

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Kamila Němcová

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



Transformace jarního ječmene genem AtWBC19

Bakalářská práce

Kamila Němcová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Prohlášení:

Čestně prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením vedoucího práce Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. Použitá literatura je v práci citována.

V Olomouci dne:.....

Podpis:.....

Poděkování:

Velmi děkuji za vedení a rady paní Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. a Bc. Janě Vaškové za odborné vedení a rady v průběhu vypracování bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Kamila Němcová

Název práce: Transformace jarního ječmene genem AtWBC19

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: PŘF UP v Olomouci, Katedra buněčné biologie a genetiky

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

Rob obhajoby práce: 2013

Souhrn

Ječmen je jednou z celosvětově hospodářsky nejvýznamnějších obilovin. Z důvodu stále se zvyšujícího počtu obyvatelstva na Zemi je potřeba větší produkce obilovin a tedy i ječmene, který je využíván v pivovarnictví, ve výrobě škrobu a také tvoří podstatnou část krmiva pro monogastriční zvířata. Ječmen je tedy častým cílem šlechtitelů, kteří se snaží o vylepšení jeho genomu. Transformační metody jsou zaměřeny na zvýšení produkce, vylepšení odolnosti vůči chorobám a patogenům a také na snížení nároků na pěstování.

Literární rešerše byla zaměřena na ABC transportéry u rostlin a gen vykazující rezistenci ke kanamycinu AtWBC19. V experimentální části byl ječmen cv. Golden Promise transformován vektorem pBRACT214::AtWBC19. Transformovaná nezralá zygotická embrya byla selektována na médiích s obsahem antibiotik a rostliny regenerované z těchto explantátů byly podrobeny PCR pro ověření úspěšnosti transformace. Na základě těchto výsledků bylo navrženo další testování genu AtWBC19.

Bibliographical identification:

Author's name and surname: Kamila Němcová

Title: Transformation of spring barley by AtWBC19

Type of thesis: Bachelor paper

Department: Faculty of Science Palacký University Olomouc,
Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Summary

Barley is one of the most agriculturally important crops used in the process of beer making, production of alcohol and starch, and it is the main component of feed for monogastric animals. Due to the continued increase of the number of people living on the planet Earth, the need for food keeps increasing. Plant breeders try to improve barley genome to make it more productive. Transformation methods are used for obtaining bigger crop production and better resistance against biotic and abiotic stresses.

A literature review was focus on plant ABC transporters genes and a gene AtWBC19 which is known for conferring antibiotic resistance to transgenic plants. An experimental part of project consisted of a transformation of a spring barley by vector pBRAC214::AtWBC19.cv. Golden Promise. *A. tumefaciens* carried vector pBRAC214::AtWBC19 Transformed zygotic embryos were selected on plates containing different antibiotics with different concentration. Plants which were able to regenerate from explants were used for PCR reaction to confirm successful transformed.

Obsah

Abstrakt

Abstract

1	Cíle práce.....	9
2	Úvod.....	10
	2.1 ABC transportéry.....	10
	2.2 Charakteristika AtWBC19.....	13
	2.2.1 Kanamycin.....	15
	2.3 Využití nativního genu pro transformaci jednoděložných rostlin.....	15
	2.4 Vztah veřejnosti ke geneticky modifikovaným organismům.....	17
3	Současný stav řešené problematiky.....	17
	3.1 Transformace hybridního topolu genem AtWBC19.....	18
	3.2 Transformace <i>Cucumis melo</i> L.....	18
4	Transformační metody.....	19
	4.1 Transformace prostřednictvím <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
	4.2 Transformace protoplastu.....	22
	4.3 Biolistická metoda.....	22
5	Materiál a metodika.....	23
	5.1 Rostlinný materiál.....	23
	5.2 Kultivace jarního ječmene.....	23
	5.3 Klonovací strategie.....	24
	5.4 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i>	26
	5.4.1 Příprava selekčního media.....	26
	5.4.2 Kultivace transformovaných kolonií <i>E. coli</i>	27
	5.4.3 Izolace plazmidu z buněk <i>E. coli</i>	27
	5.4.4 Kontrola úspěšnosti transformace buněk <i>E. coli</i>	27
	5.5 Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pomocí elektroporace.....	28
	5.5.1 Kontrola transformace <i>A. tumefaciens</i>	28
	5.5.2 Kultivace transformovaných buněk <i>A. tumefaciens</i>	28
	5.6 Transformace jarního ječmene.....	28
	5.6.1 Sterilizace nezralých zrn ječmene.....	28
	5.6.2 Izolace nezralých zygotických embryí.....	29

5.6.3	Inokulace nezralých embryí ječmene.....	29
5.6.4	Selekce transformovaných explantátů.....	29
5.6.5	Regenerace transgenních rostlin.....	30
5.6.6	Detekce transgenů pomocí PCR.....	30
6	Výsledky.....	32
6.1	Selekční analýzy.....	32
6.2	Detekce transgenních rostlin.....	38
7	Diskuze.....	39
8	Závěr.....	41
9	Seznam použitých zkratk.....	42
10	Literatura.....	44

1 Cíle práce

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na studium literatury zabývající se ABC rostlinnými transportéry a genem vykazující kanamycinovou rezistenci AtWBC19. Součástí řešení jsou transformační metody u jarního ječmene.

Experimentální částí bakalářské práce je transformace jarního ječmene odrůdy Golden Promise prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* nesoucího gen antibiotické rezistence AtWBC19. Zájmový gen byl naklonován do expresního vektoru pBRACT214 a je pod kontrolou Ubi promotoru. Funkčnost genu integrovaného do genomu ječmene bude ověřena na selekčních médiích obsahujících antibiotika (geneticin, hygromycin, kanamycin, neomycin a paromomycin) o odlišných koncentracích. Regenerované rostliny budou ověřeny pomocí PCR.

2 Úvod

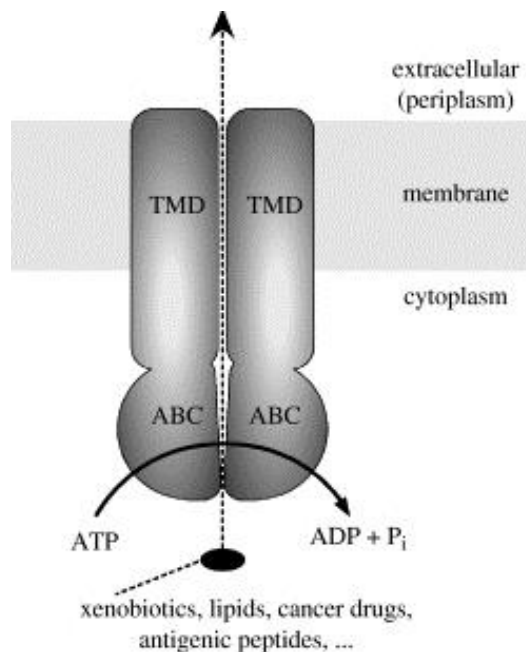
Ječmen patří mezi nejstarší a nejvýznamnější zemědělské plodiny. Archeologické důkazy svědčí o jeho výskytu v prehistorických dobách v Evropě, Asii i Africe. V současnosti se používá zejména ke krmným účelům, zvláště pro monogastriční zvířata a hraje důležitou roli i ve výrobě piva, lihu, škrobu, detergentů, kosmetických a farmaceutických přípravků. Ječné zrnko obsahuje velké množství vitamínů (např.: vitamín H, E, provitamin A téměř celý komplex vitamínů skupiny B, kyselinu nikotinovou, pantothenovou, listovou a malé množství vitamínu C), které jsou koncentrovány především v zárodku a aleuronové vrstvě. Ječmen se stal čtvrtou nejrozšířenější zemědělskou plodinou na světě. Pro svou velkou adaptabilitu a významné pěstitelské přednosti se rychle rozšířil ve všech světadílech a má nejrozsáhlejší pěstitelský areál ze všech obilovin.

