

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Martina Kadlecová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Detekce a funkční charakteristika transgenu
Atwbc19 u pšenice

Bakalářská práce

Martina Kadlecová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. Literatura použitá v této práci je citována.

V Olomouci dne 31. 7. 2017

Děkuji vedoucí práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při psaní bakalářské práce. Děkuji také Mgr. Tomáši Vlčkovi za metodickou pomoc v experimentální části práce.

Souhrn

ABC transportéry tvoří jednu z největších proteinových rodin a nacházejí se ve všech živých organismech. V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 129 těchto transportérů. Jejich hlavní funkce spočívá v transportu velkého množství látek v rostlině. Do skupiny transportérů ABCG patří i AtWBC19, který je původem z *A. thaliana* a je odpovědný za rezistenci k aminoglykosidickým antibiotikům. Předpokládá se, že transportér AtWBC19 je odpovědný za změnu obsahu kovů v rostlinách.

V bakalářské práci byl detekován a zkoumán transgen *Atwbc19* u rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) odrůd Fielder a Cadenza. Teoretická část bakalářské práce je zaměřena zejména na ABC transportéry a na způsoby transformace pšenice. V praktické části byl pomocí PCR analýzy detekován gen *Atwbc19* u rostlin pšenice, generace T1 a T2. V praktické části byl také hodnocen obsah kovů u rostlin T2 generace.

Summary

ABC transporters constitute one of the largest protein families found in all living organisms. In the *Arabidopsis thaliana* genome, 129 of these transporters has been found. The main function of these transporters is transport of large quantities of substances in the plant. The ABCG transporter group also includes AtWBC19, this originates from *A. thaliana* and is responsible for resistance to aminoglycoside antibiotics. It is assumed that the AtWBC19 transporter is responsible for changing the metal content of the plants.

In the bachelor thesis, the *Atwbc19* transgen was detected and tested in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) of the varieties Fielder and Cadenza. The theoretical part of the bachelor thesis is focused mainly on ABC transporters and on ways of transformation of wheat. In the practical part, the *Atwbc19* gene was detected by PCR analysis in wheat plants, generation T1 and T2. In this bachelor thesis was also evaluated content of metals in T2 generation plants.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce.....	9
3	Literární přehled	10
3.1	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L).....	10
3.2	Transgenoze rostlin.....	11
3.2.1	Transformace pšenice	11
3.3	Mikroprojektilový přenos DNA.....	11
3.4	Metody detekce transgenů	16
	Polymerázová řetězová reakce	16
	Real – time PCR	16
3.5	ABC transportéry.....	17
3.6	ABC transportér AtWBC19.....	22
3.7	Změny v obsahu kovů u rostlin způsobené ABC transportéry	23
3.8	Současný stav řešené problematiky	24
3.8.1	Transformace hybridního topolu genem <i>Atwbc19</i>	24
3.8.2	Transformace melounu genem <i>Atwbc19</i>	25
4	Materiál a metody.....	26
4.1	Biologický materiál.....	26
4.2	Izolace celkové rostlinné DNA metodou CTAB	26
4.3	PCR amplifikace segmentů u pšenice obecné	27
4.4	Příprava kultivačního média	29
4.5	Odběr a sterilizace nezralých obilok pšenice	29
4.6	Extirpace nezralých embryí pšenice	29
4.7	Kultivace embryí.....	29
4.8	Extrakce DNA paramagnetickými částicemi.....	29
4.9	Stanovení obsahu kovů	31
4.10	použité laboratorní přístroje	31
4.11	použité chemikálie a roztoky.....	31
5	Výsledky.....	34
5.1	Detekce transgenu <i>Atwbc19</i> v generaci T1	34

5.2	Detekce transgenu <i>Atwbc19</i> v generaci T2.....	35
5.3	Obsah kovů transgenních rostlin T2 generace.....	36
6	Diskuze.....	40
7	Závěr.....	42
8	Seznam zkratk.....	43
9	Použitá literatura.....	45

1 Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jedna z nejdůležitějších rostlin pěstovaná po celém světě. Pšenice je hlavní složkou pro výrobu pečivářských výrobků, těstovin a je součástí velkého množství prodávaných potravin. Její zrno se dále využívá jako krmivo, sláma jako stelivo hospodářských zvířat. V dnešní době nacházejí uplatnění i nové nepotravinářské odrůdy, jako zdroje škrobu a bioethanolu.

Pšenice je jednou z nejdůležitějších kulturních plodin. Získání transgenních rostlin pšenice je velmi složitý a metodicky zdlouhavý proces, jelikož dochází ke špatné integraci T-DNA (transferred DNA) do druhů jednoděložných rostlin, které nejsou přirozenými hostiteli *Agrobacterium tumefaciens*.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů
3. PCR analýza a detekce transgenu *Atwbc19* u pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) u generace T1. Selektce transformovaných embryí generace T2 na médiu obsahující neomycin.

3 Literární přehled

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice je jedna z nejstarších a nejvýznamnějších obilovin pěstovaná v oblastech s mírným klimatem v různých částech světa. Jedná se o druhou nejpěstovanější obilovinu ve světě a první v České republice.

Pšenice setá je obilovina patřící do rodu *Triticum* L. a čeledi lipnicovitých. Podle počtu chromozómů rod *Triticum* zahrnuje tři skupiny – diploidní, tetraploidní a hexaploidní. Do skupiny diploidních se řadí pšenice planá jednozrnka (*Triticum boeoticum* L.), dále pšenice kulturní jednozrnka (*Triticum monoccocum* L.) Tetraploidní skupina zahrnuje pšenici planou (*Triticum dicocoides* L.) či pšenici tvrdou (*Triticum durum* L.). Pěstitelsky nejvýznamnější je skupina hexaploidní ($2n = 42$), do které patří i pšenice setá (*Triticum aestivum* L.).

Nejvíce pěstovaným druhem je pšenice setá. Má nelámavý klas, který bývá osinatý či bezosinný a různě hustý. Plevy a pluchy jsou vejčité nebo podlouhle vejčité. Obilky bývají nahé a oblé. Pšenice setá se vyskytuje ve čtyřech varietách: *lutescens*, *milturum*, *erythrospermum* a *ferrugineum*. V České republice se nejvíce pěstuje varieta *lutescens*, která je charakteristická bezosinným či osinatým klasem bílé barvy.

Listy tvoří pšenice přisedlé, složené z pochvy a čepele. Tvorba stébla je signalizací přechodu rostliny z vegetativního do generativního období. Stéblo je duté, tvořeno zpravidla pěti články oddělenými kolénky. Květenstvím pšenice je složený klas z vícekvětých klásků umístěných na jednotlivých člancích klasového vřetene. Klásek tvoří bezosinné plevy a příslušný počet kvítků, které jsou obaleny pluchami z vnější strany a pluškami ze strany vnitřní. Na kvítcích se rovněž nachází pestíky a tyčinky. Plodem pšenice je obilka složená ze tří částí – obaly, endosperm a embryo. Obaly a obilky tvoří oplodí a osemení. Pod osemením se nachází vrstva aleuronových buněk přiléhajících k endospermu. Buňky endospermu jsou vyplněny škrobem a na bazální straně obilky přiléhá k endospermu embryo (Zimolka a kol., 2005).

Produkce pšenice v roce 2016/2017 činila v rámci světového trhu 743 milionů tun a spotřeba byla 727 milionů tun. Nejrozšířenější obilovinou je ve světovém měřítku kukuřice s podílem 36,4 %. Následuje pšenice s 30 % a jedná se tak o druhou nejrozšířenější obilovinu. Největším světovým producentem a nejvýznamnějším exportérem pšenice je Evropská unie (20,6 %), dále Čína, Indie, USA, Rusko, Kanada, Austrálie a další státy. Největším

producentem pšenice seté v Evropě je Francie s 27,1 %, následuje Německo, Velká Británie, Polsko, Rumunsko, Dánsko, Španělsko a Česká republika (3,4 %), (Pančíková, 2017).

3.2 Transgenozé rostlin

Rostliny jsou pro lidstvo důležité zejména proto, že slouží jako zdroj potravy a krmiva. Některé jsou také cenným zdrojem surovin pro chemický a farmaceutický průmysl. Z těchto mnoha důvodů jsou rostliny v popředí vědeckého zájmu různých oborů, včetně biochemie a biotechnologie. V současnosti jsou transgenní odrůdy získány u mnoha druhů rostlin, například kukuřice, rýže, sóji a řepky olejné. Genové inženýrství umožňuje přenos zájmových genů i do taxonomicky vzdálených organismů a díky němu jsme schopni překonat mezidruhové vzdálenosti. Zájmové geny, které jsou přeneseny do nového hostitelského organismu, se nazývají transgeny. Mohou být rostlinného, živočišného a bakteriálního původu. Organismus, v jehož genomu je transgen začleněn označujeme jako transgenní či geneticky modifikovaný (GM).

Pro transgenní organismy jsou charakteristické vlastnosti, které by za normálních okolností organismus evolučně pravděpodobně nezískal. Nové vlastnosti jsou využívány nejen v průmyslu a zemědělství, ale také ve zdravotnictví. Důvodů, proč vlastnosti daného organismu pozměnit, je několik. U hospodářských rostlin je snaha zvýšit výnosy a nutriční hodnotu zemědělských plodin a omezit chemizaci v zemědělské výrobě. Vědci se zaměřují také na to, jak zlepšit kvalitu či trvanlivost potravin. V neposlední řadě je snaha připravit transgenní rostliny produkující farmakologicky aktivní látky (Rosypal a kol., 2003).

3.2.1 Transformace pšenice

Pšenice je jednou z nejdůležitějších kulturních plodin, přesto byla jednou z posledních obilovin, která byla transformována. Důvodem je velký a komplexní genom této obiloviny, proto i transformace byla méně účinná než u jiných rostlin. Transformace byla prováděna mnoha metodami. Jedna z úspěšných je mikroprojektilový přenos DNA. Další hojně používaná metoda je transformace pomocí *A. tumefaciens*.

3.3 Mikroprojektilový přenos DNA

Tato metoda, též nazývaná biolistická, používá kulovité mikročástice zlata nebo wolframu o průměru přibližně 0,4 – 1,2 μm , které jsou potaženy DNA. Pro účel metody je DNA vysrážena pomocí CaCl_2 . Částice jsou následně urychlovány na 300 až 600 m/s. Proces je umožněn díky zařízením, které se nazývají „gene gun“. V komoře s transformovaným pletivem je vytvořeno vakuum a projektily pronikají do buněčných stěn rostlin. Míru

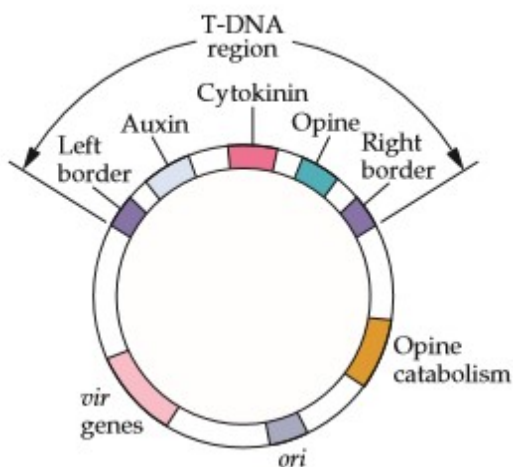
penetrace částic do cílových rostlinných buněk lze řídit použitím částic různé velikosti. Metoda může být využita k integraci DNA do rostlin, které jsou méně náchylné k přenosu DNA zprostředkované *A. tumefaciens*. Používá se k přenosu genů do chloroplastů a mitochondrií, čímž vznikla možnost do těchto organel zavést exogenní geny (Glicka kol., 2010). Vasil a kol. (1992) touto metodou poprvé úspěšně transformovali pšenici.

