné, 2,4- dichlorfenoxyoctové, LCFA A jejich LCF, Acyl koenzymu A; biosyntéza kyseliny jasonové; klíčení semen

Tab. 2. Organizace domén ABC half-transportérů do skupin. Jsou uvedeny i příklady zástupců, u kterých byla určena lokalizace a funkce v rostlinné buňce. Jednotlivé oblasti domény jsou barevně označeny takto: červeně NBF 1 a 2, světle šedě TMD 1 a 2, žlutě amphipatický signální peptid N-konce (upraveno podle S'anches-Fern'andez a kol., 2001; Rea, 2007)

Skupina	Doména	Protein	Lokalizace	Funkce / Aktivita
WBC Bílo hnědé komplexy homologů (White-brown complex homolog)		AtWBC12 AtWBC19 GhWBC1 NtWBC1	Plazmatická membrána Membrána vakuoly Plazmatická membrána Neznámá	Depozice epidermálních vosků Rezistenci vůči kanamycinu Zrání vláknů bavlny Export lipidů
ATH ABC2 homolog (ABC2 homolog)		AtATH OsATH	Neznámá Neznámá	Neznámá Neznámá
ATM ABC transportér mitochondrie (ABC transporter of the mitochondria)		AtATM1 AtATM2 AtATM3 CrCDS1	Mitochondrie Inkluze Mitochondrie Mitochondrie	Mitochondriální export Fe/S klastrů Neznámá Mitochondriální vývoz Fe/S klastrů; tolerance ke kadmii a olovu Mitochondriální vývoz Fe/S klastrů; tolerance ke kadmii
TAP Transportér spojený s antigenním zpracováním homologů (Transporter associated with antigen processing)		AtTAP1 AtTAP2	Inkluze Inkluze	Neznámá Neznámá
NAP Speciální ABC protein (Non-intrinsic ABC protein)		AtNAP1 AtNAP6 AtNAP7	Plastidy Plastidy Plastidy	Údržba Fe/S klastrů a reakce na far red světlo Údržba Fe/S klastrů; embryogeneze Údržba Fe/S klastrů; embryogeneze

2.1.1 ABC transportéry *Arabidopsis thaliana*

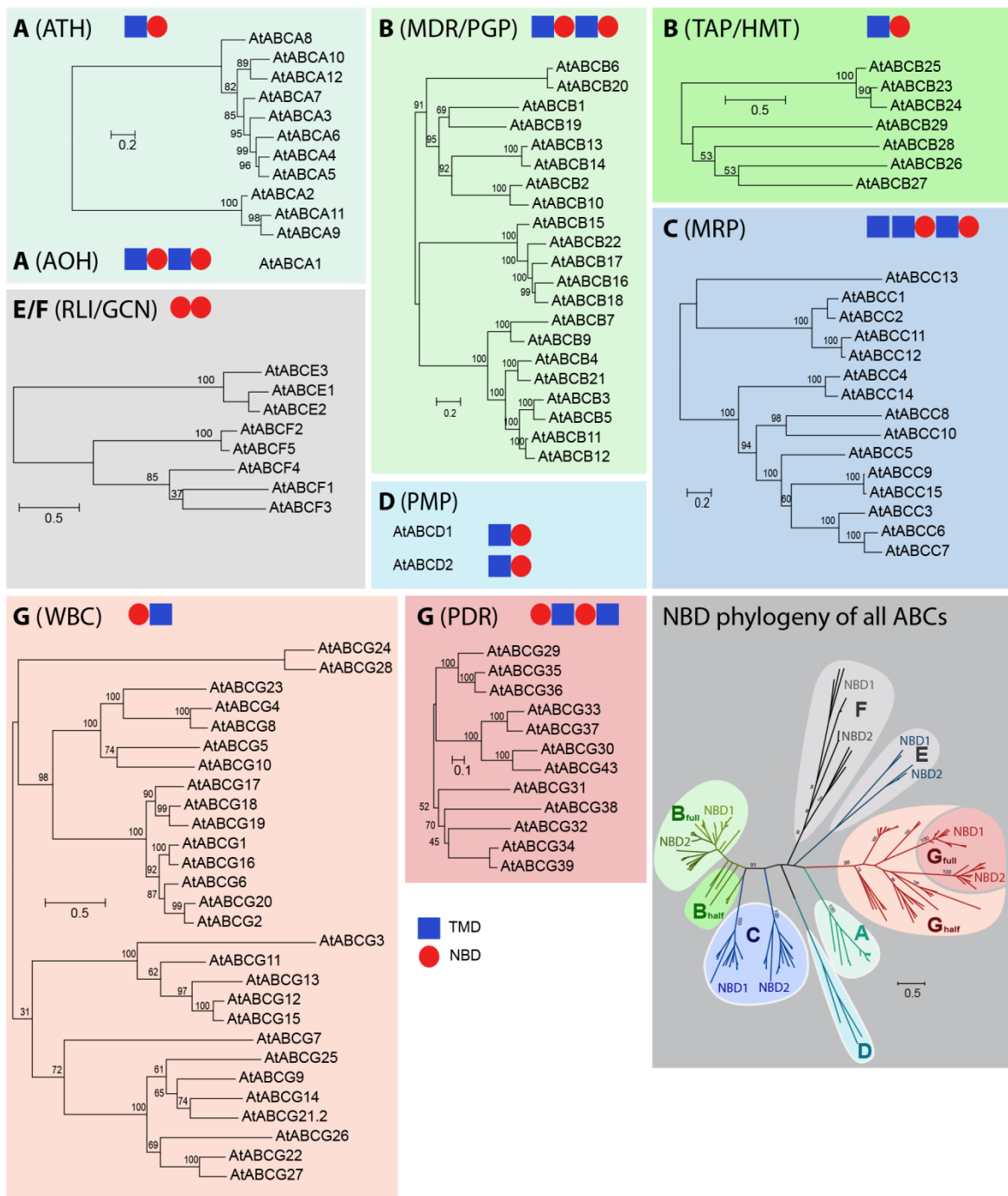
Funkce ABC transportérů je nejčastěji studována u modelové rostliny huseníčku rolního, v práci bude používán latinský název *Arabidopsis thaliana* L. (*A. thaliana*). Mnoho podobných proteinů bylo ovšem identifikováno i v rýži (*Oryza sativa*), (Rea, 2007; Matsuda, 2016).

V genomu rostliny *A. thaliana* bylo nalezeno po dokončení genomového sekvenování 130 ABC transportérů (o velikosti 250-1800 aminokyselin), ale pouze 22 bylo funkčně analyzováno (S'anches-Fern'andez a kol., 2001; Kang a kol., 2011). Pro ABC transportéry v rostlinách byl vytvořen jednoduchý identifikátor, kde jsou proteiny podle sestavení a funkce zařazeny do osmi hlavních podskupin (A-H), (Verrier a kol., 2008).

Verrier a kol. (2008) popsali stylizaci názvů ABC proteinů. ABC proteiny jsou složeny minimálně ze tří složek, např. protein AtABCB6: Nejprve je označen druh organismu, kde byl protein identifikován (At značí *Arabidopsis thaliana*), dále je přiřazena zkratka podskupiny, kam je daný protein přiřazen (ABCB) a naposled je dopsáno číslo podle pořadí genu, v podskupině v tomto případě 6.

Transportéry podskupiny A, doposud nebyly v rostlinách charakterizovány (Kang a kol., 2011). Do podskupiny B byly zařazeny proteiny lokalizované na plazmatické membráně, v membráně mitochondrií, některé i v membránách chloroplastů a vakuol. Transportéry této podskupiny jsou důležité pro transport fytohormonu auxinu, sekundárních metabolitů a cizorodých látek, např. mitochondriální AtABCB25 (AtATM3/STA1) zajišťuje export železa, síry a toleranci ke kadmiumu a olovu, AtABCB27 (AtTAP2) zajišťuje odolnost proti hliníku atd. Podskupina C transportérů je u *A. thaliana* aktivní při přepravě sloučenin do vakuoly, např. AtABCC1 (AtMRP1) a AtABCC4, AtABCC5 hrají klíčovou roli v regulaci iontových kanálů. AtABCC proteiny mohou také přispět k toleranci vůči těžkým kovům (kadmium, rtuť). Do podskupiny D patří např. membránový protein peroxisomů AtABCD1 (AtPMP2), který je důležitý při β -oxidaci. Proteiny podskupiny E a F zřejmě nejsou přímo zapojeny do transportních jevů, podílejí se na potlačení umlčování RNA. Podskupina G je v rostlinách nejvýznamnější a nejrozšířenější (viz následující kapitola). Proteiny H podskupiny nebyly u rostlin doposud objeveny.

Podskupiny ABCA až ABCD proteinů se skládají z různých částí, mají tzv. přední organizaci domény TMD-NBD, zatímco ABCG se vyznačují organizací vzad NBD-TMD (Obr. 2). Podskupina ABCE a ABCF proteinů se skládá pouze ze dvou NBD (Verrier a kol., 2008). Společným rysem těchto proteinů je ABC motiv a Walker A a B motivy (Rea, 2007).



Obř. 2. Identifikátor podskupin ABC transportřřů pro rostlinu *Arabidopsis thaliana* (převzato z Kang a kol., 2011).

2.1.2 ABCG transportřřy v *Arabidopsis thaliana*

U *Arabidopsis thaliana* je nejvřznamnřjší podskupinou ABCG, která obsahuje 28 half-proteinů (WBC) a 15 full proteinů (PDR), (Verrier a kol., 2008). Bylo zjiřtřeno, ře ABCG proteiny jsou dřležitě pro transport ABA (Rea, 2007) a regulaci prřduchů. Jednř se napřříklad o AtABCG22 (AtWBC23), AtABCG25 (AtWBC26), AtABCG40 (AtPDR12), (Kang a kol., 2011).

Protein AtABCG36 (AtPDR8/PEN3) způsobuje v rostlinách rezistenci vůči kadmiu. Transportér přepravuje Cd^{2+} ionty z cytozolu buňky do apoplastu, a dále do kořenů (Kim a kol., 2007). Tento protein se také podílí na intracelulární obraně buněčné stěny rostlin vůči patogenům (Stein a kol., 2006; Clay a kol., 2009). Protein má tedy zásadní funkci při biotickém i abiotickém stresu.

Protein AtABCG40 (AtPDR12) zvyšuje toleranci vůči olovu a podílí se na detoxikaci organismu tímto prvkem (Lee a kol., 2005). Není ovšem objasněno, zda je tolerance k olovu způsobena primárně transportem iontů olova či zda jde o sekundární efekt transportu ABA.

AtABCG11 (AtWBC11), AtABCG12 (CER5), AtABCG13 a AtABCG32 (PEC1) proteiny dopravují prekurzory lipidů na povrch epidermálních buněk rostlin a tvoří vrstvu kutikuly, AtABCG13 se nachází především u okvětních lístků a pestíku rostlin (McFarlane a kol., 2010). AtABCG26 protein se podílí na transportu sporopoleninu pro tvorbu exiny (vnějšího obalu) pylových zrn.

Nadměrná exprese proteinu AtABCG37 (AtPDR9) zvyšuje toleranci rostliny vůči syntetickým sloučeninám auxinu, např. 2,4-dichlorfenoxycetové kyselině, která se používá jako herbicid (Růžička a kol., 2010). Jiné ABCG transportéry pozitivně reagují na kyselinu jasmonovou nebo kyselinu salicylovou, které jsou zapojeny do biotických stresových reakcí a podílejí se na obraně proti patogenům či mikroorganismům.

Do ABCG podskupiny patří také AtABCG19 (AtWBC19) protein, který při nadměrné expresi v transgenních rostlinách způsobuje rezistenci vůči kanamycinu (Kan), (Burris a kol., 2008).

2.1.3 Gen *Atwbc19*

V současné době je v procesu transgenoze dvouděložných rostlin nejvíce používán selekční marker *nptII*, který vykazuje rezistenci ke Kan. Kanamycin je antibiotikum, izolované z půdní bakterie *Streptomyces kanamyceticus*. V prokaryotických i eukaryotických buňkách inhibuje syntézu bílkovin (Kang a kol., 2010). Buňky transformované genem *nptII* a kultivované na médiích s antibiotikem dobře proliferují a regenerují. Netransgenní buňky jsou na médiích inhibovány. Conte a Lloyd (2010) publikovali, že při kultivaci rostlin na médiu s vyšší koncentrací kanamycinu (více jak $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) dochází k inhibici syntézy chlorofylu a rostliny jsou albinózní.

Funkce ABC transportéru AtWBC19, pocházejícího z *A. thaliana* je od roku 2005 systematicky studována u různých druhů rostlin. Velikost genu *Atwbc19* je 2178 párů bází (bp), (Mentewab a Stewart, 2005).

Gen *Atwbc19* byl úspěšně transformován do tabáku. Transgenní rostliny generace T0 a T1 vykazovaly rezistenci k antibiotiku kanamycinu (Mentewab a Stewart, 2005). Gen

Atwbc19 poskytuje odolnost také vůči kaamycinu u melounu (Bombale a kol., 2010). Kang a kol. (2010) vložili gen *Atwbc19* do genomu hybridního topolu. Ve svých experimentech prokázali rezistenci na další tři aminoglykosidová antibiotika (neomycin (Neo), geneticin (Gen) a paromomycin). V závěru práce autoři doporučují gen *Atwbc19* použít jako alternativní selekční marker při transformaci dvouděložných rostlin (sójového bobu, bavlníku, rajčat).

Burris a kol. (2008) zjistili, že bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) po transformaci genem *Atwbc19*, místo *nptII* ztrácí rezistenci k vyšším koncentracím, než je Kan 10 mg·l⁻¹.

Mentewab a kol. (2014) studovali reakci rostlin mutanta *wbc19*, který byl pěstovaný v *in vitro* podmínkách na médiích s Kan 50 mg·l⁻¹. Během růstu srovnávali obsah kovů u mutantů a u kontrolních rostlin. Expozice antibiotika vyvolala změnu ve fotosyntetickém aparátu, metabolismu a v absorpci kovů. Výsledky ukázaly snížení absorpce železa o 60 % u kontrol a o 80 % u mutantů. U transgenních rostlin se zvýšenou expresí genu *Atwbc19* lze předpokládat zvýšenou toleranci vůči abiotickým stresům, nebo zvýšenou toleranci k houbovým chorobám.

Na základě publikovaných výsledků může být gen *Atwbc19* využit jako spolehlivý rostlinný selekční marker. Využívání bakteriálních selekčních markerů může způsobovat tzv. horizontální přenos bakteriálního genu a mohl by tak vyvolat i rezistenci na antibiotika.

2.1.3.1 Gen *Atwbc19* transformovaný do tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)

Mentewab a Stewart (2005) potvrdili expresi genu *Atwbc19* do tabáku (*Nicotiana tabacum* L. odrůdy Xanthi). Transformovali listové disky tabáku připravenými třemi expresními vektory: pNPT s genem *nptII*, pABC s *Atwbc19*, pNPT společně s pABC. Všechny zájmové geny byly pod CaMV 35S promotorem (35 S promotor, *Cauliflower mosaic virus*). Součástí vektoru byl také reportérový beta-glucuronidasový gen (*gus*). Listové disky tabáku byly transformovány pomocí *Agrobacteria tumefaciens* (*A. tumefaciens*). Selekcce a regenerace rostlin probíhala na médiích s antibiotikem Kan 50, 100, 200 mg·l⁻¹. U rostlin s vloženým genem *Atwbc19* byla při koncentraci Kan 100 mg·l⁻¹ účinnost selekcce srovnatelná s účinností bakteriálního genu *nptII* při koncentraci Kan 200 mg·l⁻¹. Pokud byly do genomu rostliny vloženy oba geny (*Atwbc19* a *nptII*) rostliny vykazovaly rezistenci při koncentraci 200 mg·l⁻¹.

U transgenních rostlin byla exprese reportérového genu *gus* potvrzena histochemickou reakcí, provedena Southern a Northern blot analýzou. Testy T1 generace ukázaly, že pouze transgenní rostliny přirozeně kořenily na médiu s Kan, kořeny netransgenních rostlin byly bledé, zakrnělé, případně již odumřelé.

2.1.3.2 Gen *Atwbc19* transformovaný do melounu (*Cucumis melo* L.)

Bombale a kol. (2010) transformovali genem *Atwbc19* zygotická embrya melounu cukrového (*Cucumis melo* L.) tří odrůd (Eden Gem, Punjab Sunheri a Hara Madhu). Pro transformaci byl opět použit vektor pABC, kde byl gen *Atwbc19* pod kontrolou 35S promotoru, součástí expresního vektoru byl i reportérový gen *gus*. Transformace byla provedena pomocí *A. tumefaciens* a pomocí mikroprojektilového přenosu DNA. Po transformaci se zygotická embrya kultivovala na médiu s Kan 80, 100, 150, 200 mg·l⁻¹. Počet regenerovaných rostlin se na médiích s různými koncentracemi se kanamycin značně lišil. Optimální koncentrace pro cukrový meloun byla Kan 100 mg·l⁻¹. Vyšší transformační účinnost byla u mikroprojektilového přenosu DNA (91%) než u transformace *Agrobacteriem* (20%). Přítomnost genu *Atwbc19* (velikost 2,18 kb) v rostlinách byla potvrzena analýzou polymerázové řetězové reakce (PCR). Bylo potvrzeno, že transgen *Atwbc19* vykazuje rezistenci ke kanamycinu i u cukrového melounu.

