

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Kateřina Burešová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Selekční geny u transgenního jarního ječmene

Bakalářská práce

Kateřina Burešová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. a za použití uvedené literatury v seznamu.

V Olomouci dne

Podpis:

SOUHRN

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na selekční geny a jejich zástupce. Zabývá se také ABC transportéry a *Arabidopsis thaliana* ABC transportéry, jejichž nejobsáhlejší skupinou je rodina AtWBC. Součástí AtWBC rodiny je gen *Atwbc19*, u kterého je prokázána rezistence k aminoglykosidovým antibiotikům. Popsána je transformace ječmene a její dvě nejvýznamnější metody, mikroprojektilový přenos DNA a transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.

Experimentální část se zabývá transformací nezralých zygotických embryí odrůdy ječmene jarního Golden Promise, pomocí dvou odlišných vektorů, pBract204::VMAtwbc19, obsahující gen *Atwbc19* a pBract204, jehož součástí byl bakteriální selekční gen *hpt*. Explantáty byly selektovány na médiích bez selekce a se selekcí, do kterých byla přidána antibiotika. Izolace rostlinné DNA byla provedena metodou CTAB. Pomocí PCR byly analyzovány transgenní rostliny.

SUMMARY

The theoretical part of this bachelor thesis is focused on selectable marker genes and their representatives. The next part describes ABC transporters and *Arabidopsis thaliana* ABC transporters with the most plentiful group - AtWBC family. One member of AtWBC family is *Atwbc19* gene which is proven to be resistant to the aminoglycoside antibiotic. The next chapter shows transformation of barley and its two most important methods, microprojectile bombardment of DNA and plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*.

The experimental part is focused on transformation of mature zygotic embryos of spring barley variety Golden Promise using two different vectors, pBract204::VMAtwbc19, containing *Atwbc19* gene and pBract204 which includes selectable marker gene *hpt*. Explants were selected on media without selection or on media with selection and added antibiotics. The isolation of plant DNA was made by CTAB method. Transgenic plants were analysed by PCR.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení a rady, které mi při vypracování této práce poskytla. Děkuji také Mgr. Tomáši Vlčkovi za metodickou pomoc v experimentální části práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Selekční geny	9
2.1.1	Neomycin fosfotransferáza II (<i>nptII</i>).....	10
2.1.2	Hygromycin fosfotransferáza (<i>hpt</i>)	11
2.1.3	Fosfinotricin acetyltransferáza (gen <i>pat</i> a <i>bar</i>).....	11
2.1.4	Fosfomanóza izomeráza	11
2.1.5	Streptomycin a spektinomycin rezistence	12
2.2	ABC transportéry	12
2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> white-brown complex 19 (<i>Atwbc19</i>).....	13
2.4	Transformace ječmene	15
2.4.1	Vektory	15
2.4.2	Promotory	15
2.4.3	Reportérové geny.....	16
2.5	Metody transformace ječmene.....	17
2.5.1	Mikroprojektilový přenos DNA	17
2.5.2	Transformace rostlin pomocí <i>A. tumefaciens</i>	18
2.6	Složky kultivačního média.....	20
3	CÍLE PRÁCE	21
4	MATERIÁL A METODIKA	22
4.1	Rostlinný materiál.....	22
4.2	Sterilizace embryí	23
4.3	Příprava inokula <i>A. tumefaciens</i>	23
4.4	Inokulace nezralých embryí.....	23
4.5	Vektory použité pro transformaci	23
4.6	Příprava médií.....	25
4.6.1	Složení kultivačních médií	26
4.7	Selekce transformovaných rostlin.....	27
4.8	Izolace celkové rostlinné DNA metodou CTAB	28
4.9	Detekce transgenů pomocí PCR	29
4.10	Detekce <i>gus</i> genu pomocí histochemické reakce.....	31

4.11	Schéma transformace jarního ječmene	32
4.12	Použité chemikálie a roztoky	33
4.12.1	Roztoky použité pro izolaci celkové rostlinné DNA metodou CTAB	34
4.13	Použité laboratorní přístroje.....	35
5	VÝSLEDKY	36
5.1	Indukce kalusů a regenerace rostlin u jarního ječmene odrůdy Golden Promise, kontrolní varianta	36
5.2	Efektivita selekce kalusů a regenerace rostlin transformovaných vektorem označeným 101 - pBract204::VMAtwbc19	37
5.3	Efektivita selekce kalusů a regenerace rostlin transformovaných vektorem označeným 111 - pBract204	37
5.4	Vyhodnocení účinnosti selekce genu <i>Atwbc19</i>	39
6	DISKUZE.....	43
7	ZÁVĚR.....	45
8	LITERATURA.....	46
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	50

1 ÚVOD

Selekční geny jsou důležité pro selekci transformovaných buněk. Výhodou selekce je růst pouze transformovaných buněk, zatímco netransformované buňky nepřežívají. Selekcími geny mohou být antibiotika, meziprodukty metabolismu nebo toxické analogy. Mezi nejčastěji používaná antibiotika, která zajišťují rezistenci, patří aminoglykosidová antibiotika jako je kanamycin, neomycin, gentamicin nebo hygromycin B. Meziproduktem metabolismu může být betain aldehyd a jako toxický analog lze použít S-aminoethyl-L-cystein. Selekcími markery však nemusí být pouze toxické. Jako netoxické látky jsou využívány D-xylóza, D-manóza a benzyladenin-N-3-glukuronid.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Selekční geny

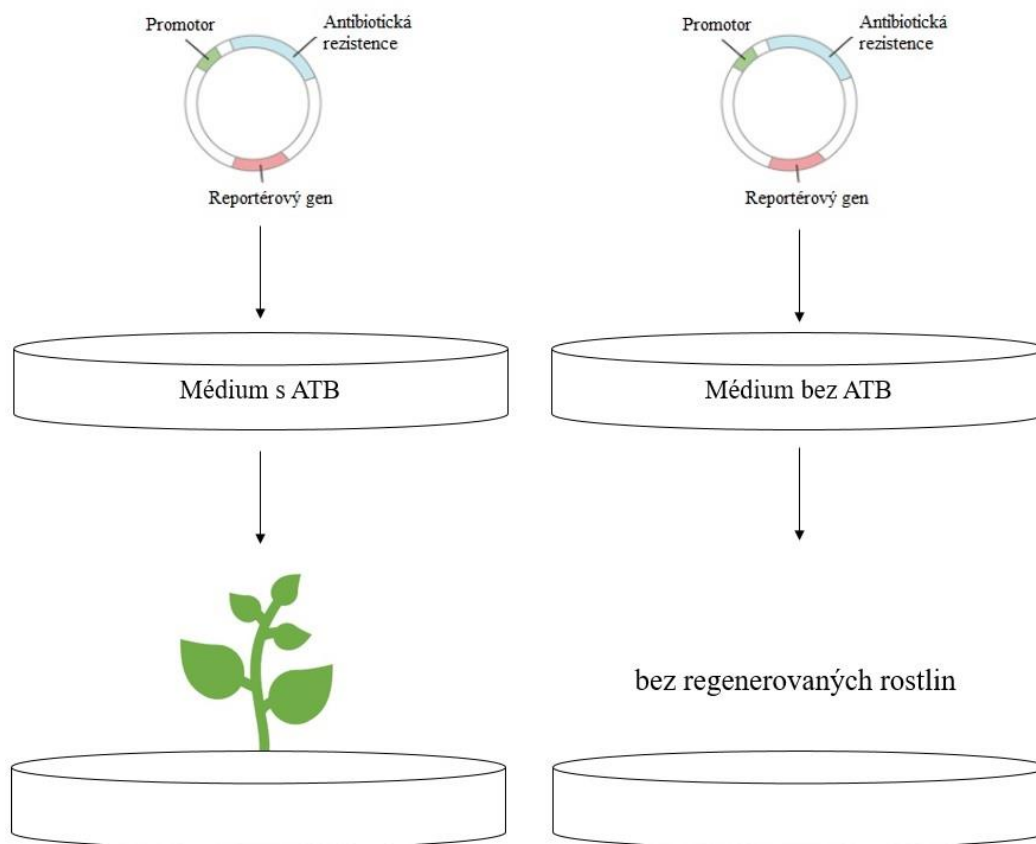
Selekční geny jsou klíčové pro úspěšnost transformace. Upřednostňují transgenní buňky, které exprimují vnesený gen rezistence (Miki a McHugh, 2004). Transformované buňky, které obsahují selekční geny, přežijí přítomnost antibiotika v selekčním médiu. Zatímco pro netransformované buňky je antibiotikum v selekčním médiu toxické (Twyman a kol., 2002).

Jako první byly objeveny selekční markery, které byly podmíněny použitím toxických látek, jako jsou např. antibiotika nebo herbicidy. Současně se však využívá netoxických prostředků jako je D-xylóza nebo D-manóza, které mohou být substráty pro růst nebo mohou vyvolat růst a diferenciaci transformovaných pletiv.

Novější strategie zahrnuje selekční geny, které nejsou podmíněné externími substráty. Mění jejich fyziologické procesy, které řídí rostlinný vývoj. Příkladem je gen *ipt*, který zvyšuje hladinu cytokininů v rostlině. Dalšími geny jsou *pga 22*, *ESR1* a *CKI* původem z *Arabidopsis thaliana* a gen *rol* původem z *Agrobacterium rhizogenes*.

Teprve na počátku je vývoj možností, jakým způsobem eliminovat selekční markery k vytvoření transgenních rostlin bez použití selekčních markerů. Jednodušší možnost spočívá v kotransformaci zájmového genu se selekčním markerem. Složitější možnost je použití místně-specifických rekombináz jako je Cre rekombináza z bakteriofága P1 nebo FLP rekombináza ze *Saccharomyces cerevisiae* (Miki a McHugh, 2004).

Nejpoužívanějšími selekčními geny pro transformaci ječmene jsou neomycin fosfotransferáza II, hygromycin fosfotransferáza, fosfínotricin acetyltransferáza, fosfomanóza izomeráza, streptomycin fosfotransferáza a adenyltransferáza.



Obrázek 1: Funkce selekčního genu

2.1.1 Neomycin fosfotranferáza II (*nptII*)

Neomycin fosfotranferáza II je selekční gen izolovaný z transpozonu Tn5 *Escherichie coli*. Je nejvíce používaným selekčním genem rostlin. Selekční gen uděluje transgenním rostlinám rezistenci vůči antibiotikům geneticin, kanamycin, neomycin a paromomycin.

Neomycin - aminoglykosidové antibiotikum, které je toxické jak pro rostlinné, tak pro živočišné buňky, je produkován bakterií *Streptomyces fradiae*. Vazbou na ribozomální podjednotku inhibuje syntézu proteinů (Miki a McHugh, 2004).

2.1.2 Hygromycin fosfotransferáza (*hpt*)

Hygromycin fosfotransferáza je selekční gen vykazující rezistenci vůči hygromycinu B. Hygromycin B je antibiotikum, které inhibuje proteosyntézu jak u prokaryot, tak u eukaryot. Pro rostliny je toto antibiotikum velmi toxické. Gen *E. coli* - *hpt* (*aphIV*, *hph*) odpovídá mimo jiné také za rezistenci vůči bakteriím, houbám, živočišným a rostlinným buňkám. Tato rezistence je dána detoxifikací hygromycinu B pomocí ATP-dependentní fosforylaci na sedmé hydroxylové skupině. Hygromycin fosfotransferáza je po neomycin fosfotransferáze II (*nptII*) druhým nejpoužívanějším selekčním markerem v rostlinných biotechnologiích (Miki a McHugh, 2004).