3.3.1.1 Transformace prostřednictvím *A. tumefaciens*

A. tumefaciens je půdní bakterie napadající rostliny a způsobující u dvouděložných rostlin nádorové onemocnění „crown gal“. Onemocnění vzniká důsledkem přenosu, integrace a exprese genů konkrétního segmentu bakteriální plazmidové DNA nazývané T - DNA, jež je součástí Ti plazmidu (tumor inducing), (Abdul a kol., 2009). T – DNA obsahuje 2 typy genů – onkogenní geny, které kódují enzymy podílející se na syntéze auxinů a cytokininů a jsou zodpovědné za tvorbu nádorů, a geny kódující syntézu opinů (obr. 1). Opiny jsou produkty, které jsou výsledkem kondenzace mezi aminokyselinami a cukry, jež jsou produkovány a vylučovány buňkami nádoru „crown gal“ (Hooykaas a Schilperoort, 1992; Zupan a Zambrysky, 1995). Původně se předpokládalo, že bakterie napadá rostlinu v místě poranění, jelikož došlo k narušení buněčných stěn a snadnému vstupu bakterie do rostliny (Hammond-Kosack a Jones, 2015). Nyní je již známo, že tyto bakterie reagují na fenolové sloučeniny vylučované rostlinnou buňkou při poranění a dochází ke stimulaci exprese virových genů nacházejících se v Ti – plazmidu (obr.1) a následnému přenosu a integraci do rostlinného genomu (Taiz a kol., 2015). Pro transformaci rostlin je bakterie využívána, jelikož do Ti plazmidu lze vložit požadovanou sekvenci DNA a následně vložit zájmový gen do genomu rostlinné buňky (Glick a kol., 2010). Dalším důvodem je minimalizace přesmyků a inzercí v mnoha kopiích při transformaci pomocí *A. tumefaciens* (Biňka a kol., 2012). Metoda transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* je reprodukovatelná, má vyšší účinnost při transformaci ve srovnání s mikroprojektilovým bombardementem u pšenice (Hu a kol., 2003).

Vývoj metody transformace pšenice pomocí *A. tumefaciens* začal v roce 1997 (Cheng a kol., 1997). Účinnost transformace touto metodou je vysoká, avšak může být ovlivněna několika faktory, zejména bakteriálním kmenem *A. tumefaciens*, binárními vektory, selekčními geny, promotory, způsobem inokulace a kultivačními podmínkami (Biňka a kol., 2012).

V současnosti jsou pro transformaci pšenice nejpoužívanější kmeny *A. tumefaciens* LBA4404, dále pak C58C1 a AGL (Gallego a kol., 2012).



Obr. 1: Schematické znázornění Ti palamidu. T – DNA je definována levým a pravým okrajem, zahrnuje geny pro biosyntézu auxinu (světle šedá), cytokininu (tmavě růžová) a opinu (modrá). Mimo oblast T-DNA se nachází virové geny (světle růžová), počátek replikace (tmavě šedá), (převzato z Glick a kol., 2010).

Promotory

Promotor má velmi významnou roli při transformaci rostlin, jelikož exprese vložených genů je omezena na jejich aktivitu. V současnosti jsou pro transformaci pšenice používány zejména promotor *CaMV35S* (virus mozaiky kvěťáku 35S) a *Ubi1* (kukuřičný ubiquitin 1). S menší frekvencí se používají promotory *act1*, *nos* a *ScBV*. Jsou využívány i specifické a vývojově regulované promotory umožňující expresi transgenů pouze v některých pletivech nebo za určitých podmínek (Abdul a kol., 2009).

Reportérové geny

Reportérové geny kódují proteiny, jejichž enzymatická aktivita může být snadno testována a umožňuje jak detekci transgenů, tak odhad úrovně exprese cizího genu v transgenním pletivu. V současnosti je široce používaný gen GUS (β -glukuronidasa), dále některé vizuální markerové geny, jako například GFP (green fluorescent protein) a LUC (luciferasa). Další reportérové geny běžně používané při transformaci pšenice jsou *Lc/Cl*

geny stimulující endogenní anthokyanovou biosyntézu v transformovaných buňkách, kdy výsledkem je produkce červeno-fialového barviva (Gallego a kol., 2012).

Selekční markery

Jako selekční markery mohou být použity geny propůjčující rezistenci vůči antibiotikům. Tedy pletiva, ve kterých jsou tyto geny začleněny, pak mohou být selektovány na médiu obsahujícím antibiotika. Používány jsou taktéž geny propůjčující rezistenci vůči herbicidům. Existují však i metabolické selekční markery, které transformovaným buňkám umožňují syntetizovat sloučeninu, kterou buňka za normálních okolností není schopna vytvářet. Selekční médium je záměrně upraveno tak, aby na něm přežily pouze transformované buňky (Abdul a kol., 2009). Přehled nejčastějších selekčních markerů je uveden v tab. 1.

Tab. 1: Přehled selekčních markerů u pšenice (převzato z Gallego a kol., 2012).

selekční geny	kódovaný enzym	selekční činidlo	účinek
<i>nptII</i>	neomycinfosfotranferasa II	aminoglykosidová antibiotika: - kanamycin - neomycin - hygromicin - G418 (geneticin) - paromomycin	vazba 30S ribozomální podjednotky, inhibice translace
<i>hpt</i>	hygromycin fosfotransferasa	aminoglykosidová antibiotika: - hygromycin	vazba 30S ribozomální podjednotky, inhibice translace
<i>bar (pat)</i>	fosfínotricin acetyltransferasa	herbicity: - fosfínotricin (PPT) - glufosinát amonný - bialaphos (tripeptidové antibiotikum)	inhibice glutamin syntázy
<i>aroA:CP4</i>	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntasa	herbicity: - glyfosát	inhibice biosyntézy aromatických kyselin (EPSPS)

3.4 Metody detekce transgenů

Pro ověření úspěšnosti transformace a pro detekci transgenů v organismu jsou používány metody molekulární biologie. Jedná se zejména o polymerázovou řetězovou reakci a její různé modifikace.

Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která probíhá zcela v podmínkách *in vitro*. Touto metodou lze rychle a vysoce selektivně namnožit konkrétní nukleotidovou sekvenci obsaženou v jakékoliv DNA (Snustad a kol., 2009). Základní složky každé PCR amplifikace tvoří dva syntetické oligonukleotidové primery (každý má délku přibližně 20 nukleotidů). Jsou komplementární k regionům na opačných vláknech DNA a ohraničují cílovou sekvenci, která má být amplifikována. Její délka se pohybuje od 100 do 35 000 bp. Důležitou složku tvoří termostabilní DNA polymeráza a všechny čtyři deoxyribonukleotidy. (Glick a kol., 2010). V současnosti je velmi používána termostabilní *Taq* – polymeráza pocházející z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Termostabilní polymeráza není denaturována vysokou teplotou a nemusí být v každém kroku reakce znovu přidávána (Lodish a kol., 2008). Každá PCR reakce je charakteristická opakováním cyklů a každý z nich zahrnuje několik kroků. Prvním krokem PCR amplifikace je tepelná denaturace vzorku DNA, kdy se teplota pohybuje kolem 95 °C po dobu 1 minuty. Po denuraci je druhým krokem následné ochlazení roztoku na teplotu 50 - 60 °C. Během této fáze se primery mohou komplementárně navázat k řetězcům DNA. Třetím krokem je pak samotná syntéza DNA. Zahájena je na 3' hydroxylovém konci obou primerů. Všechny kroky PCR jsou prováděny v automatizovaném blokovém ohříváči, který je naprogramován tak, aby v určitých periodách měnil teplotu. Jeden cyklus reakce trvá přibližně 3 – 5 minut (Glick a kol., 2010). Pro amplifikaci DNA se obvykle používá 20 – 30 cyklů, přičemž v každém cyklu se oproti předcházejícímu zdvojnásobí počet amplikonů (Snustad a kol., 2009).

Real – time PCR

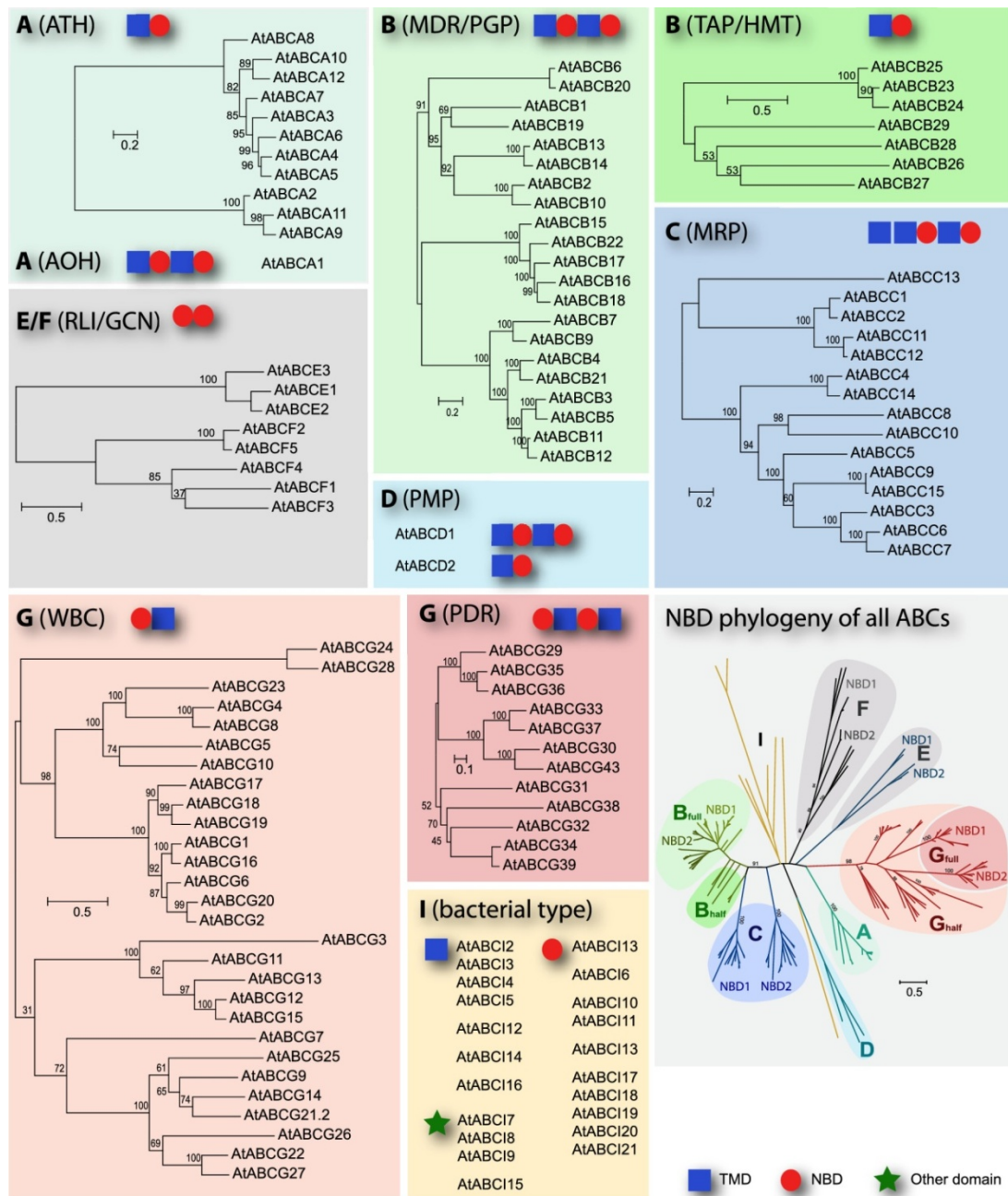
Reakce, na rozdíl od běžné PCR metody, probíhá s fluorescenční sondou či barvivem, které se na DNA v průběhu reakce váže. Následně dojde k ozáření světlem o určité vlnové délce a lze monitorovat výslednou fluorescenci, čímž je umožněno sledovat tvorbu PCR produktů. Pro reakci lze použít fluorescenční barviva (např. SYBR Green) či sondy (např. TaqMan), (Glick a kol., 2010).