2.1.3.3 Gen *Atwbc19* transformovaný do topolu (*Populus tremuloides* L.)

Kang a kol. (2010) transformovali topol (*Populus canescens* a *Populus grandidentata*) genem *Atwbc19* a *nptII*. Geny byly vloženy do plazmidů pod 35S promotor, obdobně jako v práci Mentewab a Stewart (2005) pABC a pNPT. Cílem bylo ověřit funkci genu *Atwbc19* u dřevin. Selektce transformovaných listových segmentů probíhala na médiích s Kan 80 mg·l⁻¹, regenerované rostliny byly selektovány na médiu o koncentraci 100 mg·l⁻¹ kanamycinu. Transgenní rostliny, které osahovaly transgeny *Atwbc19* nebo *nptII* vykazovaly podobnou schopnost regenerace. Přítomnost transgenů byla ověřena PCR analýzou. Pro kontrolu účinku selekce byly listové segmenty transgenních rostlin opakovaně kultivovány v *in vitro* podmínkách na médiích s různými koncentracemi antibiotik: Kan (0; 50; 100; 150; 200 mg·l⁻¹), Neo (0; 50; 100; 200; 400 mg·l⁻¹), Gen (0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 mg·l⁻¹) a paromomycin (0; 50; 100; 200; 400 mg·l⁻¹). Na rozdíl od transgenního tabáku, který byl rezistentní pouze ke kanamycinu (Mentewab a Stewart, 2005), transgenní topol s genem *Atwbc19* vykazoval rezistenci vůči třem dalším aminoglykosidovým antibiotikům (neomycinu, geneticinu a paromomycinu). Předpokládá se, že transportér se nachází v tonoplastu, odstraňuje kanamycin z cytosolu a je ukládán do vakuoly (Kang a kol., 2010). Mentewab a Stewart (2005) ovšem zjistili, že gen *Atwbc19* tvoří homodimerní nebo heterodimerní komplex s dalšími half ABC transportéry. Zdá se tedy, že AtWBC19 v transgenních rostlinách topolu (*Populus tremuloides*) tvoří heterodimer s endogenním half-transportérem, který by mohl teoreticky odpovídat za rezistenci i vůči více antibiotikům (Kang a kol., 2010).

2.2 Orthologní geny

Orthologní geny (orthology) jsou geny dvou různých organismů, které mají velmi podobnou či dokonce stejnou biologickou funkci (Fitch, 1970; Fitch, 2000). Tyto geny pocházejí pravděpodobně z jediného genu společného předka. Modelové organismy, jejichž genom je velmi dobře prostudován, umožňují srovnání biologické funkce genů u ostatních organismů (Remm a kol., 2001).

V současné době je k dispozici velký počet genomových sekvencí mnoha rostlin, což umožňuje snadnou identifikaci homologních genů (Patel a kol., 2012). Orthologní identifikace genu napříč různými druhy je stále obtížná, i když ji lze předvídat podle úrovně podobnosti genové exprese. Identifikace daného orthologu může být ztížena různými událostmi v evoluční historii druhu.

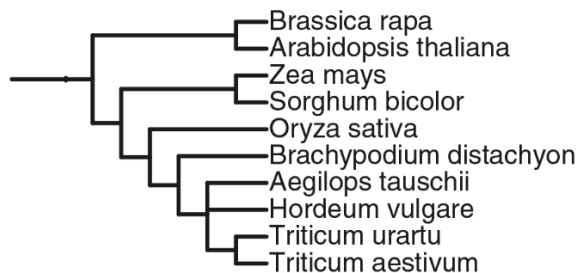
Pro nalezení orthologu jsou používány různé metody (Kuzniar a kol., 2008). Mezi ně patří například metoda založená na grafu (např. OrthoMCL, InParanoid, Ortholuge), využívající sekvenční podobnosti druhů rostlin z uložených databází. Dále je také používána metoda na bázi fylogenetického stromu (např. Orthostrapper a RIO) využívající přímé evoluční modely a z kterých se odvodí pravděpodobné orthology. Liang a kol. (2008) publikovali databázi Phytozome, Gramene pro vyhledávání orthologních genů. V současné době existuje i řada dalších on-line databází, některé z nich jsou volně dostupné na internetu.

Některé druhy rostlin slouží jako matrice pro vyhledávání orthologních genů, např. *A. thaliana*, rýže setá (*Oryza sativa*), tolice truncatula (*Medicago truncatula*), topol chlupatoplodý (*Populus trichocarpa*), sója luštinatá (*Glycine max*), jarní ječmen (*Hordeum vulgare*) a kukuřice setá (*Zea mays*), (Patel a kol., 2012).

2.2.1 Orthologní geny pšenice

Tulpan a kol. (2015) přiřadili ke genomu pšenice seté (*Triticum aestivum*) pomocí Reciprocal Best Blast Hit metody (RBBH) orthologní geny založených na DNA a proteinových sekvencích. Metoda spočívá v přiřazení genů pšenice k devíti odlišným druhům rostlin s pravděpodobnou funkční ekvivalencí (Obr. 3). Na základě provedených analýz lze odhalit fylogenetickou příbuznost: *A. thaliana*, mnohoštet Tauschův (*Aegilops tauschii*), *Brachypodium distachyon*, brukev (*Brassica rapa*), jarní ječmen (*Hordeum vulgare*), rýže setá (*Oryza sativa* subsp. Japonica), čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor*), divoká pšenice (*Triticum urartu*) a kukuřice setá (*Zea mays*).

V genomu pšenice bylo nalezeno 85 nových orthologních genů, což je 8 % z celkového počtu popsanych pšeničných genů (Tulpan a kol., 2015). Model prokázal, že rostlinný genom lze obohatit pomocí orthologů přiřazených i z jiných rostlinných druhů.



Obr. 3. Fylogenetický strom s deseti druhy rostlin (převzato z Tulpan a kol., 2015).

2.2.2 Gen *OsCYO1* orthologní k *AtCYO1*

U rostliny *A. thaliana* byl identifikován gen *AtCYO1*, který má vliv na biogenezi chloroplastů v kotyledonu (Tominaga a kol., 2016). Mutanti bez tohoto genu mají bledý kotyledon, ale v dalším vývoji rostliny se objevují normální zralé listy. Také u rýže (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica odrůdy Nipponbare) byl objeven podobný gen *OsCYO1*, který však nefunguje tak, jak by se dalo ve srovnání s *AtCYO1* očekávat. Bylo zjištěno, že po transformaci *OsCYO1* do mutanta *cyo1 A. thaliana*, byla obnovena zpět původní funkce.

Podobně jako *AtCYO1*, rekombinantní *OsCYO1* má protein disulfid reduktasu (DR). Činností DR se zvyšuje koncentrace glutathionu. Aktivita DR lze snížit použitím NADPH či NADH (donory elektronů). Funkce DR byla pozorována i u *OsCYO1*, což naznačuje, že glutathion může sloužit jako redukční činidlo pro *OsCYO1 in vivo*.

U rýže v koleoptile (první list zárodku jednoděložných rostlin) bylo zjištěno méně *OsCYO1* než ve zralých listech. Mutantní linie rostlin *OsCYO1* ovlivněné defektní RNA měly ve většině případů zelené listy, ovšem u některých byly pozorovány albinózní koleoptile a listy. U rostlin se zelenými listy byl snížen výkon fotosyntézy. Z těchto skutečností je patrné, že *OsCYO1* je enzymaticky ekvivalentní k *AtCYO1*, ale fyziologická úloha se může lišit mezi jednoděložnými rostlinami rýže a dvouděložnými rostlinami *A. thaliana*.

2.2.3 Geny rýže důležité pro její respiraci

V genomu rýže seté (*Oryza sativa* L.) bylo objeveno více jak 120 ABC transportérů, rozdělených do mnoha podskupin (Verrier a kol., 2008). Ohyanagi a kol. (2006) vytvořili pro osekvenovaný genom rýže databázi The Rice Annotation Project (RAP-DB). Podobně jako tomu bylo u *A. thaliana*, i zde jsou největší podskupinou ABCG proteiny a zahrnují full i half-molekuly.

Rýže patří mezi obilniny s vysokou citlivostí na vodní stres (Matsuda a kol., 2016). Odhaduje se, že sucho snižuje světovou produkci rýže o 50 %. Největší ztráta vody nastává odparem přes stomatální póry (průduchy) a díky působení ABA, která způsobuje uzavírání průduchů za stresových podmínek, jako je např. sucho, zima, osmotický tlak, koncentrace CO₂, solný stres apod.

U *A. thaliana* se na transportu ABA a stomatální regulaci podílejí proteiny AtABCG22, AtABCG25 a AtABCG40 (Kang a kol., 2010). U rýže je do transportu ABA zapojen protein OsABCG5 (RCN1), který je lokalizován na plazmatické membráně svěřacích buněk a zodpovídá za akumulaci ABA a poté uzavření průduchů v reakci na sucho (Matsuda a kol., 2016). To bylo prokázáno i v pokusech s mutanty *rcn1*, u kterých nastává větší ztráta vody než u přirozeného typu rostliny. OsABCG5 tvoří heterodimery s OsABCG2 (respektive OsABCG3) a hrají důležité role v reakci na abiotický stres. Další možnou dopravou ABA v organismu rýže je protein OsABCG27, jedná se pravděpodobně o ortholog k AtABCG25, který zajišťuje transport ABA v cévních buňkách.

2.2.4 Gen *Hd1* ortholog k *Constans*

Hlavním faktorem určujícím vývoj rostlin a agronomickou výkonnost plodin je fotoperioda (Jaeger a Wigge, 2007). Princip fotoperiodické dráhy a její vliv na kvetení byl objasněn u rostliny *A. thaliana*. Centrálním regulátorem fotoperiodické dráhy je *Constans* (*Co*), který je up-regulován v listech za dlouhého dne. Gen *Co* kóduje transkripční faktor a aktivuje tím hormon zvaný FLOWERING LOCUS (mobilní florigen). Ten je transportován z listů do apikálního meristému, kde spustí signální dráhu vedoucí k expresi genů způsobujících přeměnu vegetativních orgánů na generativní.

Na transkripční úrovni je *Co* regulován několika geny, které jsou pod kontrolou cirkadiálních hodin. Regulace kompletního proteinu *CO* je zajišťována pomocí fotoreceptorů, ubiquitin ligázy a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*COP1*). Tyto tři faktory napomáhají stabilizaci (na světle) či destabilizaci (ve tmě) proteinu *CO*.

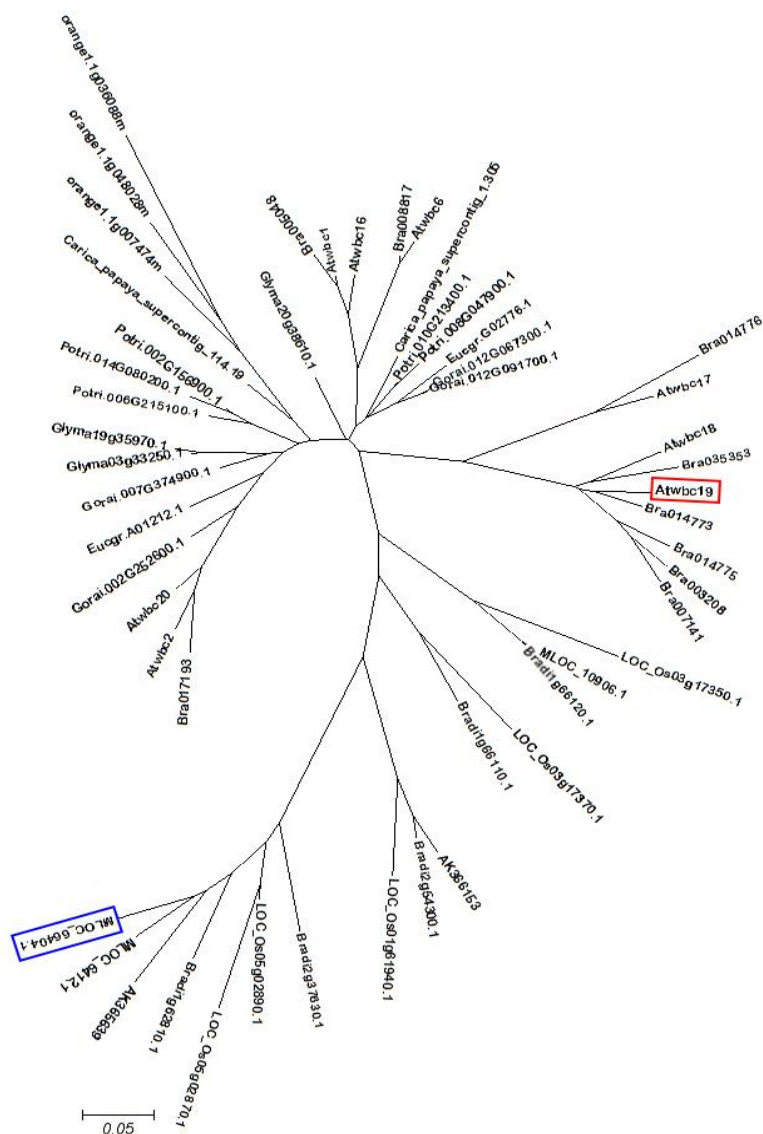
Orthologní geny *Co* byly identifikovány u mnoha druhů rostlin, např. v rýži *Hd1*. V ječmeni bylo nalezeno dokonce devět orthologů, z nichž *HvCo1* se nejvíce podobá funkci *Co* i k *Hd1* (Campoli a kol., 2012).

2.2.5 Geny *Hordeum vulgare* orthologní k *Atwbc19*

V rámci evolučního procesu jsou některé geny shodné u jednoděložných a dvouděložných rostlin (Panstruga, 2005). Je možné, že některé geny, které vykonávaly danou funkci u původních rostlin, vykovávají stejné funkce u dvouděložných i jednoděložných rostlin i dnes. Po roce 2000, kdy byla dokončena genomová sekvence

A. thaliana, je objasněna funkce a produkce některých proteinů. Nyní se hledají orthologní geny k *A. thaliana* v jiných rostlinách.

K aminokyselinové sekvenci *Atwbc19* získané z GenBank byla přiřazena prostřednictvím programu TBLASTIN dostupná sekvence ječmene odrůdy Morex. Pomocí bioinformačního nástroje ClustalW2 byl vytvořen „multiple sequence alignment“ fylogenetický strom pro porovnání získaných sekvencí ABC transportérů (Obr. 4). Byly použity sekvence *A. thaliana*, *Brassica rapa*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* (řešeno v rámci projektu KONTAKT II: LH 13069; Ohnoutková, 2013). Z testovaných genů byly vybrány čtyři ječmenné homologní geny k *Atwbc19*. V rámci diplomové práce byl vybrán ortholog MLOC_66404.1 overexpimován v genomu ječmene (Obr. 4, ortholog je vyznačen modře).



Obr. 4. Fylogenetický strom nalezených rostlinných orthologů ke genu *Atwbc19*. Červeně je označený gen *Atwbc19* a modře ječmenný ortholog navržený k transformaci (vytvořeno ClustalW2).

2.3 Transformace rostlin

Transformace je metoda cíleného vnášení vybraného genu jednoho organismu do genomu druhého organismu (Snustad a Simmons, 2009). Podle zdroje vkládaného genu rozlišujeme transgenní, cisgenní a intragenní organismy (Bradshaw, 2016). Při transgenozí je zájmový gen vnesen do genomu organismu jiného druhu, např. gen z bakterie do rostliny. Cisgenní organismy obsahují geny stejného nebo blízce příbuzného druhu, intragenní organismy jsou takové, do kterých jsou vneseny geny ze stejného druhu.

Vložení zájmového genu do vektoru (např. bakteriálním plazmidu) umožňují techniky rekombinantní DNA (Bidlack a Jansky, 2011).

2.3.1 Metody transformace

Metody transformace lze podle přenosu DNA do buněk rozdělit na přímé a nepřímé. Přímé techniky se snaží dostat transgen přímo do genomu cílových buněk. Oproti tomu nepřímé metody využívají k transformaci buněk bakterií rodu *Agrobacterium*, do jejichž plazmidu byl transgen předem vložen.

Mezi přímé metody řadíme přenos DNA do protoplastů (to jsou rostlinné buňky bez buněčné stěny) pomocí elektroporace (Matsumoto a Gonsalves, 2012). Buňky jsou vystaveny krátkým elektrickým pulzům, které tvoří dočasné póry v membráně, přes které lze přenést cizorodou DNA. Podobně funguje i chemická látka polyethylenglykol (PEG), která indukuje tvorbu membránových pórů (Li a Gray, 2005). Mikrokuličky alginátu vápenatého jsou schopny přenášet dlouhé řetězce DNA do buňky přes vytvořené póry (Matsumoto a Gonsalves, 2012). Další metodou přímého přenosu je biolistická metoda (mikroprojektilový přenos DNA). Na wolframové nebo zlaté částice o velikosti 1 – 2 μm je navázána DNA (Li a Gray, 2005). Ve speciální komůrce, ve které je umístěno transformované pletivo je vytvořeno vakuum a pod definovaným tlakem jsou částice vnášeny do buněk. Metoda je využívána převážně pro transformaci jednoděložných rostlin a také k ověření transienční exprese.

Mezi nepřímé metody řadíme transformaci prostřednictvím *A. tumefaciens*. Zájmový gen určený pro přenos do rostliny je vložen do bakteriálního plazmidu (Snustad a Simmons, 2009). Pro transformaci mohou být použity různé části rostlin např. listové disky, části květenství, protoplasty a zygotická embrya.