V dnešní době rostou nároky na produkci ječmene z důvodu zalidňování planety. Vědci se tedy zabývají šlechtěním ječmene, který by měl co největší výnosy při co nejnižších nárocích na pěstování. Genom ječmene je tedy modifikován, transformován geny pocházejícími z jiných organismů. Jednou z vlastností, kterou se šlechtitelé snaží vylepšit je rezistence ječmene vůči antibiotikům. V současné době nejpoužívanějším genem poskytujícím antibiotickou rezistenci je *nptII*, který má ovšem bakteriální původ. Tato skutečnost znesnadňuje využití ječmene, transformovaného tímto genem, pro větší hospodářské využití z důvodů obav veřejnosti vůči geneticky modifikovaným organismům (GMO). Jako nejvhodnější náhrada se jeví gen *AtWBC19*, objevený v genomu *A. thaliana* a poskytující rezistenci k aminoglykosidovým antibiotikům. Inkorporace tohoto genu do genomu ječmene na místo *nptII*, by snížila riziko horizontálního přenosu genů mezi rostlinami a bakteriemi a tak i rezistenci bakterií vůči antibiotikům.

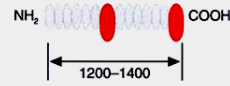
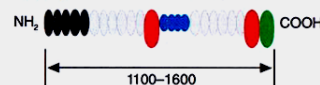
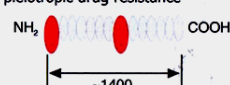
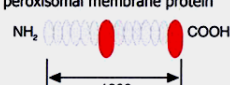


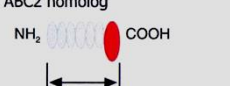
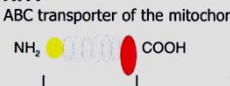


2.1 ABC transportéry

Rostlinné organismy jsou vystaveny velkému množství potenciálně toxických látek, jako jsou látky obsažené v půdě, toxiny produkované patogeny a samozřejmě produkty lidské činnosti (herbicidy a odpad z průmyslné výroby). Přeměna těchto látek a jejich následný transport se označuje jako detoxifikace a jsou ho schopny všechny živé organismy (Kang et al., 2001). Procesu detoxifikace se velkou měrou účastní ATP binding cassettes (ABC) transportéry. ABC transportéry jsou integrální membránové proteiny jejichž schopností je transport širokého spektra látek přes biologické membrány prostřednictvím vazby a následné hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP),

(Higgins, CF, 1992), (obr. 1). ABC transportéry mají ovšem i netransportní funkce, jako je regulace genů odpovědných za opravy deoxyribonukleové kyseliny (DNA), (Davidson et al., 2008) odpověď na přítomnost patogenu, akumulace fytátu v semenech a transport fytohormonů auxinu a kyseliny abscisové. Z toho vyplývá, že ABC proteiny plní nezastupitelnou roli v rostlinném růstu a vývoji, ve výživě rostlin, odpovědi na abiotický stres a interakci rostlin s okolním prostředím (Kang et al., 2001), (obr. 2). Transportéry mohou fungovat jako ATP-dependentní pumpy, iontové kanály a regulátory iontových kanálů (Theodoulou, 2000) a zajišťovat tak import látek nezbytných pro život buňky nebo naopak export látek pro buňku toxických. Další přenos látek je založen na překlopení amfipatických molekul, navázaných na fosfolipidy, z jedné strany membrány na stranu druhou (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Takto může docházet k transportu anorganických iontů, aminokyselin, peptidů, cukrů, lipidů, lipopolysacharidů, xenobiotik a také chemoterapeutik (Higgins, CF, 1992). Od jejich identifikace dochází k objevování nových funkcí, jako je odpověď na přítomnost patogenu, akumulace fytátu v semenech a transport fytohormonů auxinu a kyseliny abscisové.



Obr. 1: Schéma struktury a funkce ABC transportéru. ABC protein je složený ze dvou transmembránových domén (TMD) a dvou ABC vazebných domén (ABC). Export látek je zajišťován prostřednictvím přeměny ATP na ADP+P_i (Locher, 2008).

Subfamily/Domains	Gene name	Localization	Function/Activity
MDR multidrug resistance 	<i>AtPGP1</i> <i>AtMDR1</i> <i>AtPGP4</i> <i>BR2</i> <i>DWF3</i> <i>CjMDR1</i>	Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane	Auxin export (28, 86, 93) Auxin export (86, 93) Auxin import (123) Auxin export (84) Auxin export (84) Berberine import (117)
MRP multidrug resistance-associated protein 	<i>AtMRP1</i> <i>AtMRP2</i> <i>AtMRP3</i> <i>AtMRP4</i> <i>AtMRP5</i> <i>ZmMRP3</i> <i>ZmMRP4</i>	Vacuolar membrane Vacuolar membrane Vacuolar membrane Plasma membrane Plasma membrane Vacuolar membrane Vacuolar membrane	GS-conjugate, glucuronide and folate transport (70, 71, 100) GS-conjugate, glucuronide and chlorophyll catabolite transport (69, 70) GS-conjugate and chlorophyll catabolite transport (126) GS-conjugate and folate transport; stomatal regulation (49, 100) Stomatal regulation (25, 52) Anthocyanin transport (30) Anthocyanin transport (30)
PDR pleiotropic drug resistance 	<i>AtPDR12</i> <i>NpPDR1</i> <i>SpTUR2</i>	Unknown Plasma membrane Plasma membrane	Lead tolerance (60) Sclareolide export and resistance to <i>Botrytis cinerea</i> (42, 121) Sclareol export (129)
PMP peroxisomal membrane protein 	<i>AtPMP2</i>	Peroxisomal membrane	Peroxisomal uptake of IBA, 2,4-DB, LCFAs and/or their LCF acyl-CoAs; JA biosynthesis; seed germination (24, 36, 124, 125, 142)
AOH ABC1 homolog 	<i>AtAOH1</i>	Unknown	Unknown
b)			
WBC white-brown complex homolog 	<i>AtWBC12</i> <i>AtWBC19</i> <i>GhWBC1</i> <i>NtWBC1</i>	Plasma membrane Vacuolar membrane Plasma membrane Unknown	Epidermal wax deposition (94) Kanamycin resistance (78) Cotton fiber maturation (141) Lipid export (92)
ATH ABC2 homolog 	<i>AtATH</i> <i>OsATH</i>	Unknown Unknown	Unknown Unknown
ATM ABC transporter of the mitochondrion 	<i>AtATM1</i> <i>AtATM2</i> <i>AtATM3</i> <i>CrCDS1</i>	Mitochondria Punctate inclusions Mitochondria Mitochondria	Mitochondrial export of Fe/S clusters ^a (57) Unknown ^a Mitochondrial export of Fe/S clusters; cadmium and lead tolerance ^a (57, 45) Mitochondrial export of Fe/S clusters; cadmium tolerance (33)
TAP transporter associated with antigen processing 	<i>AtTAP1</i> <i>AtTAP2</i>	Punctate inclusions Punctate inclusions	Unknown ^b Unknown ^b
NAP nonintrinsic ABC protein 	<i>AtNAP1</i> <i>AtNAP6</i> <i>AtNAP7</i>	Plastids Plastids Plastids	Fe/S cluster maintenance and responses to far-red light (136, 137) Fe/S cluster maintenance; embryogenesis (137) Fe/S cluster maintenance; embryogenesis (137)

Obr. 2: Obrázek rostlinných ABC transportérů, jejich název, lokalizace a funkce. Jsou rozděleny do 13 podrodin na základě jejich orientace (forward, reverse), přítomnosti nebo absence ideotypické transmembránové domény (Rea, 2006).