Southern blotting

Southern blotting je metoda, při které dochází k přenosu fragmentů z gelu na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu. Tímto způsobem dojde k imobilizaci DNA fragmentů, a tak může být DNA podrobena hybridizační analýze, která umožní zjistit sekvenční podobnost fragmentů s použitou hybridizační sondou. Přenos fragmentů DNA je nejčastěji umožněn díky kapilárním silám. Nevýhoda metody spočívá v tom, že při kapilárním přenosu DNA z gelu na membránu může dojít k rozdrčení gelu vlivem jeho zatížení (Brown, 2001).

3.5 ABC transportéry

ABC transportéry tvoří jednu z největších proteinových rodin a nacházejí se ve všech živých organismech (Kang a kol., 2011). Například u *Sacharomyces* se jich vyskytuje 28, u *Drosophila melanogaster* je to 51 a 129 ABC transportérů lze nalézt u *A. thaliana* (Linton, 2007). ABC transportéry jsou rozděleny do osmi podskupin (ABCA – ABCI) (Dean a Annilo, 2005), (obr. 2). U rostlin nebyla nalezena podskupina ABCH (Kretzschmar a kol., 2011).



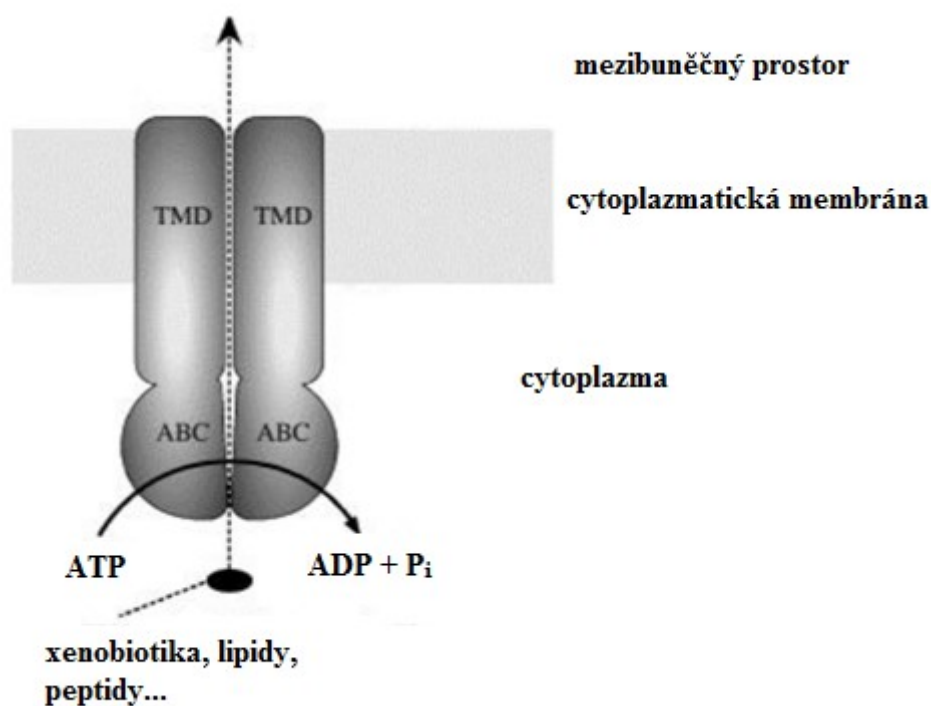
Obr. 2: Podskupiny ABC transportérů u *A. thaliana* (převzato z Kang a kol., 2011).

ABC transportéry jsou pro buňku nezbytné, jelikož přes membrány transportují mnoho různorodých látek a mají tedy širokou substrátovou specifitu. ABC transportéry využívají energii hydrolýzy ATP na translokaci rozpuštěných látek přes biologické membrány (Schneider a Hunke, 1998), (Obr. 3). Významné jsou i z hlediska klinického výzkumu díky jejich roli ve vzniku rezistence vůči léčivům u rakoviny či u malárie (Szewczak a kol., 2011).

ABC transportéry mají roli při výrobě energie, buněčné signalizaci (Linton, 2007) a při akumulaci fyátu v semenech (Shi a kol., 2007). ABC transportéry se podílí na transportu

auxinu a kyseliny abscisové, jelikož produkce těchto hormonů se liší od místa jejich účinku (Kretzschmar a kol., 2011). Některé však nejsou přímo zapojeny do transportu substrátů, ale jeví se jako součást iontových kanálů (Štěfková a kol., 2004).

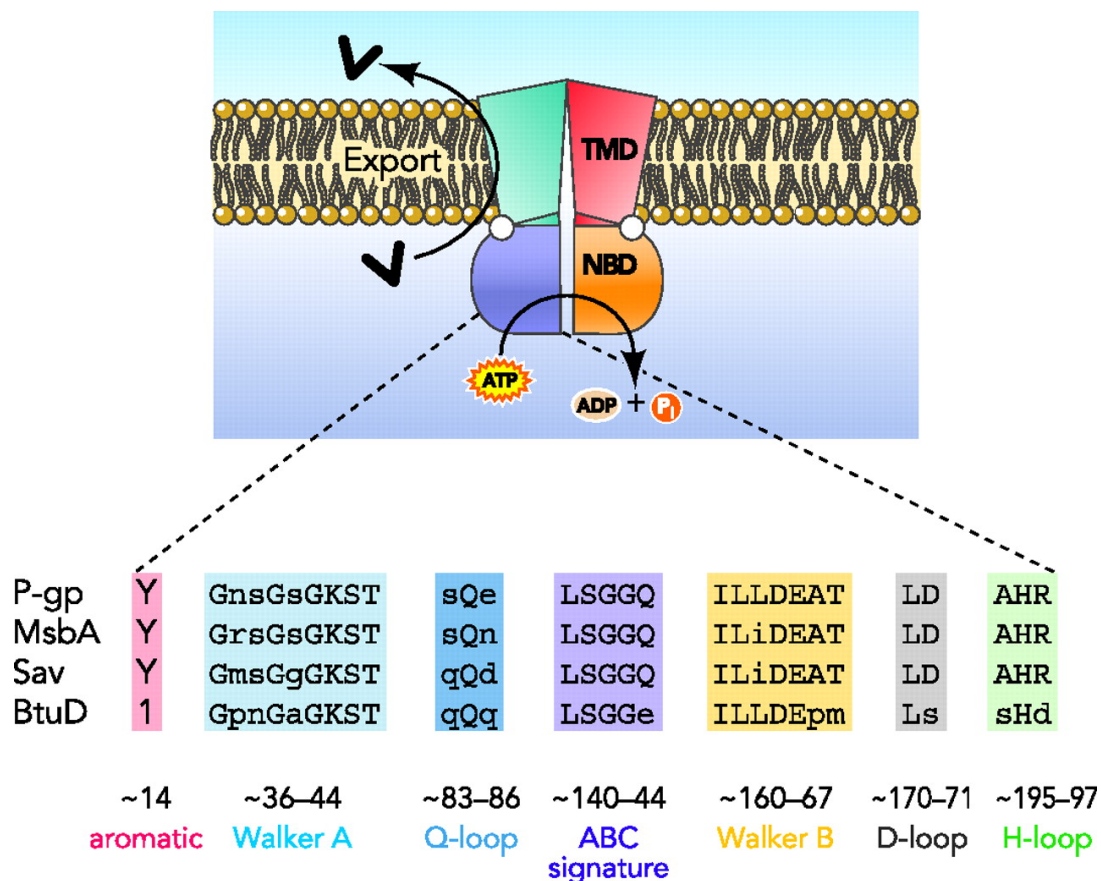
Rostliny mohou být vystaveny řadě případných toxinů. Může se jednat například o herbicidy, o toxiny, které jsou produkovány patogeny v půdě, či o produkty průmyslové výroby. Procesu odstranění těchto látek z organismu nazýváme detoxikace. (Kang a kol., 2011). U rostlin, z hlediska detoxikace, byly studovány zejména mechanismy detoxikace kovů, které se do rostlin mohou dostat při získávání živin z půdy. Kovy mohou být vyplaveny zpět do půdy, nebo jsou sekretovány do apoplastu. Předpokládá se, že při exportu kadmia a olova se uplatňují transportéry ABCG (Kretzschmar a kol., 2011).



Obr. 3: Schéma struktury a funkce ABC transportéru (upraveno podle Locher, 2008).

Základní strukturu ABC transportérů tvoří čtyři podjednotky. Jedná se o dvě nukleotid vázající domény (NBD) a dvě transmembránové domény (TMD), (Higgins, 1992). TMD se u různých podskupin liší, zatímco NBD jsou homologní v rámci celé skupiny. Každá NBD má sedm vysoce konzervativních motivů (Linton, 2007), (obr. 4). U různých organismů se seskupení čtyř základních domén liší. U Archea a Eubakteria podjednotky většinou představují čtyři samostatné domény, zatímco u vyšších organismů jsou fúzovány do domény jedné. (Schmitt a Tampé, 2002). Všechny podjednotky spolupracují v průběhu hydrolyzy

ATP, tudíž může probíhat aktivní transport (Kang a kol., 2011). Organizace domén se u jednotlivých skupin ABC transportérů liší. Skupiny ABCA – ABCD se vyznačují tzv. forward doménovou organizací TMD – NBD, naproti tomu skupina ABCG je charakteristická tzv. reverse organizací domén (NBD – TMD). ABCE a ABCF jsou skupiny, které jsou složeny jen ze dvou NBD (Verrier a kol., 2008).

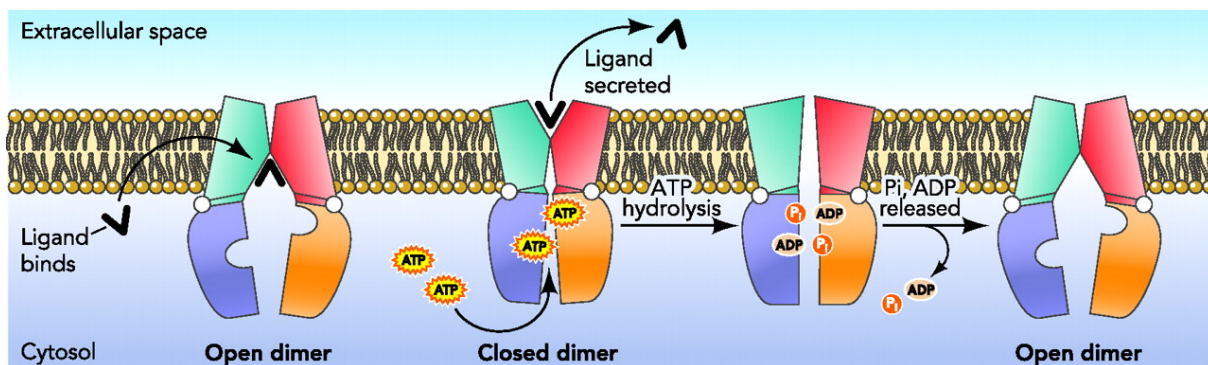


Obr. 4: Schéma ABC transportéru s vysoce variabilními sedmi NBD doménami (převzato z Linton, 2007).