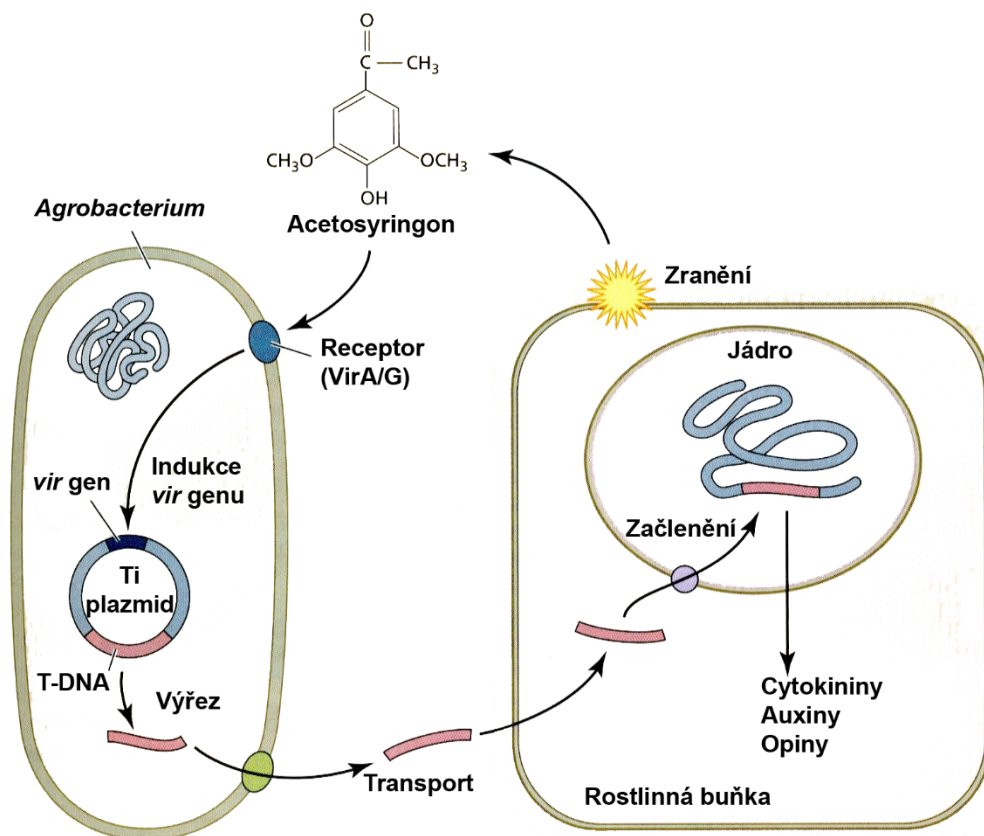
2.3.2 Transformace pomocí *Agrobacteria tumefaciens*

Princip techniky byl objasněn v 70. letech. Půdní patogenní bakterie *A. tumefaciens* je schopna vnést část své genetické informace T-DNA (transferred DNA) do genomu buněk

roślin prostřednictvím plazmidu (Ti-plazmidu, tumor inducing), (Snustad a Simmons, 2009; Hammond-Kosack a Jones, 2015).

Po infekci *Agrobacterium* dochází v rostlině k proliferaci, vytváří se nádor a začíná syntéza opinu, což je derivát argininu (Snustad a Simmons, 2009). Tato látka je bakterií využívána jako zdroj energie. Kmeny *A. tumefaciens* lze od sebe odlišit podle toho jaký druh opinů produkují (např. nopalín nebo oktopin). U buněk rostlin dochází k nadprodukci rostlinných (auxinů a cytokininů), které indukují tvorbu nádoru „crown gall“, neboli krčkového nádoru. Tento proces je přirozený u dvouděložných a nahosemenných rostlin. Schopnost *A. tumefaciens* způsobovat v rostlinách „crown gall“ nádory je řízena geny nalézající se na Ti-plazmidu o velikost až 200 000 bp. Na Ti-plazmidu jsou pro transformaci nejdůležitější dvě části, oblast virulentních genů (*vir*), které jsou nezbytné pro přenos T-DNA, a oblast T-DNA.

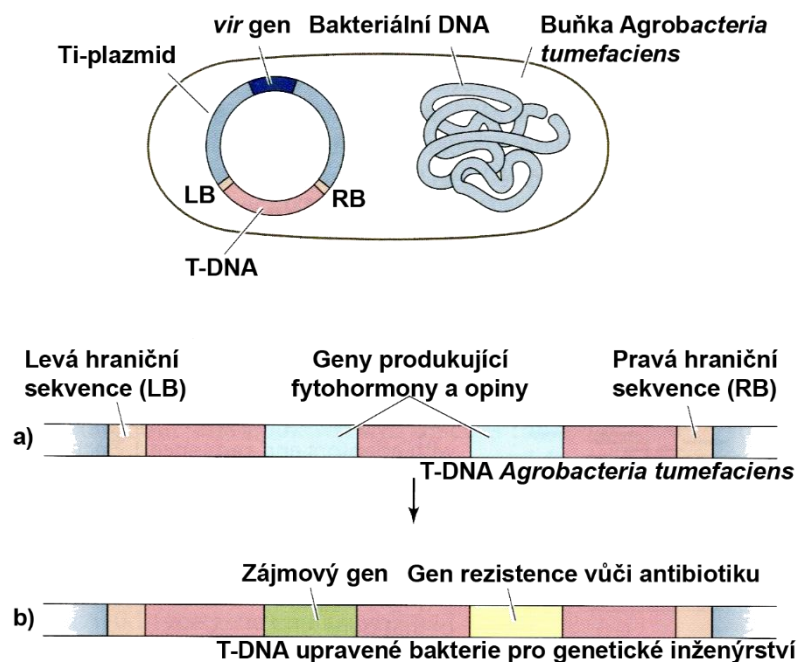
Agrobacterium převážně napadá rostliny v místě poranění (Hammond-Kosack a Jones, 2015). Poškozené buňky rostliny při procesu hojení syntetizují a do okolí vylučují fenolické látky, např. acetosyringon (Obr. 5), což je chemoatraktant pro *Agrobacterium* a následnou indukci *vir* genů z Ti-plazmidu (Taiz a kol., 2015). Bakteriální chromozomální virulentní geny jsou exprimovány přednostně, neboť zprostředkovávají uchycení bakterií k rostlinným buňkám (Hammond-Kosack a Jones, 2015). Další virulentní geny VirA-VirG lokalizované na Ti-plazmidu řídí a zprostředkovávají speciální reakce pro přenos T-DNA do genomu rostliny. Specifickou nukleázou *virD* genu je T-DNA sekvence z Ti-plazmidu vyštěpena a pomocí dalších *virD*-proteinů je přenesena a stabilně integrována do genomu rostlinné buňky.



Obr. 5. Infekce rostlinných buněk *Agrobacterium tumefaciens* (upraveno podle Taiz a kol., 2015).

Pro transformaci se používají kmeny *Agrobacteria* s upraveným Ti-plazmidem (Taiz a kol., 2015). Geny pro rostlinné hormony a pro opiny jsou z Ti-plazmidu z části T-DNA odstraněny a na jejich místo je vložen zájmový gen a selekční marker, nejčastěji je to gen rezistence k antibiotikům (Obr. 6). Upravený Ti-plazmid je vložen do *Agrobacteria*. Do bakterií infikované rostlinné buňky se přenesou jakýkoliv gen obsažený v T-DNA. Gen rezistence vůči antibiotikům umožňuje snadnou selekci transformovaných buněk.

Ti-plazmid je pro genetickou manipulaci příliš velký, tak je rozdělen na menší, tzv. binární vektory s oddělenou funkcí (Hellens a kol., 2000). Expresní vektor je do *Agrobacteria* transformován spolu s pomocným vektorem pSoup. Ve vektoru pBRACt se nacházejí geny pro replikaci v bakteriích *E. coli* a *A. tumefaciens*, selekční markery, restriční enzymy a hraniční sekvence pro vložení zájmového genu (LB, left border a RB, right border). Vektor pSoup nese úsek RepA (část pSaORI) pro replikaci pBRACt v *Agrobacteriu*.



Obr. 6. Schéma Ti – plazmidu *Agrobacterium tumefaciens*. Ti plazmid je kruhový extrachromozomální úsek DNA obsažený uvnitř bakteriální buňky. Část plazmidu, T-DNA úsek, je vnášen do genomu rostliny. Geny virulence (*vir*), které jsou na jiném místě v Ti-plazmidu, jsou nezbytné pro zahájení přenosu T-DNA. a) přirozený typ *Agrobacterium* T-DNA obsahuje geny pro fytohormony a neproteinové aminokyseliny – opiny. b) je bakterie upravena pro transformaci, geny pro fytohormony a opiny jsou odstraněny a nahrazeny zájemovým genem a genem s rezistencí vůči antibiotikům (upraveno podle Taiz a kol., 2015).

2.3.2.1 Kultivace explantátů v *in vitro* podmínkách

Pro transformaci rostlin jsou nejčastěji využívány části listu a nezralá embrya, která jsou kultivována na indukčních a regeneračních médiích (Bidlack a Jansky, 2011). Pro stimulaci tvorby kalusu, kořenů a prýtu jsou do kultivačního média přidávány růstové hormony.

Významnou vlastností rostlinných buněk je schopnost totipotence, což je přeměna v jakýkoliv typ buňky (Snustad a Simmons, 2009). Každá buňka je schopna vytvořit diferencované buňky dospělé rostliny. Diferencované buňky mají schopnost se dediferencovat do embryonálního stádia a dále rediferencovat v nové typy buněk. Pro genetické inženýrství je totipotence buněk velkou předností, protože umožňuje z jednotlivých transformovaných somatických buněk regeneraci celé rostliny.

Součástí vektorů zpravidla bývají selekční a reportérové markery (Snustad a Simmons, 2009). Selekční gen poskytuje schopnost rezistence vůči vybrané látce, antibiotiku, herbicidu nebo jinému činidlu zastavující růst netransformovaných buněk. Nejpoužívanější selekční geny jsou *nptII* a hygromycin fosfotransferasový (*hpt*), které vykazují rezistenci k antibiotikům. Mezi nejpoužívanější reportérové geny, kterými můžeme detekovat a kvantitativně stanovit expresi v transformovaném pletivu, patří *gus* a *bar* (bialaphos resistance).

2.3.3 Geneticky modifikované rostliny

Již po staletí je známa úprava rostlinného genomu formou šlechtění (Taiz a kol., 2015). Hospodářské plodiny jsou šlechtěny pro vyšší výnosnost, odolnost vůči patogenům, škůdcům a k lepšímu přizpůsobení k abiotickým faktorům. Metody klasického šlechtění jsou zdoluhavé a vyšlechtění nové odrůdy trvá od 6 do 8 let. Rozvoj molekulárních metod, který nastal v posledních letech může významným způsobem přispět ke zkrácení šlechtitelského procesu. Neboť rekombinantní technologie umožnily do rostlin přímo vnášet příslušné geny (transgeny).

První geneticky modifikovanou (GM) rostlinou v roce 1983 byl tabák s rezistencí k antibiotiku kanamycinu (Bombale a kol., 2010). První transgenní zemědělskou plodinou, která byla uvolněna na trh v USA, bylo rajče FlavrSavr s prodlouženou dobou zralosti (Ondřej, 2004).

Proti hmyzím škůdcům byly vytvořeny GM rostliny (Bt), do nichž byl transformován gen z bakterie *Bacillus thuringiensis*, který tvoří pro hmyz jedovatý δ -endotoxin, který je toxický až ve střevech larev hmyzu (Taiz a kol., 2015). K těmto rostlinám patří např. Bt-kukuřice, která je odolná proti zavíječi kukuřičnému, Bt-brambor s odolností proti mandelince bramborové a Bt-bavlník odolný k makadlovce bavlníkové (Ondřej, 2004). Významnou skupinou jsou rostliny tolerantní k herbicidu (HT, herbicide tolerance), patří sem kukuřice, sója, bavlník a řepka olejka (Bradshaw, 2016). GM upravené plodiny mají toleranci ke glyfosátu (Roundup), účinné látce, která je obsažena v herbicidu. Aplikace herbicidu inhibuje enzym 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát (EPSP) syntasy, který je důležitý pro tvorbu aromatických aminokyselin (fenylalaninu, tryptofanu a tyrosinu) v rostlinách. Byly vytvořeny i kombinace rostlin HT/Bt, např. sója, která byla pěstována v roce 2014 v Brazílii, Argentině, Paraguay a Uruguay na 5,8 mil ha. Do genomu některých rostlin byly vloženy geny pro tvorbu rezistence k daným virům. Příkladem je papája (PRSV) s tolerancí proti viru kroužkové skvrnitosti (Smith a kol., 2010).

Transgenní rostliny mohou být využity i v průmyslu (Graham a kol., 2005). Příkladem může být produkce biodegradovatelných polymerů, využitelných při tvorbě obalů či jako náhražka plastů vyrobených z neobnovitelných zdrojů. Molekulárními metodami lze upravit složení škrobů u brambor – snížit produkci amylosy a amylopektinu. Pro průmysl jsou tyto dvě látky za normálních podmínek odstraňovány. GM rostliny jsou testovány i na získávání minerálních látek či izolaci těžkých kovů z půdy, možnost dekontaminace půd. Transgenní rostliny mohou být využity jako alternativní zdroj produkce biomasy, např. topol (Bradshaw, 2016).

Transformací byly vytvořeny nové typy rostlin, příkladem je zlatá rýže (Smith a kol., 2010; Taiz a kol., 2015). Rýže obsahuje β karoten, důležitý provitamin A. Pěstování rostliny

v oblastech jihovýchodní Asie omezuje tato upravená plodina u zdejších obyvatel, a zvláště dětí, podvýživu a vitaminovou nedostatečnost.

Další transgenní plodinou je brambor se zvýšeným obsahem škrobů (Graham a kol., 2005), úprava by měla zamezit černání řezu. U řepky olejné a sóji byl vnesen gen pro produkci většího množství vitamínu E a nenasycených mastných kyselin (Ondřej, 2004). Testovány jsou také GM plodiny s produkcí protilátek proti hepatitidě B, malárii, tuberkulóze, vzteklině, choleře, využití pro oblasti s nedostatkem lékařských zařízení (Bidlack a Jansky, 2011). Testovány jsou rostliny vykazující toleranci k suchu kukuřice pro možnost pěstování v oblastech Afriky (Bradshaw, 2016). Do genomu okrasných rostlin (růží, chryzantém, karafiátů) byl vložen gen pro modré zbarvení květu (Bidlack a Jansky, 2011).

V roce 1996 byly GM plodiny pěstovány v šesti zemích světa na polích o rozloze 1,7 mil ha (Bradshaw, 2016). V roce 2014 to bylo již na 181,5 mil ha v 28 státech, nejvíce v USA, Brazílii, Argentíně, Kanadě, Indii. V rozvojových zemích pěstuje GM rostliny až 90 % farmářů. Důvodem jsou vyšší ekonomické zisky, vyšší výnosy plodin (až o 22 %). Důležitým argumentem je také nižší spotřeba chemických látek (herbicidů a insekticidů) až o 37 %, čímž je zlepšena kvalita jejich života udržitelnost životního prostředí.

Hlavním důvodem pěstování transgenních rostlin je snížení a odstranění podvýživy a hladomoru na Zemi (Bradshaw, 2016). Zajistit tedy dostatek potravy v dostatečné kvalitě pro uspokojení lidských potřeb, bez toxinů, alergenů, nepříjemné příchutě. Snahou je získat kvalitnější a výnosnější plodiny s vyšší nutriční hodnotou (složení mastných kyselin, větší obsah vitamínů, vlákniny), snížit nároky na pěstování rostlin (snížení používání pesticidů, zvýšit odolnost k abiotickým stresům – suchu, zasolení) a vytvořit rostliny důležité pro průmysl (náhrada fosilních paliv, suroviny pro výrobu ethanolu, bionafty, škrobu).

2.3.3.1 Selektce a testování GM rostlin

Proces selektce probíhá v podmínkách uzavřeného nakládání v několika na sebe navazujících etapách (Ondřej, 2004). Po transformaci rostlinných buněk následuje několikastupňová selektce v *in vitro* podmínkách. Selektován je indukovaný kalus i regenerující mladé rostliny. Plně regenerované rostliny s dobře vyvinutými kořeny jsou postupně přesazeny do zahradnického substrátu a zpravidla jsou dopěstovány ve skleníku, který je schválený pro pěstování GM rostliny. V tomto období zpravidla probíhá genotypizace rostlin, hodnocena je exprese genu, počet kopií, posuzován je i fenotyp. V T1 a v T2 generaci je hodnocen štěpný poměr a jsou vyhledávány homozygotní linie. V dalších letech, na základě povolení Ministerstva životního prostředí (MŽP), mohou být GM rostliny uvolněny do životního prostředí a pěstovány na pokusných plochách. Sledována je stabilita

trans genu, výnosové a kvalitativní ukazatele. Posledním bodem zkoušek je uvolnění GM rostlin do oběhu, tedy uznání a tržní uvolnění nových GM odrůd.

Veškeré nově vytvořené GM rostliny, které mají být uvolněny do životního prostředí jsou velmi pečlivě a přísně testovány (Ministerstvo životního prostředí, online). Hodnocena je jejich zdravotní nezávadnost i jejich dopad na životní prostředí. Nakládání s GM rostlinami je v EU regulováno právními předpisy (Evropská legislativa, online).

Aktuální informace o geneticky modifikovaných organismech, které jsou v EU povoleny (dovoz, zpracování, pěstování) jsou dostupné na webových stránkách Evropské komise, (European Commission, online).

Evropské směrnice 2001/18/ES a 2009/41/ES jsou transponovány do české legislativy zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Na základě uděleného povolení od MŽP byly v roce 2016 v rámci polních pokusů pěstovány tyto plodiny: slivoň s odolností proti šárce (Praha - Ruzyně), len s odolností k fosfinotricinu, se zvýšenou odolností k houbovým chorobám, zvýšenou schopností akumulace těžkých kovů, zvýšenou produkcí kyseliny olejové (Šumperk) a jarní ječmen se zvýšenou produkcí enzymu fytasy v zrna a cytokinin dehydrogenasou (Olomouc). Od roku 2005 se na území ČR pěstuje kukuřice MON810, která byla uvolněna do oběhu a je odolná proti zavíječi kukuřičnému. V roce 2008 byla plodina vyseta na rekordních 8 380 ha, ovšem její pěstování každoročně klesá. A v roce 2016 byla pěstována pouze v okrese Pardubice na 75,26 ha (Pěstování Bt kukuřice, online).

2.3.4 Transformace ječmene

Ječmen se řadí spolu s pšenicí mezi nejstarší pěstované obilniny (Zimolka a kol., 2006). Z původních ječmenných druhů *Hordeum spontaneum* Koch či *Hordeum agriocrithon* Åberg pěstovaných v Asii se dnes pěstuje dvouřadý a víceřadý (čtyřřadý a šestiřadý) ječmen. Rod *Hordeum* L. je podle počtu chromozomových sad ($n = 7$) rozdělen na diploidní ($2n = 14$), tetraploidní ($4n = 28$) a hexaploidní ($6n = 42$). Současné kulturní odrůdy ječmene náleží k diploidnímu druhu ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.).

První transformace jarního ječmene, byla provedena pomocí biolistické metody v roce 1994, transformována byla nezralá zygotická embrya (Wan a Lemaux, 1994). V roce 1997 byla nezralá embrya ječmene transformována pomocí *A. tumefaciens* (Tingay a kol., 1997). Obě tyto metody byly vzájemně srovnávány a bylo zjištěno, že transformace ječmene pomocí *A. tumefaciens* má vyšší účinnost (Harwood a kol., 2009).