Matthews a kol. (2001) použili hygromycin fosfotransferázu jako selekční gen pro vytvoření transgenních rostlin ječmene. Úspěšnost transformace byla 2-12 %. Jejich hlavním záměrem, ale byla eliminace selekčního genu. Oddělili selekční gen od genu zájmového a poté následovala kotransformace s využitím plazmidu nesoucího dvě T-DNA.

Pro velmi vysokou úspěšnost transformace - až 86 %, použil Hensel a kol. (2009) jako selekční gen hygromycin fosfotransferázu. Nezralá embrya ječmene (odrůda Golden Promise) transformoval pomocí *A. tumefaciens*.

2.1.3 Fosfinotricin acetyltransferáza (gen *pat* a *bar*)

Gen *bar* byl izolován z bakterie *Streptomyces hygroscopicus* a gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes*. Společně tyto dva geny kódují enzym fosfinotricin acetyltransferázu, která je využívána jako selekční marker (Sundar a Sakthivel, 2008).

Selekční gen *bar* je dalším z využívaných markerů pro transgenní rostliny ječmene (Trifonova a kol., 2001; Travella a kol., 2005; Patel a kol., 2000).

2.1.4 Fosfomanóza izomeráza

Enzym fosfomanóza izomeráza je kódován genem *manA*, izolovaným z *E. coli*. Selekcce je založena na zastavení růstu a vývoji netransformovaných buněk, jelikož mají nedostatek sacharidů (Sundar a Sakthivel, 2008).

2.1.5 Streptomycin a spektinomycin rezistence

Rezistence tohoto typu není založena na likvidaci netransformovaných buněk, ale na barevné změně. Transformované buňky mají barvu zelenou, zatímco buňky netransformované jsou bezbarvé. Streptomycin fosfotransferáza, původem z transpozonu Tn5 bakterie *E. coli*, poskytuje resistenci ke streptomycinu. Adenylyltransferáza uděluje resistenci jak antibiotiku streptomycin, tak spektinomycinu (Ziemienowicz, 2001).

2.2 ABC transportéry

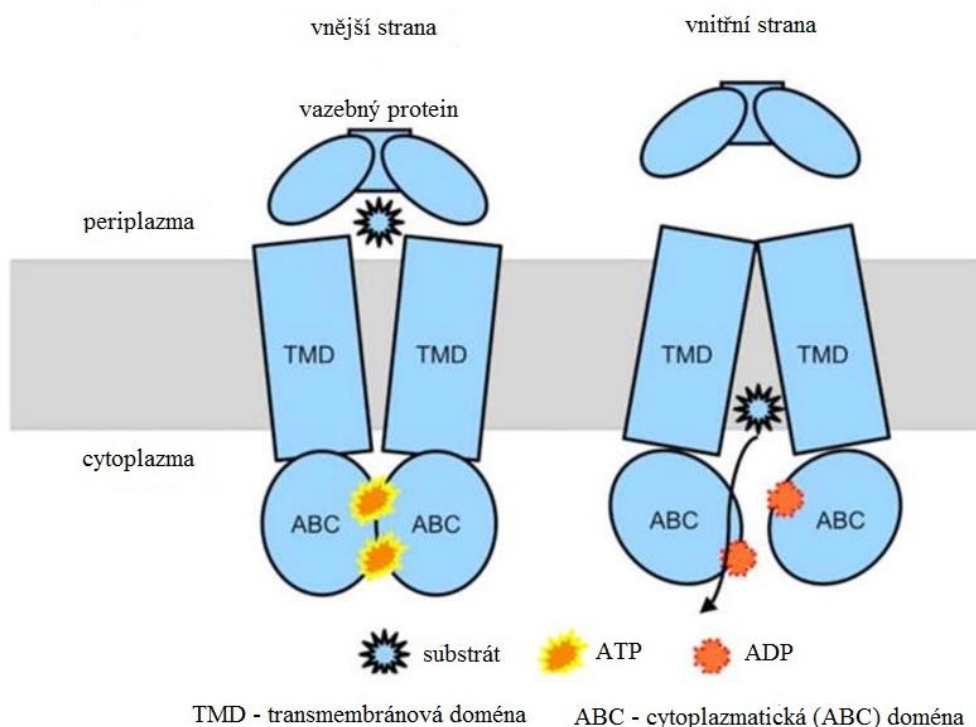
ABC transportéry jsou membránové proteiny, které přemísťují látky přes dvouvrstevnou lipidovou membránu (Zolnerciks a kol., 2011) Tvoří jednu z největších proteinových rodin v žijících organismech (Kang a kol., 2011). Nejvíce ABC transportérů je lokalizováno na plazmatické membráně a tonoplastu, nachází se však také v mitochondriích, plastidových a peroxizomálních membránách (Kretzschmar a kol., 2011).

ABC transportéry se podílejí na fyziologických procesech jako je adaptace rostliny na měnící se životní prostředí a vyrovnávání se s biotickým a abiotickým stresem. Mají důležitou roli v detoxifikačních mechanismech (Kretzschmar a kol., 2011). Fungují jako importéry - přinášejí živiny a další molekuly do buňky nebo také jako exportéry, které pumpují toxiny a lipidy ven z buňky (Rees a kol., 2009). Uplatňují se také např. při růstu orgánů, rostlinné výživě a rostlinném vývoji (Kang a kol., 2011).

Existují 3 typy ABC transportérů: ABC importéry typu I, ABC importéry typu II a ABC exportéry. Všechny 3 typy se vyskytují u prokaryot, ale pouze ABC exportéry jsou přítomny u eukaryot (Zolnerciks a kol., 2011).

Typické ABC transportéry se skládají ze 4 domén - 2 cytoplazmatické (NBDs nebo někdy označované jako ABCs) a 2 transmembránové (TMDs) domény. Odlišují se primární sekvencí, zatímco u NBDs je primární sekvence ustálená, u TMDs je jak primární sekvence, tak skládání proteinů mírně různorodé. Cytoplazmatické domény vážou hydrolyzovanou molekulu ATP, která funguje jako energie pro transportní řetězec. Transmembránové domény tvoří translokační dráhy skrz membránu a většinou určují látkovou specifitu (Zolnerciks a kol., 2011).

Vyšší rostliny obsahují více než 100 ABC transportérů, které se fylogeneticky dělí do 8 skupin: ABCA-ABCI, kromě ABCH (Kretzschmar a kol., 2011). ABCA, ABCB, ABCC a ABCD zahrnují TMD-NBD domény. ABCG a ABCH mají opačnou orientaci NBD-TMD domén. ABCE a ABCF mají pouze dvě cytoplazmatické domény (Andolfo a kol., 2015).



Obrázek 2: Struktura ABC transportéru, skládajícího se ze 2 transmembránových domén a 2 cytoplazmatických domén (převzato z Rees a kol., 2009)

2.3 *Arabidopsis thaliana* white-brown complex 19 (*Atwbc19*)

Největší rodinou ze všech *A. thaliana* ABC transportérů je AtWBC, která zahrnuje 29 členů. Funkce transportérů není však dosud objasněna. Jedním z nejvíce studovaných genů AtWBC rodiny je *Atwbc19*, který vykazuje rezistenci k aminoglykosidovým antibiotikům u transgenních rostlin (Mentewab a Stewart, 2005).

Rezistence k aminoglykosidovým antibiotikům byla zkoumána u tabáku, melounu a hybridního topolu.

Gen *Atwbc19* použili Mentewab a Stewart (2005) při transformaci listových disků tabáku (*Nicotiana tabacum* L. odrůdy Xanthi). Srovnávali transformační efektivitu tří různých vektorů: pNPT s neomycin fosfotransferázou II (*nptII*), pABC s genem *Atwbc19* a společně pNPT s neomycin fosfotransferázou II a pABC s genem *Atwbc19*. Pro selekci bylo použito různých koncentrací antibiotika kanamycinu - 50, 100 a 200 mg/l. Selekcce na 50 mg/l byla nedostatečná u všech tří kombinací. Samostatný gen *Atwbc19* při koncentraci kanamycinu 100 mg/l vykazoval srovnatelnou úspěšnost selekce jako vektor s *nptII* při koncentraci 200 mg/l. Při použití vektoru obsahujícího oba geny, byla transformační efektivita nejvyšší při koncentraci kanamycinu 200 mg/l.

Bombale a kol. (2010) využili genu *Atwbc19* při transformaci melounu (*Cucumis melo* L.). Byla použita zygotická embrya tří odrůd melounu - Eden Gem, Punjab Sunheri a Hara Madhu. Pro transformaci použili *A. tumefaciens* (kmen LBA4404). Plazmid pABC obsahoval gen *Atwbc19*, pod kontrolou CaMV 35S promotoru. Kultivace embryí probíhala na médiích, která obsahovala koncentrace kanamycinu 80, 100, 150 a 200 mg/l. Regenerované rostliny byly totožné na médiích o koncentraci kanamycinu 100, 150 a 200 mg/l. U odrůdy Punjab Sunheri byla regenerace rostlin inhibována při koncentraci kanamycinu 80 mg/l. U ostatní odrůd melounu byla regenerace inhibována při koncentraci kanamycinu 100 mg/l. Pomocí PCR byla ověřena přítomnost genu *Atwbc19*. Z 20 rostlin obsahovalo 5 rostlin amplifikovaný produkt velikosti 2,18 kb, odpovídající genu *Atwbc19*. Výsledek této transformace se shoduje s výsledky v již publikované práci Mentewab a Stewart (2005).

Jako selekčního genu využil Kang a kol. (2010) *Atwbc19* při transformaci hybridního topolu (*Populus canescens* × *P. grandidentata*). Zabývali se srovnáním genu *Atwbc19* a *nptII*. Použili dva vektory - pABC s genem *Atwbc19* a pNPT s *nptII*, oba pod promotorem CaMV 35S. Pomocí elektroporace byly vektory přeneseny do *A. tumefaciens* (kmen GV3850). Do médií byly přidány různé koncentrace čtyř antibiotik pro srovnání účinku selekce: kanamycin o koncentracích 50, 100, 150, a 200 mg/l; neomycin - 50, 100, 200 a 400 mg/l; geneticin - 1.25, 2.5, 5 a 10 mg/l; paromomycin - 50, 100, 200 a 400 mg/l. Zjistili, že schopnost regenerace rostlin je u genu *Atwbc19* a *nptII* srovnatelná. Zatímco u tabáku vykazuje gen *Atwbc19* rezistenci pouze ke kanamycinu, u hybridního topolu vykazuje rezistenci jak ke kanamycinu, tak i k dalším třem antibiotikům - neomycin, geneticin a paromomycin.