V rámci podskupiny ABCA se u *A. thaliana* vyskytuje jeden full – size transportér: AtABCA1, který představuje největší ABC protein *A. thaliana* (Verrier a kol., 2008). Zbylých 11 transportérů ABCA *A. thaliana* jsou half – size. Half – size proteiny podskupiny ABCA jsou identifikovány pouze u rostlin a prokaryot (Peelman a kol., 2003; Kovalchuk a Driessen, 2010). Genom *A. thaliana* kóduje 21 full – size a 7 half – size ABC transportérů podskupiny ABCB. Bylo prokázáno, že všechny ABCB proteiny jsou lokalizovány na plazmatické membráně (Blakeslee a kol., 2007; Rea, 2007;

Lee a kol., 2008). Tři half – size transportéry podskupiny ABCB byly lokalizovány v mitochondriích (Rea, 2007). AtABCB26 je lokalizován na chloroplastech (Ferro a kol., 2010), zatímco AtABCB27 na tonoplastu (Jaquinod a kol., 2007). U *A. thaliana* se transportéry podskupiny ABCC vyskytují pouze jako full – size transportéry, z nichž se většina vyskytuje na vakuolární membráně (Rea, 2007; Nagy a kol., 2009). ABCD podskupina je charakterizována jedním half – size a jedním full – size transportérem. V peroxizomech byl identifikován transportér AtABCD1 (Hayashi a kol., 2002). Transportéry podskupin ABCE a ABCF postrádají transmembránovou doménu a podílejí se pravděpodobně i na jiných procesech než transport. Podskupina ABCH zahrnuje half – size transportéry s reverzní organizací domén a nebyla v rostlinách identifikována (Verrier a kol., 2008). ABCI proteiny jsou lokalizovány zejména na membránách mitochondrií a chloroplastů (Verrier a kol., 2008; Shimoni – Shor a kol., 2010). ABC transportéry tvoří celkem osm podskupin a jednou z nich je podskupina ABCG (Dean a Annilo, 2005). Jedná se o podskupinu, která je nejvíce zastoupena u *A. thaliana*. Je tvořena 28 half – size transportéry (white – brown complex, WBC) a 15 full - size (pleiotropic drug resistance, PDR) transportéry (Verrier a kol., 2008). Přehled některých ABC transportérů vyskytujících se u *A. thaliana* je znázorněn na obr. 6.

ABC transportéry zprostředkovávají aktivní transport látek přes membránu, při kterém dochází ke spotřebě ATP. Mechanismus zahrnuje tři základní kroky. V prvním kroku dochází k vazbě ligandu na TMD, dojde ke změně konformace v NBD a dojde k vyšší afinitě k ATP. V dalším kroku se dvě molekuly ATP naváží na NBD. Energie uvolněná tvorbou uzavřeného dimeru NBD způsobí konformační změnu v TMD a uvolnění ligandu. V následujícím kroku ATP hydrolyza způsobí rozrušení uzavřeného dimeru NBD, což vede k dalším změnám konformace v TMD. Uvolnění fosfátů z hydrolyzy ATP obnoví transportér do původní konformace otevřeného dimeru NBD, který je tak připraven na další cyklus (Linton, 2007), (obr. 5).

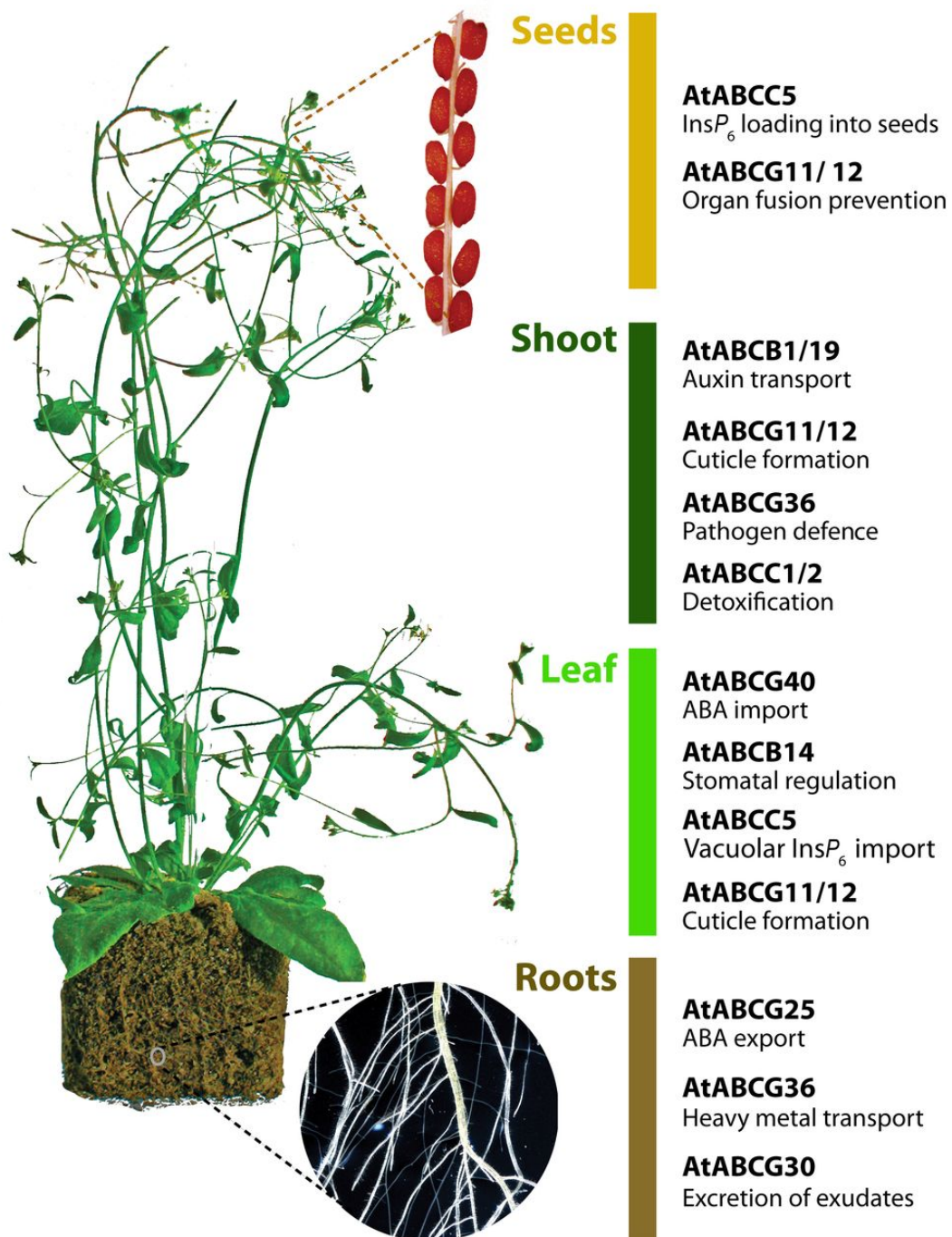


Obr 5: Schéma transportu ligandu pomocí ABC transportérů (převzato z Linton, 2007).

3.6 ABC transportér AtWBC19

Při transformaci rostlin se používají selekční markery bakteriálního původu. Jedná se o geny způsobující rezistenci vůči antibiotikům (Mikki a McHugh, 2004) a umožňující tak detekci a výběr transformovaných rostlin. Nejčastější používaný gen při transformaci je gen *E. coli* K12 transpozon Tn5 neomycinfosfortransferázy (*nptII*), který poskytuje rezistenci k několika aminoglykosidickým antibiotikům včetně kanamycinu a geneticinu (Garfinkel a kol., 1981). Jelikož jsou markery ve většině případů bakteriálního původu, došlo k obavám veřejnosti z horizontálního přenosu genů (Heinemann a Traavik, 2004). Alternativou k bakteriálním genům by mohl být ABC transportér *A. thaliana* AtWBC19. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese genu *Atwbc19* (2,178 bp) způsobuje u transgenních rostlin rezistenci vůči kanamycinu (Mentewab a Stewart, 2005). Tento fenotypový projev byl však nalezen pouze u AtABCG19, nikoliv u jiných členů podskupiny ABCG.

U genu *Atwbc19* byla zjišťována schopnost přenosu rezistence vůči kanamycinu do *E. coli*, která je na dané antibiotikum citlivá. Gen byl transformován pod kontrolou bakteriálního promotoru a následně byla porovnávána schopnost rezistence bakterií s transformovaným genem *Atwbc19* s *nptII*, což je standardní gen udělující rezistenci vůči kanamycinu u bakterií. Výsledky studie ukázaly, že *nptII* vykazoval mnohem větší rezistenci než *Atwbc19*. Ačkoliv je riziko horizontálního přenosu genů v případě *nptII* považováno za nízké, u *Atwbc19* by mělo být riziko ještě nižší (Burris a kol., 2008).



Obr. 6: Přehled ABC transportérů vyskytujících se u *A. thaliana* (převzato z Kretschmar a kol., 2011).

3.7 Změny v obsahu kovů u rostlin způsobené ABC transportéry

Rostliny jsou vystaveny působení antibiotik produkovaných půdními mikroorganismy. Jedná se například o kanamycin, který řadíme mezi aminoglykosidická antibiotika. Reakce rostlin na antibiotika není doposud dokonale objasněna. Předpokládá se, že hlavním terčem aminoglykosidů jsou chloroplasty. Jestliže je rostlina vystavena kanamycinu, dochází

u ní k bělení listů. Důvodem je rozpad chlorofylu v chloroplastu (Machold, 1971). Pokud transportér MAR1, nacházející se v chloroplastu, bude mutován (Conte a kol., 2009) nebo umlčen (Aufsatz a kol., 2009), rostliny budou rezistentní vůči kanamycinu a dalším některým aminoglykosidům. MAR1 transportér má roli v homeostázi železa a předpokládá se, že umožňuje průchod aminoglykosidům do chloroplastu, jelikož mají podobnou strukturu s chelátovými molekulami železa (Conte a kol., 2010).

Jak již bylo výše zmíněno, předpokládá se, že kanamycin je v rostlině transportován do chloroplastů. Kanamycin má však ve své struktuře několik hydroxylových a aminových skupin, což jej činí polární sloučeninou. Díky tomu pak špatně proniká membránami. Před vstupem do chloroplastů musí nejprve kanamycin vstoupit do kořenových buněk a být přenesen pomocí cévního systému. Existuje asociace mezi odolností vůči antibiotiku a transportem kovů (Conte a kol., 2009; Conte a Loyd, 2010). Je tedy předpoklad, že endogenní mechanismus rezistence vůči antibiotikům je spojen s transportem kovů (Mentewab a kol., 2014).