Funkční protein je složený ze čtyř podjednotek: dvou domén vázajících nukleotidy (NBD) a dvou transmembránových domén (TMD), (obr. 1). TMD jsou méně konzervativní než NBD (Rees et al., 2009) a jsou složeny z 4-11 α -helixů obsažených v jedné doméně propojených s buněčnou membránou a mají substrátovou specifitu (Dean et al., 2003). NBD jsou lokalizovány v cytoplazmě buňky a zodpovídají za přenos energie při transportu látek skrz membránu (Dean, 2002). Všechny NBD jsou složeny ze tří vysoce konzervativních motivů, které sdílí minimálně 25 % identitu (Dean et al., 2003): Walker A, Walker B a motiv C, který je lokalizován mezi dvěma předešlými (van Veen et Callaghan, 2003). Transportéry mohou být rozděleny na základě kombinace jejich domén na:

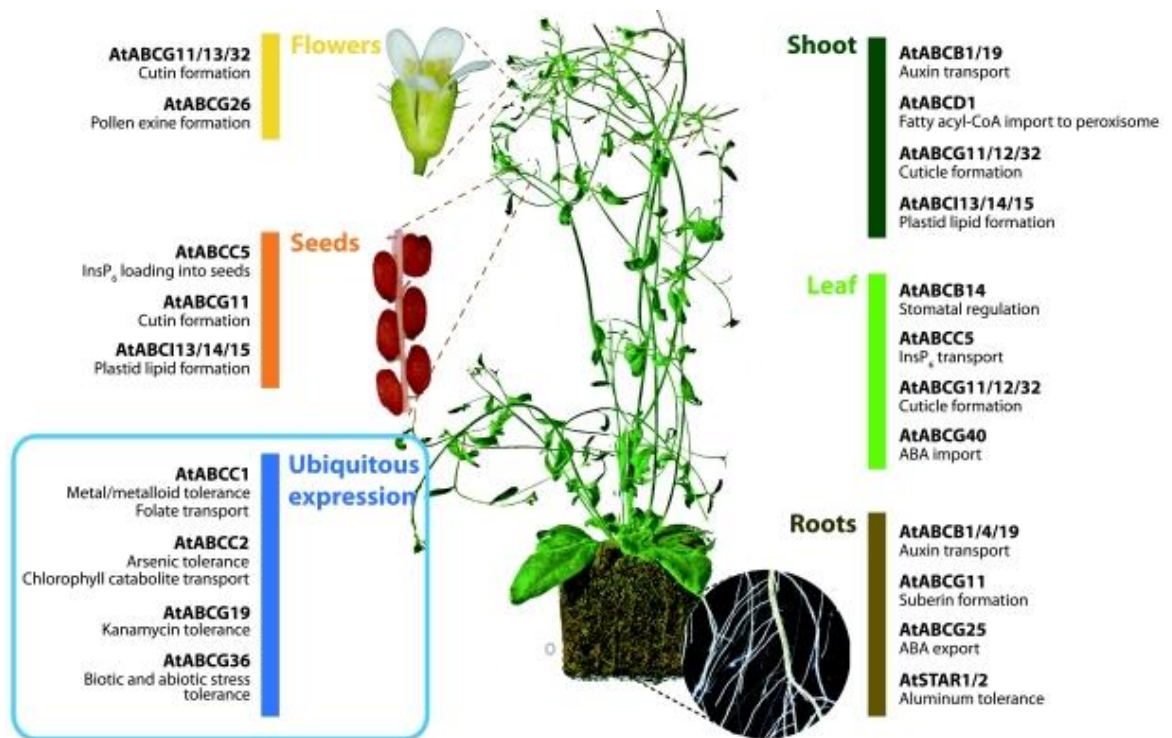
- I. Full transportéry
 - Kombinují čtyři domény (dvě TMD a dvě NBD) v jednom polypeptidu
- II. Half transportéry
 - Jsou složeny pouze ze dvou domén (jedné TMD a jedné NBD), ty mohou být vzájemně spojeny pouze jako NBD-TMD nebo TMD-NBD

Aby měly half transportéry funkci pumpy musí vytvářet homodimery či heterodimery.

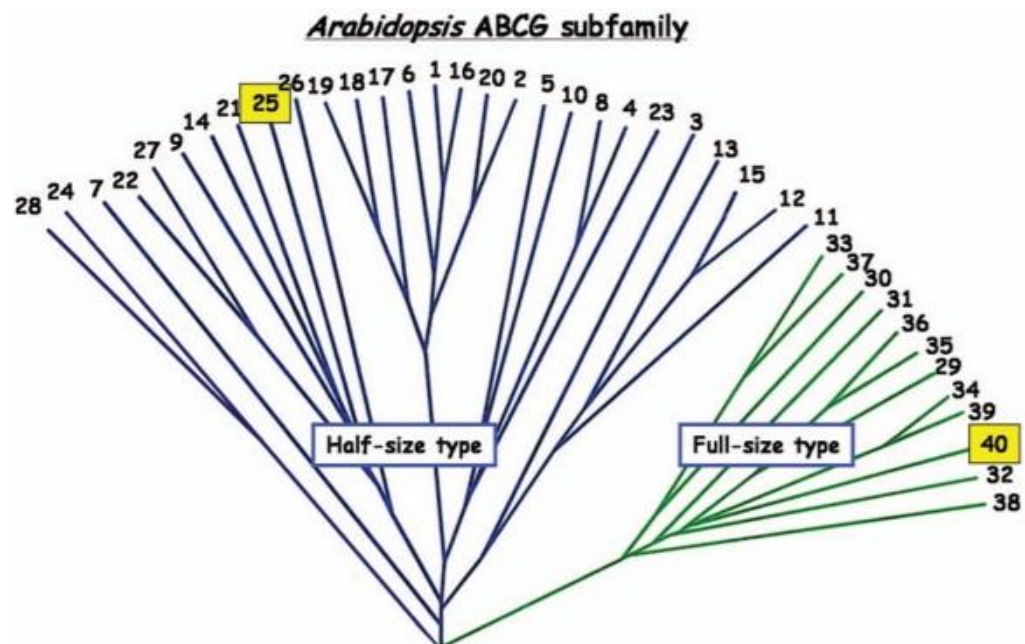
ABC transportéry vytvářejí jednu z největších proteinových rodin přítomných v genomu prokaryotních i eukaryotních buněk a jsou složeny ze 48 genů kódujících průměrně 1200 aminokyselin (Rea, 2007). Na základě sekvenčních analýz jsou rozdělovány do osmi rodin (ABCA-H), (Dean et Annilo, 2005). Společným rysem je přítomnost ABC motivu obsahujícího následující aminokyselinovou sekvenci: [LIVMFY]S[SG]G \times 3[RKA][LIVMYA] \times [LIVFM][AG]. Existuje ovšem i několik vyjímek (Rea, 2007). Rodiny ABCA až ABCD mají společnou forward TMD-NBD doménovou organizací, zatímco ABCG rodiny jsou charakteristické svou reverse NBD-TMD doménovou organizací. ABCE a ABCF jsou proteiny složeny pouze ze dvou NBD, z toho vyplývá, že ABCI rodina zahrnuje různé geny, které kódují jen jednu doménu (TMD nebo NBD) nebo část domény (Verrier et al., 2008).