Mentewab a Stewart (2005) studovali overexpresi genu *Atwbc19*, která u transgenních rostlin vede k rezistenci vůči antibiotiku kanamycin. Kanamycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované z půdní bakterie *Streptomyces kanamyceticus*. Pravděpodobně je kanamycin ukládán do vakuoly jako substrát ABC transportéru a nemůže zasahovat do rRNA v cytoplasmě, mitochondriích a chloroplastech. Je to vůbec první rostlinný gen, který rezistenci vykazuje. Většina selekčních markerů je totiž bakteriálního původu. Tento gen tedy může být určitou alternativou selekčních genů bakteriálního původu, které mají nepředvídatelné důsledky na lidské zdraví a životní prostředí z důvodu horizontálního přenosu genetické informace.

2.4 Transformace ječmene

2.4.1 Vektory

Pro proces transformace je důležitá dobře zvolená klonovací strategie včetně použitých vektorů. Pro transformaci ječmene byly vyvinuté expresní vektory pBract nebo jsou také velmi používané vektory pIPK.

Podle účelu transformace si lze zvolit promotory, selekční i reportérové geny, které jsou součástí nabízených vektorů.

2.4.2 Promotory

Pojem promotor označuje nukleotidovou sekvenci, kterou rozpoznává RNA polymeráza a po rozpoznání je zahájena iniciace transkripce. Důležitou součástí správného nasednutí RNA polymerázy na templátový řetězec jsou transkripční faktory. U eukaryot existují 3 RNA polymerázy: RNA polymeráza I transkribuje rRNA, RNA polymeráza II transkribuje mRNA a RNA polymeráza III transkribuje tRNA (Lewin, 2008).

Promotor může být konstitutivní nebo inducibilní. U konstitutivního promotoru jsou v buňce geny integrované, zatímco inducibilní promotor funguje tak, že je nutné dané geny aktivovat (Clark a Pazdernik, 2012). Příkladem konstitutivního promotoru je CaMV (virus kvěťákové mozaiky) 35S promotor, často využívaný pro expresi transgenů v rostlinách. Mezi konstitutivní promotory patří také ubiquitinový (ubi) promotor původem ze *Zea mays*, který je indukovaný teplotním šokem. Mezi inducibilní promotory patří glycerinaldehyd

3-fosfát dehydrogenáza (*GADPH*) původem z *A. thaliana* a ribulóza 1,5-bisfosfát karboxyláza (*RBCS*) původem z *Phaseolus vulgaris*. Tyto indukibilní promotory jsou indukovány světlem (Müller a Wassenegger, 2004).

2.4.3 Reportérové geny

Genovou expresi lze sledovat pomocí reportérových genů. Reportérové geny jako jsou např. enzymy β -galaktosidáza, β -glukuronidáza, luciferáza nebo *gfp*, jsou také důležitými nástroji biotechnologických metod.

Jedním z nejpoužívanějších reportérových genů je gen *gus*. Tento gen byl objeven R. A. Jeffersonem roku 1986. β -glukuronidáza je enzym izolovaný z *E. coli*. Tento enzym je kódován genem *uidA*, u rostlin se tento gen nazývá *gus* (Ondřej a Drobník, 2002).

Analýza *gus* genu se provádí pomocí spektrofotometrické, fluorometrické nebo histochemické metody (Jefferson, Burgess a Hirsh, 1986).

Nejvyužívanějším substrátem pro histochemickou analýzu je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid (X-Gluc). Barevný a rozpustný produkt 5-bromo-4-chloroindol je výsledkem štěpení substrátu pomocí genu *uidA*. Po oxidaci je následně vytvořeno nerozpustné indigo, které má tmavě modrou barvu. Histochemická metoda má velkou výhodou v tom, že zbarvení indigem je možné pozorovat pouhým okem, popřípadě pomocí mikroskopu (Vain a Thole, 2009).

Často využívaným reportérovým genem je i fluorescenční gen *gfp*. GFP je protein izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*. První zmínka o GFP pochází z roku 1955, kdy buňky medúzy při ozáření fluoreskovaly zeleně. Bioluminiscenci způsobuje protein aequorin, který je aktivní v přítomnosti vápníkových iontů, kdy emituje modré světlo. Zelená barva je výsledkem toho, že absorbovaná energie je reemitována jako zelené světlo (Chalfie a Kain, 2005). V roce 2008 za objev a výzkum GFP získali Osamu Shimomura, Martin Chalfie a Roger Y. Tsien Nobelovu cenu za chemii (Miyawaki, 2008).

2.5 Metody transformace ječmene

Mezi nejčastěji používané metody transformace patří mikroprojektilový přenos DNA (particle bombardment) a transformace pomocí *A. tumefaciens*. První transformace mikroprojektilovým přenosem byla provedena u jarního ječmene v roce 1994 (Ritala a kol.). Tingay a kol. provedli první transformaci pomocí *A. tumefaciens* u jarního ječmene v roce 1997.

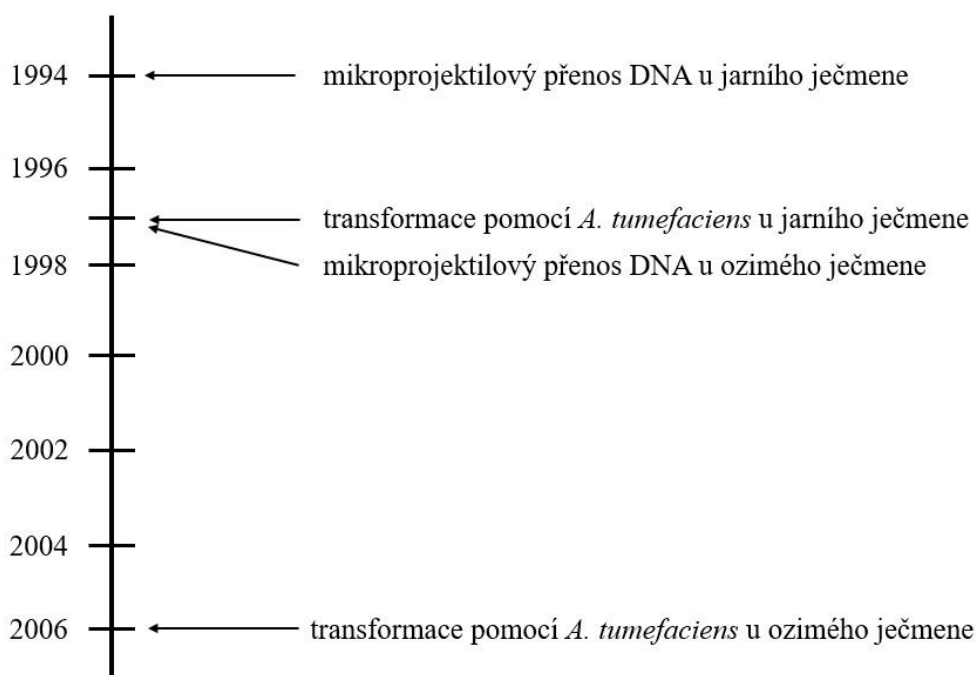


Schéma č. 1: Aplikace transformačních metod u ječmene (převzato z Jones a kol., 2008)

2.5.1 Mikroprojektilový přenos DNA

Mikroprojektilový přenos DNA je univerzální metoda pro transformaci rostlinného materiálu. Na rozdíl od transformace pomocí *A. tumefaciens* lze úspěšně transformovat jak jednoděložné, tak dvouděložné rostliny (Altpeter a kol., 2005). Bruce a kol. roku 1989 transformovali jako první pomocí této metody rýži. Jarní ječmen byl mikroprojektilovým přenosem DNA transformován roku 1994 (Jones a kol., 2009).

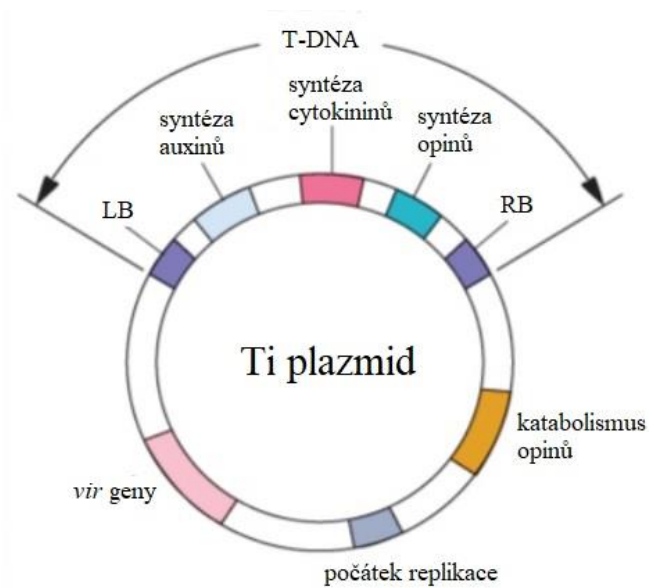
Plazmidová DNA je s wolframovými nebo zlatými částicemi, jejichž velikost je 0,5-2 μm , vstřelena do rostlinného pletiva za přetlaku helia. Rostlinné pletivo je po celou dobu umístěno ve vakuu (Li a Gray, 2005).

2.5.2 Transformace rostlin pomocí *A. tumefaciens*

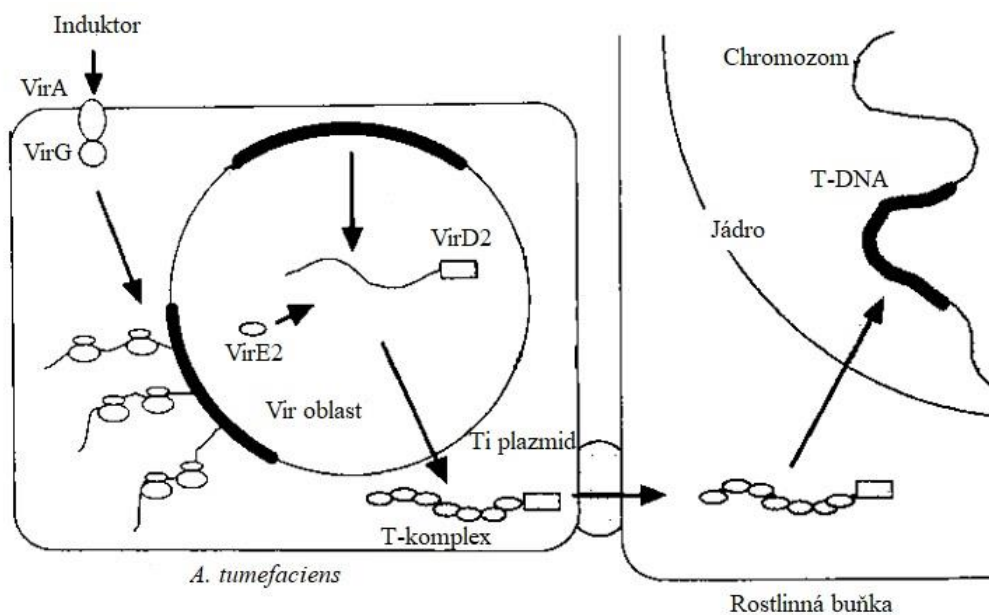
A. tumefaciens je gramnegativní, půdní bakterie způsobující nádory převážně dvouděložných rostlin. Tumorigeneze je způsobena přenosem T-DNA do jádra infikované rostlinné buňky. T-DNA je integrována do genomu a exprimována (Watson a kol., 2016).

První transformované rostliny pomocí *A. tumefaciens* byly zaznamenány v 80. letech 19. století.

