



Transformace lnu pro zlepšování užitečných vlastností

Disertační práce

Vedoucí práce:

Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.

Vypracovala:

Ing. Michaela Ludvíková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci: *Transformace lnu pro zlepšování užitných vlastností* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Disertační práce je školním dílem a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně.

V Brně dne:.....

Podpis:.....

Tato práce byla podpořena projektem MŠMT LH12226: „Komplexní studium genetické variability druhu *Linum usitatissimum* L., vzájemná výměna genetických zdrojů kolekcí České republiky a Ruské federace s cílem zvýšení jejich užitné hodnoty a využití pro tvorbu odrůd s všestranným uplatněním“.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svým školitelům, Ing. Pavlu Hanáčkovi, Ph.D. a RNDr. Miroslavu Grigovi, CSc. za odborné vedení a pomoc při zpracování disertační práce.

Dále děkuji všem kolegům z Oddělení biotechnologií společnosti Agritec. Především RNDr. Evě Tejklové, Ing. Ivě Smýkalové, Ph.D., Ing. Miroslavě Vrbové, Ph.D. a Ing. Lence Švábové, Ph.D. za cenné rady a postřehy týkající se transformace rostlin. Děkuji také technickým pracovnícím Daně Bencové a Janě Vychodilové za pomoc při transformačních pokusech.

Ing. Vojtěchu Hudzieczkovi z Biofyzikálního ústavu AV ČR děkuji za pomoc s tvorbou konstruktů a za možnost použití výsledků získaných týmovou prací.

Děkuji celé mojí rodině za všestrannou podporu a za to, že mi drželi palce.

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na snížení exprese genu *fad2* (fatty acid desaturase 2) ve lnu (*Linum usitatissimum* L.) pomocí metod genového inženýrství. Snížení exprese genu *fad2* může vést ke zvýšenému obsahu kyseliny olejové v semenech lnu.

K dosažení snížené exprese byly aplikovány dva různé přístupy. První z nich spočíval v umlčení genu pro FAD2 prostřednictvím mechanismu post-transkripčního umlčování (RNA interference). Při tvorbě konstruktů indukujících RNA interferenci byl fragment genu *fad2* vložen v sense/antisense orientaci pod 35S promotor do vektoru pHannibal. Expresní kazeta byla klonována do vektorového systému pGreenII, který obsahoval reportérový gen pro histochemické GUS testování (*uidA*) a selekční gen pro rezistenci k fosfotricinu (*bar*). Výsledný konstrukt byl vložen elektroporací do *Agrobacterium tumefaciens* kmene EHA105. Funkčnost konstruktů byla potvrzena zkušební transformací listových disků tabáku.

Následně byla provedena agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů lnu setého. Získané transformované rostliny byly histochemicky GUS pozitivní. V jejich genomu byly pomocí PCR detekovány geny *uidA* a *bar*. Dle výsledků reverzní transkripční PCR a qPCR byly u některých transgenních linií patrné rozdíly v expresi *fad2* ve srovnání s kontrolou. Analýza obsahu a složení oleje však neprokázala zvýšení obsahu kyseliny olejové v semenech.

Druhým přístupem pro zvýšení obsahu kyseliny olejové v semenech lnu byla transformace s využitím konstruktů TALENs (Tale nucleases transcription activator-like effectors). Po úspěšné transformaci měla dle předpokladu vzniknout v genu *fad2-1* (či *fad2-2*) mutace, čímž měla být snížena jeho funkčnost, a tudíž i desaturace kyseliny olejové na kyselinu linolovou. Konstrukty byly vytvořeny pro indukci vzniku mutace v genu *fad2-1* (konstrukty pVO045, pVO046, pVO047) a pro vznik mutace v genu *fad2-2* (konstrukty pVO048 a pVO049). TALENs konstrukty byly použity pro agrobakteriální transformaci segmentů hypokotylů lnu setého. Pomocí PCR bylo zjištěno, že byly získány transformované rostliny obsahující selekční gen *bar*, nicméně dle výsledků enrichment PCR a sekvenace žádná z testovaných rostlin neobsahovala mutaci indukovanou v genu *fad2-1/fad2-2* TALENs konstruktem.

TALENs konstrukt pVO045 spolu s kontrolním konstruktem pBI α MT obsahujícím gen *uidA* byl použit také pro zkušební transformaci lnu metodou floral dip. Tato metoda se ukázala být použitelnou alternativou pro transformaci lnu.

Klíčová slova: len, transformace, *Agrobacterium tumefaciens*, post-transkripční umlčování genů, TALENs, kyselina olejová

Abstract

This work is focused on downregulation of the *fad2* (fatty acid desaturase 2) gene in flax (*Linum usitatissimum* L.) using the methods of genetic engineering. The downregulation of the *fad2* gene should lead to increased oleic acid content in linseed.

To achieve the *fad2* downregulation, two different approaches were applied. The first approach was based on *fad2* RNA mediated post-transcriptional gene silencing. As a part of RNAi construct creation fragments of *fad2* gene were inserted in sense/antisense orientation under the 35S promoter in to the pHannibal plasmid. Resulting expression cassette was cloned into pGreen II vector system containing a reporter gene for GUS histochemical testing (*uidA*) and selection gene for resistance to the herbicide phosphinotricin (*bar*). This construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 by electroporation. The ability of the construct to transform plants was proved by transformation of tobacco leaf discs.

Agrobacterium-mediated transformation of flax hypocotyls was performed. Transformed plants seemed histochemical GUS positive, transgenes *uidA* and *bar* were detected in their genomes by PCR. There were found noticeable differences in *fad2* expression in some of transgenic lines compared to control detected by RT-PCR and qPCR. Nevertheless, the analysis of oil content and its composition did not show increased oleic acid content in the seeds.

The second approach to achieve the increased oleic acid content was the flax transformation using TALENs (Tale nucleases trascription activator-like effectors) constructs. After the successful transformation a mutation in *fad2-1* (*fad2-2*) gene should be induced. As a consequence the function of *fad2* gene should be disrupted resulting in lower desaturation of oleic acid to linoleic acid. The constructs were created to induce a mutation in *fad2-1* gene (constructs pVO045, pVO046, pVO047) and to induce a mutation in *fad2-2* gene (pVO048 and pVO049). The TALENs constructs were used for *Agrobacterium*-mediated transformation of flax hypocotyls. Obtained transformed plants were tested by PCR method, which confirmed the presence of selective *bar* gene in their genomes. Nevertheless, none of transgenic plants showed the occurence of mutation induced by TALENs construct according to enrichment PCR results and sequencing.

TALENs construct pVO045 together with pBI α MT construct containing *uidA* gene were used for flax floral dip trial transformation. According to our results this method seems to be a usable alternative for flax transformation.