2.2 Charakteristika AtABCG19

Genom *Arabidopsis thaliana* kóduje více než 130 ABC transportérů (obr. 2), avšak pouze 22 z nich bylo funkčně analyzováno (Kang et al., 2001). Největší rodinou ABC transportérů nalezených u modelové rostliny *A. thaliana* je ABCG, která se skládá z 28 half-size white brown complex (WBC) a 12 full-size proteinů (obr. 3).



Obr. 3: Schéma exprese ABC transporterů v *Arabidopsis* funkčně analyzovaných do roku 2011. (Kretzchmar et al., 2011).



Obr. 4: ABCG rodina ABC transporterů *Arabidopsis*. ABCG rodina obsahuje největší množství zástupců kódovaných v genomu *Arabidopsis*, je složena z 28 half transporterů (1-28) a 12 full transporterů (29-40), (Verrier et al., 2008).

Bakalářská práce se zabývá významným zástupcem rodiny ABCG, kterým je AtABCG19. Tento transportér byl objeven v genomu *Arabidopsis thaliana* u knockout mutanta, který vykazoval podstatně kratší kořenový růst na médium obsahujícím kanamycin, než druhý knockout mutant s neomycinphosphotransferase II (*nptII*) v T-DNA. Bylo dokázáno, že overexprese tohoto genu u *A. thaliana* je odpovědná za rezistenci vůči kanamycinu. Studie předpokládají, že AtWBC19 je schopný přeměrovat kanamycin do vakuoly a tak zabránit inaktivaci ribozomů (Mentewab et Stewart, 2005). V případě bakterií může dojít k umístění AtWBC19 do bakteriální membrány, což může vyvolat transport kanamycinu z buňky a poskytnout tak nízkou míru rezistenci (obr. 5).

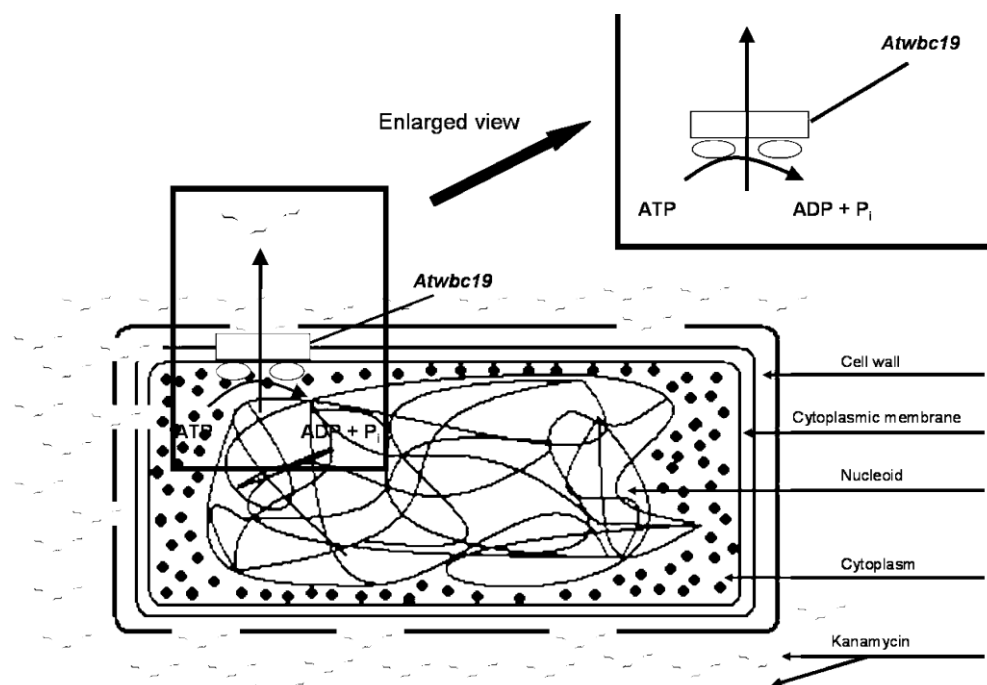
Tento fenotyp byl zatím nalezen pouze u AtABCG19, ostatní členové rodiny ABCG tuto vlastnost nemají. Původně byl tedy gen AtABCG19 navržen jako transgenní rostlinný selektivní marker, protože poskytuje rezistenci pouze vůči kanamycinu a nikoliv i k jiným aminoglykosidovým antibiotikům jako je tomu u běžně používaného genu *nptII* (Mentewab et Stewart, 2005). V pozdějších studiích bylo ovšem zjištěno, že v případě transformace jiných rostlinných druhů (hybridní *Populus* a *Cucumis melo* L.) dochází k širší antibiotické rezistenci (Kapitola Současný stav řešené problematiky).

2.2.1 Kanamycin

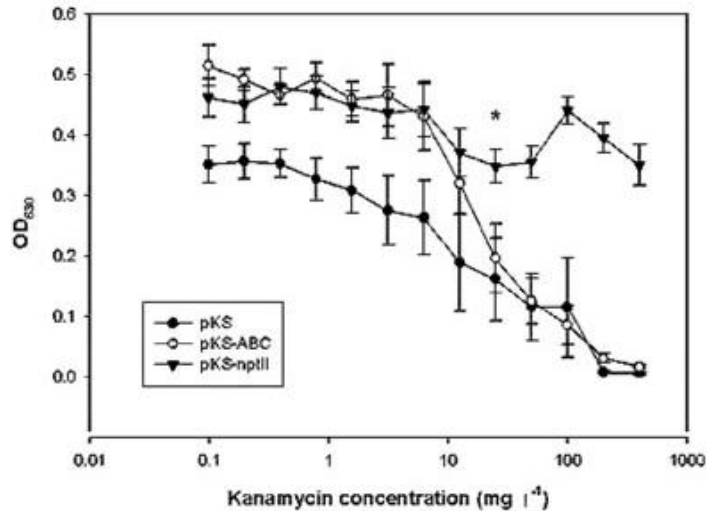
Kanamycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované z půdní bakterie *Streptomyces kanamyceticus*. Jeho vlastností je inhibice syntézy proteinu u prokaryotních i eukaryotních buněk vazbou na ribozomální komplex (Bar-Nun et al. 1983). Toto antibiotikum je hojně používáno při rostlinné transformaci jako selekční reagent. Pokud byly rostlinné buňky transformovány genem kódujícím *nptII* byly schopny proliferace na živném médiu obsahujícím kanamycin, avšak rostlinné netransformované buňky byly inhibovány, nebyly životaschopné (Horsch et al., 1985).