3.8 Současný stav řešené problematiky

Funkce genu *Atwbc19* byla studována nejen u *A. thaliana*, ale i u transgenního hybridního topolu (*Populus canescens* × *P. grandidentata*), (Kang a kol., 2010) a u transgenního melounu (*Cucumis melo* L.), (Bombale a kol., 2010).

3.8.1 Transformace hybridního topolu genem *Atwbc19*

Využitím genu *Atwbc19* namísto bakteriálního *nptII* při transformaci se ve své studii zabýval i Kang a kol. (2010). Transformován byl hybridní topol genem *Atwbc19* a genem *nptII*. V této studii byl použit vektor pABC, který nesl gen *Atwbc19* řízený promotorem CaMV 35S a vektor pNTP, který nesl gen *nptII*, který byl též řízený promotorem CaMV 35S. Oba tyto vektory byly elektroporací přeneseny do *A. tumefaciens*, kmen GV3850, a následně jím bylo infikováno sto listových segmentů. Po kultivaci byla použita antibiotika: karbenicilin a cefotaxim (obě v koncentraci 250 mg/l) k eliminaci *A. tumefaciens*. Použito bylo i antibiotikum kanamycin o koncentraci 80 mg/l, který zde byl využit pro selekci transformovaných buněk. K identifikaci genů *Atwbc19* a *nptII*, a tedy i k ověření úspěšnosti transformace, byla využita polymerázová řetězová reakce s použitím příslušných primerů. Kultivací rostlin na médiích obsahujícím antibiotika v různých koncentracích byla ověřena účinnost selekce: kanamycin (0, 50, 100, 150 a 200 mg/l), neomycin (0, 50, 100, 200

a 400 mg/l), geneticin (0; 1,25; 2,5; 5,0 a 10,0 mg/l) a paromomycin (0, 50, 100, 200 a 400 mg/l).

Ve studii bylo zjištěno, že rostliny transformované genem *Atwbc19* nebo *nptII* mají srovnatelnou schopnost regenerace při stejné koncentraci antibiotik v médiu. Schopnost regenerace byla 2 až 3 krát vyšší než u listových segmentů netransformované kontrolní rostliny.

3.8.2 Transformace melounu genem *Atwbc19*

Využitím genu *Atwbc19* jako selekčního markeru se také zabýval i Bombale a kol. (2010). Jako rostlinný materiál byl použit meloun (*Cucumis melo* L.). K přímé regeneraci byla využita semena odrůd: Eden Gem, Hara Madhu a Punjab Sunheri. Pro transformaci bylo využito *A. tumefaciens* (kmen LBA4404), do kterého byl vložen plazmid pABC nesoucí gen *Atwbc19*, který byl pod kontrolou promotoru CaMV 35S. Následně po transformaci byly explantáty kultivovány na médiu obsahujícím kanamycin v koncentracích: 80, 100, 150 a 200 mg/l. Za transgenní rostliny byly vybrány ty, které rostly na médiu s antibiotikem o koncentraci 100 mg/l a více.

Bylo zjištěno, že u odrůdy Punjab Sunheri kanamycin inhiboval regeneraci rostlin již v koncentraci 80 mg/l, zatímco u odrůd Eden Gem a Hara Madhu k tomuto jevu došlo až při koncentraci 100 mg/l. Odrůdy Hara Madhu a Eden Gem jsou tedy více rezistentní vůči kanamycinu.

Pro ověření přítomnosti genu *Atwbc19* byla provedena PCR, kdy byly použity specifické primery. Z celkem 20 vybraných rostlin mělo 5 rostlin amplifikovaný produkt (2,18 kb), který odpovídá *Atwbc19* genu. Tento výsledek se shodoval s tím, který publikovali Mentewab a Stewart (2005) ve své práci. Přítomnost transgenů byla také prokázána restriční analýzou s využitím enzymů *Sac I* a *Kpn I*.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem bakalářské práce byla transgenní jarní pšenice, která byla transformována vektorem pBract214AS::Atwbc19opt, obsahující zájmový gen *Atwbc19*. Přítomnost transgenu byla analyzována u 111 rostlin T1 generace odrůd Fielder a Cadenza. Obilky z pozitivních rostlin T0 generace byly sklizeny a potomstvo vybraných linií bylo vyseto do sadbovačů a rostliny byly pěstovány ve fytotronu (režim 16 hodin světlo, 8 hodin tma). V růstové fázi 13, tří listů, byla odebrána část listu, ze kterého byla izolována DNA. U potomstva rostlin T1 generace byla pomocí PCR zjišťována přítomnost transgenu *Atwbc19* a byl stanoven poměr pozitivních a negativních rostlin.

4.2 Izolace celkové rostlinné DNA metodou CTAB

Z testovaných rostlin označených 1 až 111 byla metodou CTAB izolována genomová DNA.

Postup izolace:

1. Předehřát vodní lázeň na 65 °C.
2. Z rostliny sterilními nůžkami odstříhnout list o velikosti cca 4 cm. Vložit do 1,5 ml mikrozkušavky, ponořit do tekutého dusíku. Ihned homogenizovat sterilní tyčinkou.
3. Vyjmout mikrozkušavku z tekutého dusíku, nechat přibližně 3 minuty ve stojanu, aby se teplota homogenátu zvýšila těsně pod bod mrazu.
4. Homogenát zalít 140 µl 2x CTAB předehřátého na 65 °C. Roztok promíchat pipetou.
5. Mikrozkušavku uzavřít a nechat 5 min ve vodní lázni předehřáté na 65 °C.
6. Přidat 210 µl chloroformu, důkladně protřepat v ruce a odstředovat 30 s při 12 000 rpm ve stolní centrifuzě.
7. Odebrat 120 µl supernatantu do nové mikrozkušavky, přidat 12 µl 10% CTAB solution (10:1) předehřátého na 65 °C. Protřepat v ruce.
8. Přidat 120 µl chloroformu, důkladně protřepat v ruce, odstředovat 30 s při 12 000 rpm ve stolní centrifuzě.
9. Do čisté mikrozkušavky odebrat 100 µl supernatantu (odebírat pomalu, aby se neodebral chloroform).
10. Přidat 100 µl CTAB precipitation buffer (1:1) a jemně promíchat pipetou. Odstředovat 60 s při 14 000 rpm ve stolní centrifuzě.

11. Opatrně odstranit supernatant.
12. Přidat 50 µl High – salt TE buffer, vortexovat. Přemístit do vodní lázně, ponechat 10 min při 65 °C, poté znovu vortexovat.
13. Přidat 100 µl 96 % etanolu vychlazeného na -20 °C, promíchat pipetou.
14. Odstředit 10 min při 14 000 rpm ve stolní centrifuze. Odstranit supernatant.
15. Přidat 50 µl 80 % etanolu vychlazeného na -20 °C. Odstředit 5 min při 14 000 rpm ve stolní centrifuze.
16. Odstranit supernatant a nechat přibližně hodinu vysoušet při pokojové teplotě.
17. Rozpustit v 15 µl 0,1 x TE buffer. Genomovou DNA uchovávat při -20 °C.

Vzorky DNA byly následně měřeny na spektrofotometru DS-11 DeNovix a byla hodnocena kvalita DNA a její koncentrace. Genomová DNA byla ředěna na koncentraci 200 - 300 ng/µl.

4.3 PCR amplifikace segmentů u pšenice obecné

Detekce transgenu *Atwbc19* byla zjišťována pomocí polymerázové řetězové reakce. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 2. Pro reakci byl použit REDTaq® ReadyMix™ PCR reakční mix s MgCl₂ (Sigma – Aldrich) a deionizovaná voda pro PCR (Water PCR reagent, Sigma – Aldrich). Dále byly použity primery: forward (F) *Atwbc19-F* 5' CGG CGA CGG CGT AAA AAG CG 3' ($T_m = 67,28$ °C) a primer reverse (R) *Atwbc19-R* 5' CGC GCC GTC TCT CTC CTC CA 3' ($T_m = 69,02$ °C).

Postup přípravy PCR reakční směsi:

1. Všechny složky PCR reakční směsi důkladně rozmrazit a vortexovat.
2. Do 1,5 ml mikrozkušavky napipetovat složky směsi podle tab. 2. Směs vortexovat a centrifugovat.
3. Do PCR mikrozkušavky pipetovat 8 µl PCR reakční směsi.
4. Do každé mikrozkušavky přidat 2 µl genomové DNA o koncentraci 200 - 300 ng/µl.
5. Mikrozkušavky vortexovat a centrifugovat, vložit do termocykléru s časovým a teplotním profilem podle schématu 1.

Tab. 2: Složení PCR reakční směsi.

Složky PCR reakční směsi	Pipetovaný objem na 1 vzorek [μ l]
ddH ₂ O	2,5
ReadyMix	5,0
primer F (10 μ mol/l)	0,25
primer R (10 μ mol/l)	0,25
templátová DNA (200 - 300 ng/ μ l)	2,0

Schéma č. 1: Časový a teplotní profil PCR reakce

1. 94 °C ... 3 min
 2. 94 °C ... 1 min
 - 55 °C ... 45 s
 - 72 °C ... 1 min
- } 38 x
3. 72 °C ... 5 min
 4. 12 °C ... ∞
6. Amplifikované produkty byly rozděleny elektroforetickou separací na 1,3% agarózovém gelu. Jako negativní kontrola byla použita DNA izolována z netransformovaných rostlin, pozitivní kontrolou byly vzorky ječmene, u kterých byl detekován gen *Atwbc19*. Pro stanovení velikosti produktů byl použit marker molekulové hmotnosti.
7. Gel byl po ukončení elektroforetické separace umístěn do UV transiluminátoru a pomocí programu GeneSnap byl zaznamenán výsledek. Na základě porovnání testovaných vzorků s pozitivní kontrolou a markerem molekulové hmotnosti byla detekována přítomnost transgenu *Atwbc19* ve vzorcích.

4.4 Příprava kultivačního média

Médium pro kultivaci embryí bylo připraveno za použití MS média (Duchefa, kat. č. M0222). Na analytických vahách byla navážena sacharóza a MS médium. Složky byly následně rozpuštěny v destilované vodě v nádobě umístěné na magnetické míchačce. Po rozpuštění všech složek byl objem doplněn na 1 litr a pH média upraveno na hodnotu 5,8 pomocí KOH. Následně bylo médium rozlito do lahví po 500 ml a do každé lahve byl přidán phytoagar v koncentraci 6g/l. Média byla sterilizována v autoklávu při 121 °C. Bylo připraveno kultivační médium bez antibiotika a kultivační médium, do kterého byl přidán neomycin v koncentraci 200 mg/l a za sterilních podmínek bylo médium rozlito po 100 ml do sterilních kotlíků.

4.5 Odběr a sterilizace nezralých obilek pšenice

Z rostlin generace T1 byly odebrány klasy, ze kterých byly následně vyjmuty nezralé obilky. Ty byly zbaveny pluch a plušek a poté sterilizovány. Sterilizace obilek byla provedena v několika krocích. Nejprve byly obilky omývány 70% etanolem po dobu 2 minut. Následně byly třikrát promyty sterilní destilovanou vodou. Vždy po dobu 1 minuty. Dalším krokem byla sterilizace 6% roztokem chlornanu sodného po dobu 5 minut. Posledním krokem sterilizace bylo promytí obilek sterilní destilovanou vodou po dobu 1 minuty.