2.3.4.1 Transformace ječmene genem *Atwbc19*

V bakalářské práci Němcové (2013), která byla řešena v rámci projektu LH13069, byla transformována nezralá zygotická embrya jarního ječmene odrůdy Golden Promise připraveným vektorem pBract214::*Atwbc19* (gen byl pod kontrolou ubiquitinového promotoru, Ubi). Embrya byla selektována na médiích s různými antibiotiky o různých koncentracích (Gen 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 mg·l⁻¹; Hygromycin (Hyg) 25; 50; 100; 150 mg·l⁻¹; Kan 50; 100; 150; 200 mg·l⁻¹; Neo 50; 100; 200; 400 mg·l⁻¹; paromomycin 50; 100; 200; 400 mg·l⁻¹). Do médií (kalus indukčního, transientního a regeneračního) byla přidávána příslušná antibiotika po celou dobu kultivace. Posuzována byla účinnost selekce jednotlivých antibiotik. Přítomnost transgenu byla hodnocena pomocí metody PCR. Nejvyšší selekční efekt byl zjištěn u média, které obsahovalo Hyg 100 mg·l⁻¹ a Neo 200 mg·l⁻¹. Na médiu s kanamycinem neregenerovaly žádné rostliny.

V rámci projektu KONTAKT II: LH13069, byla u jarního ječmene testována selekční schopnost genu *Atwbc19* v závislosti na promotoru (Ohnoutková a kol., 2015). Byly připraveny zcela nové dva expresní vektory. V prvních z nich byl zájmový gen pod kontrolou Ubi promotoru a ve druhém byl řízen promotorem 35S. Celkem bylo transformováno 1560 embryí jarního ječmene odrůdy Golden Promise. regenerovalo 852 rostlin, přítomnost transgenu u regenerantů byla analyzována pomocí PCR. Výsledky potvrdily selekční schopnost genu *Atwbc19*. Nejvyšší účinnost selekce byla na médiu s antibiotikem neomycinem, při koncentraci 200 mg·l⁻¹, prokázána byla 80% úspěšnost transgenu. Transformace vektorem, kde byl gen pod kontrolou Ubi promotoru, měla vyšší účinnost než vektor s genem pod kontrolou 35S promotoru.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

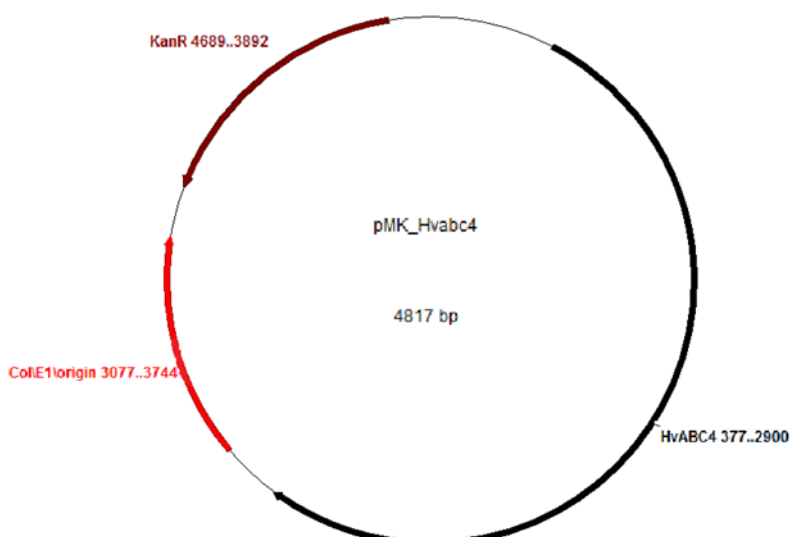
3.1.1 Biologický materiál

Pro transformaci ječmene prostřednictvím *A. tumefaciens* byla použita nezralá zygotická embrya jarního ječmene (*Hordeum vulgare* L. odrůdy Golden Promise). Golden Promise je starší skotská odrůda sladovnického dvouřadého jarního ječmene (Forster, 2001). Odrůda byla vytvořena působením gama-zářením na obilky odrůdy Maythorpe. Registrována byla v roce 1966, v roce 1967 byla zařazena do seznamu pěstovaných plodin v Anglii. Vyznačuje se rychlým růstem, nižším a tužším stéblem a odolností vůči zasolení. V dnešní době se již prakticky nepěstuje.

V současné době je odrůda Golden Promise využívána jako jedna z mála odrůd jarního ječmene v genovém inženýrství, Z pletiva nezralých zygotických embryí lze snadno indukovat embryogenní kalus, z kterého následně regenerují rostliny.

3.1.2 Gen *Hvabc4*

Byl použit ječmenný ortholog ke genu *Atwbc19*, *Hvabc4* (v databázi AK_363603, MLOC_66404.1). Aminokyselinová sekvence genu byla identifikována z GeneBank databáze. *Hvabc4* gen byl nasyntentizován včetně restričních míst a vložen do vektoru pMK (ThermoFischer SCIENTIFIC), Obr. 7.

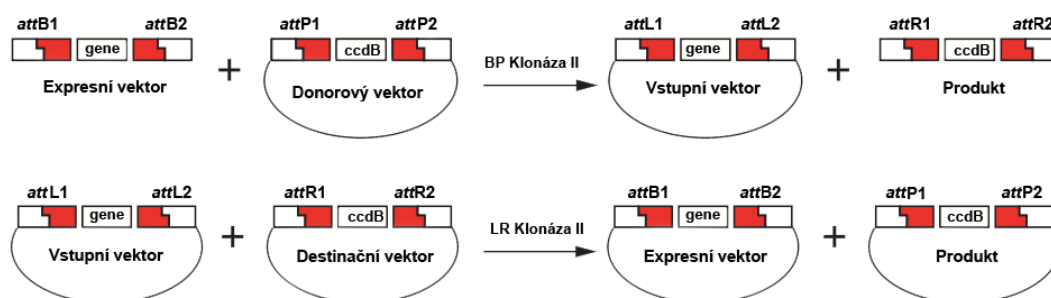


Obr. 7. Schéma vektoru pMK::Hvabc4. Vytvořeno v programu ApE, A plasmid editor.

3.2 Metody

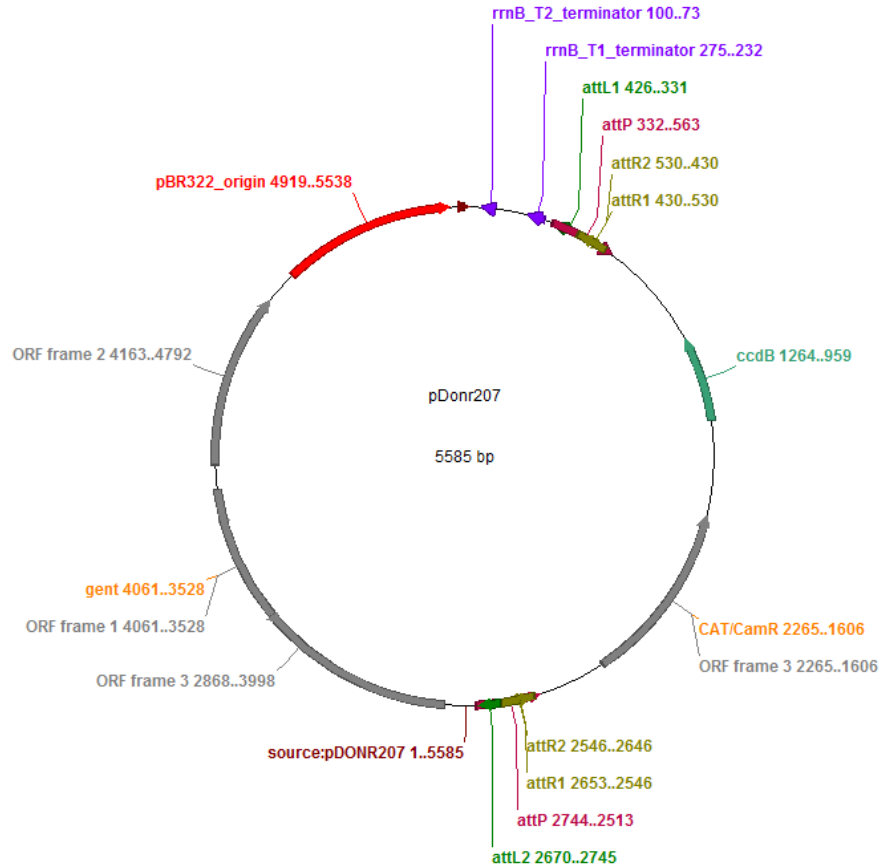
3.2.1 Klonovací strategie

Zájmový gen *Hvabc4* byl vložen pomocí Gateway BP a LR klonovací strategie do expresního vektoru pBract214AS::*Hvabc4*. Gateway technologie je oproti tradičnímu klonování restrikčními enzymy jednodušší, rychlejší a procentuálně úspěšnější (ThermoFisher SCIENTIFIC, online). Klonovací metoda je vhodná pro jednoduché a spolehlivé vnesení genu do expresního vektoru (Obr. 8). Principem Gateway BP a LR klonázové reakce je přenos vybraného genu mezi vektory pomocí specifické rekombinace. Klonázové reakce probíhají postupně za účasti speciálních enzymů, které jsou již přítomny v komerčně připraveném master mixu.



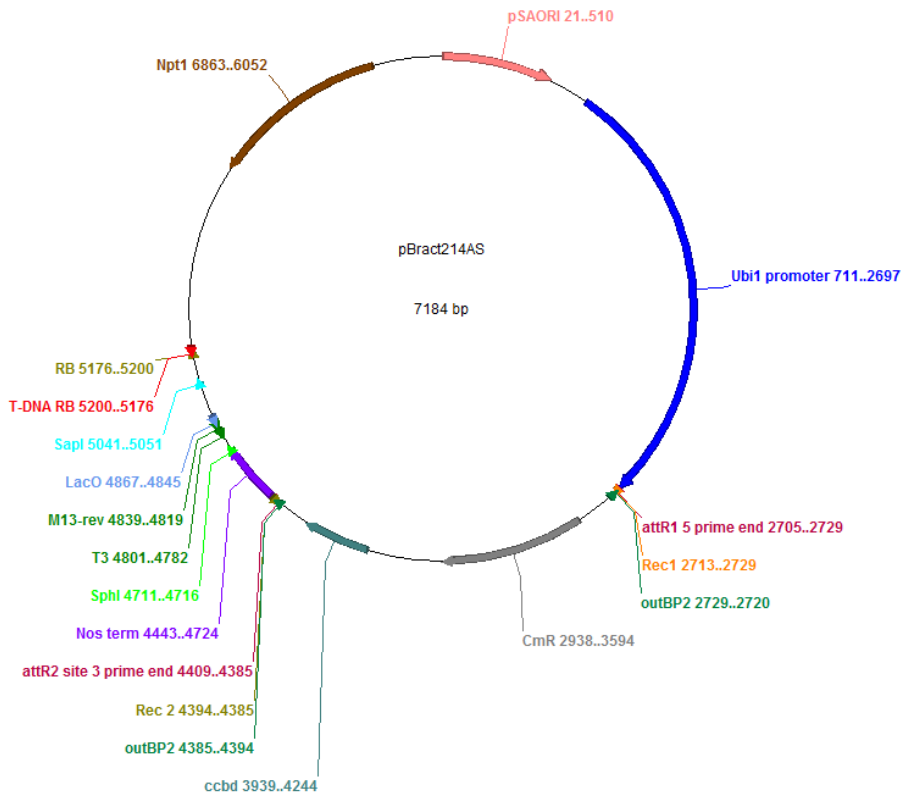
Obr. 8. Schéma BP a LR klonázové reakce (převzato z Invitrogen. Gateway Technology with Clonase II, 2012).

Zájmový gen byl vložen do vektoru pDonr207 pomocí BP klonázové reakce (Obr. 9), mezi místa *attP1* a *attP2* místa (Invitrogen. Gateway Technology with Clonase II, 2012). Nově získaný vektor byl transformován do bakterií *E. coli* (DH5 α), kde proběhla selekce na antibiotikách. Následně byla z buněk vyizolována plazmidová DNA. Správnost vložení byla ověřena mocí restrikčních analýz.



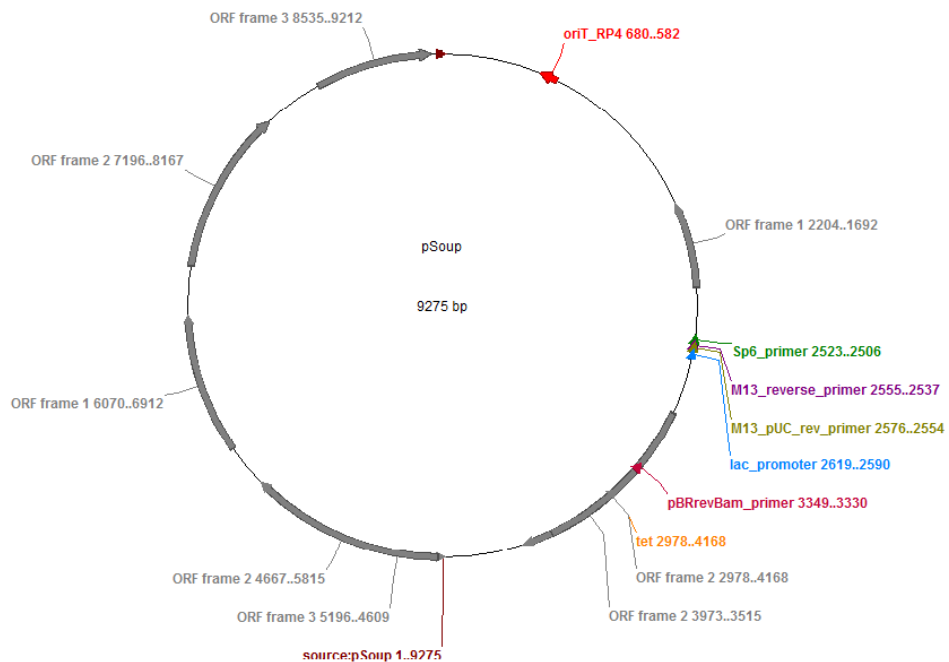
Obr. 9. Vektor pDonr207. Vytvořeno v programu ApE, A plasmid editor.

Gen *Hvabc4* byl z vektoru pDonr207::*Hvabc4* naklonován do vektoru pBract214AS (gen pod kontrolou Ubi promotoru, absence funkční kazety 35S-Hyg-nos) pomocí LR klonázové reakce pod kontrolu Ubi promotoru (Invitrogen. Gateway Technology with Clonase II, 2012). Vektor je ze série vektorů pBRACT, které jsou navrženy pro transformaci ječmene, pšenice a dvou druhů *Brassica*, *B. oleracea* a *B. napus* prostřednictvím *A. tumefaciens* (pBRACT, online). pBract214AS je upravený vektor pBract214 se ztrátou selekční kazety 35S-Hyg-nos (Obr. 10). Produkt klonázové reakce byl transformován do buněk chemicky kompetentních bakterií *E. coli*, vyizolován. Byla provedena kontrolní restriční analýza.



Obr. 10. Vektor pBract214AS. Vytvořeno v programu ApE, A plasmid editor.

Do *A. tumefaciens* byly pomocí elektroporace transformovány dva vektory pBract214AS::Hvabc4 a pSoup (Obr. 11). Hypervirulentní kmeny *Agrobacteria* (AGL1) a systém binárních vektorů zvyšuje systém transformace binárních vektorů.



Obr. 11. Pomocný vektor pSoup pro transformaci *Agrobacteria tumefaciens*. Vytvořeno v programu ApE, A plasmid editor.

3.2.1.1 Vložení zájmového genu *Hvabc4* do donorového vektoru pDonr207

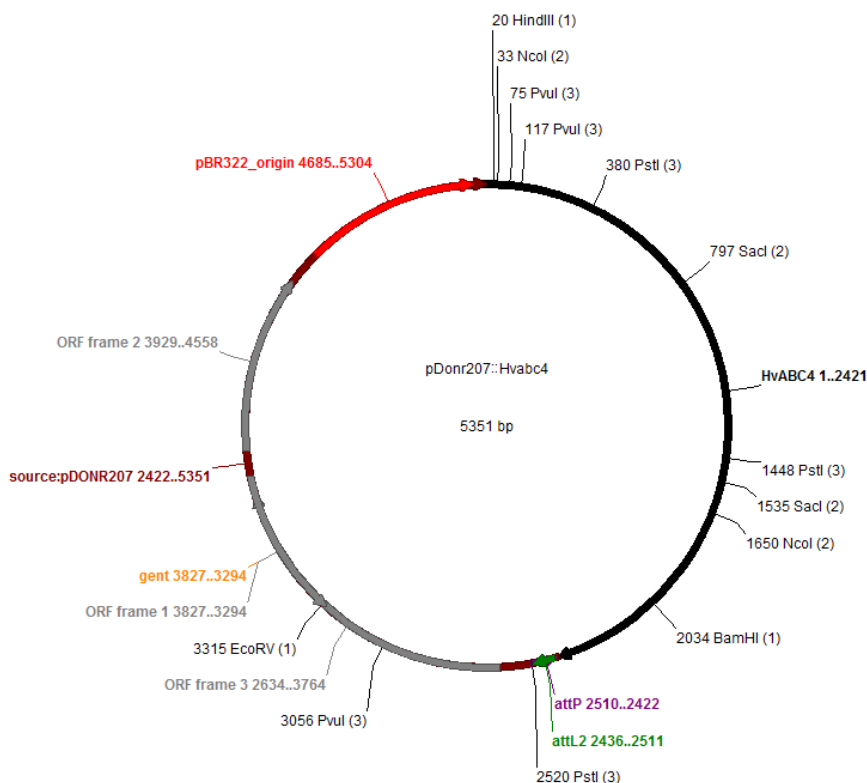
Zájemový gen *Hvabc4* v byl vložen pomocí BP klonázové reakce do donorového vektoru pDonr207 (Obr. 12).

1. BP klonázová reakce byla uskutečněna podle protokolu (Gateway BP Clonase II Enzyme mix, Invitrogen Corporation). Do 1,5 ml mikrozkušavky byly napipetovány oba vektory (Tab.3).