2.3 Využití genu AtWBC19 pro transformaci jednoděložných rostlin

podstatně nižší než je tomu u *nptII* (Mentewab et Stewart, 2005). Toto bylo dokázáno v práci Burris et al., 2008 (obr. 6). Míra rezistence byla schodná u bakterií *E. coli* DH5 α transformovanými geny AtWBC19 (pKS-ABC) a *nptII* (pKS-nptII) pouze do koncentrace kanamycinu 10 mg/l, poté došlo k prudkému poklesu životaschopnosti bakterií transformovaných AtWBC19 na médiích obsahujících vyšší koncentraci kanamycinu než u bakterií transformovaných *nptII*. Nízký stupeň rezistence je nejspíš zapříčiněn integrováním AtWBC19 do bakteriální membrány a



Obr. 5: Předpokládaný model funkce AtWBC19 bakteriální buňce. V případě bakterií může dojít k umístění AtWBC19 do bakteriální membrány, což může vyvolat transport kanamycinu z buňky a poskytnout tak nízkou rezistenci (Burris et al., 2008).



Obr. 6: *E. coli* DH5 α netransformované (pKS) a transformované genem *nptII* (pKS-nptII) a genem *AtWBC19* (pKS-ABC) byly kultivovány na médiích obsahujících vzestupné koncentrace kanamycinu pro testování jejich rezistence.

2.4 Vztah veřejnosti ke geneticky modifikovaným organismům (GMO)

Obiloviny se biotechnologicky změněným genomem začaly být využívány pro komerční pěstování roku 1996. Tímto datem začaly také regulace pro GMO, které se liší v jednotlivých zemích, které povolují pěstování GMO pro hospodářské využití (Broeders et al., 2012). Navzdory výhodám, které GMO poskytují pro produkci potravin, existují ve Spojených Státech Amerických (USA) celé skupiny oponentů. Nejčastěji jimi jsou dovozci obilovin ze zemí Evropské Unie (EU) do Ameriky, farmáři zabývající se organickým způsobem pěstování, konzumenti, skupiny lidí vyznávající zdravý životní styl a mnoho dalších. Důvodem jejich odmítání GMO jsou obavy z možné toxicity, znečištění životního prostředí, nekontrolovaných genový přenos a s tím spojenou antibiotickou rezistencí a také možné vyvolání alergií a rakoviny. Zastánci GMO z řad výzkumníků, US farmářů a spotřebitelů argumentují zlepšením kvality zeleniny a ovoce (obsahu tuků, karbohydrátů a proteinů), vylepšením kvality a kvantity masných výrobků a mléka (Uzogara, 2000).

3 Současný stav řešené problematiky

Od objevení a zjištění funkce ABC transportérů poskytujících antibiotickou rezistenci u *A. thaliana* se vědci zaměřili na možnost využití tohoto genu u hospodářsky významných dvouděložných druhů. Funkce *Atwbc19* byla studována u transgenního melounu (*Cucumis melo* L.) a transgenního hybridního topolu (*Populus canescens* x *Populus grandidentata*). Obě tyto rostliny

jsou charakteristické malým genomem (367 Mbp res. 550 Mbp), který je maximálně 4krát větší než je genom *A. thaliana*. Dalšími výhodami jsou: rychlý juvenilní růst, fertilní hybridi a vysoká úspěšnost transformace a regenerace.

3.1 Transformace hybridního topolu genem AtWBC19

Ve své práci se Kang et al., 2010 zaměřili na hybridní topol transformovaný *Atwbc19* a *nptII*. Cílem jejich výzkumu bylo ověření funkce *AtWBC19*, jako genu poskytujícího antibiotickou rezistenci a jeho porovnání dosažených výsledků s genem rostlinami transformovanými genem *nptII*. K transformaci použili *Agrobacterium* nesoucí ve svém plazmidu gen pro *Atwbc19* nebo *nptII* a infikovali jim sto listových segmentů. Nově formované kalusy byly následně přeneseny na médium obsahující kanamycin o koncentraci 80 mg/l. Na tomto médiu vyseletovali transformované kalusy od netransformovaných. Transformované listové segmenty byly schopny regenerace a produkce výhonků. K ověření transformace byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) a ke zjištění stupně transkripce *Atwbc19* a *nptII* byla využita real-time polymerázová řetězová reakce (RT-PCR). Obě tyto metody potvrdily úspěšnou transformaci rostlin geny *Atwbc19* a *nptII*. Rostliny byly dále testovány na selekčních médiích obsahujících kanamycin o koncentracích (0, 50, 100, 200 a 400 mg/l), geneticin (0, 1.25, 2.5, 5.0 a 10 mg/l), neomycin (0, 50, 100, 200 a 400 mg/l) a paromomycin (0, 50, 100, 200 a 400 mg/l). Rostliny transformované genem *Atwbc19* nebo *nptII* vykazovaly na těchto médiích srovnatelnou schopnost regenerace adventivních výhonků z listových segmentů. Tato schopnost byla 2 – 3krát vyšší než u netransformované kontrolní rostliny.

Bylo prokázáno, že *Atwbc19* neposkytuje rezistenci pouze vůči kanamycinu, jak ukázaly dřívější studie u rostlin tabáku (Mentewab et Stewart, 2005), ale také vůči třem dalším aminoglykosidovým antibiotikům v případě hybridního *Populu*. Tato skutečnost může být důsledkem interakce *Atwbc19* s jinými geny topolu nepřítomnými v genomu *A. thaliana*.

3.3 Transformace *Cucumis melo* L.

Gen *AtWBC19* byl použit jako selektivní marker také pro *Cucumis melo* L. (Laxman, 2010). V této práci byla použita semena melounu (*Cucumis melo* L.) transformovaná genem *AtWBC19* a netransgenní semena dvou odrůd (Punjab Sunheri, Hara Madhu a Eden Gem), která byla vystavena čtyřem různým koncentracím kanamycinu (80, 100, 150 a 200 mg/l) po dobu 20 dnů

v kontrolovaných podmínkách. Plazmid, nesoucí gen AtWBC19, pABC byl transformován do *Agrobacterium tumefaciens* kmenu LBA4404 a použit pro transformaci. AtWBC19 byl pod kontrolou CaMV 35S promotoru, stejně jako v případě hybridního **topolu** (Kang et al, 2010). Expresní vektor obsahoval reportérový gen *gus*. Kanamycin o koncentraci 80 mg/l úplně inhiboval vývoj výhonků v případě netransformovaných Punjab Sunheri na rozdíl od odrůd Hara Madhu a Eden Gem, které vykazovaly větší stupeň rezistence při koncentraci kanamycinu 100 mg/l. Transgenní rostliny byly selektovány na médiích obsahujících kanamycin o koncentracích (100, 150 a 200 mg/l). Rostliny byly schopny regenerace na těchto médiích, ale jejich počty se lišily, proto pro další studie byly použity pouze rostliny regenerované z média s kanamycinem o koncentraci 100 mg/l. Přítomnost transgenu byla ověřena restriční enzymovou reakcí za použití enzymů *SacI* a *KpnI* a také pomocí PCR. Pro PCR bylo vybráno 20 rostlin, pět z nich vykazovalo přítomnost 2.18 kb amplifikovaného produktu, což odpovídá velikosti genu AtWBC19, který obdrželi při svých studiích Mentewab and Stewart (2005). Gen AtWBC19 poskytuje tedy kanamycinovou rezistenci také rostlinám *Cucumis melo L.*

4 Transformační metody

Transformace je proces vnášení syntetických, modifikovaných nebo cizorodých genů do živočichů či rostlin (Snustad, 2009). Důležitou vlastností uplatňující se při genovém inženýrství u rostlin je jejich schopnost totipotence. To znamená, že každá jednotlivá buňka je schopna vytvořit všechny diferencované buňky dospělé rostliny. Mnoho diferencovaných rostlinných buněk má schopnost dediferencovat se do embryonálního stadia a následně rediferencovat v nové typy buněk. Totipotence rostlinných buněk je pro genové inženýrství velkou výhodou, neboť umožňuje regeneraci celé rostliny z jednotlivých modifikovaných somatických buněk.