Key words: flax, transformation, *A. tumefaciens*, post-transcriptional gene silencing, TALENs, oleic acid

OBSAH

1 ÚVOD.....	9
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Len setý	10
2.1.1 Len setý – charakteristika	10
2.1.2 Složení oleje lnu.....	11
2.2 Transformace rostlin	11
2.2.1 Agrobakteriální transformace	11
2.2.2 Binární vektory	13
2.2.3 Selekční a reportérové geny.....	14
2.2.4 Promotory použité pro transformaci lnu	15
2.2.5 Metody transformace používané u lnu.....	17
2.3 RNA interference	18
2.3.1 Princip RNA interference	18
2.3.2 Vektory pro vyvolání RNA interference	19
2.4 Trendy v genovém inženýrství.....	20
2.4.1 TALENs.....	21
2.5 Transgenoze u lnu	22
2.5.1 Počátky transformace lnu.....	22
2.6 Ovlivnění obsahu a složení mastných kyselin u lnu	24
2.6.1 FAD2 desaturasa.....	24
2.6.2 Ovlivnění obsahu mastných kyselin u lnu genetickou modifikací	26
2.6.3 Použití RNA interference genu pro FAD2 desaturasu.....	27
2.7 Potenciální riziko spojené s pěstováním a využíváním GM lnu	28
2.7.1 CDC Triffid.....	29
2.8 Pěstování GM lnu – současný stav.....	30
3 CÍLE PRÁCE.....	31
4 MATERIÁL A METODY	32
4.1 Použitý materiál.....	32
4.1.1 Rostlinný materiál.....	32
4.1.2 Bakteriální kultury	32
4.1.3 Použité plasmidy.....	32
4.1.4 Použitá média, roztoky	35
4.2 Metodika.....	38
4.2.1 Tvorba konstruktů pWellFAD2i	38
4.2.2 Transformace tabáku.....	44
4.2.3 Tvorba konstruktů TALENs	46
4.2.4 Agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů lnu.....	47
4.2.5 Transformace lnu pomocí metody floral dip	48
4.2.6 Testování semen/rostlin po transformaci floral dip	49
4.2.7 Testování rostlin získaných transformací segmentů hypokotylů TALENs konstrukty	50
4.2.8 Testování FAD2-i transformantů pomocí reverzně transkripční PCR	53
4.2.9 Testování FAD2-i transformantů pomocí qPCR	54
4.2.10 Testování skladby oleje	55
5 VÝSLEDKY	56
5.1 Tvorba konstruktů pro indukci RNA interference genu <i>fad2</i>	56
5.1.1 Navržení primerů a PCR amplifikace	56
5.1.2 Klonování do vektoru pJET a ověření sekvence	57

5.1.3	Klonování <i>fad2</i> fragmentů do vektoru pHannibal	57
5.1.4	Transformace rostlin tabáku pomocí <i>A.tumefaciens</i>	63
5.2	Tvorba konstruktů TALENs	65
5.2.1	Sekvenování genů <i>fad2</i>	65
5.2.2	Tvorba konstruktů	65
5.2.3	Elektroporace plasmidů TALENs do <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
5.3	Agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů lnu	66
5.3.1	Transformace segmentů hypokotylů lnu konstruktem pWellFAD2i	67
5.3.2	Testování FAD2-i transformantů pomocí reverzně transkripční PCR	69
5.3.3	Testování FAD2-i transformantů pomocí qPCR	71
5.3.4	Složení oleje a skladba mastných kyselin u transformantů	73
5.3.5	Transformace segmentů hypokotylů lnu konstrukty TALENs	74
5.3.6	Transformace lnu pomocí metody floral dip	75
5.3.7	Detekce rostlin úspěšně transformovaných konstrukty TALENs	77
6	DISKUSE	80
7	ZÁVĚR	90
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92
	PŘÍLOHY	104
	SEZNAM OBRÁZKŮ	114
	SEZNAM TABULEK	116
	SEZNAM ZKRATEK	118

1 ÚVOD

Lněné semeno je v podmínkách ČR nejvýznamnějším zdrojem vysychavého oleje vhodného pro výrobu barev a laků díky vysokému podílu mastné kyseliny α -linolenové v semenném oleji. Tato mastná kyselina, velmi cenná i z dietetického hlediska, podléhá po vylisování oleje rychlé oxidaci – probíhá polymerace produktů rozpadu, dochází ke žluknutí a houstnutí oleje. Tyto vlastnosti lněného oleje brání jeho potravinářskému využití. Neplatí to však pro olej získaný z nového typu lnu, tzv. nízkolinolenového. Mutací došlo ke změně skladby mastných kyselin v oleji, obsah kyseliny α -linolenové se snížil z původních 50 – 60 % na 3 %, a to ve prospěch kyseliny linolové, které je v tomto typu oleje až 70 %. Tento olej se skladbou mastných kyselin prakticky rovná slunečnicovému oleji, který zaujímá v lidské dietě v Evropě a Severní Americe významné místo. Vysoká konzumace slunečnicového oleje však narušuje potřebnou rovnováhu mezi ω -6 a ω -3 mastnými kyselinami, která je nutná pro zdraví člověka.

Nedostatek ω -3 mastných kyselin vzniká nejen jejich nízkým příjmem, ale také v důsledku vysokého poměru přijímané kyseliny linolové ke kyselině α -linolenové, neboť enzymy zapojené do metabolismu těchto mastných kyselin jsou přednostně využívány k přeměně ω -6 mastných kyselin – tedy kyseliny linolové. Tento nepříznivý stav je možné řešit náhradou slunečnicového oleje jiným olejem s vyšším obsahem kyseliny olejové a nízkým obsahem kyseliny linolové.

Změny obsahu jednotlivých mastných kyselin v rostlinách mohou být vedle použití konvenčního šlechtění indukovány pomocí metod genového inženýrství. Jednou z možností je změnit skladbu mastných kyselin ve lněném oleji cestou umlčování genů pomocí RNA interference nebo také využití nových metod cílené modifikace genomu, mezi které patří mimo jiné metoda TALENs (Tale nucleases trascription activator-like effectors).

Vznik kyseliny linolové konverzí z kyseliny olejové v semeni lnu zajišťuje enzym FAD2 desaturasa. Genovou manipulací je možné přerušit tvorbu tohoto enzymu, což se projeví zvýšením obsahu kyseliny olejové, ze které kyselina linolová přirozeně vzniká, a současně snížením kyseliny linolové. Cílem práce je touto cestou získat len s olejem svou skladbou mastných kyselin podobným olivovému oleji. K tomuto účelu byly navrženy a vytvořeny vektorové konstrukty, které byly použity pro transformaci lnu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Len setý

2.1.1 *Len setý – charakteristika*

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) má několik technologických typů. Tato skutečnost vyplývá především z toho, že je rozšířen na všech kontinentech v různých klimatických a půdních podmínkách.

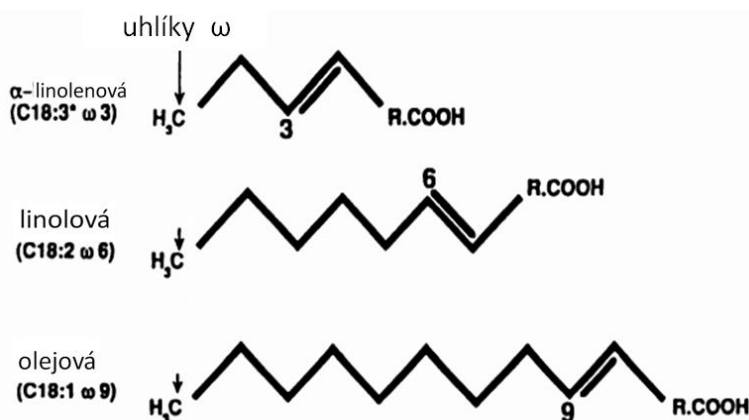
Kulturní len je prastarou plodinou známou asi 6000 let př. n. l. Jeho pěstování a zpracování znali již staří Egypťané cca 3200 let př. n. l. Odtud se len šířil kolem roku 1200 př. n. l. do zemí Středního východu. Ve starověku bylo známo používání lnu i v Řecku, v oblasti původního starého Říma se ve větším měřítku objevil až v 7. – 12. století n. l. V Evropě se len objevuje až ve středověku a období renesance na území Itálie, Francie, Flander, Ruska, Německa, Anglie, Irska a Skotska (Mojžíš, 1988).