Tab. 2. BP klonázová reakce

Složení mix BP	Objem [μl]
pMK:: <i>Hvabc4</i> (15-150 ng·μl ⁻¹)	1-7,0
pDonr 207 (150 ng·μl ⁻¹)	1,0
TE pufr (pH 8)	doplněn na: 8,0

2. K roztoku plazmidů bylo přidáno 2 μl BP Klonasy (Clonase II enzyme mix, kat. č. 11789-020). Inkubace reakční směsi probíhala přes noc v 25 °C.
3. Do vzorku bylo přidáno 1 μl proteinasy K (Proteinase K solution) a vzorek byl inkubován 10 min v 37 °C.



Obr. 12. Vektor pDonr207::*Hvabc4* s navrženými enzymy pro kontrolní restrikci a linearizaci. Vytvořeno pomocí programu ApE, A plasmid editor.

3.2.1.2 Transformace *Escherichia coli* vstupním (expresním) vektorem

Vektor pDonr207::Hvabc4 (stejný postup u pBract214AS::Hvabc4) byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* (typ DH5 α , ThermoFisher SCIENTIFIC, kat. č. 18258012) pomocí teplotního šoku (heat shock).

1. Produkt BP (LR) klonázové reakce byl inkubován 24 hod v 25 °C.
2. K buňkám *E. coli* bylo přidáno 4,5 μ l produktu reakce po promíchání byla směs ponechána 30 min při 5 °C.
3. Mikrozkušavka s *E. coli* byla vložena na 30 s do vodní lázně (42 °C), kde byl na buňky aplikován teplotní šok.
4. Do mikrozkušavky bylo přidáno 250 μ l S.O.C média (Invitrogen, kat. č. 15544-034) přehřátého na 37 °C a směs byla inkubována na třepačce 200 rpm při 37 °C.

Transformované buňky byly kultivovány na Lennox-Broth (LB) médiu (25 g l⁻¹ LB Sigma-Aldrich L3022, 16 g l⁻¹ agaru a 1 l deionizované vody) s Kan 50 mg·l⁻¹. Kultivace (v kultivačním boxu Biological thermostat BT 120 MR) probíhala do druhého dne při 37 °C.

Vybrané kolonie buněk *E. coli* byly přeneseny do kultivačních zkumavek s 2,2 ml tekutým LB médiem (25 g·l⁻¹ LB Sigma-Aldrich L3022, 1 l deionizované vody) s Kan 50 mg·l⁻¹ a kultivace probíhala na třepačce do druhého dne / 200 rpm v 37 °C.

Z kultury byly vytvořeny glycerinové stoky (100 μ l sterilního 50% glycerolu, 100 μ l kultury) a ty byly uskladněny v hlubokomrazícím boxu v teplotě -80 °C. Ze zbývajících kultur byla izolována plazmidová DNA (pDNA) dle protokolu (QIAGEN, 2011). Na spektrofotometru DS-11 (DeNovix, Delaware) byla změřena koncentrace a kvalita pDNA.

3.2.1.3 Kontrolní restrikční analýza

Pro ověření správného vložení zájmového genu do vektoru byla provedena enzymová kontrolní restrikční analýza. Typy enzymů pro restrikci byly vybrány pomocí programu ApE.

Podle Tab. 4 byly připraveny vzorky pro enzymovou restrikční reakci. Byl použit enzym *Pst*I pro kontrolu pDonr207::Hvabc4. Vzorky byly inkubovány do druhého dne v 37 °C. Produkty štěpení byly separovány v 1% agarózovém gelu. Gel byl po ukončení separace vizualizován pomocí UV transiluminátoru (SYNGENE, UK) a počítačového programu GeneSnap (SYNGENE, UK).

Tab. 3. Složení reakční směsi pro pDonr207::Hvabc4

Složka	Objem [μl]
H ₂ O	24,5
Pufr 10x	3,0
pDNA (1000 ng· μl^{-1})	1,0
Enzym	1,5
Celkový objem	30,0

3.2.1.4 Linearizace vektoru pDonr207::Hvabc4

Pomocí restrikčního štěpení byl vstupní vektor pDonr207::Hvabc4 linearizován. Podle Tab. 5 byly namíchané vzorky a inkubovány do druhého dne při 37 °C.

Tab.4. Linearizace vektoru pDonr207::Hvabc4 (c=1 000 ng· μl^{-1})

Složka	Objem [μl]
H ₂ O	43,3
Pufr 10x	5,0
pDNA (1000 ng· μl^{-1})	0,7
Enzym	1,0
Celkový objem	50,0

3.2.1.5 Vložení zájmového genu do destinačního vektoru pBract214AS

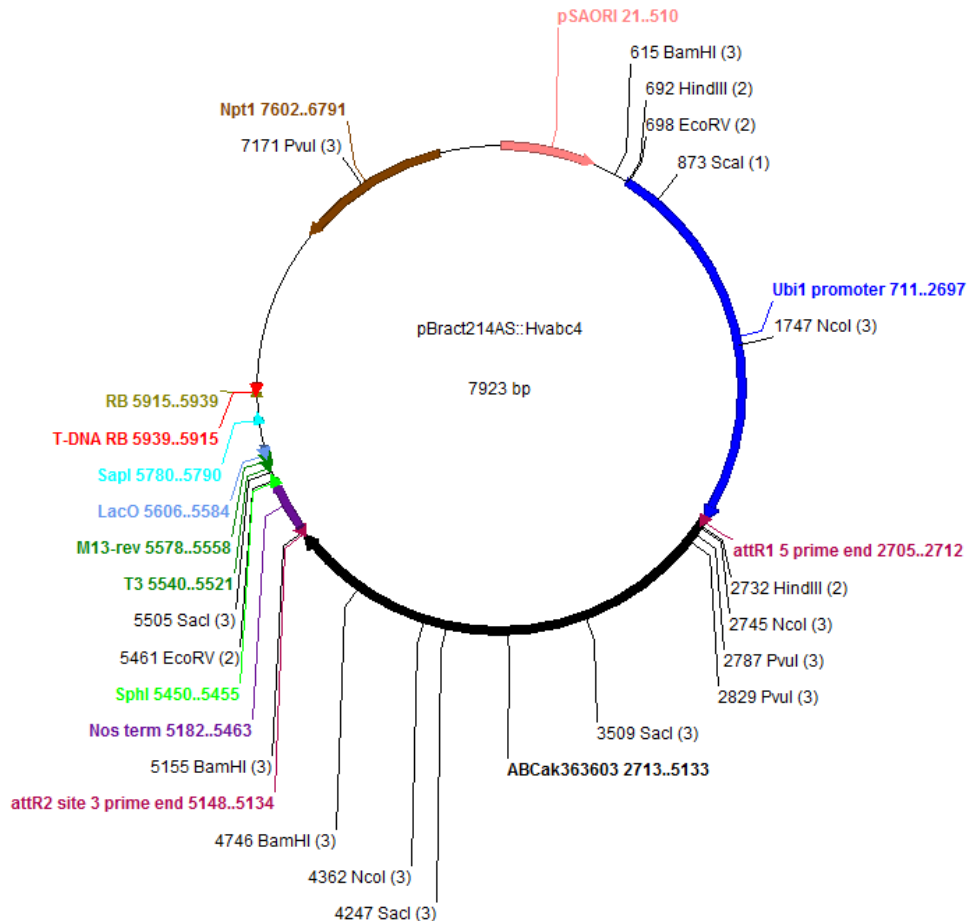
Linearizovaný plazmid pDonr207::Hvabc4 byl použit pro vnesení LR klonázovou reakcí do destinačního vektoru pBract214AS. Reakcí vznikl expresní vektor pBract214AS::Hvabc4 (Obr. 13).

1. LR klonázová reakce byla uskutečněna podle protokolu (Gateway LR Clonase II Enzyme mix, Invitrogen Corporation). Do 1,5 ml mikrozkušavky byly napipetovány oba vektory (Tab.6).

Tab. 5. LR klonázová reakce

Složení mix LR	Objem [μl]
Linearizovaný pDonr207::Hvabc4 (50-150 ng· μl^{-1})	1-7
pBract214AS (132 ng· μl^{-1})	1,5
TE pufr (pH 8)	doplněn na: 8,0

2. K roztoku plazmidů bylo přidáno 2 µl LR Klonázy (Clonase II enzyme mix, kat.č.11791-019). Inkubace reakční směsi probíhala přes noc v 25 °C.
3. Do vzorku bylo přidáno 1 µl proteinasy K (Proteinase K solution). Vzorek byl inkubován 10 min v 37 °C.



Obr. 13. Vektor pBract214AS::Hvabc4 s navrženými enzymy pro kontrolní restrikci. Vytvořeno pomocí programu ApE, A plasmid editor.

Pro ověření úspěšnosti transformace genu byly vytvořeny z pDNA vzorky pro enzymovou restrikční analýzu. Restrikce byla připravena podle Tab. 4 z kapitoly 3.2.1.3. Byl použit enzym *HindIII*, (pro kontrolu i enzym *NcoI*), po inkubaci byl enzym inaktivován 20 min v 80 °C.

Z vybraných vzorků (glycerinových stoků) byla podle protokolu (QIAGEN, 2011) izolována pDNA přes kolonky (Qiagen kat. č. 27106).

3.2.2 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* vektorem pBract214AS::Hvabc4

Do elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens* AGL1 (JIC) byl pomocí elektroporace transformován vektor pBract214AS::Hvabc4 s pomocným vektorem pSoup.

1. K AGL1 byly napipetovány vektory 1 μl pDNA ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a 1 μl pSoup ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Inkubace probíhala 10 min na ledu.
2. Elektroporační kyveta byla vložena do elektroporátoru (Cellject Duo, Thermo Elektron corporation) s nastavením na 1800 V, 15 μF , 335 R.
3. Po elektroparaci bylo do kyvety přidáno 250 μl přehřátého ($28 \text{ }^\circ\text{C}$) S.O.C média. Inkubace probíhala na třepačce 1 - 2 hod / 200 rpm při $28 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. Buňky byly rozetřeny a kultivovány v Petriho miskách (P. miskách) na selekčním LB médiu s antibiotiky Kan $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, rifampicin (Rif) $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, tetracyklin (Tet) $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2 - 3 dny při teplotě $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě.

Vybrané kolonie AGL1 buněk byly přeneseny do 50 ml falkon s tekutým LB médiem 5 ml a antibiotiky (Kan $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, Rif $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, Tet $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Kultivace probíhala na třepačce 2 - 3 dny při $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Z kultury byly vytvořeny glycerinové stoky (500 μl 50% sterilního glycerolu a 500 μl kultury) a uloženy v hlubokomrazícím boxu v $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Ze zbývajících kultur byla izolovaná pDNA dle protokolu (QIAGEN, 2011), pro naše účely byl postup upraven.

1. Falkona s bakteriální kulturou byla centrifugována 5 - 10 min / 10 000 rpm.
2. Ke vzorku byly přidány komerční roztoky QIAGEN (kat. č. 12143): P1 (pufr P1 - resuspension buffer), P2 (pufr P2 - lysis buffer) a P3 (pufr P3 - neutralization buffer).
P1 250 μl - pelet byl rozsuspendován a přepitován do kónické 1,5 ml mikrozkušavky.
P2 250 μl - jemně promíchat a 8 min nechat odstát v laboratorní teplotě.
P3 350 μl - vzorek byl důkladně promíchán.
3. Centrifugace 10 min / 14 000 rpm. Supernatant 800 - 820 μl byl přenesen do nové mikrozkušavky.
4. Opakování kroku 3.
5. Přidat 600 μl studeného isopropanolu ($5 \text{ }^\circ\text{C}$). pDNA byla vysrážena při $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min.
6. Centrifugace 10 min / 14 000 rpm, pelet byl omyt 500 μl 75% ethanolem.
7. Po centrifugaci 5 min / 8 000 rpm byl pelet cca 20 min sušen v laminárním boxu.
8. pDNA byla rozpuštěna (podle velikosti peletu) v 15 μl EB:H₂O (1:3) nahřátého na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a nechána do druhého dne v chladničce.
9. Byla změřena koncentrace a kvalita pDNA na spektrofotometru DS-11 (DeNovix, Delaware).

Správnost transformace byla ověřena pomocí vhodných restrikčních enzymů: *HindIII*, *PstI*, *SacI*, *NcoI*. Restrikční směs byla namíchána podle Tab. 4 z kapitoly 3.2.1.3.

Ověřený vzorek *A. tumefaciens* byl použit jako inokulum pro transformaci explantátu. Do 10 ml MG/L média (trypton 5 g·l⁻¹, mannitol 5 g·l⁻¹, kvasničný extrakt 2,5 g·l⁻¹, L-glutamová kyselina 1,0 g·l⁻¹, KH₂PO₄ 250 mg·l⁻¹, NaCl 100 mg·l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 100 mg·l⁻¹, biotin 10 µl (zásobní roztok 0,1 mg·l⁻¹), upraveno NaOH na pH 7,2) bylo přidáno 60 - 70 µl AGL1. Inkubováno na třepačce 24 hod / 200 rpm při 28 °C.

3.2.3 Transformace rostlinného materiálu

Do nezralých zygotických embryí jarního ječmene odrůdy Golden Promise o velikosti 1,5 mm byl vnesen zájmový gen *Hvabc4*. Pracovní postup byl převzat z protokolu od Harwood a kol. (2009).

Nezralé obilky vybraných klasů byly sterilizovány promytím: 100 ml 70% ethanolu 2 min, sterilní deionizovanou vodou, 100 ml 6% NaClO 4 min a promytí sterilní deionizovanou vodou 2 min (krok zopakován 4 krát).

Za sterilních podmínek byly z obilek pinzetou a ostrým skalpelem pod stereomikroskopem izolovány nezralé zárodky (tzv. *embrya*). Odstraněna byla embryonální osa a upravené štítky (*scutellum*) byly umístěny (štítkem nahoru) do P. misek (90x15 mm) na kalus indukční médium (CI) bez antibiotik a kultivovány v kultivačním boxu (Biological thermostat BT 120) při 25 °C ve tmě.

Následující den byly štítky v P. miskách odměrným kapátkem zakápnuty připraveným inokulem bakteriální suspenze *A. tumefaciens* s vloženým plazmidem (při optické hustotě - OD 0,7) a po 10 min působení byly přeneseny (štítkem dolů) na nové CI médium s antibiotikem Timentin (Tim 160 mg·l⁻¹), které zabraňuje prorůstání *Agrobacteria*. Kokultivace probíhala 3 dny ve tmě při teplotě 25 °C.

Složení kultivačních médií a podmínky kultivace jsou uvedeny v protokolu Harwood a kol. (2009). Selektce buněk a indukce kalusů transformovaných explantátů na CI médiu s různými antibiotiky (Tim 160 mg·l⁻¹ a Gen 1,25 či 2,5 mg·l⁻¹ nebo Tim 160 mg·l⁻¹ a neomycinem Neo 100 či 200 mg·l⁻¹) probíhala 6 týdnů ve tmě při teplotě 25 °C. Pasáže na nové CI médium byly vždy po 14 dnech.

Po šestitýdenní selekci byly dobře rostoucí kalusy přeneseny na přechodné, transienční médium (TM) s antibiotiky shodného typu a koncentrace jako u CI média. Kultivace při nízké intenzitě světla (překrytí P. misek filtračním papírem) v kultivačního boxu (Adaptis by CONVIRON, CMP6010). Po 14 dnech byly kalusy a regenerující rostliny přeneseny do Erlenmeyerových baněk na regenerační médium (RM) s antibiotiky (stejná jako při první

selekcí). Kultivace probíhala v režimu 16 hodin světlo (intenzita $850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) / 8 hodin tma, teplota $23 \text{ }^\circ\text{C}$ do úplné regenerace rostlin. Regenerované rostliny byly přesazeny do rašelinových tablet (41/7 mm Jiff, Rosteto, ČR), kde v ZIP sáčcích při pokojové teplotě cca 6 týdnů rostly.

3.2.4 Izolace genomové DNA

Podle protokolu Edwards a kol. (1991) byla z listů vybraných rostlin izolována genomová DNA. Pro naše účely byl pracovní postup izolace modifikován.

1. Z rostliny byl sterilními nůžkami odstřižen list o velikosti cca 5 cm, který byl vložen do 1,5 ml mikrozkušavky, ta byla uložena do nádoby s tekutým dusíkem.
2. Zmražené listy byly rozdrceny vychlazenou sterilní izolační tyčinkou. K obsahu byl přidán extrakční pufr, 400 μl , (Tab. 7) a směs byla promíchána (5 s) do úplné homogenizace.

Tab. 6. Extrakční pufr

Extrakční pufr	Objem [ml]
200 mM Tris HCl (pH 7,5)	10,00
250 mM NaCl	2,50
25 mM EDTA	2,50
0,5% SDS	0,25
Doplnit do objemu 50 ml sterilní deionizovanou H_2O	

3. Extrakce rostlinného vzorku probíhala 60 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci 1 min / 13 000 rpm byl supernatant (300 μl) přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkušavky a přidán studený $5 \text{ }^\circ\text{C}$ isopropanol (300 μl). Směs byla opatrně promíchána (převrácením zkumavky) a ponechána cca 30 min v $5 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. Centrifugace 12 min / 14 000 rpm. Po odstranění supernatantu byl k peletu přidán 75% ethanol (300 μl), obsah zkumavky byl promíchán (převrácením).
5. Po centrifugaci 5 min / 5 000 rpm byl supernatant opatrně odpipetován. A pelet byl vysušen (cca 20 min).
6. DNA byla rozpuštěna podle množství peletu v 30 - 50 μl sterilní DNA/RNA free vodě.
7. Vzorky byly ponechány v $5 \text{ }^\circ\text{C}$ do druhého dne.

Koncentrace a kvalita DNA byla měřena na spektrofotometru DS-11. DNA byla naředěna DNA/RNA free vodou na 200 - 300 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

3.2.5 Polymerázová řetězová reakce

Vzhledem k tomu, že se jednalo o přirozeně se vyskytující gen v genomu ječmene, bylo navrženo několik primerů zahrnující specifické funkční části expresního vektoru (*nos* terminátor a *Ubi* promotor) a kombinace jednotlivých primerů byla v rámci diplomové práce testována.