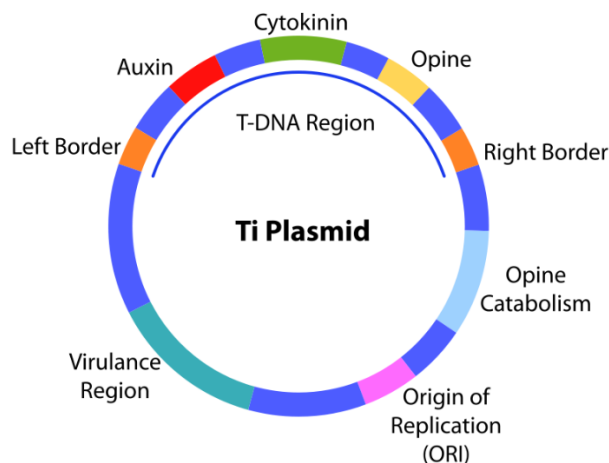
Genetické modifikace byly prováděny po mnoho desetiletí, v současné době je však již možné přímo modifikovat DNA rostliny, a tak rychle přidávat geny jiných druhů do genomů rostlin s využitím technologie rekombinantní DNA. Transgenní rostliny mohou být vytvořeny několika způsoby (Snustad, 2009).

4.1 Transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

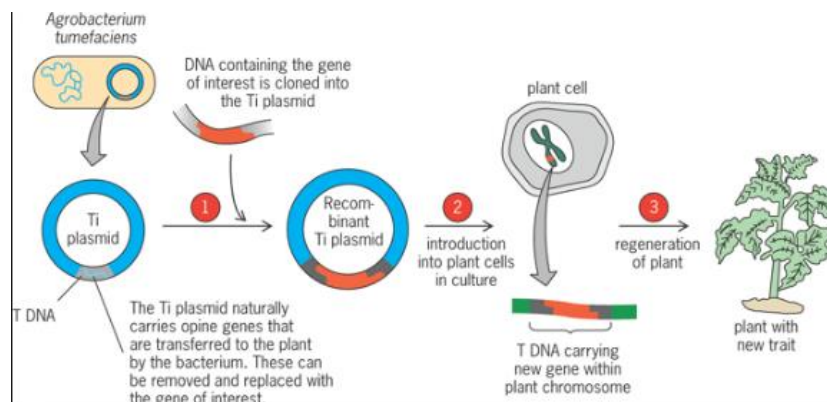
Transformace rostlin prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* je patrně nejrozšířenější metodou, přinejmenším u krytosemenných rostlin.

Agrobacterium tumefaciens je gram-negativní půdní bakterie, jež vyvinula přirozený systém genového inženýrství, obsahuje segment, který je přenášen z bakterie do rostlinných buněk. Při genovém inženýrství se využívá jeho schopnosti způsobovat krčkové nádory u dvouděložných rostlin. Po infekci poraněného místa bakterií *A. tumefaciens* dochází ke dvěma klíčovým událostem: (1) rostlinné buňky proliferují a vytvářejí nádor a (2) začínají syntetizovat derivát argininu nazývaný opin (nopalín nebo oktopin, v závislosti na kmenu *A. tumefaciens*). Tento opin je využíván bakterií jako zdroj energie. *A. tumefaciens* má schopnost přeměňovat metabolické zdroje hostitelské buňky k syntéze opinů, které nemají pro rostlinu žádný přínos.

Schopnost *A. tumefaciens* vyvolávat v rostlinách krčkové nádory je řízeny genetickou informací nalézající se na velkém plazmidu (až 200 000 bp), který se označuje Ti-plazmid (obr. 7). Pro transformaci rostlinných buněk jsou nezbytné dvě části Ti-plazmidu, které se označují jako T-DNA a oblast *vir*. Během transformace je T-DNA vyštěpena z plazmidu, přenesena do rostlinné buňky a integrována do DNA rostlinné buňky (obr. 8). K integraci T-DNA může docházet v různých místech chromozomů a také začlenění T-DNA může být vícenásobné v téže buňce (Snustad a kol., 2009).



Obr. 7: Schéma plasmidu *A. tumefaciens*. http://en.wikipedia.org/wiki/Ti_plasmid.



Obr. 8: Schéma transformace rostlin pomocí *A. tumefaciens*. <http://www.accessscience.com>.

Oblast *vir* Ti-plazmidu obsahuje geny nezbytné pro přenos T-DNA. Tyto geny kódují enzymy potřebné pro vyštěpení, přenos a začlenění úseku T-DNA během procesu transformace. Tyto geny jsou na velmi nízké úrovni exprimovány v buňkách *A. tumefaciens*, které žijí v půdě. Pokud se však bakterie vystaví poraněným buňkám rostliny nebo jejich sekretům, dojde ke zvýšení exprese genů *vir*.

Cizorodé geny lze včlenit do T-DNA a poté vnést do rostlin společně se zbytkem T-DNA. Problémem tohoto postupu je skutečnost, že takto transformované buňky ztrácejí schopnost normálního buněčného dělení a vytvářejí nádory. Vzhledem k této vlastnosti T-DNA se v mnoha případech Ti-plazmidy standardního typu nedají použít pro přenos genů. Tento problém byl vyřešen nalezením genů v T-DNA, které zodpovídají za vznik nádorů. Avšak delece genů, způsobujících nádor znesnadňuje identifikaci rostlin, které získaly tuto T-DNA. Je proto nezbytné, aby existoval způsob, jak identifikovat rostlinné buňky transformované tímto Ti-plazmidem - ideální je mít dobře zvolený markerový gen lokalizovaný v oblasti přenášené T-DNA.

Dobrým selekčním markerem je takový gen, který poskytuje rezistenci vůči určité látce, antibiotiku nebo jinému činidlu zastavujícímu růst normálních rostlinných buněk. Selekční látka by měla inhibovat růst netransformovaných buněk. Nejrozšířenějším selektivním činidlem je u rostlin antibiotikum kanamycin.

4.2 Transformace protoplastu

Metoda transformace protoplastu se řadí mezi přímé transformační metody. U obilovin se ovšem příliš nevyužívá z důvodu špatné regenerace rostlin a rovněž nízké exprese transgenu. Toto je způsobeno poškozením buněk protoplastu během transformace (chemické látky a využití elektrického pole).