4.6 Extirpace nezralých embryí pšenice

Ze sterilizovaných obilek byla extirpována nezralá embrya. Izolace byla provedena ve sterilních podmínkách pomocí pinzety, skalpelu a lupy. Skalpelem byla obilka rozříznuta a pinzetou bylo embryo odděleno od endospermu.

4.7 Kultivace embryí

Izolovaná embrya o velikosti 2 mm byla následně přenesena do sterilních kultivačních nádob na ½ MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Kultivace embryí probíhala na ½ MS médiu a na ½ MS médiu, do kterého bylo přidáno antibiotikum neomycin o koncentraci 200 mg/l. Kultivace probíhala v kultivační komoře.

4.8 Extrakce DNA paramagnetickými částicemi

Po přibližně 14 dnech kultivace byla z jednotlivých rostlin izolována genomová DNA metodou využívající paramagnetické částice. Následně byla provedena PCR amplifikace vzorků genomové DNA. Izolace byla provedena podle následujícího postupu:

Pro izolaci je nutno nejprve připravit basic lysis buffer (viz kapitola 4.11). Po napipetování všech složek do sterilní lahve doplnit sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml a upravit pH roztoku pomocí HCl na hodnotu 7,2. Dalším krokem izolace je příprava lyzačního pufru, jehož složení je rovněž uvedeno v kapitole 4.11.

1. Z rostliny odstříhnout sterilními nůžkami přibližně 4 cm listu a vložit do mikrozkušavky s kulatým dnem. Nechat sušit (2 dny při 37 °C nebo 2 hod při 65 °C).
2. Po usušení listů vložit do každé mikrozkušavky dvě homogenizační kuličky a listy homogenizovat.
3. K homogenizovaným listovým segmentům přidat 250 µl lyzačního pufru a inkubovat 45 min ve vodní lázni při 65 °C.
4. Do mikrozkušavky smíchat 11 µl paramagnetických částic, 80 µl izopropanolu a 100 µl lyzátu.
5. Připravenou směs vložit na magnet a nechat přibližně 5 min odstát.
6. Odstranit supernatant a mimo magnet přidat 100 µl 70% etanolu. Tento krok 3x opakovat.
7. Přidat 12 µl deionizované vody pro PCR, promíchat a umístit na magnet. Supernatant přenést do nové mikrozkušavky.
8. Izolovanou genomickou DNA uchovávat při -20 °C.
9. Následně byla provedena detekce transgenu *Atwbc19*. Postup je shodný s tím, který je uveden kapitole 4.3 s rozdílem použitých primerů. Pro testování generace T2 byly použity primery: primer forward (F) 3ABC_PSF F 5' GTC CAA CCC AAC CTC TAT GG 3' ($T_m = 59,61$ °C) a primer reverse (R) 3ABC_PSR 5' GGC ATC CTG ATC CAG TTC TT 3' ($T_m = 58,29$ °C). Reakce byla nastavena s časovým a teplotním profilem podle schématu 2.

Schéma č. 2: Časový a teplotní profil PCR reakce

1. 94 °C ... 4 min
 2. 94 °C ... 25 s
 - 56 °C ... 45 s
 - 72 °C ... 30 s
- } 37 x
3. 72 °C ... 5 min
 4. 4 °C ... ∞

4.9 Stanovení obsahu kovů

Transgenní rostliny generace T2 byly testovány na obsah kovů – mangan, draslík, hořčík a vápník. Obsah kovů byl měřen ve spolupráci s oddělením Centrální laboratoře a podpora výzkumu CRH (Mgr. Monika Jarošová, Ph.D.). Obsah kovů byl měřen za použití ICP – MS spektrometru (Agilent 7700x; Agilent Technologies, Tokyo, Japan).

4.10 použité laboratorní přístroje

- Spektrofotometr DS-11 (DeNovix, Delaware)
- UV transiluminátor (G:BOX, Syngene)
- Počítačový program GeneSnap (Syngene)
- Vortex mixer Wizard (Velp Scientifica)
- Stolní centrifuga Prism™ Air-Cooled Microcentrifuge (Labnet)
- Termocyklér: Thermal Cycler T100™ (BioRad)
- Kultivační komora Adaptis CMP6010 (CONVIRON)
- Elektroforetická komůrka Sub-Cell™ model 192 (BioRad)
- Zdroj elektrického napětí PoerPac™ (Bio Rad)

4.11 použité chemikálie a roztoky

- REDTaq® ReadyMix™ PCR reakční mix s MgCl₂ (Sigma – Aldrich)
- deionizovaná voda pro PCR (Water PCR reagent, Sigma – Aldrich)
- Marker molekulové hmotnosti Ladder II (HyperLadder™ 50 kb, BioLine).
- MS médium (Duchefa, kat. č. M0222)
- Phytoagar (Duchefa)
- Agaróza (Duchefa)
- antibiotikum neomycin No:M0135.0025m (Duchefa)

- Paramagnetické částice A63880 (GE Healthcare)
- primery firmy Generi biotech

roztoky:

Basic lysis buffer

- 10 ml 5 mol/l NaCl
- 10 ml 1 mol/l TRIS HCl
- 10 ml 0,5 mol/l EDTA

Lyzační pufr

- 0,5 g hydrogenuhličitanu sodného
- 0,1 g kyseliny citronové
- 100 µl merkaptoethanolu
- 100 µl Rnasy (1 mg/ml)
- doplnit basic lysis buffer na objem 100 ml

2x CTAB buffer (příprava pro 100 ml roztoku)

- 2 g 2% CTAB
- 10 ml 1 mol/l TRIS (pH 8,0)
- 4 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)
- 28 ml 5 mol/l NaCl
- 1 g PVP ($M_r = 40\ 000$)

10% CTAB

- 10 g CTAB
- 14 ml 5 mol/l NaCl

CTAB precipitation buffer

- 1 g CTAB
- 5 ml 1 mol/l TRIS (pH 8,0)
- 2 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)

High – salt TE buffer

- 1 ml 1 mol/l TRIS (pH 8,0)
- 0,2 ml 5 mol/l EDTA (pH 8,0)
- 20 ml 5 mol/l NaCl

0,1x TE buffer

- 0,1 ml 1 mol/l TRIS (pH 8,0)
- 0,02 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)

5 Výsledky

U transgenní jarní pšenice odrůd Fielder a Cadenza v potomstvu T1 byla pomocí PCR analyzována přítomnost transgenu *Atwbc19*. U jednotlivých heterozygotních linií rostlin T1 generace byl stanoven poměr pozitivních a negativních rostlin.

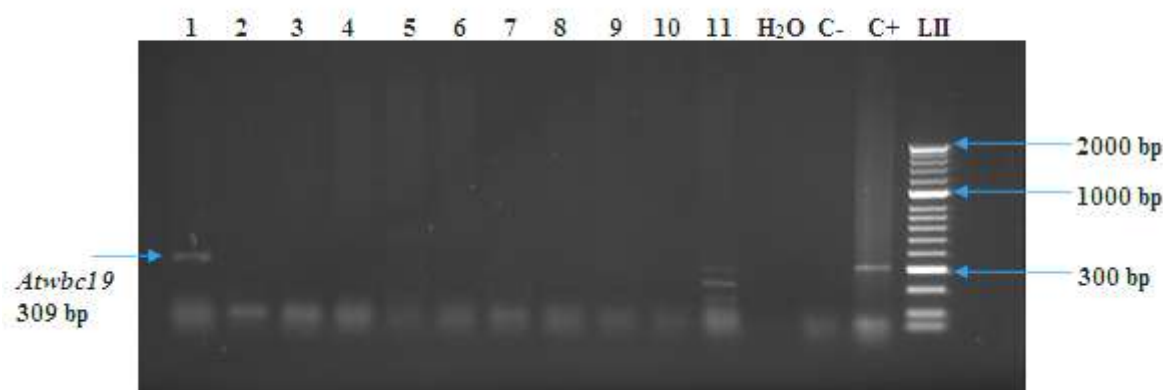
Z vybraných PCR pozitivních rostlin T1 generace byla izolována nezralá zygotická embrya (generace T2), která byla *in vitro* kultivována na médiu s antibiotikem (neomycinem 200 mg/l) a bez antibiotika. U těchto rostlin byla opět provedena analýza přítomnosti zájmového genu *Atwbc19*. U vybraných transgenních rostlin, které byly kultivovány na médiu s antibiotikem (neomycinem 200 mg/l) i bez antibiotika, byl stanoven obsah kovů (Mn, Mg, K, Ca).

5.1 Detekce transgenu *Atwbc19* v generaci T1

Ze 109 rostlin pšenice T1 generace, obou odrůd Fielder a Cadenza byla pomocí metody CTAB izolována genomová DNA a byla použita k detekci transgenu *Atwbc19*. PCR produkt 309 bp byl vizualizován v UV transilminátoru, snímky byly vytvořeny pomocí počítačového programu GeneSnap.

Transgen *Atwbc19* detekován u 12 rostlin. U odrůdy Fielder byl gen *Atwbc19* zjištěn u 10 rostlin z 84 testovaných, u odrůdy Cadenza byly zjištěny pouze dvě pozitivní rostliny z celkového počtu 25. Výsledky PCR analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 3 a 4. Elektroforetický záznam detekce genu *Atwbc19* je zobrazen na obr. 7.

Obr. 7: Elektroforetogram 11 vybraných vzorků pšenice (1 – 11) generace T1, H₂O, C- (negativní kontrola), C+ (pozitivní kontrola), LII (marker molekulové hmotnosti); pozitivní: 1, 11.



Tab. 3: Výsledky PCR analýzy potomstev pšenice generace T1 cv. Fielder.

Číslo linie	Počet vyšetých obilek	PCR pozitivní	PCR pozitivní [%]
246	20	3	15,0
253	10	2	20,0
290	9	1	11,1
295	16	3	18,8
334	10	0	0,0
551	9	1	11,1
549	10	0	0,0
Celkem	84	10	12,0

Tab. 4: Výsledky PCR analýzy potomstev T1 generace cv. Cadenza.

Číslo linie	Počet vyšetých obilek	PCR pozitivní	PCR pozitivní [%]
491	9	2	22,2
504	7	0	0,0
513	9	0	0,0
Celkem	25	2	8,0

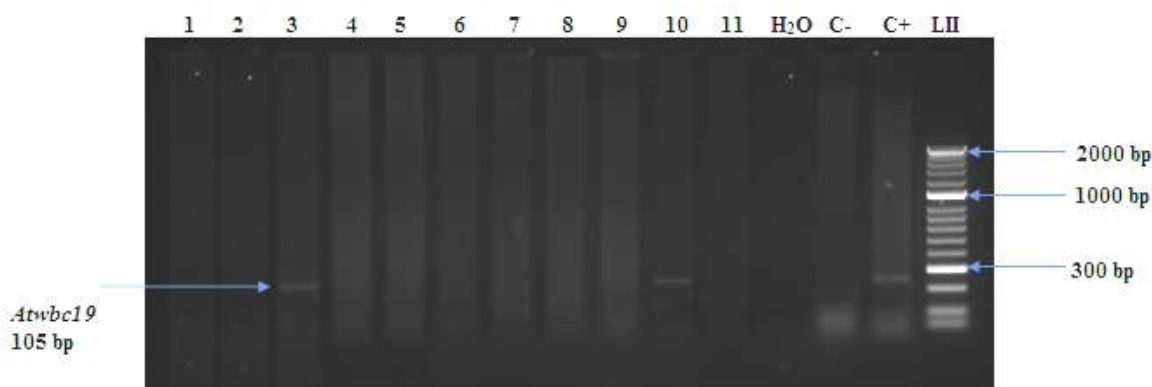
5.2 Detekce transgenu *Atwbc19* v generaci T2

Z vybraných 12 pozitivních rostlin T1 generace obou odrůd byla z obilek extirpována nezralá zygotická embrya o velikosti 1 – 2 mm a kultivována na ½ MS médiu, ve dvou variantách, s antibiotikem (neomycin 200 mg/l) a bez antibiotika. Na stejných médiích byly kultivovány embrya o stejné velikosti i kontrolních, netransformovaných odrůd. Celkem bylo

kultivováno 278 embryí, polovina na médiu s neomycinem. Z tohoto množství vyrostlo pouze 120 rostlin.