Pro přípravu reakční směsi byl použit premix ReadyMix REDTag PCR s $MgCl_2$ značky Sigma-Aldrich (kat. č. R2648-20RXN) a deionizovaná voda (Water PCR reagent, Sigma-Aldrich, kat. č. W1754). Vybrány byly primery firmy Generi biotech: primer forward (F) 1308C5; ABC4 abc4-nosF 20-mer 5'-GCT TCT TCA TCA ACC GCG AC-3' ($T_m = 56,8$ °C), velikost produktu 769 bp a primer reverse (R) 1315F6; ABC4 abc4-nos3R 19-mer 5'-AAG ACC GGC AAC AGG ATT C-3' ($T_m = 55,0$ °C), velikost produktu 542 bp.

1. Podle Tab. 8 byl namíchán do mikrozkušavky PCR Reagent Mix pro daný počet vzorků.
2. Do 0,5 ml PCR mikrozkušavek byl přepipetován připravený Reagent mix o objemu 8,0 μ l a 2,0 μ l templátová DNA 200-300 $ng \cdot \mu$ l⁻¹ (izolována z rostlin).

Tab. 7. PCR protokol

Reagent Mix	Mix 1x [μ l]	Vzorek [μ l]
ddH ₂ O	2,5	
ReadyMix	5,0	8,0
Primer F	0,25	
Primer R	0,25	
Templát DNA		2,0
Celkový objem		10,0

3. Na termocykleru (Thermal Cycler T100™, Bio Rad, Kalifornie) byl nastaven optimalizovaný program (Tab. 9) a PCR reakce byla spuštěna.

Tab. 8. Protokol teplotního profilu PCR pro Hvabc4

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
1.	95	4:00
2.	95	0:30
3.	56	0:30
4.	72	1:00
5.	od kroku 2 opakováno	34x
6.	72	5:00
7.	12	∞

4. PCR produkty byly rozděleny pomocí elektroforetické separace na 1% agarózovém gelu. Spolu se vzorky byla na gel nanesena i sterilní DNA/RNA free voda (H₂O), negativní kontrola – z netransformovaných rostlin (C-), pozitivní kontrola – vektor pBract214AS::Hvabc4 (p+), marker molekulových hmotností - Ladder II (HyperLadder 50 kb, H2-415208, BioLine).
5. Gel byl vložen do UV-transiluminátoru (SYNGENE, UK). Pomocí počítačového programu GeneSnap (SYNGENE, UK) byl zaznamenán výsledek. Přirovnáním k markeru molekulových hmotností byla zjištěna přítomnost transgenu *Hvabc4* ve vzorcích.

4 VÝSLEDKY

Byla realizována navržená klonovací strategie. Nasyntetizovaný gen vybraného ječmenného orthologu ke genu *Atwbc19*, *Hvabc4* (v databázi AK_363603, MLOC_66404.1), byl vnesen klonázovou reakcí do destinačního vektoru pBract214AS. Nově vytvořený expresní vektor pBract214AS::Hvabc4 byl elektroporací transformován do elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens*, AGL1. Pomocí nepřímé metody, prostřednictvím *Agrobacteria*, byla transformována nezralá zygotická embrya jarního ječmene odrůdy Golden Promise. Pro srovnání indukce kalusů a regenerace rostlin byly explantáty kultivovány na médiích:

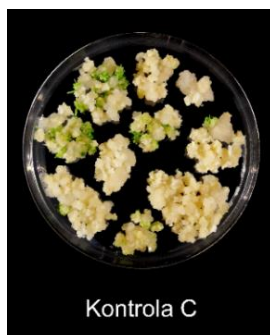
- s antibiotiky (geneticin 1,25 a 2,5 mg·l⁻¹ nebo neomycin 100 a 200 mg·l⁻¹)
- bez antibiotik: transformovaná embrya, bez selekce (C)
netransformovaná embrya (C-)

Celková doba kultivace od počátku transformace do přesazení rostlin do zeminy trvala čtrnáct týdnů. V první fázi růstu byly explantáty kultivovány šest týdnů na CI médiích, dále byly přeneseny na čtrnáct dní na TM a za dalších čtrnáct dní byly regenerující kalusy přeneseny na RM. Vitální rostliny s dobře vyvinutým kořenovým systémem byly přesazeny do rašelinových tablet (jiffů).

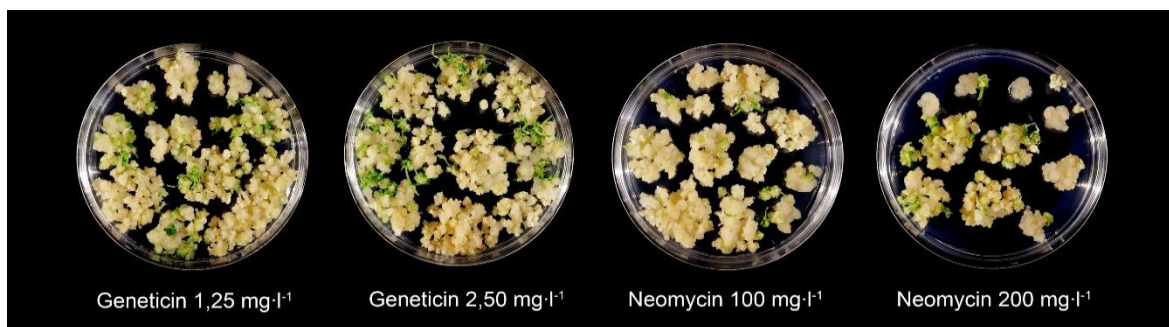
4.1 Indukce kalusů u transgenních a netransgenních embryí

4.1.1 Indukce kalusů u transgenních embryí

Celkem bylo transformováno 150 embryí o velikosti 1,5 - 2 mm, která byla rozdělena po deseti ve třech opakováních. Vliv genu *Hvabc4* na selekci byl sledován po celou dobu kultivace v *in vitro* podmínkách. Do indukčního (CI), přechodného (TM) a regeneračního (RM) média byly přidávány vždy stejné koncentrace dvou aminoglykosidových antibiotik: Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹. Indukce kalusů po šesti týdnech kultivace je zobrazena na fotografiích (Obr. 14; 15).



Obr. 14. Indukce kalusů po transformaci vektorem pBract214AS::Hvabc4 po šesti týdnech kultivace na médiu CI bez antibiotik (foto O. Blahoušek).



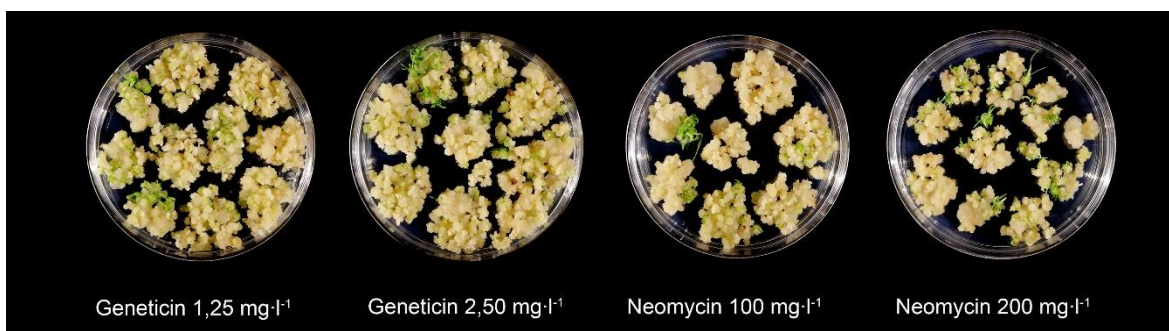
Obr. 15. Indukce kalusů transformovaných vektorem pBract214AS::Hvabc4 po šesti týdnech kultivace na médiu CI obsahující antibiotika Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹ (foto O. Blahoušek).

4.1.2 Indukce kalusů u netransgenních embryí

Pro zjištění účinnosti selekce byla kultivována netransformovaná embrya (celkem 50). Deset netransformovaných embryí (v jednom opakování) bylo kultivováno na pěti P. miskách na médiích s antibiotiky Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹ a bez antibiotik. Indukce kalusů po šesti týdnech kultivace je zobrazena na fotografiích (Obr. 16; 17).



Obr. 16. Indukce kalusů po šesti týdnech kultivace na médiu CI neobsahující antibiotika (foto O. Blahoušek).



Obr. 17. Indukce netransformovaných kalusů po šesti týdnech kultivace na médiu CI obsahující antibiotika Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ a Neo 100 a 200 mg·l⁻¹ (foto O. Blahoušek).

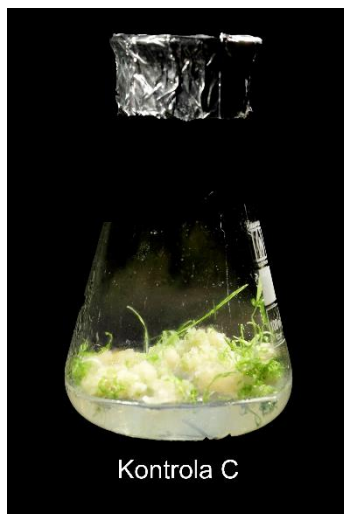
Indukce kalusů byla po celém kultivačním procesu na CI médiu vizuálně hodnocena. Největší a nejrychlejší růst kalusů byl na médiích bez antibiotik u netransformované kontrolní C- varianty. Na médiích s geneticinem byla (v transformované i netransformované

variantě) indukce kalusů větší než na médiích s neomycinem. Celkově nejnižší indukce a nejpomalejší růst byl pozorován u transgenních kalusů, které byly kultivovány na médiích s Neo 200 mg·l⁻¹. Proliferace kalusů závisí na použitém antibiotiku a jeho koncentraci.

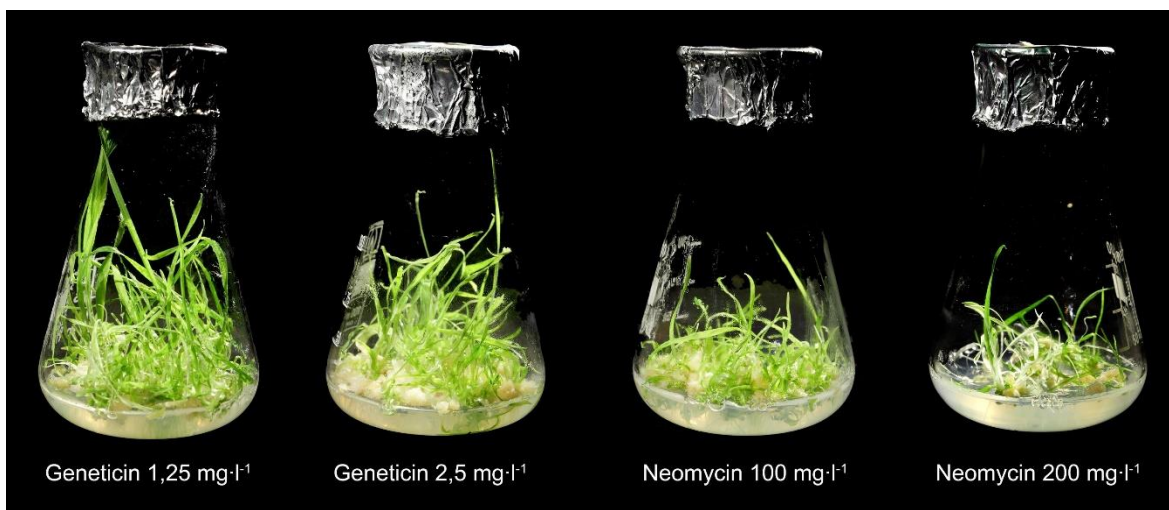
4.1.3 Regenerace transgenních rostlin

Na RM po dvou týdnech začaly regenerovat rostliny (Obr. 18; 19). Při převodu rostlin do zeminy po šesti týdnech byly u každé varianty spočítány regenerované (zelené a albinózní) rostliny (Tab. 10 - 14). Průměrné množství regenerovaných rostlin z jednoho transformovaného embrya ze všech opakování a celkového počtu je vyjádřeno graficky, včetně směrodatné odchylky (SD), (Obr. 20).

Pomocí Studentova t-testu byly statisticky hodnoceny počty regenerovaných transgenních rostlin. Srovnávány byly počty regenerovaných rostlin na médiích s antibiotiky s kontrolní variantou, bez selekce (C, bez antibiotik). Byl zjištěn statistický významný rozdíl na hladině významnosti $P \leq 0,05$ (P , pravděpodobnost).



Obr. 18. Počáteční regenerace transgenních kontrolních rostlin jarního ječmene na RM bez antibiotik (foto O. Blahoušek).



Obr. 19. Transgenní rostliny jarního ječmene regenerované na RM obsahující antibiotika Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹. Rozdíl ve frekvenci regenerovaných transgenních rostlin po 2 týdnech kultivace na RM (foto O. Blahoušek).

Tab. 9. Počet regenerovaných zelených a albinózních rostlin jarního ječmene po transformaci vektorem pBract214AS::Hvabc4 na médiích bez antibiotik pro kontrolní C rostliny, bez selekce

Kontrola C		Kultivovaná embrya / počet regenerovaných rostlin										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Celkem
1	Zelené	4	6	5	4	6	9	5	6	8	5	58
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Zelené	8	6	5	7	8	6	5	4	8	9	66
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Zelené	7	4	8	5	6	7	5	9	4	6	61
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 10. Počet regenerovaných zelených a albinózních rostlin jarního ječmene po transformaci vektorem pBract214AS::Hvabc4 na médiích s antibiotikem Gen 1,25 mg·l⁻¹

Geneticin 1,25 mg·l ⁻¹		Kultivovaná embrya / počet regenerovaných rostlin										
Opakování / P. miska		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Celkem
1	Zelené	-	10	6	7	8	9	-	10	-	9	61
	Albinózní	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	2
2	Zelené	7	10	7	12	-	6	10	7	7	5	71
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
3	Zelené	8	11	4	10	10	9	9	8	10	12	91
	Albinózní	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2

Tab. 11. Počet regenerovaných zelených a albinózních rostlin jarního ječmene po transformaci vektorem pBract214AS::Hvabc4 na médiích s antibiotikem Gen 2,50 mg·l⁻¹

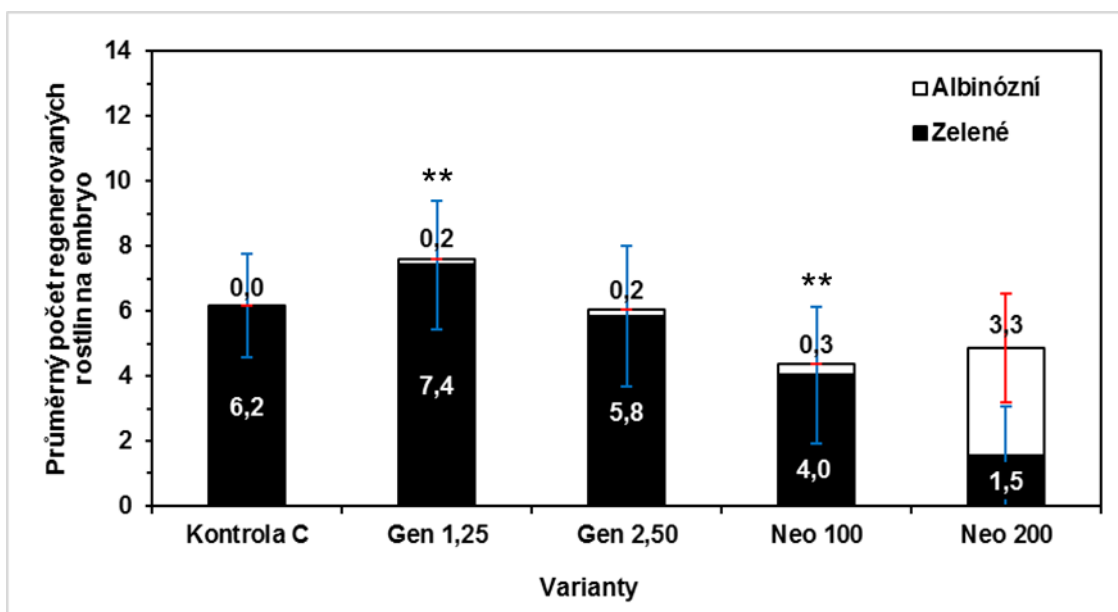
Geneticin 2,50 mg·l ⁻¹		Kultivovaná embrya / počet regenerovaných rostlin										
		Opakování / P. miska	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Zelené	3	3	7	3	-	5	-	5	5	6	37
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Zelené	6	8	5	6	4	3	9	8	4	6	59
	Albinózní	2	-	-	-	-	1	-	-	-	2	5
3	Zelené	7	8	5	9	7	10	5	9	9	10	79
	Albinózní	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1

Tab. 12. Počet regenerovaných zelených a albinózních rostlin jarního ječmene po transformaci vektorem pBract214AS::Hvabc4 na médiích s antibiotikem Neo 100 mg·l⁻¹

Neomycin 100 mg·l ⁻¹		Kultivovaná embrya / počet regenerovaných rostlin										
		Opakování / P. miska	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Zelené	-	4	3	8	7	-	2	6	-	3	33
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
2	Zelené	-	8	2	4	7	7	3	6	-	9	46
	Albinózní	-	3	-	-	2	1	1	-	-	-	7
3	Zelené	3	2	3	5	4	7	4	7	3	4	42
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

Tab. 13. Počet regenerovaných zelených a albinózních rostlin jarního ječmene po transformaci vektorem pBract214AS::Hvabc4 na médiích s antibiotikem Neo 200 mg·l⁻¹

Neomycin 200 mg·l ⁻¹		Kultivovaná embrya / počet regenerovaných rostlin										
Opakování / P. miska		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Celkem
1	Zelené	3	3	-	2	-	-	-	1	-	1	10
	Albinózní	-	5	-	8	3	7	1	4	3	-	31
2	Zelené	3	2	2	2	3	1	1	1	-	5	20
	Albinózní	1	5	4	10	6	4	-	-	-	9	39
3	Zelené	-	-	2	-	4	-	3	-	7	-	16
	Albinózní	-	6	-	5	5	1	2	3	6	2	30



Obr. 20. Průměrný počet regenerovaných transgenních rostlin jarního ječmene na embryo po transformaci na RM pro kontrolní C embrya (bez selekce). Kultivace byla na RM obsahujícím antibiotika Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹. Byly zaznamenány zelené (zobrazeno černě) a albinózní (zobrazeno bíle) regenerované rostliny (pro 30 kalusů u každého typu média). Vyjádřena SD modře pro zelené rostliny, červeně pro albinózní rostliny. ** udávají statistickou významnost $P \leq 0,05$ (Studentův t-test).