4.3 Biolistická metoda

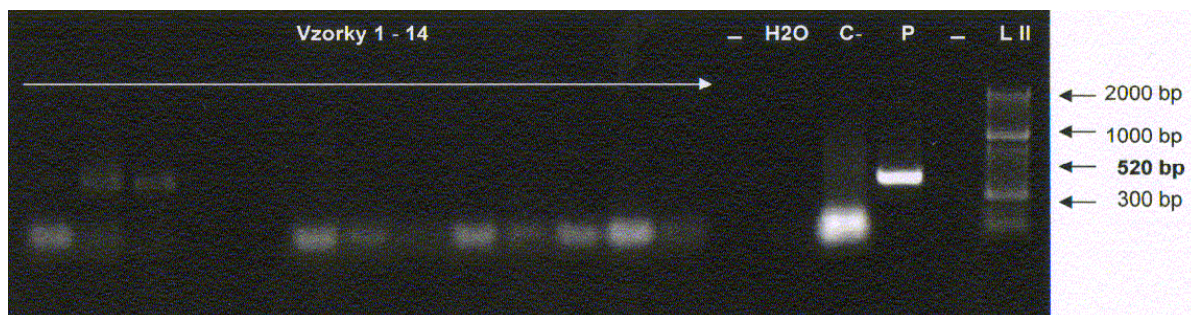
Biolistická metoda (particle bombardment) byla jednou z prvních metod navržených a aplikovaných speciálně pro transformaci ječmene, jedná se o mikroprojektilový přenos DNA. Zájmové geny jsou navázány na mikroskopické zlaté nebo wolframové částice o velikosti 1 – 2 μm a nastřeleny do jader buněk za pomoci biolistického děla, které využívá přetlaku helia. Další nezbytnou podmínkou je umístění rostlinného pletiva do vakua, kterého je dosaženo pomocí vývěvy (Harwood et al., 2009). Důvodem nízké produkce transgenních rostlin, transformovaných pomocí biolistické metody, je skutečnost, že pouze 5 % mikroprojektilů pronikne až do buněčného jádra. Většina buněk navíc není schopna takovou transformaci přežít (Ondřej et Drobník, 2002).

Původně se předpokládalo, že přirozené rostlinné bariéry nedovolí aplikaci *Agrobacteria* jako vektoru pro genetickou modifikaci jednoděložných rostlin (Cheng et al., 1997).

Byla provedena studie, která srovnávala účinnost těchto dvou transformačních metod. Výsledky této studie provedené na ječmeni potvrzují *Agrobacterium* jako vhodný vektor k transformaci, díky které bylo dosaženo 2% účinnosti, kdežto při využití particle bombardment pouze účinnosti 1 %. Rovněž stabilní exprese reportérového genu (genu pro luciferázu) byla 3krát větší než v porovnání s rostlinami transformovanými biolistickou metodou. Tento jev poukazuje na silencing genu. *Agrobacterium* integrovalo pouze jednu až tři kopie transgenu bez reorganizace genomu ječmene oproti tomu v genomu ječmene transformovaného particle bombardment metodou bylo nalezeno více než osm kopií transgenu, který způsoboval změnu organizace DNA. Tento transgen vykazoval nepředvídatelnou expresi a dědičnost v případě rostlin biolisticky transformovaných rostlin. Mendelistická dědičnost a stabilní míra exprese byla naopak dosažena u rostlin transformovaných *Agrobacteriem*. Transformace pomocí *Agrobacteria* poskytuje tedy větší úspěšnost transformace a lepší výsledky dědičnosti (Travella et al., 2004).

6.2 Detekce transgenních rostlin

Izolace nezralých zygotických embryí byla provedena dle postupu v metodice (str. 29). Indukované kalusy byly pasážovány ve čtrnáctidenních intervalech na čerstvá média (3krát kalus indukující, 1krát transientní a 1krát regenerační). Transformované indukované kalusy vykazovaly rozdílnou schopnost regenerace na selekčních médiích v závislosti na zvoleném antibiotiku a jeho koncentraci. Jako negativní kontrola bylo kultivováno 120 embryí, která nebyla transformována. U všech regenerovaných rostlin byla provedena PCR analýza pro detekci zájmového genu AtWBC19. Velikost amplifikovaného fragmentu byla 520 bp. Příklad PCR detekce genu AtWBC19 u regenerovaných rostlin na médiu s neomycinem 200 mg/l je uveden na obr. 17.



Obr. 17: Elektroforetogram PCR produktu genu AtWBC19 v rostlinách selektovaných na médiu s neomycinem 200 mg/l. Regenerované rostliny (vzorky 1 - 14); P – pozitivní kontrola, plazmid, pBRAC214::AtWBC19; C - negativní kontrola, H₂O a netransgenní rostlina; velikostní marker (BioLine L II). Přítomnost genu AtWBC19 byla prokázána u vzorků číslo 2 a 3.

5 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma ABC transportéty rostlin, příprava vektoru obsahující AtWBC19 gen a transformace jarního ječmene cv. Golden Promise. Tato odrůda byla vybrána na základě vysoké produkce transgenních rostlin. Hensel et al. (2009) ve své práci uvádí vysokou efektivitu transformace pomocí *A. tumefaciens*. Z regenerovaných rostlin této odrůdy bylo 86 % transgenních.

Ječmen byl transformován genem AtWBC19, identifikovaného v genomu *Arabidopsis thaliana*. AtWBC19 je jedním z rostlinných ABC proteinů nalézajících se v genomu rostlin. Tento přirozený gen poskytuje antibiotickou rezistenci vůči kanamycinu u rostliny *A. thaliana* a rostliny *Nicotiana bentamiana* (Mentewab et Stewart, 2005). Tento gen byl navržen jako selektivní marker pro transformaci rostlin místo nejčastěji používaného selekčního genu *nptII* (Bevan et al., 1983). Důvodem snahy o nahrazení bakteriálního genu *nptII* jsou obavy veřejnosti z horizontálního přenosu tohoto genu z jeho vlivu při zavedení GMO do běžné produkce

Burris et al. (2008) porovnával rezistenci bakterií transformovanými geny *nptII* a AtWBC19 vůči kanamycinu. Výsledky této studie jasně dokazují podstatně nižší míru rezistence bakterií v případě AtWBC19. Další výzkum týkající se antibiotické rezistence genu AtWBC19 byl proveden na rostlinách: *Cucumis melo* L. a hybridního topolu (*Populus canescens* x *Populus grandidentata*). Výsledkem studie funkčnosti tohoto genu u hybridního topolu, je průkaz rezistence vůči dalším aminoglykosidovým antibiotikům (geneticinu, neomycinu, paromomycinu). Míra antibiotické rezistence dosažené genem AtWBC19 je srovnatelná s mírou antibiotické rezistence dosažené inzercí genu *nptII* do stejného hybridu (Kang et al., 2010). Pro transformaci *Cucumis melo* L. byly vybrány tři odrůdy (Punjab Sunheri, Hara Madhu a Eden Gem). Laxman (2010) porovnával schopnost regenerace semen *C. melo* transformovaných genem AtWBC19 a netransformovaných semen stejných odrůd na médiích s obsahem kanamycinu. Laxmanova studie prokázala kanamycinovou rezistenci u testovaných semen *C. melo*. Na základě těchto výsledků jsme očekávali kanamycinovou rezistenci také u nezralých zygotických embryí jarního ječmene transformovanými genem AtWBC19. Ze selekčních analýz provedených na médiích s obsahem kanamycinu 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l a 200 mg/l ovšem vyplývá, že embrya jsou sice schopna produkce kalusů, ale nikoliv už regenerace rostlin. Rozdílná funkce genu inzerčního genu v genomu jarního ječmene byla také podpořena selekcí na hygromycinu. Transgenní rostliny selektované na

médiu obsahující hygromycin o koncentraci 50 mg/l jsou z 85 % transgenní (Hensel et al., 2009). Selektce transformovaného jarního ječmene na médiu s hygromycinem o koncentraci 50 mg/l neposkytla žádné rostliny. Možným důvodem rozdílných výsledků této bakalářské práce, v porovnání s výzkumem Kang et al., 2010, je použití rozdílného promotoru. Zatím co gen AtWBC19 použitý ve výzkumu Kang et al., (2010) byl pod CaMV35S promotorem, gen použitý v této práci pro transformaci jarního ječmene byl pod Ubi promotorem.