Za přenos T-DNA jsou zodpovědné geny, které jsou shromážděné ve virulentním místě mimo Ti plazmid (Komari a kol., 2004). Vir-místo je velké asi 40 kb a kóduje proteiny potřebné pro přenos nebo poskytuje vedlejší funkce nezbytné pro interakci s rostlinou. Operony *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* a *virG* kódují proteiny, které jsou důležité pro transfer T-DNA. Exprese těchto genů je regulována a jsou exprimovány v případě, kdy bakterie infikuje rostlinu. VirA a virG tvoří regulační systém. Chemoreceptor virA jako první rozpoznává *vir*-vyvolávající signály a poté je aktivován virG pomocí fosforylace. VirG funguje jako transkripční faktor, který zvyšuje expresi všech *vir*-genů (Hooykaas, 2004). Vytvoří se jednovláknový T-komplex. VirD2 se připojí na 5' konec T-DNA a bakteriální helikáza rozvolní T-DNA z plazmidu. T-DNA je obalena proteinem virE2 a pomocí konjugace se dostane do jádra rostlinné buňky. Jednovláknová T-DNA je převedena na dvouvláknovou pomocí DNA ligázy, polymerázy a chromatin remodelujících proteinů (Clark a Pazdernik, 2012).



Obrázek 3: Ti plazmid (převzato z Glick a kol., 2010)



Obrázek 4: Přesun T-DNA z *A. tumefaciens* do jádra rostlinné buňky (převzato z Komari a kol., 2004)

2.6 Složky kultivačního média

Důležitou součástí explantátů po transformaci jsou složky kultivačních médií. Kultivační média se skládají z makroelementů, mikroelementů, sacharidů a vitamínů. Součástí kultivačních médií jsou i růstové hormony.

Jako první rostlinné hormony byly objeveny auxiny. Název auxin (z řeckého slova *auxein* - růst, zvětšovat se) odpovídá hlavní funkci tohoto hormonu - prodlužování buněk. Dalšími funkcemi tohoto hormonu jsou: růst adventivních kořenů, stimulace diferenciací dělivých pletiv, regulace buněčného cyklu nebo růst plodů (Campbell a kol., 2015).

Součástí kultivačních médií pro indukci kalusu u ječmene je nejčastěji používána 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina a Dicamba. Nejnižší koncentraci kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové použil Shrawat a kol. (2006). Koncentrace byla 2 mg/l. Koncentraci 2,5 mg/l použili ve svých pracích Bartlett a kol. (2008), Hensel a kol. (2009), Harwood a kol. (2009). Nejnižší koncentraci Dicamby použil Shrawat a kol. (2006). Koncentrace byla 0,5 mg/l. Vyšší koncentraci 2,5 mg/l použili Trifonova a kol. (2001), Bartlett a kol. (2008), Hensel a kol. (2009), Harwood a kol. (2009).

Další skupinou růstových hormonů jsou cytokininy. Cytokininy jsou deriváty adeninu, které stimulují buněčné dělení. První cytokinin - kinetin byl objeven F. K. Skoogem a C. Millerem roku 1955. Cytokininy mají vliv na regeneraci částí pletiv, tvorbu chlorofylu a škrobu, klíčení semen anebo také na stárnutí. Biosyntéza cytokininů probíhá v kořenech, ze kterých jsou pomocí xylému transportovány do nadzemních částí rostliny (Campbell a kol., 2015). Používaným cytokininem pro indukci kalusu u ječmene je 6-benzylaminopurin.

Tab. I: Použité koncentrace 6-benzylaminopurinu pro transformaci ječmene

BAP	
Autor	koncentrace [mg/l]
Shrawat a kol., 2006	2
Travella a kol., 2003	0,1
Hensel a kol., 2009	0,225
Harwood a kol., 2009	0,1

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
- 2) Provést transformaci ječmene dvěma vektory s odlišnými selekčními geny.
- 3) U regenerovaných rostlin pomocí PCR analyzovat přítomnost transgenu, vyhodnotit efektivitu transformace na různých antibioticích a na médiích bez selekce.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

Rostlinným materiálem použitým v této bakalářské práci byl jarní ječmen (*Hordeum vulgare* L.), odrůda Golden Promise.

Golden Promise je odrůda jarního dvouřadého ječmene, která byla vyšlechtěna v roce 1965 v Anglii. Je využívána jako modelová rostlina pro transformaci, díky své vysoké regenerační schopnosti v *in vitro* podmínkách.

Rostliny jarního ječmene, z kterých byly odebírány explantáty pro transformaci, byly pěstovány ve směsi zeminy a zahradního substrátu ve fytotronu, ve dne při teplotě 15 °C a v noci při 12 °C. Světelná perioda byla 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Jako zdroj světla byly použity halogenové výbojky s wolframovými žárovkami. Ve fázi dozrávání, při velikosti zygotických embryí 1,5-2 mm byly klasy odstříženy a přeneseny do laboratoře.



Obrázek 5: Rostliny jarního ječmene použité pro odběr klasů (Foto autor)

4.2 Sterilizace embryí

Obilky byly vyjmuty z klasu a zbaveny osin. Následně byly obilky sterilizovány v 70% ethanolu po dobu pěti minut, opláchnuty ve sterilní vodě, promyty 6 % hypochloridem sodným po dobu šesti minut a čtyřikrát propláchnuty sterilní vodou.

Zygotická embrya byla extirpována pod binokulární lupou ve flow boxu. Pomocí skalpelu a pinzety bylo odstraněno koleoptile a koleorhiza. Explantát byl umístěn štítkem nahoru na kalus indukční médium, připraveného v Petriho miskách.

4.3 Příprava inokula *A. tumefaciens*

Bakteriální inokulum pro transformaci pletiva ječmene bylo připraveno z pěti ml sterilního MG/L média a 20 µl glycerinového zásobního roztoku označeného AGL 101/1, který je uložen v mrazicím boxu v -80 °C. Po 12 hodinách byla změřena optická denzita (OD) při 600 nm (OD 0,6 - 0,8). Inokulum bylo umístěno na třepačku a kultivováno při teplotě 28 °C, při otáčkách 200 rpm.

4.4 Inokulace nezralých embryí

Na pletivo štítku bylo kápnuto inokulum o OD 0,8. Po pěti minutách byl explantát přenesen na nové kalus indukční médium a umístěn na médium štítkem dolů. Petriho misky byly uzavřeny páskou M3 a inkubovány ve tmě při 24 °C po dobu tří dní.

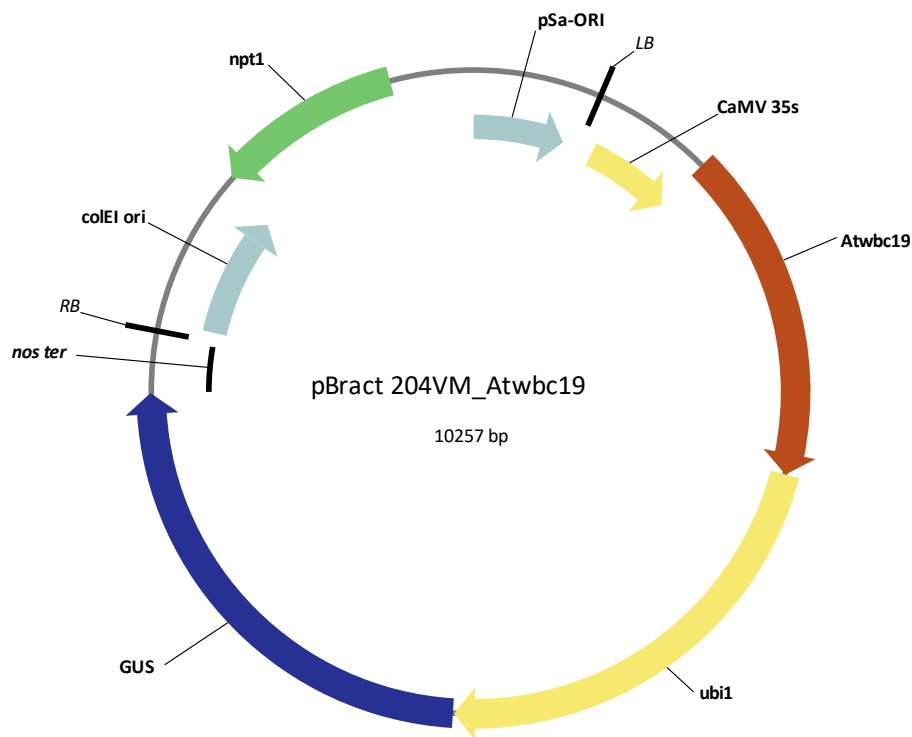
4.5 Vektory použité pro transformaci

Pro transformaci jarního ječmene byly použity dva vektory:

a) pBract204::VMABC19opt

Velikost vektoru byla 10 257 bp. PSa-ORI označuje replikační počátek *A. tumefaciens*. Součástí tohoto vektoru je gen transportéru *Atwbc19*, který vykazuje rezistenci k aminoglykosidovým antibiotikům a je pod CaMV 35S promotorem. Reportérový gen *gus* je pod konstitutivním ubiquitinovým promotorem (*ubi1*), zakončený terminační

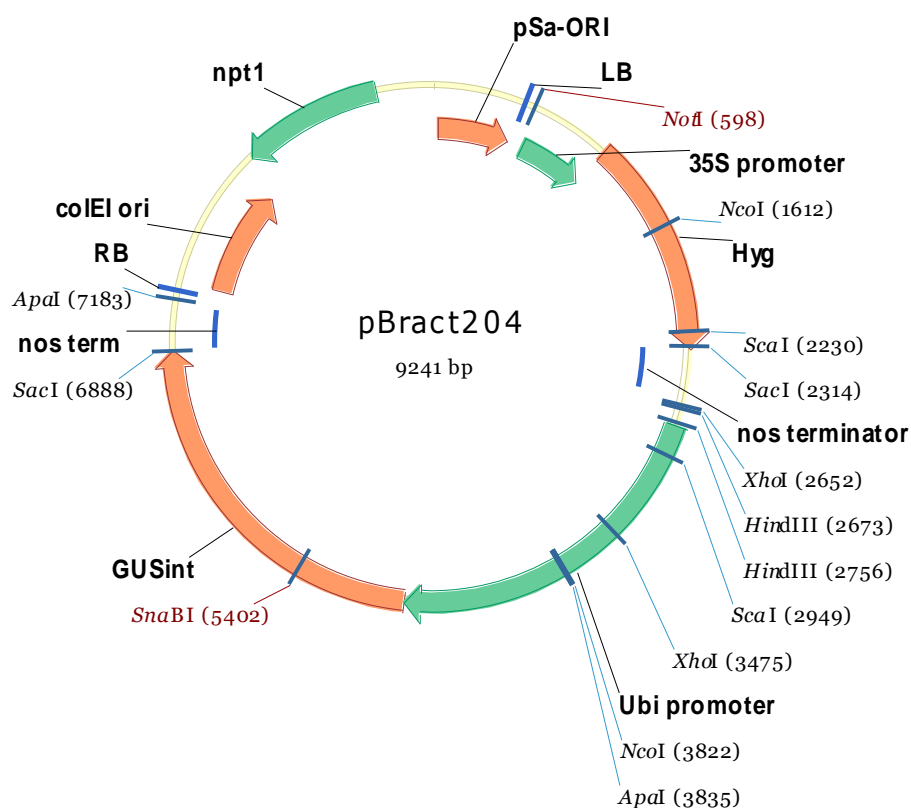
sekvencí nos ter. CoIEI ori označuje replikační počátek v bakterii *E. coli*. Vektor obsahuje selekční gen *nptII* pro neomycin fosfotransferázu II.