Len je samosprašná rostlina. Kořenový systém se skládá z hlavního křovitého kořene a značného množství postranních kořínků. Semeno lnu je lesklé, nejčastěji hnědé barvy, přičemž hmotnost tisíce semen se pohybuje okolo 6 g. U olejného lnu je výnos semene průměrně asi 1,3 t.ha⁻¹ v závislosti na odrůdách, agrotechnických metodách a podmínkách prostředí (Bjelková et al., 2010).

Z technologického hlediska se len dělí na dva vyhraněné typy, a to len přadný a len olejný; k nim se řadí přechodný typ, označovaný jako len olejnopřadný.

Len přadný má dlouhý, tenký a slabě rozvětvený stonek, menší tobočky a drobnější semena. Stonek obsahuje jemné a dlouhé technické vlákno, pro které se pěstuje.

Olejný len se vyznačuje krátkými, více rozvětvenými stonky, většími tobočkami a semenem s vyšším obsahem oleje (Gill, 1987).



Obr. 1: Strukturální vzorce kyseliny α-linolenové, linolové a olejové. První číslo udává počet uhlíkových atomů v molekule a druhé udává počet dvojných vazeb. ω3, ω6, ω9 označují pozici první dvojně vazby v dané molekule mastné kyseliny (převzato ze Simopoulos, 1991).

2.1.2 *Složení oleje lnu*

Semena lnu obsahují 35 – 45 % oleje s nenasycenými mastnými kyselinami. Původní využití oleje bylo v průmyslu (při výrobě fermežových barev). Tradiční složení mastných kyselin pro průmyslové využití je cca 6 % kyseliny palmitové (C16:0), 2 % kyseliny stearové (C18:0), 16 – 20 % kyseliny olejové (C18:1), 13 – 18 % kyseliny linolové (C18:2) a 52 – 60 % kyseliny α -linolenové (C18:3) (obr.1 ; Simopoulos, 1991).

Indukovanou mutagenezí ethylmethansulfonátem (EMS) byly vytvořeny genotypy s velmi nízkým obsahem kyseliny α -linolenové a zvýšeným obsahem kyseliny olejové (Tejnklová, 1995; Pavelek et al., 2011).

Pro modifikaci obsahu oleje a složení mastných kyselin ve lnu se nabízí využití metod genového inženýrství. Tyto metody jsou rychlejší než konvenční způsoby šlechtění rostlin, přesnější než tradiční šlechtitelské přístupy a umožňují přenos genů, které standardním křížením přenést nelze.

2.2 Transformace rostlin

K přípravě transgenních rostlin mohou být použity různé metody. U dvouděložných rostlin je nejrozšířenější transformace za použití bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Jednoděložné rostliny však nejsou agrobakteriemi přirozeně infikovány, proto je jejich transformace touto metodou obtížnější. Využívá se u nich spíše biolistická transformace (particle bombardment).

2.2.1 *Agrobakteriální transformace*

2.2.1.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je půdní gramnegativní bakterie, která patří do čeledi *Rhizobiaceae*. Jde o rostlinný patogen s jedinečnou schopností přenášet segment plasmidové DNA do eukaryotického genomu.

Bakterie *A. tumefaciens* byly již na počátku 20. století identifikovány jako příčina tvorby nádorů „crown-gall“ na poraněných pletivech (Smith a Townsend, 1907). Nádory indukované agrobakteriemi byly následně označeny jako zdroj auxinu (Link a Eggers, 1941) a cytokininů (Brown, 1958).

Identifikace Ti (tumor inducing) plasmidu v agrobakteriu (Van Larebeke et al., 1974; Van Larebeke et al., 1975; Zaenen et al., 1974) vyústila v objev v Ti plasmidu obsažené T-DNA (transferred DNA) (Chilton et al., 1977; Chilton et al., 1978). Bylo prokázáno, že tato agrobakteriální DNA může být začleněna do DNA hostitelské rostlinné buňky.

Metoda transformace rostlin pomocí agrobakteria a jeho Ti plasmidu jako vektoru, včetně produkce prvních transgenních rostlin, byla poprvé provedena na rostlinách tabáku (Zambryski et al., 1983). Ve stejném roce byla publikována první práce týkající se agrobakteriální transformace lnu (Hepburn et al., 1983).

2.2.1.2 Přenos T-DNA z agrobakteria a integrace do genomu rostlin

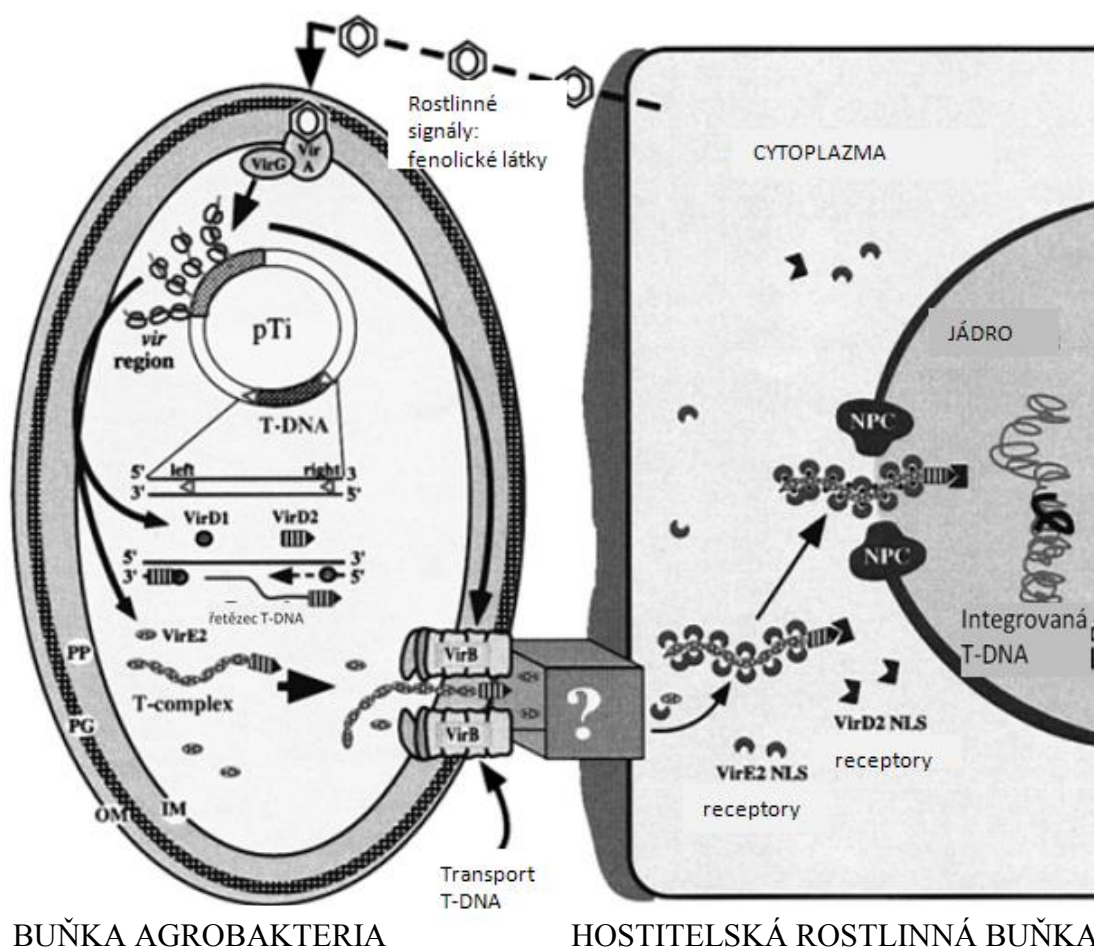
Molekulárním základem genetické transformace rostlinné buňky pomocí agrobakteria je přenos T-DNA Ti plasmidu z bakterie a jeho integrace do rostlinného genomu (schéma uvedeno na obrázku 2). Na Ti plasmidu se nachází T-region o velikosti přibližně 10 až 30 kbp, obsahující přenášenou T-DNA, a dále geny odpovědné za virulenci. Ty jsou lokalizovány v osmi operonech (virA až virH). Tyto geny řídí a zprostředkovávají interakci rostlinné buňky a *A. tumefaciens*, která vede k přenosu T-DNA (Gelvin, 2003).