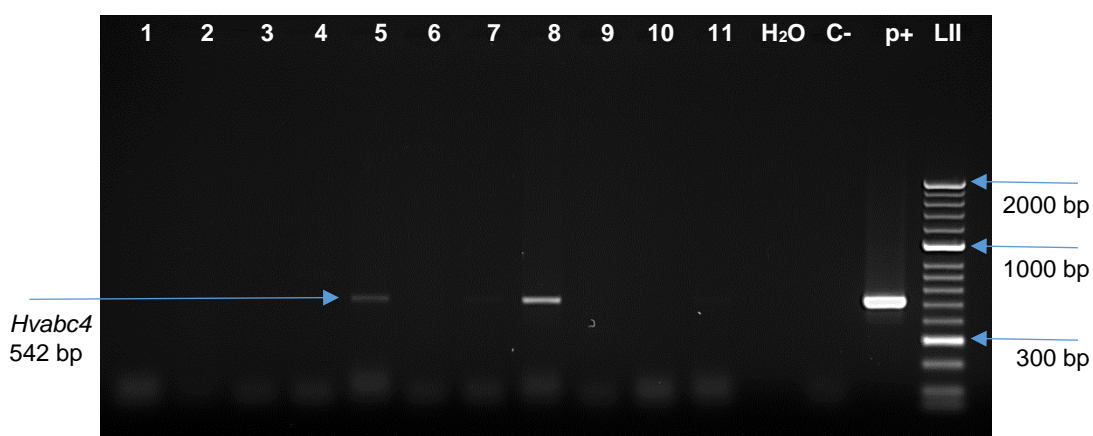
Z jednoho transformovaného embrya regenerovalo v průměru od 4,3 do 7,6 rostlin/jedno embryo (dle antibiotika v médiu). Nejvíce rostlin regenerovalo na médiích s Gen 1,25 mg·l⁻¹ (7,6 rostlin/jedno embryo), to je o 18,4 % více rostlin než u C kontroly, bez selekce. U zbývajících variant bylo menší množství regenerovaných rostlin na embryo než u kontroly. Na všech médiích (s výjimkou transformované kontroly C, bez selekce)

regenerovaly albinózní rostliny. Nejvíce rostlinných albínů (68,5 %) bylo pozorováno na médiích s Neo 200 mg·l⁻¹.

Byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P \leq 0,05$) mezi počtem rostlin regenerovaných na médiích bez antibiotik a mezi počtem rostlin regenerovaných na médiích s antibiotikem Gen 1,25 mg·l⁻¹. Na stejné hladině významnosti byly zjištěny rozdíly mezi počtem rostlin regenerovaných na médiích bez antibiotik a mezi počtem rostlin regenerovaných na médiích s antibiotikem Neo 100 mg·l⁻¹.

4.1.3.1 PCR analýza a detekce transgenů

Nejdůležitějším parametrem k ověření selekční schopnosti genu *Hvabc4* byla detekce transgenů pomocí PCR analýzy u regenerovaných rostlin. Z prvních tří regenerovaných rostlin, které regenerovaly z jednoho embrya, byla izolována genomová DNA. Fragment o velikosti 542 bp byl detekován na 1% agarózovém gelu (Obr. 21). Počet rostlin s detekovaným transgenem je uveden v Tab. 15.



Obr. 21. PCR analýza transgenů *Hvabc4* u jarního ječmene odrůdy Golden Promise. 1-11 analyzované vzorky (pozitivní 5, 7, 8, 11), H₂O, C- (negativní kontrola), p+ (pozitivní kontrola, vektor pBract214AS::Hvabc4), LII (DNA HyperLadder).

Tab. 14. Výsledky PCR analýzy regenerovaných rostlin jarního ječmene

Antibiotikum mg·l ⁻¹	Počet vybraných rostlin	PCR pozitivní rostliny	
		Počet	%
Kontrola C	43	2	4,7
Geneticin 1,25	39	17	43,6
Geneticin 2,50	38	8	21,0
Neomycin 100	34	7	34,0
Neomycin 200	16	9	56,3

Zájemový gen *Hvabc4* byl detekován u všech testovaných variant. Procento zjištěných pozitivních rostlin se pohybovalo v rozmezí 4,7 - 56,3 %. Nejvíce transgenních rostlin bylo zjištěno na médiích Gen 200 mg·l⁻¹, gen byl detekován z 56,3 %. U transgenních rostlin regenerujících na médiích s antibiotiky Gen 1,25 mg·l⁻¹, Neo 100 mg·l⁻¹ a Gen 2,50 mg·l⁻¹ (v tomto pořadí) byl zaznamenán pokles v procentuální zastoupení detekovaného genu. U transgenních kontrolních rostlin (bez selekce) bylo pozorováno nízké (4,2 %) procentuální zastoupení genu.

4.1.3.2 Závislost účinku selekce k detekovanému genu *Hvabc4*

Pomocí kontingenční tabulky byla zjištěna statisticky významná závislost mezi účinkem selekce a počtem detekovaných transgenních rostlin. Srovnáním testového kritéria (T) a kritické hodnoty (K) dat z kontingenční tabulky můžeme říci, že účinek selekce a počet detekovaných transgenních rostlin jsou na sobě závislé (neboť $T > K$). Největší selekční efekt byl zaznamenán ($P \leq 0,001$) u transgenních rostlin regenerujících na médiích s Neo 200 mg·l⁻¹, u těchto rostlin byla zjištěna transformační efektivita zájemového genu *Hvabc4* s úspěšností 53,3 % (Tab. 17).

Tab.17. Závislost účinku selekce k detekovanému genu *Hvabc4*

		Selekce na médiu s Neo 200 mg·l ⁻¹	Kontrola C, bez selekce	Celkem
Detekce transgenu	Pozitivní	9	2	11
	Negativní	7	41	48
Celkem		16	43	59

Testové kritérium (T) = 20, 49

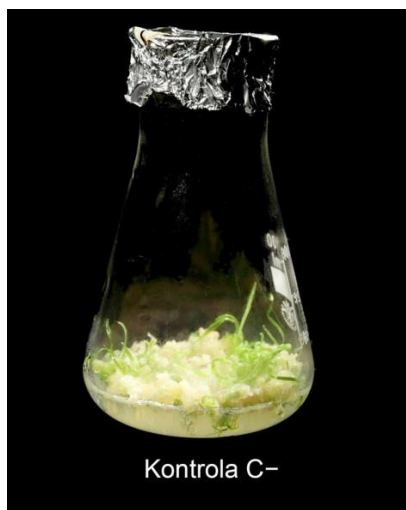
Kritická hodnota (K) = 10,82

P = 0,001

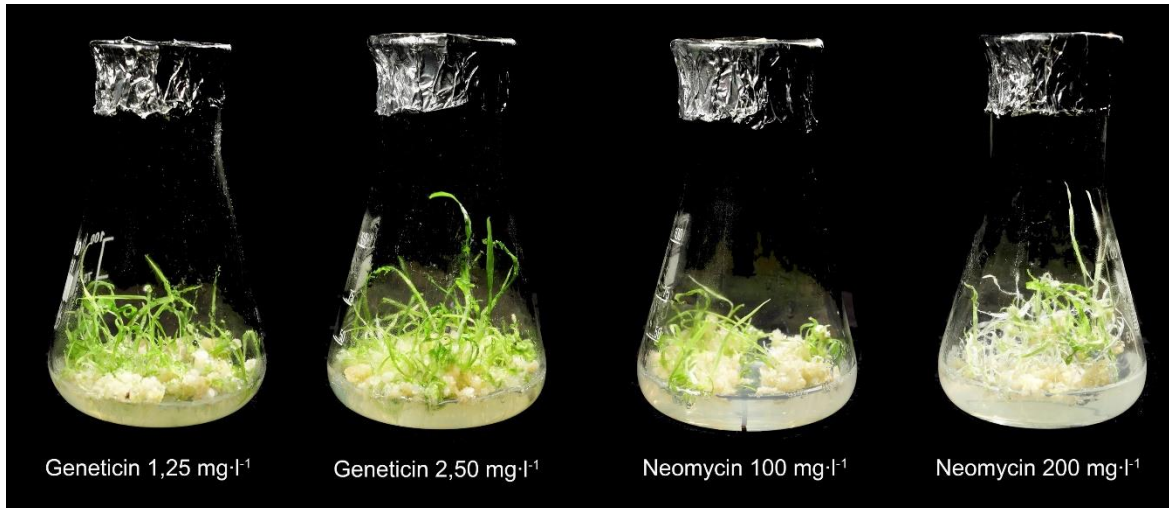
4.1.4 Regenerace netransgenních rostlin

Byla sledována regenerace u netransgenních rostlin obdobně jako u transgenní varianty (Obr. 22; 23). Počet regenerovaných rostlin, zelených a albinózních, byl zaznamenán do Tab. 16. Průměrné množství regenerovaných rostlin z netransformovaného embrya je vyjádřeno graficky včetně SD (Obr. 24).

Pomocí Studentova t-testu byly statisticky hodnoceny počty regenerovaných netransgenních rostlin. Srovnávány byly počty regenerovaných rostlin na médiích s antibiotiky s kontrolní variantou (C-, bez antibiotik). Byl zjištěn statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P \leq 0,05$.



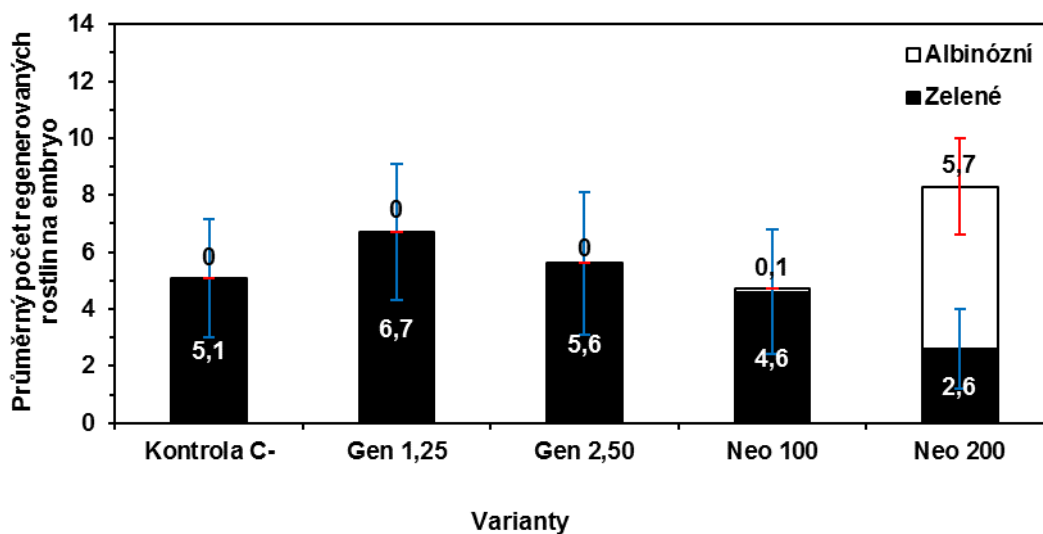
Obr. 22. Počáteční regenerace kontrolních rostlin jarního ječmene regenerované na RM bez antibiotik (foto O. Blahoušek).



Obr. 23. Netransgenní rostliny jarního ječmene regenerované na RM obsahující antibiotika Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹. Rozdíl ve frekvenci regenerovaných netransgenních rostlin po 2 týdnech kultivace na RM (foto O. Blahoušek).

Tab. 15. Počet regenerovaných rostlin jarního ječmene na médiích bez antibiotik (kontrolní C-) a na médiích s antibiotiky Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹

Netransformováno		Kultivovaná embryo / počet regenerovaných rostlin										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Celkem
Varianta / Antibiotikum mg·l ⁻¹												
Kontrola C-	Zelené	7	5	4	5	1	7	4	3	7	8	51
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geneticin 1,25	Zelené	6	8	4	8	5	9	5	6	4	12	67
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geneticin 2,50	Zelené	2	2	6	6	6	8	7	8	2	9	56
	Albinózní	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomycin 100	Zelené	3	5	3	6	5	-	2	5	9	8	46
	Albinózní	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Neomycin 200	Zelené	2	4	-	3	5	2	1	4	1	4	26
	Albinózní	5	5	7	4	4	6	9	5	4	8	57



Obr. 24. Průměrný počet regenerovaných rostlin na netransformované embryo jarního ječmene pro RM pro kontrolní C- embryo (bez antibiotik) a pro RM obsahující antibiotika Gen 1,25 a 2,50 mg·l⁻¹ nebo Neo 100 a 200 mg·l⁻¹. Byly zaznamenány zelené (zobrazeno černě) a albinózní (zobrazeno bíle) regenerované rostliny (pro 10 kalusů z každého typu média). Vyjádřena SD modře pro zelené rostliny, červeně pro albinózní rostliny.

U netransgenních variant byla v době kultivace pozorována nejpomalejší regenerace rostlin u kontroly C-. V průměru regenerovalo 4,7 až 8,3 rostlin/jedno embryo (dle antibiotika v médiu). Albinózní rostliny regenerovaly pouze na médiích s neomycinem. Nejvíce zelených rostlin regenerovalo na médiích s Gen 1,25 mg·l⁻¹ (6,7 rostlin/jedno embryo). Zjištěné hodnoty regenerace netransgenních rostlin nebyly statisticky významné.

Srovnáním transgenních a netransgenních variant se ukázalo, že u transformovaných embryí dochází v případě kontroly a geneticinu (obě koncentrace) k nárůstu průměrného množství rostlin na jeden kalus. To může značit posílení tolerance vůči geneticinu. Naopak v případě neomycinu (obě koncentrace) dochází k poklesu průměrného množství zelených rostlin na jeden kalus. To by mohlo značit snížení tolerance vůči tomuto druhu antibiotika. U Neo 200 mg·l⁻¹ bylo pozorováno v obou případech nadpoloviční množství albinózních rostlin.

5 DISKUZE

Genetické manipulace jednoděložných rostlin nejsou rutinní záležitostí a samotná transformace obilnin je obtížná. Vlivem technologických pokroků se metody transformace zdokonalují a postupně zvyšují transformační účinnost. Pro úspěšnou transformaci ječmene je třeba naplánovat a zrealizovat přenos genu do vhodného explantátu, kde se po integraci do genomu exprimuje. Z regenerovaných rostlin se poté určuje efektivita transformace.

Transformace pomocí *A. tumefaciens* je často používanou metodou transformace, díky které lze transformovat různé typy rostlinných explantátů, např. listy, embrya (Bidlack a Jansky, 2011). Metoda sloužila k transformaci dvouděložných rostlin, ale Tingay a kol. v roce 1997 úspěšně transformovali nezralá zygotická embrya ječmene. Pro vnesené geny (*bar* - selekční marker, *gus* - zájmový gen) byla zjištěna transformační efektivita 4,2 % (z 1282 transformovaných embryí bylo 54 regenerovaných rostlin transgenních).

Pro transformaci ječmene pomocí *A. tumefaciens* bylo vytvořeno několik protokolů, které byly postupně optimalizovány (Bartlett a kol. 2008). Bylo totiž zjištěno, že efektivita transformace je ovlivněna několika zásadními faktory: vybraným agrobacteriálním kmenem, expresním vektorem, jeho velikostí, typem promotoru, genotypem transformovaného explantátu (Mrízová a kol. 2014).

Pro úspěšnou transformaci je důležitá volba správného explantátu vytvořeného z donorové rostliny, kde jsou velmi důležité podmínky pěstování: stabilní teplota, optimální osvětlení a vzdušná vlhkost, kterých lze dosáhnout v řízených podmínkách. Pro účinnou transformaci metodou *A. tumefaciens* je nejlepší jarní ječmen odrůdy Golden Promise (Mrízová a kol. 2014). Nejvhodnějším explantátem z důvodu vysoké indukční schopnosti a následné regenerace rostlin je nezralé zygotické embryo o velikosti 1,5 - 2 mm.

Bartlett a kol. (2008) dosáhli po transformaci embryí agrobacteriálním kmenem AGL1 25% transformační účinnosti. Reportérový gen pro luciferázu (*luc*) a selekční gen *hpt* a byly vneseny do ječmenného genomu. V experimentu byly poprvé využity binární vektory.

Vyroubalová a kol. (2011) hodnotili transformační efektivitu z publikovaných výsledků transformace ječmene pomocí *A. tumefaciens* za použití bakteriálních selekčních markerů (*bar*, *hpt*). Efektivita selekce genu *bar*, který byl ve vektoru pod kontrolou Ubi1 nebo 35S promotoru, se pohybovala 1 - 15 %. Selekční efektivita genu *hpt* pod kontrolou 35S promotoru byla 2 - 12 % (Matthews a kol., 2001). Pro indukci kalusů je důležitá koncentrace mikro a makro prvků (anorganické soli), aminokyselin (např. glutamin, prolin), syntetických fytohormonů (např. kyselina 2-methoxy-3,6-dichlorbenzoová) přidávané do média.

Harwood a kol. (2009) použili nový, efektivní a přesný klonovací systém, který je součástí vektorů pBRACT, které jsou určené pro transformaci pomocí *A. tumefaciens*. Součástí vektorů je bakteriální selekční gen *hpt*, který je řízen 35S promotorem. Součástí vektoru byl i reportérový gen pro luciferázu (*luc*). Připraveným vektorem transformovali nezralá zygotická embrya ječmene. Kalusy a regenerované rostliny byly selektovány na médiích s Hyg 50 mg·l⁻¹. Efektivita transformace byla vysoká, 25 %, 95 % regenerovaných rostlin bylo transgenních.