Obrázek 6: Vektor pBract204::VMAtwwbc19

b) pBract204

Velikost vektoru pBract204 byla 9 241 bp. CoIEI ori označuje replikační počátek v bakterii *E. coli*, *nptI* - gen pro syntézu neomycin fosfotransferázy II, pSa-ORI označuje replikační počátek *A. tumefaciens*. Jeho součástí je selekční gen *hpt* zajišťující rezistenci transgenních buněk vůči hygromycinu B. Gen *hpt* je řízen CaMV 35S promotorem. Reportérový gen *gus* (GUSint) je pod konstitutivním ubiquitinovým promotorem (Ubi promoter), zakončený terminační sekvencí nos (nos term).



Obrázek 7: Vektor pBract204

4.6 Příprava médií

Média pro kultivaci explantátů byla připravována ze dvou komponentů, ztužující látky a složek média. Gelující přípravek phytoagar (6 g/l), byl smíchán s destilovanou vodou a následně autoklávován. Všechny potřebné složky média (viz Složení kultivačních médií) byly naváženy nebo napipetovány a doplněny do potřebného objemu sterilní destilovanou vodou. pH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na 5,8. Ve flow boxu bylo médium přefiltrováno pomocí podtlaku a ponecháno ve vodní lázni 60 °C. Obě složky média byly smíchány a podle použitého vektoru byla přidána antibiotika. Do Petriho misek o průměru 9 cm bylo nalito 25 ml média.

4.6.1 Složení kultivačních médií

1) Kalus indukční médium - množství na 1 l média

MS médium (M0221)	4,3 g
maltóza	30 g
kasein hydrolyzát	1 g
myo-inositol	350 mg
prolin	690 mg
thiamin HCl	1 mg
Dicamba	2,5 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1,25 mg

2) Transientní médium - množství na 1 l média

MS médium (M0238)	2,7 g
maltóza	20 g
NH ₄ NO ₃	165 mg
glutamin	750 mg
myo-inositol	0,4 mg
thyamin HCl	0,4 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1,25 mg

použité fytohormony:

2,4-D	2,5 mg
BAP	0,1 mg

použitá antibiotika:

Timentin (T0190)	160 mg
hygromycin B	50 mg
neomycin	200 mg

3) Regenerační médium - množství na 1 l média

MS médium (M0238)	2,7 g
maltóza	20 g
NH ₄ NO ₃	165 mg
glutamin	750 mg
myo-inositol	100 mg
thyamin HCl	0,4 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1,2 mg

použitá antibiotika:

Timentin (T0190)	160 mg
hygromycin B	50 mg
neomycin	200 mg

pH médií bylo upraveno 0,1 M roztokem NaOH na 5,8.

4.7 Selekcce transformovaných rostlin

Proces indukce kalusu a regenerace na selekčních médiích trval celkem 101 dní.

Selekcce č. 1 transformovaných explantátů začíná po třech dnech od inokulace. Explantáty byly pasážovány na nové kalus indukční médium. Médium obsahovalo antibiotikum Timentin o koncentraci 160 mg/l a antibiotika podle použitého vektoru (hygromycin B o koncentraci 50 mg/l a neomycin o koncentraci 200 mg/l). Petriho misky byly inkubovány ve tmě při 24 °C po dobu 14 dní.

Selekcce č. 2 - explantáty byly pasážovány na nové kalus indukční médium za stejných podmínek jako při 1. selekci.

Selekcce č. 3 - po 14 dnech byly explantáty pasážovány na nové kalus indukční médium za stejných podmínek jako při 1. a 2. selekci.

Selekcce č. 4 - kalusy byly pasážovány na tranzientní médium. Tranzientní médium obsahovalo antibiotikum Timentin o koncentraci 160 mg/l a antibiotika podle použitého

vektoru (hygromycin B o koncentraci 50 mg/l a neomycin o koncentraci 200 mg/l). Petriho misky byly umístěny do termostatu a zakryty papírem. Kultivace probíhala při 24 °C po dobu 14 dní.

Selekce č. 5 - po uplynutí 14 dní byla somatická embrya přenesena na regenerační médium v Petriho miskách o výšce 1,5 cm. Kultivace probíhala při 24 °C po dobu 14 dní.

Z regeneračního média byly rostliny přepasážovány do Erlenmeyerových baněk, které obsahovaly stejné regenerační médium. Regenerované rostliny byly přesazeny do pěstebních rašelinových bločků (Jiffy). Z listů rostlin byla izolována DNA, pomocí PCR byla detekována přítomnost transgenu.

4.8 Izolace celkové rostlinné DNA metodou CTAB

Do dvou ml mikrozkušavek bylo umístěno 100 mg listů a dvě homogenizační kuličky. Pomocí kulového mlýnu byly listy homogenizovány po dobu dvou minut při 27 000 otáčkách. Homogenát byl zalit 140 µl 2x CTAB extrakčního pufru zahřátým na 65 °C, pomocí pipety byl roztok promíchán. Mikrozkušavka byla inkubována pět minut ve vodní lázni při 65 °C. V digestoři bylo přidáno 210 µl chloroformu. Vzorek byl odstředován dvě minuty při 12 000 rpm. Do nové mikrozkušavky bylo odebráno 120 µl supernatantu. K supernatantu bylo přidáno 12 µl 10% CTAB roztoku předeřátého na 65 °C. V digestoři bylo přidáno 120 µl chloroformu, mikrozkušavka byla protřepána a dvě minuty odstředována při 12 000 rpm. Bylo odebráno 100 µl supernatantu do nové mikrozkušavky (odebírán pomalu, aby se neodebral chloroform). Bylo přidáno 100 µl CTAB precipitačního pufru a promícháno pipetou. Poté byl vzorek umístěn do centrifugy a odstředován 10 minut při 14 000 rpm. Supernatant byl odstraněn. Bylo přidáno 50 µl high-salt TE pufru, mikrozkušavka byla zvortexována. Vzorek byl 10 minut ponechán ve vodní lázni při 65 °C a poté byl znovu vortexován. Bylo přidáno 100 µl 96% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Vše bylo promícháno pomocí pipety. Mikrozkušavka byla odstředována 10 minut při 14 000 rpm. Byl odstraněn supernatant. Bylo přidáno 200 µl 80% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Mikrozkušavka byla odstředována pět minut při 14 000 rpm. Byl odstraněn supernatant a vzorek byl ponechán jednu hodinu při laboratorní teplotě. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 15 µl 0,1x TE pufru a vše bylo

necháno jednu hodinu rozpouštět. Vzorky s izolovanou rostlinnou DNA byly uchovávány při -20 °C. Následující den byla pomocí spektrofotometru změřena koncentrace DNA.

4.9 Detekce transgenů pomocí PCR

Pro PCR byl použit premix REDTaq® ReadyMix™ PCR reakční mix s MgCl₂ (Sigma-Aldrich).

Do mikrozkušavky typu Eppendorf byl namíchán PCR mix pro daný počet vzorků.

Tab. II: PCR mix

Reagent mix	Mix 1x [μl]	Vzorky [μl]
ddH ₂ O	2,5	8
ReadyMix 2x	5	
Primer F	0,25	
Primer R	0,25	
Templátová DNA		2
Celkem		10

Do PCR mikrozkušavek umístěných v ledové tříšti bylo napipetováno 8 μl PCR mixu a 2 μl templátové DNA o průměrné koncentraci 100 ng/μl. PCR mikrozkušavky byly stočeny na stolní mini centrifuze a vloženy do naprogramovaného termocykléru T100™ (BioRad).

Pro detekci genu *Atwbc19* byly navrženy primery *Atwbc19opt* od firmy Generi Biotech.

Forward primer: 5' -GAA CAA GAT CTC CCT CAT CCA G-3'

Reverse primer: 5' -TGG TCA AGC TTC CAG TAA ACG-3'

Tab. III: Teplotní a časový profil PCR pro detekci genu *Atwbc19*

1.	94 °C	4 min	
2.	94 °C	45 s	
	56 °C	45 s	Počet cyklů: 38
	72 °C	45 s	
3.	72 °C	5 min	

Pro detekci reportérového genu *gus* byly použity primery GUSint/p204 od firmy Geneti Biotech.

Forward primer: 5' -TCG TCC GTC CTG TAG AAA CC-3'

Reverse primer: 5' -GAC CCA CAC TTT GCC GTA AT-3'

Tab. IV: Teplotní a časový profil PCR pro detekci reportérového genu *gus*

1.	94 °C	3 min	
2.	94 °C	1 min	
	55 °C	45 s	Počet cyklů: 35
	72 °C	1 min	
3.	72 °C	5 min	

Byl připraven 1,2% agarózový gel pro detekci PCR produktů pomocí elektroforetické separace. Agaróza byla smíchána s TAE pufrem. Vše bylo rozvařeno v mikrovlnné troubě a poté byly přidány 2 µl ethidium bromidu. Po ukončení elektroforetické separace byl gel umístěn do UV transiluminátoru (program GeneSnap, SYNGENE) a byly vyhodnoceny výsledky.

4.10 Detekce *gus* genu pomocí histochemické reakce

Pro detekci *gus* genu byly připraveny tyto roztoky:

1) Příprava fosfátového pufru o pH = 7.

Roztok A byl připraven ze 4,2 g disodium fosfátu (Na_2HPO_4) a doplněn do 100 ml H_2O . Roztok B byl připraven ze 3,14 g monosodium fosfátu (NaH_2PO_4) doplněn do 100 ml H_2O . Výsledný roztok byl připraven tak, že bylo odměřeno 65 ml roztoku A a postupně byl přidáván roztok B do pH = 7.

2) Příprava roztoku hexakyanatanu železnato-draselného $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Do 10 ml H_2O bylo přidáno 0,329 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Skladováno při 4 °C.

3) Příprava roztoku hexakyanatanu železito-draselného $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Do 10 ml H_2O bylo přidáno 0,442 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Skladováno při 4 °C.

4) Příprava reakčního roztoku X-Gluc:

fosfátový pufr	25 ml
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	250 μl
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	250 μl
0,5 M EDTA	1 ml
Triton X-100	50 μl
destilovaná H_2O	23 ml
X-Gluc	25 mg - rozpustit v DMSO

Reakční roztok X-Gluc byl doplněn fosfátovým pufrem do objemu 50 ml a roztok byl skladován ve 4 °C.

Kalus, který byl transformován pomocí vektoru pBract204::VMAtwbc19, kultivován po dobu 17 dní a obilky z rostliny č. 9 transgenního jarního ječmene byly vloženy do mikrozkuřavky s 200 μl roztoku X-Gluc a po dobu dvou minut byl pomocí vývěvy vyvolán podtlak. Vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.

Následující den byl odebrán roztok X-Gluc. Vzorky byly třikrát promyty 70% ethanolem a uchovány při 4 °C.