T-DNA obsahuje také enzymy pro syntézu opinových látek, které slouží jako substrát pro výživu bakterií a indukují přenos Ti plasmidu do dalších buněk agrobakteria. Podle kódovaných opinů můžeme rozlišit různé typy Ti plasmidů, nejběžnějšími jsou nopalinové a oktopinové. Zatímco T-DNA nopalinového typu je souvislá, T-DNA oktopinového typu je rozdělená na dva úseky. Vždy je přítomen T_L (levý) úsek, obsahující geny pro dediferenciaci a nádorový růst. Přítomnost T_R úseku odvozeného z přilehlé oblasti Ti plasmidu není nezbytná (Zambryski et al., 1983).

Patogeneze je zahájena, když receptory bakterií *Agrobacterium* rozpoznají molekuly uvolňované aktivně rostoucími buňkami v poraněných rostlinách. Jedná se o fenolické látky typu acetosyringonu. Tyto molekuly indukují expresi série genů virulence, které kódují produkty umožňující přenos jednořetězcové T-DNA do rostlinné buňky, kde se náhodně začlení v genomu (Halford, 2011).

T-DNA integrovaná v rostlině exprimuje geny kódující enzymy pro syntézu opinů sloužících pro výživu bakterií a také geny, které mění hladiny rostlinných hormonů (auxinů a cytokininů), což vede k buněčné proliferaci typické pro nádorové bujení (Goodner et al., 2001).

Vir systém obsažený v agrobakteriu umožní přesun jakékoliv DNA mezi hraničními sekvencemi (left a right border), což je klíčová vlastnost pro genové inženýrství rostlin (Zupan et al., 2000).



BUŇKA AGROBAKTERIA

HOSTITELSKÁ ROSTLINNÁ BUŇKA

Obr. 2: Schéma transformace rostlinných buněk pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (převzato z Sheng a Citovsky, 1996).

2.2.2 Binární vektory

Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens* vyžaduje tři hlavní prvky: 1. hraniční oblasti, které obklopují T-DNA a vyčleňují přenášenou oblast; 2. *vir* geny lokalizované na Ti plasmidu; 3. geny lokalizované na bakteriálním chromozomu (Lee a Gelvin, 2008).

Zpočátku byla práce s Ti-plasmidy složitá, protože jsou relativně velké a v agrobakteriu se vyskytují jen v malém počtu kopií. Obtížná je také jejich izolace a manipulace *in vitro* a další nevýhodou je, že se nereplikují v *Escherichia coli*. Oblast T-DNA ze standardních Ti plasmidů má obvykle značnou velikost a neobsahuje restriční místa vhodná pro klonování (Lee a Gelvin, 2008).

Manipulace s Ti-plasmidy byla následně zjednodušena po zjištění, že *vir* oblast a T-DNA pocházející z jednoho plasmidu mohou být odděleny ve dva separátní replikony. Pokud budou tyto replikony umístěny ve stejné buňce *A. tumefaciens*, budou proteiny kódované geny *vir*

schopny působit na T-DNA a umožní její přenos do rostliny (Hoekema et al., 1983). Toto je základní princip plasmidových vektorů, skládajících se ze dvou plasmidů – označovaných jako binární.

Jeden z plasmidů obsahuje úsek virulence s geny pro přenos a integraci T-DNA do rostlinného genomu, druhý plasmid pak obsahuje modifikovanou T-DNA a selekční gen mimo oblast T-DNA (Halford et al., 2011). Onkogeny a geny pro syntézu opinů, odstraněné z T-DNA jsou nahrazeny geny kódujícími selekční a reportérové geny a dalšími zájmovými geny.

Jeden z prvních binárních vektorů, schopných replikace jak v *E. coli*, tak v *A. tumefaciens*, byl nazván pBin19 (Bevan et al., 1984).

2.2.3 *Selekční a reportérové geny*

2.2.3.1 *Selekční geny a jejich využití při transformaci lnu*

Selekční markery přítomné v konstruktu podmiňují toleranci transformovaných buněk rostlin vůči antibiotikům či herbicidům. Slouží tak k rozlišení úspěšně transformovaných pletiv od netransformovaných.

Geny rezistence k antibiotikům jsou v přírodě poměrně rozšířené. Všechny geny používané pro navození rezistence k antibiotikům pocházejí z běžně se vyskytující bakterie *E. coli*.

Pravděpodobně nejvíce užívaným selekčním genem pro dvouděložné rostliny je *nptII* (gen pro neomycin fosfotransferasu) navozující rezistenci ke kanamycinu (také ke geneticinu, paromycinu a neomycinu). Nevýhodou využití selekce na kanamycin je výskyt velkého množství „escapes“, tzn. netransgenních rezistentních explantátů, protože řada rostlin disponuje přirozenou kanamycinovou rezistencí. Netransgenní prýty vznikají také často z netransformovaných buněk, které jsou obklopeny buňkami transformovanými (Jordan a McHughen, 1988; McHughen, 1989).

Hygromycinová rezistence je kódována genem *hpt* (gen pro hygromycin fosfotransferasu). Využití hygromycinu B bylo popsáno jako alternativní způsob antibiotické selekce transformantů u lnu (Rakouský et al., 1999b). Publikováno bylo též použití spectinomycinu pro selekci při transformaci lnu (Bretagne-Sagnard a Chupeau, 1996).

Z genů kódujících rezistenci vůči herbicidům jsou nejpoužívanější *bar* a *pat* (geny pro fosfotricin acetyltransferasu) pocházející z bakterií *Streptomyces hygrosopicus* a *Streptomyces viridochromogenes*. Kódují rezistenci vůči herbicidům založeným na glyfosátu jako účinné látce (Halford et al., 2011).