Na základě dosažených výsledků byl publikován protokol pro transformaci ječmene (Harwood a kol., 2009), který zaručuje úspěšnou transformaci. Ta je však závislá na použitém zájmovém genu, jeho velikosti, původu a stavu donorových rostlin, z kterých jsou odbírány explantáty. Uvedený protokol byl použit pro transformaci jarního ječmene v rámci řešení diplomové práce.

V rámci klonovací strategie v diplomové práci byl použit upravený plazmid pBract214AS, který patří do skupiny pBRACT vektorů. Úspěšnost transformace v jednotlivých etapách experimentů se pohybovala v závislosti na koncentraci a druhu antibiotika. Nejvíce transgenních rostlin, které obsahovaly overexprimovaný ječmenný gen *Hvabc4* (v databázi AK_363603, MLOC_66404.1), bylo na médiích s Neo 200 mg·l⁻¹, 56,3 %.

Cílem diplomové práce bylo ověřit, zda overexprimovaný ječmenný ortholog vykazuje toleranci vůči aminoglykosidovým antibiotikům, podobně jako je tomu u genu *Atwbc19*. Gen *Atwbc19* byl izolován z *A. thaliana*. Funkce *Atwbc19* je od roku 2005 studována u různých druhů rostlin. U transgenního tabáku (Mentewab a Stewart, 2005) a transgenního melounu (Bombale a kol., 2010) byla při nadměrné expresi genu pozorována rezistence vůči kanamycinu. Rezistence ke kanamycinu a dalším třem antibiotikům (neomycin, geneticin a paromomycin) byla zkoumána u hybridního topolu (Kang a kol., 2010).

Ohnoutková a kol. (2015) transformovali gen *Atwbc19* do ječmene za účelem studia účinnosti selekce genu na čtyřech aminoglykosidových antibiotikách. Nejvyšší účinnost selekce (80 %) byla na médiích s antibiotikem Neo 200 mg·l⁻¹. Předpokládá se, že protein AtWBC19 je zodpovědný za transport kanamycinu do vakuoly. Tento gen by mohl být používán jako selekční marker a nahradit tak bakteriální selekční geny.

V diplomové práci byla hodnocena selekční schopnost overexprimovaného ječmenného genu *Hvabc4* na médiích s antibiotiky geneticinem a neomycinem. Největší selekční schopnost byla také zjištěna na médiích s neomycinem v koncentraci 200 mg·l⁻¹, 56,3% z regenerovaných rostlin bylo transgenních. Oproti účinku genu *Atwbc19* byla schopnost selekce genu *Hvabc4* nižší o 23,7 %. U kontrolní neselektované transformované varianty byla selekce pouze 4,7 %.

Srovnáním transgenních a netransgenních variant se ukázalo, že u transformovaných embryí dochází v případě kontroly a geneticinu (obě koncentrace) k nárůstu průměrného množství rostlin na jeden kalus. To může značit posílení tolerance vůči geneticinu. Naopak v případě neomycinu (obě koncentrace) dochází k poklesu průměrného množství rostlin na jeden kalus. To by mohlo značit snížení tolerance vůči tomuto druhu antibiotika. U Neo 200 mg·l⁻¹ bylo pozorováno v obou případech nadpoloviční množství albinózních rostlin.

Oproti genu *Atwbc19* byl u regenerovaných rostlin zaznamenán vysoký výskyt albinózních rostlin. Podle Conte a Lloyd (2010) se albinózní rostliny vyskytují na médiích s antibiotikem, neboť se inhibuje syntéza chlorofylu v chloroplastech. V našem experimentu není ovšem jasné, proč na Neo 200 mg·l⁻¹ regenerovalo tak mnoho albinózních rostlin. Může to být způsobeno např. koncentrací a druhem antibiotika obsaženém v médiu.

Bylo zjištěno, že tento typ rostlinných transportérů zodpovídá za transport širokého spektra látek přes buněčnou membránu, detoxikační procesy, reakci na abiotický a biotický stres, metabolismus buňky a další důležité funkce důležité pro chod buňky (Kang a kol., 2011). Vzhledem k významnosti a specifitě účinku identifikovaného genu a možnosti praktického využití, byla aplikace genu *Atwbc19*, jako přirozeného selekčního markeru v roce 2013 patentována (US20080250527; Mentewab a Stewart, 2008).

Mentewab a kol. (2014) zjistili, že mutace v genu kódujícím transportér AtWBC19 způsobila změnu ve schopnosti rostliny přijímat kationty kovů za stresových podmínek. U transgenních rostlin se zvýšenou expresí genu *Atwbc19* lze předpokládat zvýšenou toleranci vůči abiotickým stresům, nebo zvýšenou toleranci k houbovým chorobám.

Na základě bioinformačních analýz byl identifikován ječmenný ortholog ke genu *Atwbc19*. Jeho funkce nebyla dosud studována. Na základě výsledků v diplomové práci bylo zjištěno, že overexprimovaný ječmenný gen *Hvabc4* ovlivňuje selekční schopnost transformovaných pletiv a rostlin.

6 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma ABC rostlinných transmembránových proteinů. Uvedena je základní funkce vybraných ABC transportérů u *A. thaliana*, kde byl identifikován gen vykazující rezistenci k aminoglykosidovým antibiotikům, který by se dal využít v genovém inženýrství rostlin. Bioinformatickými nástroji byly identifikovány čtyři ječmenné orthology k tomuto genu.

V experimentální části byl gen *Hvabc4* vybraného orthologu vložen do vektoru pBract214AS. Pomocí *A. tumefaciens* byl gen transformován do jarního ječmene odrůdy Golden Promise.

Bylo zjištěno, že overexprimovaný gen ječmenného orthologu ovlivňuje selekční schopnost transformovaných pletiv na médiích s antibiotiky, geneticinem a neomycinem. U regenerovaných transformovaných rostlin byla pomocí PCR analýzy stanovena přítomnost genu *Hvabc4*. Nejvyšší selekční schopnost byla zjištěna na médiích, která obsahovala antibiotikum neomycin s koncentrací 200 mg·l⁻¹, u 56,3 % regenerovaných rostlin byl detekován zájmový gen *Hvabc4*.

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že overexprimovaný gen *Hvabc4* ovlivňuje selekci transgenních pletiv a rostlin jarního ječmene. Funkce genu *Hvabc4* bude v dalších experimentech testována u dvouděložných rostlin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bartlett, J.G., Alves, S.C., Smedley, M., Snape, J.W., Harwood, W.A. (2008). High-throughput Agrobacterium-mediated barely transformation. *Plant. Methods.* 4 (22): DOI: 10.1186/1746-4811-4-22.
- Bombale, S.L., Gowda, P.H.R., Gunnaiah, R., Malatheshaiah, N.T., Salome, T., Swamidatta, S.H. (2010). *In vitro* regeneration and transformation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) with alternative *Atwbc19* marker gene. *IJBB.* 6 (1): 1-12.
- Burris, K., Mantewab, A., Ripp, S., Stewart C.N. (2008). An *Arabidopsis thaliana* ABC transporter that confers kanamycin resistance in transgenic plants does not endow resistance to *Escherichia coli*. *Microb. Biotechnol.* 1 (2): 191–195.
- Campoli, C., Drosse, B., Searle, I., Coupland, G., von Korff, M. (2012). Functional characterisation of *HvCO1*, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of *CONSTANS*. *Plant J.* 69 (5): 868-880.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., Ausubel, F.M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323 (5910): 95-101.
- Conte, S.S., Lloyd, A.M. (2010). The MAR1 transporter is an opportunistic entry point for antibiotics. *Plant Signal. Behav.* 5 (1): 49-52.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19 (6): 1349.
- Fitch, W.M. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* 19 (2): 99–113.
- Fitch, W.M. (2000). Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet.* 16 (5): 227-231.
- Forster, B.P. (2001). Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica* 120 (3): 317-328.

- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible Binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol.* 42 (6): 819-832.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8: 67-113.
- Jaeger, K.E., Wigge, P.A. (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17 (12): 1050-1054.
- Kang, B., Ye, X., Osburn, L.D., Stewart, C.N., Cheng, Z.M. (2010). Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP-binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics. *Plant Cell Rep.* 29 (6): 643-650.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretzschmar, T., Lee, Y., Martinoia, E. (2011). Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book* 9: e0153.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y. (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J.* 50 (2): 207-218.
- Kuzniar, A., van Ham, R.C.H.J., Pongor, S., Leunissen, J.A.M. (2008). The quest for orthologs: finding the corresponding gene across genomes. *Trends Genet.* 24 (11): 539-551.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., Lee, Y. (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138 (2): 827-836.
- Liang, C., Jaiswal, P., Hebbard, C., Avraham, S., Buckler, E.S., Casstevens, T., Hurwitz, B., McCouch, S., Ni, J., Pujar, A., Ravenscroft, D., Ren, L., Spooner, W., Teclé, I., Thomason, J., Tung, C.W., Wei, X., Yap, I., Youens-Clark, K., Ware, D., Stein, L. (2008). Gramene: a growing plant comparative genomics resource. *Nucleic Acids Res.* 36 (1): 947-953.
- Matsuda, S., Takano, S., Sato, M., Furukawa, K., Nagasawa, H., Yoshikawa, S., Kasuga, J., Tokuji, Y., Yazaki, K., Nakazono, M., Takamure, I., Kato, K. (2016). Rice stomatal closure requires guard cell plasma membrane ATP-binding cassette transporter RCN1/OsABCG5. *Mol. Plant.* 9 (3): 417-427.

- Matthews, P.R., Wang, M.B., Waterhouse, P.M., Thornton, S., Fieg, S.J., Gubler, F., Jacobsen, J.V. (2001). Marker gene elimination from transgenic barely, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Mol. Breed.* 7(2): 195-202.
- McFarlane, H.E., Shin, J.J.H., Bird, D.A., Samuels, A.L. (2010). Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell.* 22 (9): 3066–3075.
- Mentewab, A., Matheson, K., Adebisi, M., Robinson, S., Elston B. (2014). RNA-seq analysis of the effect of kanamycin and the ABC transporter AtWBC19 on *Arabidopsis thaliana* seedlings reveals changes in metal content. *PLoS ONE* 9 (10): e109310.
- Mentewab, A., Stewart, C.N. (2005). Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat. Biotech.* 23 (9): 1177–1180.
- Mentewab, A., Stewart, C.N. (2008). Antibiotic Resistance Conferred by a Plant Abc Transporter Gene when Expressed in Transgenic Plants. US 20080250527 A1.
- Mrízová, K., Holásková, E., Öz, M.T., Jiskrová, E., Frébort, I., Galuszka, P. (2014). Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnol. Adv.* 32 (1): 137-157.
- Němcová, K. (2013). Transformace jarního ječmene genem *Atwbc19*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Ohnoutková, L. (2013). Nové geny ABC transportérů u jednoděložných rostlin. Projekt KONTAKT II: LH 13069. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Ohnoutková, L., Křenek, P., Vašková, J., Mentewab, A. (2015). *In vitro* selection and regeneration of spring barely overexpressing the *Atwbc19* gene. Volume: 51, Supplement: 1, *In vitro* cellular & Developmental Biology-Animal., Arizona, poster and oral presentation S53-S54.
- Ohyanagi, H., Tanaka, T., Sakai, H., Shigemoto, Y., Yamaguchi, K., Habara, T., Fujii, Y., Antonio, B.A., Nagamura, Y., Imanishi, T., Ikeo K., Itoh, T., Gojobori, T., Sasaki, T. (2006). The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;34 (Database issue): D741-744.

- Panstruga, R. (2005). Discovery of novel conserved peptide domains by ortholog comparison within plant multi-protein families. *Plant Mol. Biol.* 59 (3): 485-500.
- Patel, R.V., Nahal, H.K., Breit, R., Provart, N.J. (2012). BAR expressolog identification: expression profile similarity ranking of homologous genes in plant species. *Plant J.* 71 (6): 1038-1050.
- Rea, P.A. (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 347–375.
- Remm, M., Storm, C.E., Sonnhammer, E.L. (2001). Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J. Mol. Biol.* 314 (5): 1041-1052.
- Růžička, K., Strader, L.C., Bailly, A., Yang, H., Blakeslee, J.J., Łangowski, Ł., Nejedlá, E., Fujita, H., Itoh, H., Syōno, K., Hejátko, J., Gray, W.M., Martinoia, E., Geisler, M., Bartel, B., Murphy, A.S., Friml, J. (2010). *Arabidopsis PIS1* encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (23): 10749–10753.
- S'anches-Fern'andez, R., Davies, T.G.E., Coleman, J.O.D., Rea, P.A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* 276: 30231–30244.
- Stein, M., Dittgen, J., S'anches-Rodríguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., Somerville, S. (2006). *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18 (3): 731-746.
- Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettell, R. (1997). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11 (6): 1369-1376.
- Tominaga, J., Mizutani, H., Horikawa, D., Nakahara, Y., Takami, T., Sakamoto, W., Sakamoto, A., Shimada, H. (2016). Rice CYO1, an ortholog of *Arabidopsis thaliana* cotyledon chloroplast biogenesis factor AtCYO1, is expressed in leaves and involved in photosynthetic performance. *J. Plant Physiol.* 207: 78-83.

- Tulpan, D., Leger, S., Tchagang, A., Pan, Y. (2015). Enrichment of *Triticum aestivum* gene annotations using ortholog cliques and gene ontologies in other plants. *BMC Genomics* 16 (1): 1-19.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K., Theodoulou, F.L. (2008). Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 13 (4): 151-159.
- Vyroubalová, Š., Šmehilová, M., Galuszka, P., Ohnoutková, L. (2011). Genetic transformation of barley: limiting factors. *Biol. Plantarum.* 55 (2): 213-224.
- Wan, Y., Lemaux, P.G. (1994). Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 1 (104): 37-48.

Knihy:

- Bidlack, J.E., Jansky, S.H. (2011). Plant breeding and propagation. In: *Stern's Introductory Plant Biology*, pp. 252-257. McGrawHill: Edit. 12., 622. ISBN: 978-0-07-122212-9.
- Bradshaw, J.E. (2016). Genetically modified crops. In: *Plant breeding: Past, present and future*, pp. 50-55, 572-575. Springer: Edit. 1., 693. ISBN: 978-3-319-23285-0.
- Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W. (2005). Plant Reproduction, Genetics and Evolution. Genetic Engineering. In: *Plant Biology*, pp. 266-277. Pearson Prentice Hall: Edit. 2., 704. ISBN: 0-13-146906-1.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (2015). Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (ed). *Biochemistry & molecular biology of plants*, pp 984-1050. Wiley Blackwell: Edit. 2., 1264. ISBN: 9780470714218.
- Harwood, W.A., Bartlett, J.G., Alves, S.C., Perry, A.M., Smedley, M., Leyland, N., Snape, J.W. (2009). Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. In: Jones, H.D., Shewry, P.R. (ed). *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*, pp137-147. Humana Press, ISBN: 978-1-59745- 379-0.
- Li, Z.T., Gray, D.J. (2005). Genetic engineering technologies. In: Trigiano, R.N., Gray, D.J. (ed). *Plant development and biotechnology*, pp. 241-250. CRC Press: Edit. 1., 358. ISBN: 0-8493-1614-6.

- Matsumoto, T.K., Gonsalves, D. (2012). Biolistic and other non-*Agrobacterium* technologies of plant transformation. In: Altman, A., Hasegawa, P.M. (ed). Plant Biotechnology and Agriculture – Prospects for the 21st Century, pp. 117-129. Elsevier: Edit. 1., 586. ISBN: 978-0-12-381466-1.
- Ondřej, M. (2004). Geneticky modifikované rostliny. In: Káš, J. (ed). Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy, pp. 27-34. JPM tisk s.r.o.: Edit. 1., 67. ISBN: 80-86313-13-1.
- QIAGEN (2011). QIAprep Spin Miniprep Kit. In: Quick Start Protocol. Qiagen, Sample & assay technologies. 1066960 01
- Smith, A.M., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R., Amey, A. (2010). Domestication and agriculture. In: Plant Biology, pp. 573-601. Garland Science: Edit. 1, 664. ISBN: 978-0-8153-4025-6.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009). Aplikace molekulární genetiky. Genetika, pp. 504-541. Masarykova Univerzita: Edit.1., 871. ISBN: 978-80-210-4852-2.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M., Murphy, A. (2015). Genome structure and gene expression. In: Taiz, L., Zeiger, E. (ed). Plant Physiology and Development, pp. 51-79. Sinauer Associates: Edit. 6., 761. ISBN: 978-1-60535-255-8.
- Zimolka, J., Cerkal, R., Dvořák, J., Edler, S., Ehrenbergerová, J., Hřivna, L., Kamler, J., Klem, K., Milotová, J., Míša, P., Procházková, B., Psota, V., Richter, R., Ryant, P., Tichý, F., Vaculová, K., Váňová, M., Vejražka, K. (2006). Historie, význam a postavení ječmene. Botanická a biologická charakteristika ječmene. In: Ječmen – formy a užitkové směry v České republice, pp. 11-35. Profi Press, s.r.o.: Edit. 1., 200. ISBN: 80-86726-18-5.

Internetové odkazy:

- European Commission (online). Genetically modified organisms (cit. 20. 3. 2017). Dostupné z: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm.
- Evropská legislativa (online). Ministerstvo životního prostředí (cit. 25. 3. 2017). Dostupné z: http://www.mzp.cz/cz/evropska_legislativa_gmo.

Invitrogen. Gateway Technology with Clonase II (2012). A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems (cit. 2. 3. 2017). Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gateway_clonaseii_man.pdf.

Ministerstvo životního prostředí (online). Registr povolených geneticky modifikovaných organismů (cit. 20. 3. 2017). Dostupné z: http://www.mzp.cz/cz/registr_povolenych_geneticky_modifikovanych_organismu.

pBRAC T (online). Biotechnology resources for arable crop transformation (cit. 3. 3. 2017). Dostupné z: <http://www.bract.org/index.htm>.

Pěstování Bt kukuřice (online). Místa pěstování modifikované Bt kukuřice MON 810 v České republice v roce 2016 (cit. 25. 3. 2017). Dostupné z: [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/\\$FILE/oeres-mista_kukurice_MON810-20160805.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/$FILE/oeres-mista_kukurice_MON810-20160805.pdf).

ThermoFisher, SCIENTIFIC (online). Gateway recombination cloning technology (cit. 1. 3. 2017). Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/gateway-technology.html>.