4.11 Schéma transformace jarního ječmene

Den	Etapa transformace
1.	odběr klasů, vyjmutí obilek z klasů a sterilizace
1.	extirpace embryí, odstranění koleoptile a koleorhizy
1.	pasáž explantátu na kalus indukční (CI) médium
1.	příprava inokula, inokulace embryí
1.	pasáž explantátů na nové CI médium
1.	kultivace ve tmě při 24 °C po dobu tří dní
3.	I. selekce - CI médium s Timentinem a antibiotiky
17.	II. selekce po 14 dnech - nové CI médium s antibiotiky
31.	III. selekce po 14 dnech - nové CI médium s antibiotiky
45.	kultivace kalusů na tranzientním médiu (14 dní)
59.	pasáž kalusů na regenerační médium (14 dní)
73.	kultivace kalusů na regeneračním médiu v Erlenmeyerových baňkách (14 dní)
87.	přesazení regenerovaných rostlin do pěstebních rašelinových bločků
101.	izolace DNA
101.	detekce transgenů pomocí PCR

4.12 Použité chemikálie a roztoky

2,4-D (Duchefa, katalogové číslo D0911)
Agaróza (Serva, kat. č. 11404)
Antibiotikum hygromycin (Roche, kat. č. 1084355001)
Antibiotikum neomycin (Duchefa, kat. č. M0135)
BAP (Sigma, kat. č. B3408)
Deionizovaná voda pro PCR (Water PCR reagent, Sigma, kat. č. W1754)
Destilovaná voda
Dicamba (Sigma, kat. č. D5417)
Disodium fosfát (Sigma, kat. č. S3264)
Dusičnan amonný (Sigma, kat. č. A3795)
EDTA (Serva, kat. č. 39760)
Ethanol: 70 %, 80 %, 96 % (Sigma-Aldrich, kat. č. 46139)
Ethidium bromid (Invitrogen, kat. č. 15585)
Glutamin (Duchefa, kat. č. 65763)
Hexakyanatan železito-draselný (Sigma-Aldrich, kat. č. 393517)
Hexakyanatan železnato-draselný (Aldrich, kat. č. 455989)
Hydroxid sodný (Sigma, kat. č. 72068)
Hypochlorid sodný 6 % (Fluka, kat. č. 13440)
Kasein hydrolyzát (Duchefa, kat. č. C1301)
Maltóza (Duchefa, kat. č. M0811)
Marker molekulové hmotnosti Ladder II (HyperLadder™ 50 kb, BioLine, kat. č. BIO-33039)
MG/L médium (vlastní výroba)
Monosodium fosfát NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, kat. č. S8282)
Murashige and Skoog (MS) medium (Duchefa, kat. č. M0221, M0238)
Myo-inositol (Sigma, kat. č. I0609)
Pentahydrát síranu měďnatého (Sigma, kat. č. C3036)
Phytoagar (Duchefa, kat. č. P1003)
Primery (Generi Biotech)
Prolin (Sigma, kat. č. P5607)

REDTaq® ReadyMix™ PCR reakční mix s MgCl₂ (Sigma-Aldrich, kat. č. P4600)

Thiamin HCl (Sigma, kat. č. T3902)

Timentin (Duchefa, kat. č. T0190)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. X100)

4.12.1 Roztoky použité pro izolaci celkové rostlinné DNA metodou CTAB

2x CTAB pufr (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

10% CTAB roztok

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

CTAB precipitační pufr

- 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 pufr

- 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 pufr

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

4.13 Použité laboratorní přístroje

Centrifuga 5418 (Eppendorf)

Elektroforetická komora (BioRad)

Magnetická míchačka (Variomag)

Mlýn kulový vibrační (Retsch, MM400)

Orbitální třepačka-inkubátor (Biosan)

PH metr (pH 526, WTW)

Spektrofotometr DS-11 (DeNovix)

Stolní centrifuga Prism™ Air-Cooled Microcentrifuge (Labnet)

Termocyklér: Thermal Cycler T100™ (BioRad)

UV transiluminátor (G:BOX, Syngene)

Vodní lázeň (SUB6, Grant)

Vortex mixer Wizard (Velp Scientifica)

Zdroj elektrického napětí (BioRad)

5 VÝSLEDKY

Pomocí *A. tumefaciens* byla transformována nezralá zygotická embrya ječmene odrůdy Golden Promise. Transformována byla dvěma vektory, první vektor byl označen číslem 101 (pBract204::VMAtwbc19) a obsahoval gen *Atwbc19* a selekční gen *nptII* pro neomycin fosfotransferázu II. Druhý vektor, se kterým byla účinnost selekce srovnávána, byl označen číslem 111 (pBract204), obsahoval selekční gen *hpt* pro hygromycin fosfotransferázu a reportérový gen *gus*.

Oběma vektory bylo celkem transformováno 120 nezralých zygotických embryí, 10 embryí nebylo transformováno a varianta sloužila jako kontrola bez transformace.

Pro zjištění účinnosti selekce u vektoru 101 - gen *Atwbc19* byla embrya rozdělena do dvou skupin bez selekce a se selekcí na antibiotiku neomycin, vždy po 30 explantátech.

Stejně skupiny také byly transformovány vektorem 111 - gen *hpt*, 30 explantátů bylo kultivováno bez selekce a 30 explantátů bylo kultivováno se selekcí na antibiotiku hygromycin B.

Nezralá embrya byla u každé varianty kultivována ve třech nezávislých opakováních po 10 embryích (3×10), experiment byl proveden vždy ve dvou opakováních.

Během kultivace explantátů byl sledován rozdíl v indukci kalusu a regeneraci rostlin, které byly kultivovány na médiích bez selekce a se selekcí. Účinnost selekce byla kontrolována při každém pasážování na indukční, tranzientní a regenerační médium.

Cílem práce bylo porovnat selekční schopnost genu transportéru AtWBC19 s používaným selekčním genem pro ječmen - *hpt*, který byl součástí vektoru pBract204.

5.1 Indukce kalusů a regenerace rostlin u jarního ječmene odrůdy Golden Promise, kontrolní varianta

Bylo kultivováno 30 embryí, které nebyly transformovány a byly použity pro kontrolu. Celkem regenerovalo 35 rostlin. V průměru z jedno kultivovaného embrya regenerovalo 1,17 rostlin.

5.2 Efektivita selekce kalusů a regenerace rostlin transformovaných vektorem označeným 101 - pBract204::VMAtwbc19

a) bez selekce

Celkem bylo kultivováno 30 embryí. Ze 46 regenerovaných rostlin, které byly transformovány vektorem 101 a nebyly selektovány, bylo pomocí PCR detekováno 7 transgenních rostlin. V průměru z jedno kultivovaného embrya regenerovalo 1,53 rostlin.

b) se selekcí

Bylo kultivováno 30 embryí, ze kterých regenerovalo 10 rostlin. U všech regenerovaných rostlin byla pomocí PCR prokázána přítomnost genu *Atwbc19*. Účinnost selekce i úspěšnost transformace byla 33 %.

5.3 Efektivita selekce kalusů a regenerace rostlin transformovaných vektorem označeným 111 - pBract204

a) bez selekce

Celkem bylo kultivováno 30 embryí. Ze 49 regenerovaných rostlin transformovaných vektorem 111 bez selekce bylo pomocí PCR detekováno 5 transgenních rostlin. V průměru z jedno kultivovaného embrya regenerovalo 1,64 rostlin.

b) se selekcí

Bylo kultivováno 30 embryí. Z 15 regenerovaných rostlin, které byly transformovány vektorem 101 a média obsahovala antibiotikum hygromycin B (koncentrace 50 mg/l) bylo 14 rostlin transgenních, což znamená 47% úspěšnost transformace.

Tab. V: Efektivita selekce kalusů a regenerace rostlin

Médium	Bez selekce		Se selekcí		Kontrola
	Vektor 101	Vektor 111	Vektor 101 <i>Atwbc19</i>	Vektor 111 <i>hpt</i>	
Počet indukovaných kalusů					
1. CI	30	30	30	30	10
2. CI	16	19	17	18	10
3. CI	16	19	17	18	10
TM	10	10	10	15	10
Počet regenerovaných rostlin					
1. RM	51	55	10	16	28
2. RM	46	49	10	15	35

CI - kalus indukční médium, TM - tranzientní médium, RM - regenerační médium

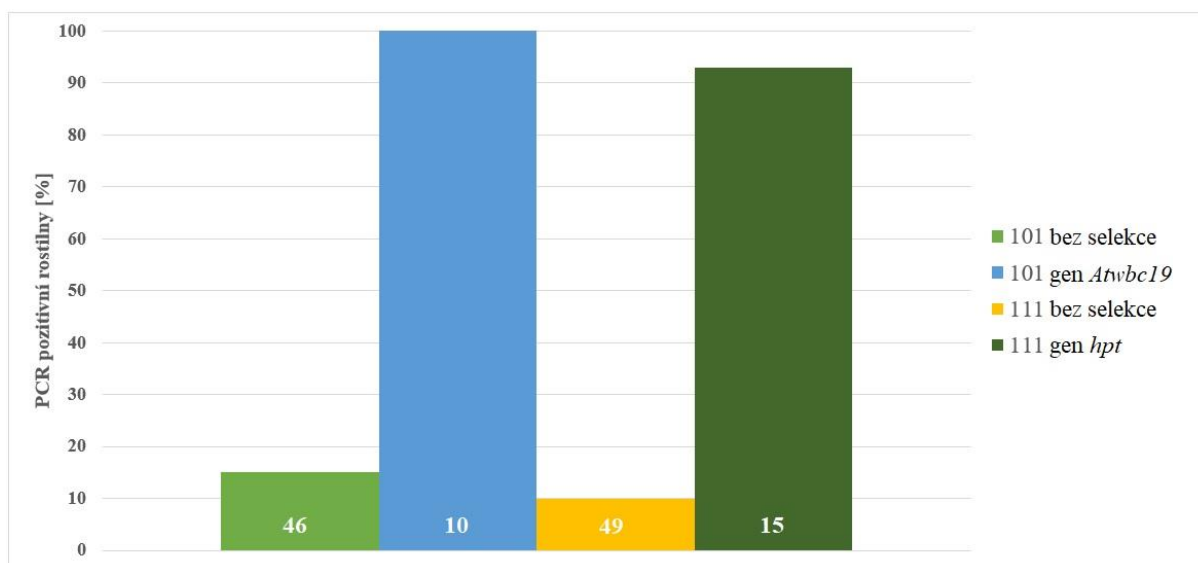
101 - transformace embryí pomocí vektoru pBract204::VMAtwbc19