Vedle rezistence k antibiotikům či herbicidům je možno pro selekci transformovaných rostlin využít i gen *pmi* kódující enzym fosfomanosa isomerasu vyvolávající rezistenci k manose (Joersbo et al., 1998). Úspěšné použití tohoto genu pro selekce při transformacích bylo popsáno také u lnu (Lamblin et al., 2007), přičemž transformační efektivita byla srovnatelná s použitím *nptII* jako selekčního markeru.

2.2.3.2 Reportérové (signální) geny

Jedná se o geny kódující vizuálně detekovatelné produkty, které mohou posloužit jako měřítko stupně exprese transgenů. Jejich expresi lze snadno detekovat a kvantitativně stanovovat. Signální geny jsou připravovány *in vitro* jako chimérické konstrukty fúzí promotorů eukaryotického typu, strukturálních genů kódujících signální enzymy a vhodných terminátorů transkripce.

Mezi nejčastěji používané reportérové geny patří gen *uidA* pro β -glukuronidasu (GUS), gen pro zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein – GFP) izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, a gen pro luciferasu (*lux*) pocházející z bakterie *Vibrio harveyi* či ze světlušky *Photinus pyralis*. Enzym β -glukuronidasa byl izolován z *Escherichia coli* a jeho aktivitu můžeme detekovat dvěma způsoby: fluorescenční metodou se substrátem MUG (4-methyl-umbelliferylglukoronidem), jehož fluorescence je měřena (Jefferson et al., 1987) či histochemickou metodou, která využívá jako indigogenní substrát barvivo X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukuronid) (Jefferson et al., 1987).

Nevýhodou GUS testování je, že se jedná o destruktivní metodu – rostlinné pletivo je analýzou zničeno, zatímco produkty genu pro luciferasu a genu pro GFP mohou být vizualizovány bez destrukce pletiv. Použití genu pro GFP jako reportérového markeru při transformaci lnu bylo detailně popsáno (Hraška et al., 2006).

Vedle výše uvedených reportérových genů je možno využít také gen pro chloramfenikol acetyltransferasu (CAT). Ten způsobuje acetylaci dodaného radioaktivně značeného chloramfenikolu a výsledný produkt může být detekován chromatograficky.

2.2.4 Promotory použité pro transformaci lnu

Konstitutivní CaMV 35S promotor byl použit při transformaci téměř všech doposud modifikovaných druhů rostlin a byl také úspěšně aplikován v mnoha klíčových studiích týkajících se transformace lnu (Rakouský et al., 1999a; McHughen, 2000; Wrobel et al., 2004; Wrobel-Kwiatowska et al., 2007a; Lorenc-Kukula et al., 2007; Preťová et al., 2007; Pavelek et al., 2012; Badere et al., 2014).

Na druhou stranu bylo již u lnu publikováno použití řady specifických promotorů. Jain et al. (1999) popsali izolaci dvou orgánově specifických promotorů z genů *sad1* a *sad2* kódujících SAD (stearoyl-acyl carrier protein desaturase). Promotor *sad2* vykazoval v transgenním lnu silnější aktivitu, takže se jevil jako vhodný kandidát pro užití v transformaci lnu. Následně byly obě sekvence patentovány. Patentován byl také promotor *cn11* (z genu pro conlinin) pro specifickou expresi v semeni lnu (Truksa et al., 2003).

Drexler et al. (2003) testovali čtyři možné promotory pro cílenou expresi v semenech lnu za užití reportérového genu pro GUS. Promotory zahrnovaly regulační oblasti genu kódujícího β -ketoacyl-CoA syntasu (KCS) a genu pro protein napin z řepky olejky (*Brassica napus* L.), promotorové oblasti z „unknown seed protein“ (USP), gen pro legumin (*leb4*) pocházející z bobu (*Vicia faba* L.) a CaMV 35S promotor jako pozitivní kontrolu. Všechny promotory vykazovaly určitou aktivitu, avšak pouze promotory CaMV 35S, LeB4 a USP se jevily jako vhodné pro využití ve transformaci lnu.

Promotor 14-3-3 získaný restrikcí plasmidu pBI101-14-3-3 byl použit pro cílenou expresi ve stonku lnu a jevil se jako vhodný promotor pro transformace přadného lnu (Wrobel et al., 2004).

Testována byla také transkripční aktivita promotoru genu pro pinoresinol-lariciresinol reduktasu (*luplr*) za užití reportérového genu pro GUS během vývoje semen lnu (Hano et al., 2006). Exprese GUS byla patrná v osemení, zatímco ve vegetativních orgánech exprese pozorována nebyla (na rozdíl od kontroly pod CaMV 35S promotorem).

Promotor USP s expresí specifickou pro semena, izolovaný z *Vicia faba* (Bäumlein et al., 1991), který je velmi aktivní od ranných vývojových stádií semene, byl také úspěšně použit pro transformaci lnu (Rui-López et al., 2009).

Exprese reporterového genu pro GUS s intronem pod čtyřmi různými promotory s odlišnou délkou založenými na dříve popsaných sekvencích (Hano et al., 2006) byla testována týmem Renouard et al. (2012).

V recentním článku týkajícím se problematiky RNA interference *fad2* genů u lnu (Chen et al., 2015) byly použity promotor a terminátor pro linin s cílenou expresí v semeni lnu (Patent WO/2001/016340).

2.2.5 *Metody transformace používané u lnu*

Nejpoužívanější metodou pro transformaci lnu je (stejně jako u dalších dvouděložných druhů) transformace hypokotylů za pomoci agrobakteria, popsána u lnu již v roce 1983 (Hepburn et al., 1983).

Buňky lnu mohou být relativně snadno transformovány pomocí *A. tumefaciens* a snadno pěstovány, pokud je aplikována vhodná inokulační/ selekční/ regenerační metoda (Jordan a McHughen, 1988). Byla učiněna řada pokusů, jak zvýšit efektivitu transformačního procesu včetně prodloužení indukční fáze kalusu, odstranění epidermis a prodloužené kokultivace.

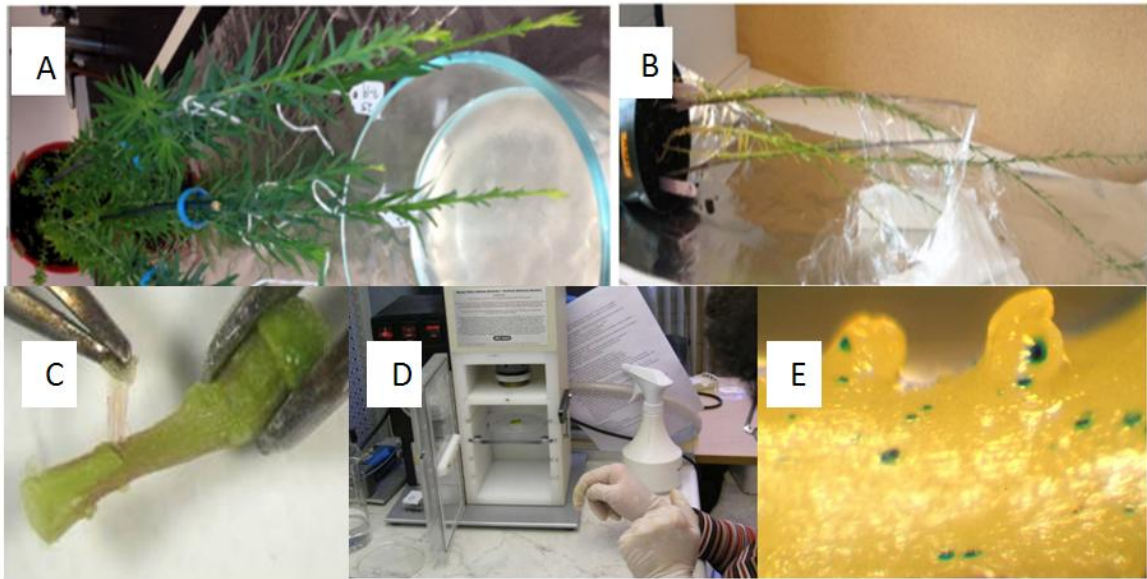
Další možností je agrobakteriální transformace kalusů lnu získaných z prašnickové kultury, které jsou kokultivovány s *A. tumefaciens* (Chen a Dribnenki, 2003; Chen et al., 2008; Chen et al., 2015).