Z rostlin generace T2, které na médiu vyrostly, byla izolována genomová DNA metodou využívající paramagnetické částice. Detekce transgenu v T2 generaci byla provedena pomocí PCR analýzy a elektroforetické separace. Amplifikovaný produkt měl u pozitivních rostlin velikost 105 bp. Vzorky byly porovnány s pozitivní kontrolou a velikost amplifikovaného produktu byla zjištěna srovnáním se standardem molekulové hmotnosti (obr. 8).

Obr. 8: Elektroforetogram 11 vybraných vzorků pšenice seté (1 – 11) generace T2, H₂O, C- (negativní kontrola), C+ (pozitivní kontrola), LII (marker molekulové hmotnosti); PCR pozitivní vzorky jsou ve dráze: 3, 10.



Z celkového počtu 120ti analyzovaných rostlin bylo 65rostlin odrůdy Fielder a 55 rostlin odrůdy Cadenza. U odrůdy Cadenza byly zjištěny čtyři pozitivní rostliny, z nichž dvě vyrostly na médiu s antibiotikem neomycin o koncentraci 200 mg/l a dvě na médiu bez antibiotika. U odrůdy Fielder bylo detekováno pět pozitivních rostlin. Tři z nich vyrostly na médiu bez antibiotika a dvě na médiu obsahujícím neomycin o koncentraci 200 mg/l. Celkem u obou odrůd bylo detekováno 9 pozitivních rostlin.

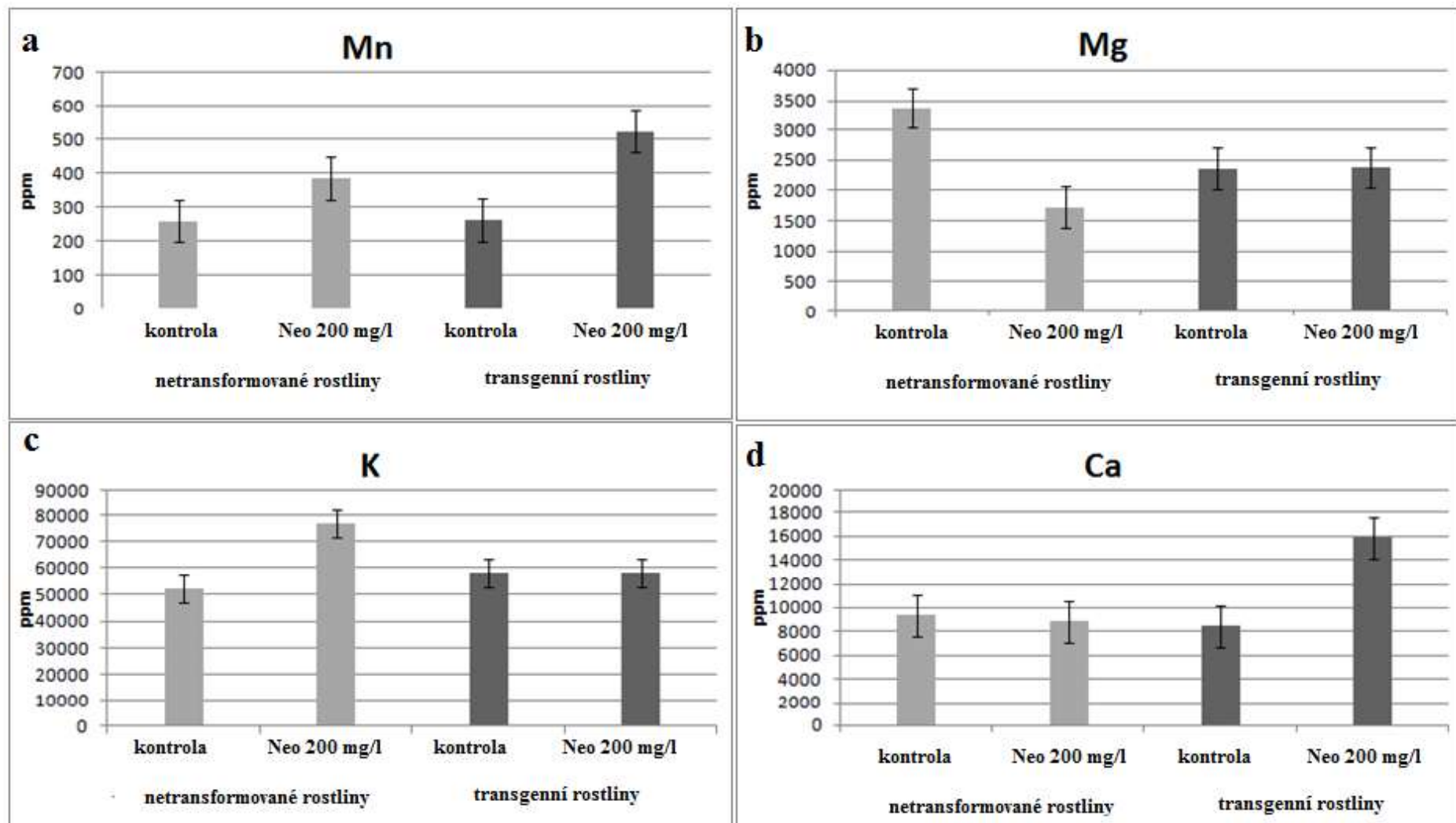
5.3 Obsah kovů transgenních rostlin T2 generace

U všech 9 pozitivních rostlin obou odrůd generace T2 byl stanoven obsah kovů: manganu, hořčíku, draslíku a vápníku (obr. 9 a 10). U transgenních rostlin, které byly kultivovány ve stresových podmínkách, které byly navozeny antibiotikem, došlo k nárůstu

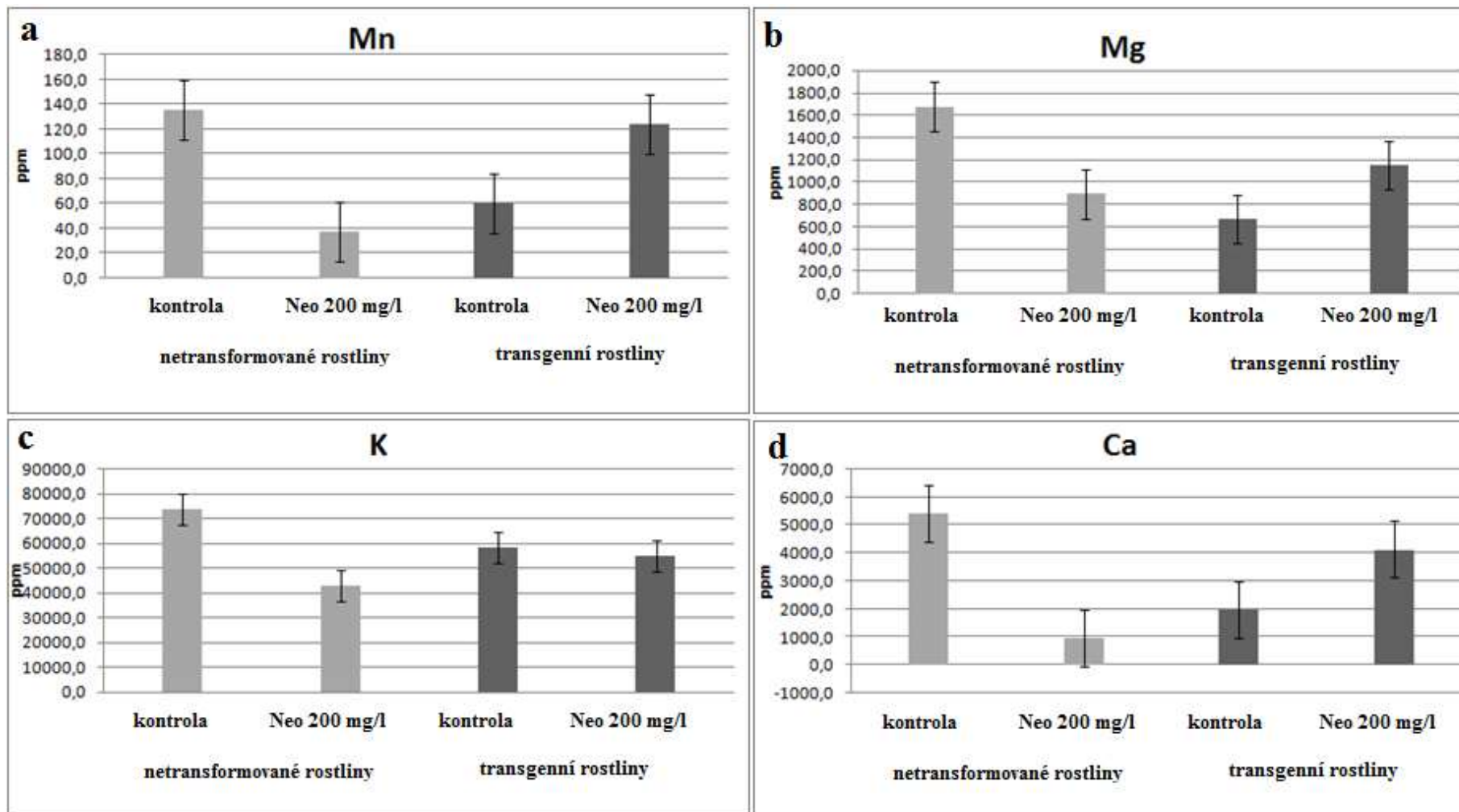
obsahu Mn a Ca, oproti transgenním rostlinám, které byly kultivovány na médiu bez antibiotika (obr. 9a,d, 10a,d).

U obou odrůd byl pozorován pokles obsahu hořčíku v případě netransgenní kontroly vystavené stresu na antibiotiku ve srovnání s kontrolní nestresovanou variantou. Tento pokles nebyl zaznamenán u transgenních rostlin (9b a 10b). Shodná podobnost projevu byla pozorována v obsahu Mn a Ca u odrůdy Cadenza (10a, 10d). Obsah K nebyl výrazně ovlivněn stresovými kultivačními podmínkami (9c, 10c).

Obr. 9: Výsledky měření kovů u rostlin pšenice jarní odrůdy Fielder.



Obr. 10: Výsledky měření kovů u rostlin pšenice jarní odrůdy Cadenza.



6 Diskuze

Pšenice je jednou z nejdůležitějších hospodářských plodin na světě. Vzhledem ke stoupající populaci naší planety a změnám klimatu je zapotřebí zvyšovat výnos, nutriční hodnoty, také zlepšovat ostatní žádané vlastnosti, odolnost proti biotickým a abiotickým stresům. Dosažení těchto cílů bude možné pouze spojením klasického šlechtění a moderních metod molekulární biologie. Uplatnění rekombinantních technologií je jednou z možností. Transgenozie je nástrojem jak pro expresi žádaných genů, tak i umlčování. Prostřednictvím genového inženýrství lze funkci genů také studovat. Ukazuje se, že právě ABC transportéry mají důležité funkce ve všech živých organismech, avšak funkce většiny rostlinných ABC transportérů není dosud objasněna. Předpokládá se, že u rostlin mají tyto proteiny nezastupitelnou roli v růstu a vývoji, ve výživě, odpovědi na abiotický a biotický stres a interakci rostlin s okolním prostředím.