111 - transformace embryí pomocí vektoru pBract204

Tab. VI: Celkový počet regenerovaný a transgenních rostlin

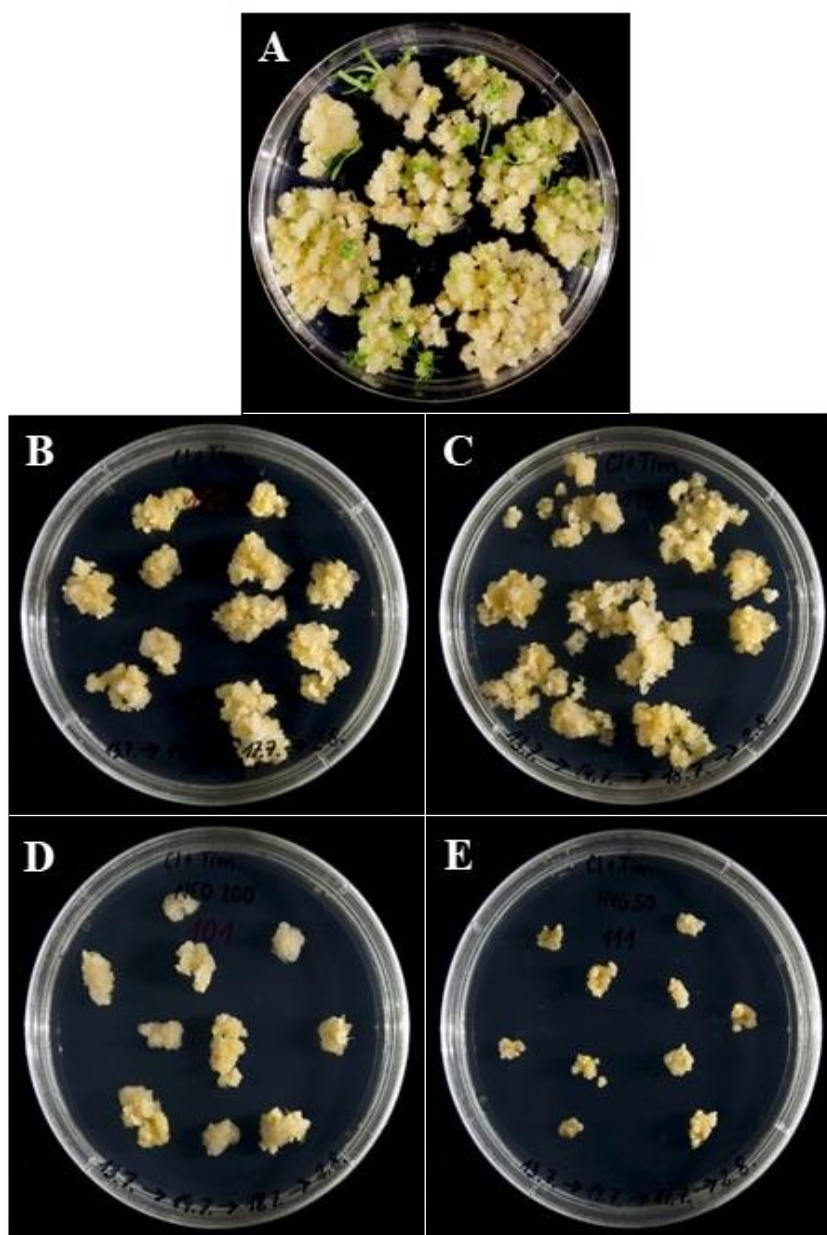
Číslo vektoru, selekce	Počet regenerovaných rostlin	PCR+	PCR-
101 bez selekce	46	7	39
101 gen <i>Atwbc19</i>	10	10	0
111 bez selekce	49	5	44
111 gen <i>hpt</i>	15	14	1

Graf č. 1: Procentuální zastoupení transgenních rostlin z celkového počtu rostlin regenerovaných u každé z variant



5.4 Vyhodnocení účinnosti selekce genu *Atwbc19*

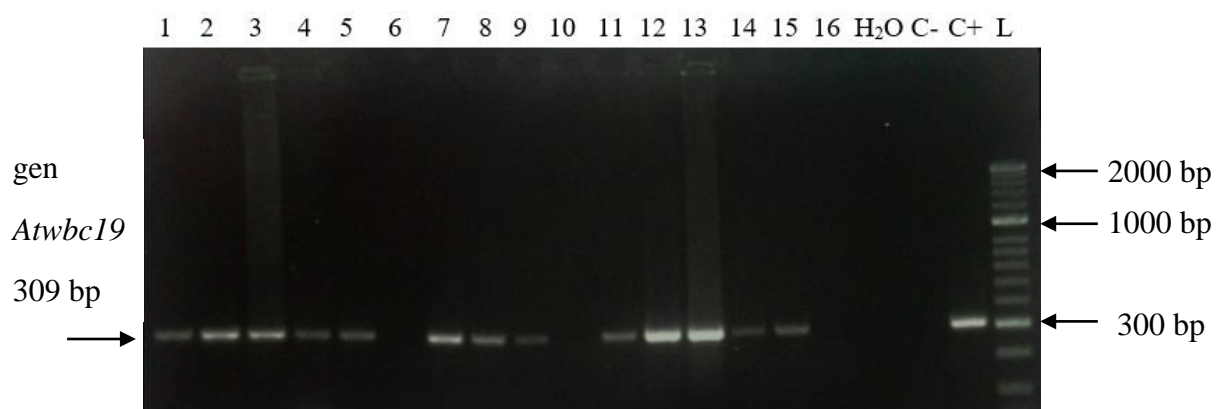
V porovnání účinnosti selekce genu *Atwbc19* oproti selekčnímu genu *hpt* je počet regenerovaných rostlin 10 respektive 15. Všechny rostliny transformované vektorem 101 s genem *Atwbc19* ale na rozdíl od rostlin transformovaných pomocí vektoru 111 se selekčním genem *hpt* byly transgenní. U rostlin transformovaných pomocí vektoru 111 se selekčním genem *hpt* bylo transgenních 14 z 15 regenerovaných rostlin.



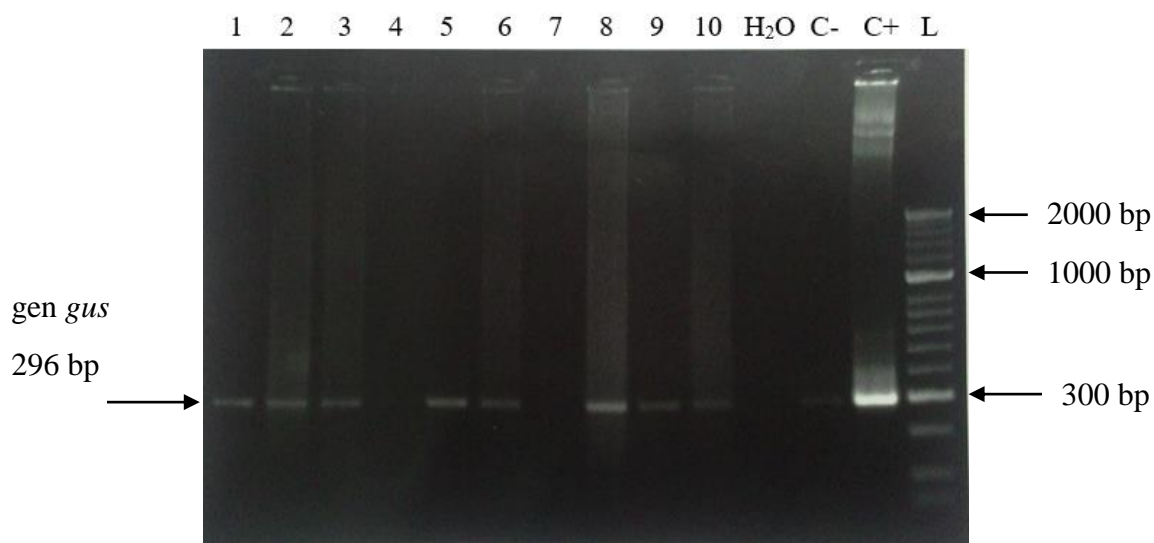
Obrázek 8: Kalusy jarního ječmene po 31 dnech kultivace. *A*, Kontrolní regenerující kalusy na médiu bez antibiotik. *B*, Regenerující kalusy transformované vektorem 101 na médiu bez antibiotik. *C*, Regenerující kalusy transformované vektorem 111 na médiu bez antibiotik. *D*, Regenerující kalusy transformované vektorem 101 na selekčním médiu s neomycinem (200 mg/l). *E*, Regenerující kalusy transformované vektorem 111 na selekčním médiu s hygromycinem B (50 mg/l).



Obrázek 9: Regenerující rostlina na médiu 2. RM s antibiotikem neomycin o koncentraci 200 mg/l (Foto autor)

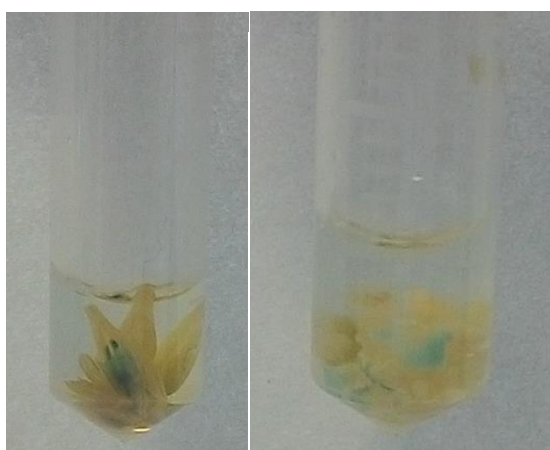


Obrázek 10: PCR analýza genu *Atwbc19* u regenerovaných rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost amplikonu 309 bp). Vzorky 1 - 7 rostliny jarního ječmene transformované vektorem 101 obsahující gen *Atwbc19*; vzorky 8 - 16 rostliny jarního ječmene transformované vektorem 101 bez selekčního genu; C- negativní kontrola (netransformovaná rostlina); C+ pozitivní kontrola; L marker molekulové hmotnosti Ladder II.



Obrázek 11: PCR analýza *gus* genu u regenerovaných rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost ampliconu 296 bp). Vzorky 1 - 6 rostliny jarního ječmene transformované vektorem 111 bez selekčního genu; vzorky 7 - 10 rostliny jarního ječmene transformované vektorem 111 se selekčním genem *hpt*; C- negativní kontrola (netransformovaná rostlina); C+ pozitivní kontrola; L marker molekulové hmotnosti Ladder II.

Úspěšná transformace byla ověřena pomocí připraveného roztoku X-Gluc. Přítomnost *gus* genu lze usuzovat z modrého zbarvení obílek a kalusu.



Obrázek 12: Detekce *gus* genu pomocí histochemické reakce (Foto autor)

6 DISKUZE

Ječmen je čtvrtou nejrozšířenější zemědělskou plodinou světa (po pšenici, rýži a kukuřici). Využívá se zejména ve sladovnictví a jako krmivo. Dále se používá pro výrobu lihu, škrobu, detergentů, farmaceutických a kosmetických výrobků (Zimolka, 2006).

Ječmen patří z hlediska transgenozy mezi obtížně transformovatelné druhy rostlin. Efektivita transformace se s vývojem transformačních metod postupně zvyšovala.

Efektivita transformace je definována jako procentuální vyjádření počtu úspěšně transformovaných buněk z celkového počtu izolovaných embryí (Harwood a kol., 2009).

Transformační efektivita může být ovlivněna mnoha faktory: odrůdou, typem a velikostí explantátů, kmenem *A. tumefaciens*, vektorem, provedením inokulace *A. tumefaciens*, složením kultivačních médií a selekcí (Bartlett a kol., 2008).

Tingay a kol. (1997) jako první publikovali úspěšnou transformaci ječmene (odrůda Golden Promise) pomocí *A. tumefaciens*. Vektor pDM805 obsahoval selekční gen *bar* a reportérový gen *gus*. Vyizolovali celkem 1282 embryí, z toho 54 bylo úspěšně transformováno, což znamená 4,2% efektivitu transformace.