Popsána byla také transformace lnu s užitím *Agrobacterium rhizogenes*. První zmínka o regeneraci lnu transformovaného *A. rhizogenes* pochází z roku 1988 (Zhan et al.). V této práci bylo testováno použití *A. tumefaciens* obsahujícího odzbrojený Ti-plasmid v porovnání s *A. rhizogenes* nesoucím nemodifikovaný Ri plasmid. Z transformace pomocí *A. rhizogenes* byly získány transformované rostliny se zkroucenými listy a krátkými internodii, některé měly více vyvinutý kořenový systém. Výsledky naznačily, že by použití *A. rhizogenes* mohlo být alternativou k transformacím pomocí *A. tumefaciens*.

Úspěšná transformace lnu byla provedena také v protoplastové kultuře (Ling a Binding, 1997). Výsledky nicméně ukázaly, že přímý transfer genů do protoplastů je vhodnou metodou zejména u planých druhů lnu jako je např. snadněji regenerovatelný *Linum suffruticosum*, zatímco u *L. usitatissimum* se zdá být tato technologie méně účinná.

Dalším často užívaným přístupem pro transformaci rostlin je biolistická metoda (particle bombardment). Wijayanto a McHughen (1999) dokumentovali úspěšnou biolistickou transformaci a regeneraci transgenního lnu na standardním selekčním médiu.

Nedávno byla popsána použití metody „floral dip“ pro agrobakteriální transformaci přadného i olejného lnu (Bastaki a Cullis, 2014). Výhodou metody jsou dle autorů jednoduchost, nižší cena a vyšší transformační efektivita. Vybrané metody pro transformaci lnu jsou znázorněny na obr. 3.



Obr.3: Metody transformace *lnu*

a) a b) Agrobakteriální transformace *lnu* metodou floral dip (Bastaki a Cullis, 2014); c) Odstraňování epidermis před transformací hypokotylů pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Vrbová, 2010); d) Zařízení pro biolistickou transformaci (Vrbová, 2008a); e) Histochemické GUS testování po biolistické transformaci (Vrbová, 2008b).

2.3 RNA interference

2.3.1 Princip RNA interference

Objev RNA interference je připisován publikaci popisující vpravení RNA indukující vznik vlásenky (umožňující vznik dvouřetězcové RNA – dsRNA) do *Caenorhabditis elegans*. To mělo za následek snížení exprese genů se stejnou nukleotidovou sekvencí, jako měla původní vpravená RNA (Fire et al., 1998). Za tento objev získali autoři v roce 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

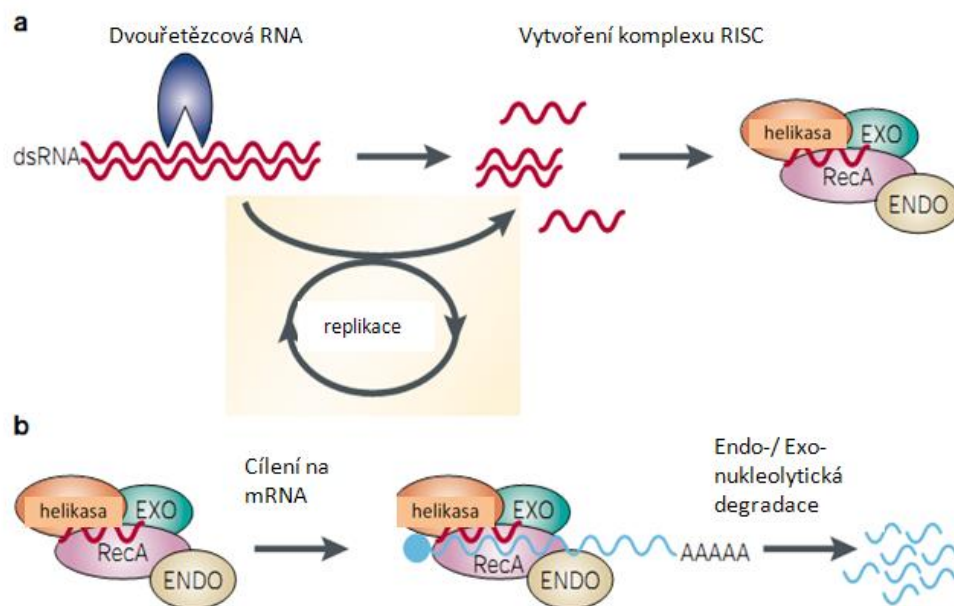
Již několik let před tímto objevem však byly publikovány studie týkající se RNA interference. Ve snaze získat výraznější zbarvení květů, byl do petúnií vložen transgen pro nadprodukcii chalkon synthasy (Napoli et al., 1990; Van der Krol et al. 1990). Navzdory očekáváním však nadprodukce chalkon synthasy nevedla k sytějšímu zbarvení, naopak některé květy byly zcela bílé. Napoli et al. (1990) tento jev označili jako „kosupresi“.

Z použití RNA interference se stal významný nástroj reverzní genetiky umožňující knock down v expresi cílových genů v rostlinách i dalších organismech.

RNA interference je mechanismus post-transkripčního umlčování genů. Umlčování RNA je jednak formou genové regulace, ale také formou obrany genomu proti „invazivním“ nukleovým kyselinám. Rozezná-li buňka aberantní cizorodou RNA, dojde k aktivaci RNA dependetní RNA polymerasy, která syntetizuje druhé komplementární vlákno RNA. Takto vzniklá dvouvláknová RNA je štěpena komplexem enzymů Dicer obsahujícím nukleasu RNA III.

RNA interference může být vyvolána také vnesením fragmentu sekvence cílového genu v sense a antisense orientaci tak, že po transkripci vzniká dvouvláknová (ds)RNA – tzv. vlásenková (hairpin či hp) RNA (Primrose a Twyman, 2006).

Vzniklá dsRNA je štěpena nukleasou zvanou Dicer na krátké duplexy, o velikosti 21 – 25 bp, s přesahy. Tyto duplexy označované jako siRNA (small interfering) následně spoluutváří tzv. RNA induced silencing complex (RISC), který degraduje také komplementární mRNA (obr. 4).



Obr. 4: Průběh RNA interference (převzato z Hammond et al., 2001)
 a) V prvním kroku je vložená dvouřetězcová RNA rozštěpena na 21-25 bp sekvence.
 b) Tyto RNA jsou inkorporovány do komplexu nukleas, nazvaného RISC (RNA induced silencing complex), který štěpí RNA komplementární k původní sekvenci.