Transportér AtWBC19, původem z *A. thaliana* je jedním z posledních identifikovaných a studovaných rostlinných transportérů, který patří do skupiny G (původně White-Brown Complex). Zjistilo se, že je odpovědný za rezistenci vůči aminoglykosidovému antibiotiku kanamycinu u huseníčku, tabáku (Mentewab a Stewart 2005) a také u melounu (Bombale a kol., 2010). U topolu byla popsána rezistence i k ostatním třem aminoglykosidovým antibiotikům - neomycinu, geneticinu a paromomycinu (Kang a kol., 2010a). Vzhledem k významnosti a specifitě účinku identifikovaného genu a možnosti praktického využití byla aplikace transportéru AtWBC19, jako přirozeného selekčního markeru, patentována.

Pracovníkům oddělení OCHBG (CRH) se v roce 2014 podařilo gen transportéru AtWBC19, úspěšně natransformovat do jarní pšenice odrůd Cadenza a Fielder.

Cílem bakalářské práce byl výběr transgenních rostlin v generaci T1 a T2. Součástí bakalářské práce byla kultivace rostlin ve stresových podmínkách, u kterých byl stanoven obsah kovů. Mentewab a kol. (2014) publikovala, že mutace v genu kódujícím transportér AtWBC19 způsobila změnu ve schopnosti rostliny přijímat kationty kovů za stresových podmínek vyvolaných aminoglykosidovým antibiotikem kanamycinem v kultivačním médiu. V experimentu, který byl proveden, bylo zjištěno, že stres způsobený antibiotikem ovlivňuje obsah kovů. Bylo pozorováno, že obsah Mg u netransgenní pšenice v závislosti na obsahu antibiotika v médiu klesá, zatímco u transgenní linie zůstává stejný, nebo mírně vzrůstá.

V případě Ca a Mn byl pozorován nárůst obsahu těchto prvků při stresových podmínkách vyvolaných neomycinem, ale k tomuto nárůstu nedošlo u kontrolní netransgenní varianty. Předpokládá se, že tento jev může způsobovat zvýšená exprese transportéru AtWBC19.

Na základě omezeného množství literárních zdrojů a na základě dosažených výsledků v rámci bakalářské práce je zřejmé, že transportér AtWBC19 může mít významnou funkci při důležitých fyziologických procesech a může ovlivňovat i jiné fyziologické pochody v rostlině.

7 Závěr

V rámci bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma transgenozy pšenice a ABC transportéry. U vybraných rostlinných ABC transportéru je uvedena struktura a jejich funkce. U *A. thaliana* byl identifikován gen transportéru AtWBC19 vykazující rezistenci k aminoglykosidovým antibiotikům, který byl transformován do pšenice.

V experimentální části byl proveden skrínig potomstev T1 a T2 generace odrůd Fielder a Cadenza. Metodou PCR bylo v T1 generaci celkem analyzováno 109 rostlin, z nichž bylo 12 rostlin pozitivních. Z pozitivních rostlin bylo na médiu s antibiotikem neomycin kultivováno celkem 278 nezralých zygotických embryí, získáno bylo 120 rostlin T2 generace, detekováno bylo 9 transgenních rostlin. U rostlin, které byly pěstovány v *in vitro* podmínkách, byl pomocí ICP-MS měřen obsah kovů. Bylo zjištěno, že transgenní rostliny pšenice s genem *Atwbc19*, jsou schopné za stresových podmínek přijímat stejné nebo vyšší nebo i nižší množství kovů.

8 Seznam zkratek

35 S promotor	CaMV 35S promotor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček rolní)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABC	ATP-binding cassette
<i>act1</i>	promotor
ATP	adenosintrifosfát
<i>aroA:CP4</i>	gen kódující 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntasu
<i>bar</i>	bialaphos resistance – reportérový gen
bp	párů bází
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GFP	Green fluorescent protein
GM	geneticky modifikovaný
<i>gus</i>	beta-glucuronidasový gen
<i>hpt</i>	gen kódující hygromycin fosfotransferázu
<i>KpnI</i>	gen pocházející z <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LUC	luciferáza
MAR1	multiple antibiotics resistance 1
MS	Murashige a Skoog
NBD	nukleotide binding domain – nukleotid vázající doména
<i>nptII</i>	gen kódující neomycin fosfotransferázu
pBract214AS	název vektoru
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDR	pleiotropic drug resistance

primer F	primer Forward
primer R	primer Reverse
<i>Sac I</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
T0	obilky rostlin transformovaných genem <i>Atwbc19</i>
T1	generace transgenních rostlin č. 1
T2	generace transgenních rostlin č. 2
T – DNA	transferová DNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Ti – plazmid	tumor – inducing plasmid
TMD	transmembrane domain – transmembránová doména
<i>Ubi</i> promotor	ubiquitinový promotor
WBC	white-brown complex

9 Použitá literatura

Abdul, R., Ma, Z., Wang, H. (2004): Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L.): A Review. *Molecular Plant Breeding* 2(4): 457-464.

Aufsatz, W., Nehlin, L., Voronin, V., Schmidt, A., Matzke, A.J. (2009): A novel strategy for obtaining kanamycin resistance in *Arabidopsis thaliana* by silencing an endogenous gene encoding a putative chloroplast transporter. *Biotechnol J* 4: 224–229.

Bińka, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2012): The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*x Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes. *J. Appl. Genet.* 53 1–8.

Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Lee, O.R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S.N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W.A., Murphy, A.S. (2007): Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19:131–147.

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.

Brown, T. (2001): UNIT 10.6A Southern Blotting. *Curr Protoc Immunol.* doi: 10.1002/0471142735.

Burris, K., Mentewab, A., Ripp, S., Stewart, C. N. Jr (2008): An *Arabidopsis thaliana* ABC transporter that confers kanamycin resistance in transgenic plants does not endow resistance to *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol* 1: 191–195.

Conte, S., Stevenson, D., Furner, I., Lloyd, A. (2009): Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiol* 151: 559–573.

Conte, S. S., Lloyd, A. M. (2010): The MAR1 transporter is an opportunistic entry point for antibiotics. *Plant Signal Behav* 5: 49–52.

Cheng, M., Fry, J. E. , Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W. a kol. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115, 971–980.

Dean, M., Annilo, T (2005): Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 6, 123–142.

Ferro, M., Brugiere, S., Salvi, D., (2010): Seigneurin-Berny D. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics.* 9:1063–1084.

Gallego, P. P., Pérez-Pineiro, P., Gago, J., Landín, M. (2012): *Agrobacterium* Mediated Transformation of Wheat: General Overview and New Approaches to Model and Identify the Key Factors Involved. In: ÖZDEN - ÇİFTÇİ, Y. *Transgenic plants - Advances and Limitations.* 1. vydání. Rijeka: InTec. s. 3-26. ISBN 978-953-510181-9.

Garfinkel, D. J., Simpson, R. B. , Ream, L.W., White, F.F., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1981): Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27: 143–153.

Glick, B. R., Pasternak, J. J., Patten, C. L. (2010): *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*, 4th Edition, 1000 s. ASM Press, Washington D. C., USA. ISBN 978-1-55581-498-4.

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.

Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T., Nishimura, M. (2002): Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrate for fatty acid β -oxidation. *Plant Cell Physiol.* 43:1–11.

Heinemann, J. A., Traavik, T. (2004): Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nat Biotechnol* 22: 1105–1109.

Higgins, C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* ;8:67–113.

- Hooykaas, Paul J. J., Chilperoort, Rob A. (1992): *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.
- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F., Fry, J., (2003): *Agrobacterium* mediated large scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*. 21(10): 1010-1019.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J., Bourguignon, J. (2007): A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell. Proteomics*. 6:394–412.
- Kang, B. G., 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., Kretschmar, T., Lee, Y., Martinoia, E. (2011): Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*9: e0153.
- Kovalchuk, A., Driessen, A. J. M. (2010): Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. *BMC Genomics*. 11:177–197.
- Kretschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E., Negy R. (2011): Functions of ABC transporters in plants. *Essays Biochem* 7;50(1):145-60. doi: 10.1042/bse0500145.
- Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y. Y., Jeon, B., Maeshima, M., Yoo, J.Y., Martinoia, E., Lee, Y. (2008): The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat. Cell Biol.* 10:1217–1223.
- Linton, K. J. (2007): Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 22, 122–130.
- Locher, K. P. (2009): Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 239–24.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaria, P. (2008): *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. 1150 s. V. H. Freeman and Company. New York, USA.

Machold, O. (1971): Lamellar proteins of green and chlorotic chloroplasts as affected by iron deficiency and antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 238: 324–331.

Mentewab, A. a Stewart, C. N., Jr. (2005): Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin rezistance to transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 23 (9): 1177-1180.

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.

Miki, B., a McHugh, S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107: 193–232.

Nagy, R., Grob, H., Weder, B., Green, P., Klein, M., Frelet, A., Schjoerring, J. K., Brearley, C. A., Martinoia, E. (2009): The *Arabidopsis* ATP-binding cassette protein ATMRP5/ATABCC5 is a high-affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage. *J. Biol. Chem.* 284:33614–33622.

Pančíková, J. (2017): Roste produkce i spotřeba obilovin. *Úroda* 2:13-14.

Peelman, F., Labeur, C., Vanloo, B., Roosbeek, S., Devaud, C., Duverge, r N., Denèfle, P., Rosier, M., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. (2003): Characterization of the ABCA Transporter Subfamily: Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Members, Phylogeny and Topology. *J. Mole. Biol.* 325:259–274.

Rea P. A. (2007): Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:347–375.

Rosypal, S. a kol. (2003): *Nový přehled biologie*. 797 s. 1. vydání. Scientia. Praha. ISBN 80-7183-268-5.

Schmitt, L., Tampé, R. (2002): Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 12(6):754–760.

Schneider, E., Hunke, S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev.*22(1):1–20.

Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J. M., Meeley, R. B., Ertl, D. S., Ranch, J. P., Glassman, K. (2007): Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.* 25:930–937.

Shimoni-Shor, E., Hassidim, M., Yuval-Naeh, N., Keren, N. (2010): Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. *Plant Cell Environ.* 33:1029–1038.

Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2009): *Genetika*. 871 s. Nakladatelství Masarykovy univerzity. Brno. ISBN 978-80-210-4852-2.

Szewczak, A., Ziomkiewicz, I., Jasinski, M. (2011): Hiring cell gatekeepers – ABC transporters in plant biotechnology. *Bio Technologia Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology.* 92 (2): 132-139.

Štefková, J., Poledne, R., Hubáček, J. A. (2004): ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 53(3):235–243.

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.

Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E., Vasik, I. K. (1992): Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *Nature Biotechnology* 10: 667 – 674.

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.*13:151–159.

Zimolka, J. (2005): Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna. 1. vydání. Praha: Profi Press, s. r. o., 180 s. ISBN 80-86726-09-6.

Zupan, J. R., Citovsky, V., Zambryski, P. (1996): *Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2392–2397. 10.1073/pnas.93.6.2392.