Vyšší transformační efektivitu dosáhl Bartlett a kol. (2008). Vektory řady pBract obsahovaly selekční gen *hpt* a reportérový gen *luc* (gen pro luciferázu). Po vyizolování 1750 nezralých embryí, bylo úspěšně transformováno 432. Ve výsledku se tedy jedná o efektivitu 24,7 %.

Harwood a kol. (2009) publikovali postup transformace pomocí *A. tumefaciens*, kmenem AGL1. Pro dosažení 25% transformační efektivitu doporučuje transformovat nezralá zygotická stejný den nebo den následující po jejich izolaci. V rámci této bakalářské práce byl tento doporučený metodický postup použit. V roce 2011 dosáhla Harwood a kol. 35% efektivitu transformace.

Nejvyšší úspěšnost transformace ječmene pomocí *A. tumefaciens* byla dosažena v jednom experimentu - 86 % (Hensel a kol. 2009). Transformovali embrya jarního ječmene, odrůda Golden Promise, vektorem pSB187, jehož součástí byl selekční gen *hpt*

pod CaMV 35S promotorem a reportérový gen *sgfp* (syntetický GFP protein) řízený konstitutivním ubiquitinovým promotorem.

V rámci bakalářské práce byla provedena transformace vektorem pBRACT204, který obsahuje stejný selekční gen *hpt*. Transformována byla rovněž nezralá zygotická embrya, stejné odrůdy Golden Promise. Efektivita transformace byla 46,6 %. Ve srovnání s publikovanými výsledky Harwood a kol. (2009), kdy v obou případech byla použita stejná metodika transformace a selekce, bylo v bakalářské práci dosaženo vysoké transformační efektivity.

Cílem bakalářské práce bylo také srovnat efektivitu transformace selekčního bakteriálního genu *hpt* s genem transportéru AtWBC19, který je rostlinného původu a pochází z *A. thaliana*. Mentewab a Stewart (2005), Rommens (2006) a Bombale (2010) navrhují využití genu *Atwbc19* pro selekci v rámci procesu transformace jako alternativu k bakteriálním genům. Ve srovnání s efektivitou genu *hpt* byla selekční efektivita genu *Atwbc19* nižší, v experimentu bylo získáno 10 transgenních rostlin ze 30 kultivovaných embryí. Efektivita transformace byla 33 %. Jedná se však o přirozený rostlinný gen, který by bylo možné spolehlivě využít i v procesu transformace ječmene. Z hlediska možného horizontálního přenosu se tento alternativní selekční marker dá považovat za bezpečnější.

Výsledky bakalářské práce potvrdily, že selekční markery jsou důležitou součástí expresních vektorů a výrazným způsobem ovlivňují efektivitu transformace.

7 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma selekčních genů používaných u ječmene jarního a na alternativní selekční gen *Atwbc19*, který vykazuje u transgenních rostlin rezistenci vůči aminoglykosidovým antibiotikům. Transportér AtWBC19 je součástí nejpočetnější rodiny ABC transportérů - rodiny AtWBC.

V experimentální části byla provedena transformace nezralých embryí pomocí *A. tumefaciens*. Byly použity dva vektory - pBract204::VMAtwbc19, jehož součástí byl gen *Atwbc19* a srovnávací vektor pBract204, který obsahoval selekční gen *hpt*. Pomocí PCR byly u regenerovaných rostlin detekovány transgenní rostliny. Vyhodnocena byla účinnost selekce bakteriálního genu *hpt* a genu transportéru AtWBC19. Součástí bakalářské práce bylo také hodnocení poměru transgenních a netransgenních rostlin regenerovaných bez selekce.

8 LITERATURA

Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P. J., Fauquet, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T. T., Nugent, G., Raemakers, K., Romano, A., Somers, D. A., Stoger, E., Taylor, N., a Visser, R. (2005): Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, 15(3), 305-327.

Andolfo, G., Ruocco, M., Di Donato, A., Frusciante, L., Lorito, M., Scala, F., Ercolano, M. R. (2015): Genetic variability and evolutionary diversification of membrane ABC transporters in plants. *BMC plant biology*, 15(1), 51.

Bartlett, J. G., Alves, S. C., Smedley, M., Snape, J. W., Harwood, W. A. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4(1), 22.

Bombale, S. L., Gowda, P. H. R., Gunnaiah, R., Malatheshaiah, N. T., Salome, T., a Swamidatta, S. H. (2010): In vitro regeneration and transformation of muskmelon (*Cucumis melo* L.) with alternative *AtWBC19* marker gene. *Intl J Biotechnol Biochem*, 6, 1-12.

Bruce, W. B., Christensen, A. H., Klein, T., Fromm, M., a Quail, P. H. (1989): Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9692-9696.

Campbell, N. A. a kol. (2015): *Biology: A Global Approach* (10th ed.). Pearson. ISBN: 978-1-292-00865-3

Clark, D. P., a Pazdernik, N. J. (2012): *Biotechnology* (Update ed.). Elsevier, AP Cell Press. ISBN: 978-0-12-385063-8, 397-423.

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.

Harwood, W. A., Bartlett, J. G., Alves, S. C., Perry, M., Smedley, M. A., Leyl, N., Snape, J. W. (2009): Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques. In: Jones H., Shewry P. (eds.) *Transgenic Wheat, Barley and Oats. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 478. Humana Press, 137 - 147.

- Harwood, W. A. (2011): Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *Journal of experimental botany*, 63(5), 1791-1798.
- Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., a Kumlehn, J. (2009): *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics*.
- Hooykaas, P. J. J. (2004): Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Tkacz, J. S., a Lange, L. (eds.). *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. Springer Science & Business Media.
- Chalfie, M., a Kain, S. R. (2005): Green fluorescent protein: properties, applications and protocols (Vol. 47). John Wiley & Sons.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M., Hirsh, D. (1986): β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8447-8451.
- Jones, H. D., Shewry, P. R. (2009): Transgenic Wheat, Barley a Oats, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. ISBN 978-1-58829-961-1
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., Martinoia, E. (2011): Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*, e0153.
- Kang, B. G., Ye, X., Osburn, L. D., Stewart, C. N., a 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 reports*, 29(6), 643-650.
- Komari, T., Ishida, Y., Hiei, Y. (2004): Plant Transformation Technology: *Agrobacterium*-Mediated Transformation. In: Christou, P., a Klee, H. (eds.). *Handbook of plant biotechnology* (Vol. 1). John Wiley & Sons. ISBN: 0-471-85199-X, 233-261.
- Kretschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E., Nagy, R. (2011): Functions of ABC transporters in plants. *Essays in biochemistry*, 50, 145-160.
- Lewin, B. (2008): *Genes IX*. Jones and Bartlett. ISBN: 9780763740634

- Li, Z. T., Gray, D. J. (2005): Genetic engineering technologies. In: Trigiano, R. N., Gray, D. J. (ed). Plant development and biotechnology, pp. 241-250. CRC Press: Edit. 1., 358. ISBN: 0-8493-1614-6
- Matthews, P. R., Wang, M. B., Waterhouse, P. M., Thornton, S., Fieg, S. J., Gubler, F., Jacobsen, J. V. (2001): Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular breeding*, 7(3), 195-202.
- Mentewab, A., a Stewart, C. N. (2005): Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nature biotechnology*, 23(9), 1177-1180.
- Miki, B., a McHugh, S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 193-232.
- Miyawaki, A. (2008): Green fluorescent protein glows gold. *Cell*, 135(6), 987-990.
- Murray, F., Brettell, R., Matthews, P., Bishop, D., Jacobsen, J. (2004): Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant cell reports*, 22(6), 397-402.
- Müller, A. E., a Wassenegger, M. (2004): Control and silencing of transgene expression. In: Christou, P., a Klee, H. (eds.). *Handbook of plant biotechnology* (Vol. 1). John Wiley & Sons. ISBN: 0-471-85199-X, 291-330.
- Ondřej, M. a Drobník, J. (2002): *Transgenozé rostlin*. Academia. ISBN: 80-200-0958-2.
- Patel, M., Johnson, J. S., Brettell, R. I., Jacobsen, J., Xue, G. P. (2000): Transgenic barley expressing a fungal xylanase gene in the endosperm of the developing grains. *Molecular Breeding*, 6(1), 113-124.
- Rees, D. C., Johnson, E., Lewinson, O. (2009): ABC transporters: the power to change. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(3), 218-227.
- Ritala, A., Aspegren, K., Kurtén, U., Salmenkallio-Marttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T., H., Enari, T. M. (1994): Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Molecular Biology*, 24(2), 317-325.

- Rommens, C. M. (2006): Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a potentially multifaceted gene. *Trends in plant science*, 11(7), 317-319.
- Shrawat, A. K., a Lörz, H. (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant biotechnology journal*, 4(6), 575-603.
- Sundar, I. K., a Sakthivel, N. (2008): Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Journal of plant physiology*, 165(16), 1698-1716.
- Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettell, R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal*, 11(6), 1369-1376.
- Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W., Harwood, W. A. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant cell reports*, 23(12), 780-789.
- Trifonova, A., Madsen, S., Olesen, A. (2001): *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of in vitro culture conditions. *Plant Science*, 161(5), 871-880.
- Twyman, R. M., Christou, P., Stoger, E. (2002): Genetic transformation of plants and their cells. In: Oksman-Caldentey, K. M., a Barz, W. H. (eds.). *Plant biotechnology and transgenic plants* (Vol. 92), 111-141, CRC press.
- Vain, P., a Thole, V. (2009): Gene insertion patterns and sites. In: Lazzeri, P. A., a Jones, H. D. *Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization Protocols*, 203-226.
- Watson, M. R., Lin, Y. F., Hollwey, E., Dodds, R. E., Meyer, P., McDowall, K. J. (2016): An improved binary vector and *Escherichia coli* strain for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(7), 2195-2201.
- Ziemienowicz, A. (2001): Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(3), 363-374.
- Zimolka, J. (2006): *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Profi Press, Praha, ISBN 80-86726-18-5.
- Zolnerciks, J. K., Andress, E. J., Nicolaou, M., Linton, K. J. (2011): Structure of ABC transporters. *Essays in biochemistry*, 50, 43-61.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC - ATP-binding cassette

TMD (transmembrane domain) - transmembránová doména

NBD (nucleotide binding domain) - nucleotide-binding doména

CTAB - Cetyltrimethyl ammonium bromid

PCR (polymerase chain reaction) - polymerázová řetězová reakce

AGL - kmen *Agrobacterium tumefaciens*

X-gluc - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid

DMSO - dimethylsulfoxid

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

AtWBC - *Arabidopsis thaliana* white-brown complex

hpt - hygromycin fosfotransferáza

nptII - neomycin fosfotransferáza II

TAE pufr - Tris-acetát-EDTA pufr

TE buffer - Tris-EDTA buffer

BAP - 6-benzylaminopurin

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

MS médium - Murashige a Skoog médium

MUG - 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronid

CI - kalus indukční médium

T-DNA (transferred DNA) - transferová DNA

Ti-plazmid (tumor inducing plasmid) - plazmid vyvolávající nádor

TRIS - trisaminomethan

ATP - adenosintrifosfát

rpm (revolutions per minute) - otáčky za minutu

primer F - forward primer

primer R - reverse primer

bp (base pair) - párů bází