2.3.2 Vektory pro vyvolání RNA interference

Nejsnadnějším způsobem indukce tvorby dvouřetězcové RNA je použití vektorových konstruktů pro vznik komplementární vlásenkové RNA.

Fire již v roce 1998 prokázal, že použit pro RNA interferenci sekvenci v sense a antisense orientaci současně je přibližně 10krát efektivnější, než použit jen sense orientaci.

Pro zvýšení stability vlásenky je mezi sense a antisense fragmenty v konstruktech vložena smyčka. Bylo zjištěno, že nejvyšší účinnost PTGS (post-transkripčního umlčování genů) je dosahována, pokud tuto smyčku tvoří sekvence intronu – hpRNA konstrukty obsahující intron dávají větší procento transformantů s umlčeným GOI (gene of interest – genem našeho zájmu) než konstrukty bez intronu (Wesley et al., 2001).

Mezi vektory používanými pro indukci RNA interference (ihpRNA silencing konstrukty) patří například pFGC5941 a MCG161 dostupné z Plant Functional Genomics of Chromatin Consortium (<http://www.chromdb.org>) nebo vektory pHannibal či pHellsgate (Wesley, 2001), pocházející ze CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Austrálie). Vedle pHannibal s rezistencí k ampicilinu je možno použít sesterský vektor pKannibal s rezistencí ke kanamycinu. pHellsgate je tzv. high-throughput konstrukt vhodný např. pro klonování genových knihoven (Engelke et al., 2003).

2.4 Trendy v genovém inženýrství

Výsledkem tradičních metod transgenózy je náhodné začlenění transgenů do genomu rostliny. Biologický efekt transgenů může být tedy značně ovlivněn místem integrace, počtem integrovaných kopií transgenů apod. Při použití progresivních metod tzv. cílené modifikace genomu („Targeted genome modification“ – TGM) je však možné modifikovat genom na specifickém místě a zabránit náhodné inzerci transgenů.

Mezi nástroje TGM nacházející uplatnění ve výzkumu, biotechnologiích i genové terapii patří např. použití TALENs (Tale nucleases transcription activator-like effectors), této metodě je věnována další podkapitola.

V souvislosti s cílenou modifikací genomu (nejen) rostlin bývá velmi často zmiňován systém CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/ Cas (CRISPR-associated) (Belhaj et al., 2013; Xu et al., 2014). Pomocí tohoto systému se bakterie brání bakteriofágům a plasmidům exogenního původu. Systém CRISPR/Cas funguje v podstatě jako analog RNA interference u eukaryot (Makarova et al., 2006). Pokusy se systémem CRISPR byly popsány u *Arabidopsis* a tabáku (Li et al., 2013) či rýže a pšenice (Shan et al., 2013).

Mezi metody umožňující místně specifické modifikování genomu patří také využití tzv. zinc finger nucleases – nukleas „zinc-finger“ (ZFNs). Uvnitř ZFN jsou přítomny dvě oddělené proteinové domény. Jedna pro rozpoznání specifické sekvence DNA a druhá pro endonukleasovou aktivitu (*FokI*). První doména rozpozná místo na DNA, naváže se na něj a allosterickou interakcí přenesení signál na endonukleasovou doménu za vzniku zlomu (Durai et al., 2005). Použití ZFN bylo popsáno např. u tabáku (Townsend et al., 2009) či kukuřice (Shukla et al., 2009).

Dalším nástrojem TGM jsou meganukleasy. Jedná se o přirozeně se vyskytující restriční enzymy s nejvyšší specifitou (rozpoznávací region 12 – 40 bp) (Choulika et al., 1994).

Podobně jako TALENs a ZFNs mohou být připravovány uměle, nevýhodou je však vyšší časová a finanční náročnost.

Můžeme předpokládat další expanzi těchto nových progresivních metod „targeted genome engineering“ (CRISPR, TALENs, ZFNs) jako alternativu k metodám klasického šlechtění rostlin a také běžně užívaných transgenních přístupů.

2.4.1 *TALENs*

Metoda TALENs („Tale nucleases trasciption activator-like effectors“) využívá hlavní faktory virulence umožňující rozmnožování a následné šíření bakterií změnami genové exprese rostlinných buněk. Programované nukleasy typu TALENs představují dobře prostudovanou a vysoce účinnou skupinu chimérických enzymů, sloužící k indukci dvouřetězcových zlomů u celé řady organismů, včetně savců. Tyto umělé enzymy obsahují DNA-vazebnou doménu a druhou doménu pro endonukleasovou aktivitu (*FokI*). Katalytická doména *FokI* pochází z restrikční endonukleasy typu II, objevené u *Flavobacterium okeanoikoites*. Oblast, která váže DNA, byla odstraněna a nahrazena DNA-vázající doménou, odvozenou od „Transcription activator-like effectors“ (TAL efektorů), což je skupina bakteriálních proteinů (z rodu *Xanthomonas*), které vážou promotorové sekvence v hostitelské rostlině a napomáhají infekcím.

Programovatelné nukleasy, včetně TALENs, jsou schopné vytvářet dvouřetězcový zlom (DSB) v požadovaném cílovém místě v DNA (Mahfouz et al., 2011; Christian et al., 2013). Mezi vazebnými sekvencemi TALENového páru je vzdálenost 12 – 16 nukleotidů. Jeden člen páru váže a štěpí jedno vlákno, druhý pak vlákno komplementární. Štěpená DNA obsahuje převis o délce čtyř nukleotidů. Vznik DSB pak vede k mutacím v cílovém místě, které se vyskytnou jako následek chyby během reparačního procesu. DSB je ve většině případů opraven pomocí reparace NHEJ (nehomologní spojování volných konců), která často vede k drobným inzercím nebo delecím. Alternativní způsob reparace je pak HR (homologní rekombinace), která může umožnit vnášení genů nebo jejich částí.

TALENs lze modifikovat a lze jimi snadno manipulovat za účelem požadované cílové specifity. Jejich cílová specifita je totiž určena centrální doménou, tvořenou 33 – 35 aminokyselinami, které jsou tandemově uspořádány, mají modulární charakter a jednoduchý vazebný kód pro rozpoznávání cílové sekvence DNA. Příprava umělých DNA-vazebných domén s požadovanou sekvencí specifitou je možná během relativně krátké doby a s minimálními náklady (Boch et al., 2009). Přesto není zatím užívání TALENs pro TGM

u rostlin tolik rozšířeno jako u jiných organismů. Jedním z důvodů je kolísavá efektivita použití TALENs u rostlin v laboratorních testech (Chen a Gao, 2013).

Změna obsahu a složení mastných kyselin metodou TALENs byla již popsána u sóji (Haun et al., 2014), konkrétně bylo popsáno zvýšení obsahu kyseliny olejové pomocí cílené mutagenese *fad2* genů (*fad2-1*, *fad2-2*). Obdobným způsobem by těchto metod mohlo být využito ve šlechtění lnu.

Využití technologie TALENs se v rámci cílené genomové modifikace rapidně rozmáhá. V posledních čtyřech letech vyšlo množství publikací, týkajících se jak technologie TALENs obecně (Joung a Sander, 2012; Marx, 2012; Pennisi, 2012), tak jejího využití pro genomiku rostlin (Chen a Gao, 2013; Haun et al., 2014; Mahfouz et al., 2011; Cermak et al., 2011).