Nepřítomnost hygromycinové rezistence a tedy neschopnost produkce transgenních rostlin na hygromycinovém médiu poukazuje na interakci mezi selekčním genem *hpt*, který je v pBRACT214 a je pod kontrolou 35S promotoru a mezi zájmovým genem AtWBC19, který je řízený Ubi promotorem.

Navrhuji tedy použít jiný expresní vektor, který bude obsahovat pouze gen AtWBC19, který bude pod 35S promotorem.

6 Závěr

Ječmen, jako jedna z nejrozšířenějších a hospodářsky nejvýznamnějších obilovin, je cílem mnoha transformačních metod, jejichž snahou je zlepšit genom ječmene a získat tak lepší vlastnosti, větší výnosy, a odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům. Jednou z nejrozšířenějších transformačních metod používanou u ječmene je transformace pomocí *A. tumefaciens*. Druhou nepoužívanější metodou, je transformace pomocí mikroprojektilového přenosu DNA (biolistická metoda).

Experimentální část bakalářské práce se zabývala transformací nezralých zygotických embryí, která jsou nejčastěji používaným typem explantátů pro indukci kalusů a následnou regeneraci rostlin u ječmene, odrůdy ječmene Golden Promise genem AtWBC19. Zygotická embrya byla transformována plazmidem pBRACT214::AtWBC19, který byl vložen do *A. tumefaciens*. U transformovaných explantátů byla ověřována antibiotická rezistence na médiích obsahujících různá antibiotika o odlišných koncentracích. Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí PCR, která byla provedena na rostlinách regenerovaných ze štítků zygotických embryí.

7 Seznam použitých zkratek

2,4-D - 2,4-dichlorfenoxy kyselina

A. tumefaciens – *Agrobacterium tumefaciens*

ATP – adenosintriphosphate

AtWBC19 – *Arabidopsis thaliana* white-brown complex, gen kódující kanamycinovou rezistenci

BAP – 6-benzylaminopurin

CaMV 35S – promotor (cauliflower mosaic virus)

cat. no. – catalog number, katalogové číslo

CI – kalus indukční médium

cv. – kultivar, odrůda

DH5 α – kmen bakterie *E. coli*

E. coli – *Escherichia coli*

EU – European Union, Evropská unie

GMO – geneticky modifikovaný organismus

gus – gen kódující β -glukoronidázu

HindIII, *NcoI*, *SacI*, *KpnI* – restriční enzymy

hpt – gen kódující hygromycintransferázu

In vitro – u uzavřených podmínkách

Kb – kilobase, počet nukleotidových bází

LB – Luria Broth, typ média pro kultivaci *E. coli*

LBA4404 – kmen *A. tumefaciens* použitého k transformaci

Mg/l – počet miligramů v 1 litru

NBD – nucleic binding domain, doména vázající sekvence nukleotidů

nptII – gen kódující neomycintransferázu

OD – optical density, optická denzita

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

pKS – ABC – plazmid obsahující gen pro AtWBC19

pKS – *nptII* – plazmid obsahující gen pro *nptII*

Primer F – forward primer, předním primer

Primer R – reverse primer, obrácený primer

pSoup, pBRACT214, pGreen – názvy plazmidů

RepA – trans-acting replikázový gen

Rpm – round per minute, počet otáček za minutu

RT-PCR – real time polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce v reálném čase

T-DNA – transferred DNA, transferová DNA

TE pufr – Tris-EDTA pufr

Ti plazmid – tumor inducing plasmid, plazmid vyvolávající nádor

TMD – trans membrane domain, trans membránová doména

Ubi promotor – typ promotoru

USA – Spojené státy americké

8 Literatura

Bar-Nun, S., Shneyour, Y., Beckmann, J. S. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta* 1983, 741(1), 123-127.

Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M., K., Poolman, B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. 2006, 580 (4), 1023-1035.

Broeders, S., R., M., De Keersmaecker, S., S., J., Roosens, N., H., C. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 2012: 402418

Bryan, L. E. Antimicrobial Drug Resistance 1984, 241-277.

Burris, K., Mentewab, A., Ripp, S., Stewart, C. N. *Microbial Biotechnology.* 2008, 1 (2), 191-195.

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle. C., Chen, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008, 72, 317–364.

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

Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. Human and Drosophila ABC proteins. In: Holland, I. B., Cole, S. P. C., Kuchler, K., Higgins, C. F., editors. *ABC Proteins: from Bacteria to Man.* New York: Academic Press, 2003, 47–61.

Harwood, W. A., Bartlett, J. G., Alves, S. S., Perry, M., Smedley, M. A., Leyland, N., Snape, J. W. Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. V: Jones, H. D., Shewry, P. R., (ed.): *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*, vol. 478. Humana Press, 2009, ISBN 978-1-59745-379-0.

Hensel, G., Kastner, Ch., Oleszczuk, S., Riechen, J., Kumlehn, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, Triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics.* 2009

- Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 1992, 8, 67-113.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., Fraley, R. T. A simple and general-method for transferring genes into plants. *Science.* 1985, 227(4691), 1229–1231.
- Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W., Wan, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 1997, 115, 971–980.
- Kang, B. G., Ye X., Osburn, L. D., Stewart, C. N., Cheng, Z. M. Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP-binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics. *Plant Cell Rep.* 2010 (29)6. 643-650.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., Martinoia E. *Plant ABC Transporters. Arabidopsis Book* 2001, 9, e0153.
- Laxman, B. S., Raamanjini, G. P. H., Raghavendra, G. In vitro regeneration and transformation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) with alternative *AtWBC19* marker gene. *International Journal of Biotechnology and biochemistry.* 2010, 6 (1), 1-12.
- Mentewab, A., Stewart, C. N. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1177–1180.
- Ondřej, M., Drobník, J. *Transgenoze rostlin*, 316 s. Academia, Praha, 2002, ISBN 80-200-0958-2
- Rea, P. A. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006, 58, 347-375.
- Rea, P. A. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007, 58, 347–375.
- Rees, D. C., Johnson, E., Lewinson, O. ABC transporters: the power to change.
- Theodoulou, F. L. Plant ABC transporters *Biochim Biophys Acta.* 2000, 1, 1465(1-2), 79-103.
- Uzogara S., G. The impact of genetic modification of human foods in he 21st century: a review. *Biotechnol Adv.* 2000, 18(3), 179-206.

Veen van, H. W., Callaghan, R. In: ABC proteins: From Bacteria to Man. Holland, I.B., Cole, S. P. C., Kuchler, K., Higgins, C. F. editor. London: Academic Press; 2003. Substrate-binding sites in ABC transporters; pp. 81–105.

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. Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory. Trends Plant Sci. 2008, 13, 151–159.

Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Ismail, A. M., Xu, J., Cui, X., Close, T. J. Array-based genotyping and expression analysis of barley cv. Maythorpe and Golden Promise. BMC Genomics. 2007, 8, 87.

Internetové zdroje

http://en.wikipedia.org/wiki/Ti_plasmid

http://www.pgreen.ac.uk/a_pls_fr.htm

<https://www.lablife.org/>