U *Arabidopsis* byla touto metodou u transgenních linií dosažena frekvence mutagenese 41 – 73 % (Christian et al., 2013). Byla popsána také vysoce úspěšná genová inserce za použití TALENs u protoplastů tabáku (Zhang et al., 2013). V nedávné době byla technologie TALENs využita u rýže, ječmene a kukuřice (Gurushidze et al., 2014; Li et al., 2014; Liang et al., 2014; Shan et al., 2013; Wendt et al., 2013).

2.5 Transgenozu u lnu

2.5.1 Počátky transformace lnu

Len patřil k prvním plodinám geneticky modifikovaným za pomoci DNA rekombinantních technologií. První zmínky o transformaci lnu pocházejí z roku 1983 (Hepburn et al.), k transformaci byly použity bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. První transformační pokusy zaměřené na transfer celé nemodifikované T-DNA *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes* byly postupně nahrazeny integrací modelových prokaryotických genů (Basiran et al., 1987; Dong a McHughen, 1993; Mlynářová et al., 1994; Bretagne-Sagnard a Chupeau, 1996) a specifických genů kódujících ekonomicky významné znaky (Jordan a McHughen, 1988; McHughen, 1989; Mc Hughen a Holm, 1995; a další) do genomu lnu.

Na rozdíl od některých jiných rostlin jsou u lnu transformační a regenerační protokoly již poměrně dobře propracovány. Transformace probíhá s relativně vysokou úspěšností, daří se regenerovat a dopěstovat fertlní rostliny. Transformace je po krátkodobé selekci následných generací stabilní a v porovnání s konvenčními přístupy šlechtění může poskytnout homogenní materiál pro další experimentální činnost i praktické využití. Historické milníky v transformaci lnu jsou shrnuty v tab. 1.

Tab. 1: Historické milníky v transgenozí lnu

Rok	Výsledek	Reference
1983	První zpráva o úspěšné agrobakteriální transformaci buněk lnu	Hebpurn et al., 1983
1987	Buněčné linie lnu rezistentní k sulfonylmočovině	Jordan a McHughen, 1987
	Regenerace prýtů z transformovaného kalusu	Basiran et al., 1987
1988	První transgenní linie lnu s tolerancí ke glyfosátu (Roundup®)	Jordan a McHughen, 1988
1989	Vnesení rezistence k sulfonylmočovině do komerčních odrůd lnu	McHughen, 1989
1991	První testy s transgenním lnem v polních podmínkách	McHughen a Holm, 1991
1991–1996	Optimalizace transformační metodiky a regeneračních protokolů	převážně tým A. McHughena
1995	Odvození a polní testování GM-lnu s tolerancí ke glufosinát-amoniu	McHughen a Holm, 1995
1996	Registrace odrůdy transgenního lnu CDC Triffid pro komerční pěstování	McHughen et al., 1997
1997	Transformace protoplastů u lnu	Ling a Binding, 1997
1999	Genetická transformace lnu s využitím metody „particle bombardment“	Wijayanto a McHughen, 1999
	Vyvinutí tkáňově specifického promotoru z <i>Linum usitatissimum</i> pro využití při transformacích lnu	Jain et al., 1999
	První uvolnění GM lnu do životního prostředí v EU (linie lnu po inzerční mutagenézi T-DNA, náhodně indukované fenotypové změny)	Rakouský et al., 1999a; 2001
od 2000	Probíhají transformace u lnu s využitím nejrůznějších typů GOI – „gene of interest“ a souběžné studie a monitoring rizik pěstování a zpracování GM lnu:	
2001	Byla zrušena registrace transgenního lnu CDC Triffid	www.cabn.ca
2004	Použití tkáňově specifického promotoru pro expresi tří genů potřebných pro syntézu poly-β-hydroxybutyrátu (PHB) ve stonku lnu – produkce biodegradovatelných polymerů	Wróbel et al., 2004
	Zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin v semeni lnu (vneseny geny pro desaturasy a elongasy)	Abbadi et al., 2004
2005	Zvýšená antioxidační kapacita: vnesení genů pro chalkon synthasu, chalkon isomerasu a dihydroflavonol reduktasu	Lorenc-Kukuła et al., 2005
2007	Syntéza polyhydroxybutyrátu, zlepšení elasticity vláken lnu	Wróbel-Kwiatkowska et al., 2007a
	Deficit ligninu, zlepšení mechanických vlastností	Wróbel-Kwiatkowska et al., 2007b
	Rezistence k fusáriu (vnesený gen pro glykosyl transferasu ze <i>Solanum soganandinum</i>), zvýšený obsah flavonoidů	Lorenc-Kukuła et al., 2007
2008	Vnesení genu <i>crtB</i> do lnu, zvýšení obsahu karotenoidů (α-karoten, β-karoten, lutein)	Fujisawa et al., 2008
	Biosyntéza pektinázy	Musialak et al., 2008

Rok	Výsledek	Reference
2009	Syntéza glutathionu, tolerance k oxidativnímu stresu a rezistence k fusáriu	Czuj et al., 2009
	Syntéza ω -3 mastných kyselin v semeni lnu	Rui-López et al., 2009
	Vnesení genu <i>ssgt1</i> , vyšší rezistence k fusáriu, zvýšený obsah flavonoidů	Lorenc-Kukula et al., 2009
	Testování dopadu na životní prostředí (únik transgenů, mezidruhová hybridizace)	Tejklová et al., 2009
2011	Polní experimenty s GM a bio lnem, vyhodnocení dopadu na životní prostředí	Jhala et al., 2011
2012	Vnesený gen pro chalkon synthasu z <i>Petunia hybrida</i> , zvýšení antioxidační kapacity, zvýšená rezistence k fusáriu	Zuk et al., 2012
2013	Vnesení genu <i>aMT1</i> kódujícího savčí metalothionein, zvýšená akumulace těžkých kovů	Vrbová et al., 2013
	Expres chimérického <i>gfp-TUA6</i> využita pro vizualizaci mikrotubulů	Shysha et al., 2013
2014	RNAi silencing genu pro pinoresinol-lariciresinol reduktasu (<i>lup1r</i>), snížení akumulace SDG	Renouard et al., 2014
2015	Zvýšený obsah kyseliny olejové díky RNAi silencingu genů pro FAD2 desaturasu	Chen et al., 2015

2.6 Ovlivnění obsahu a složení mastných kyselin u lnu

2.6.1 *FAD2* desaturasa

2.6.1.1 *FAD2* desaturasa – funkce

FAD2 desaturasa (fatty acid desaturase 2, také Δ 12 či ω 6-desaturasa) je enzym zajišťující vkládání dvojnásobné vazby na Δ 12 pozici olejové kyseliny a umožňuje tak její konverzi na linolovou kyselinu. Vedle kódování desaturasy pro konverzi kyseliny olejové v linolovou byly objasněny a popsány také některé další funkce genu *fad2*.

FAD2 desaturasa hraje například významnou roli při abiotických stresech. Bylo zjištěno, že se u rostlin uplatňuje při toleranci k stresům způsobeným zasolením či nedostatkem světla (Zhang et al., 2012), ačkoliv přesný mechanismus jejího působení zatím nebyl objasněn. *FAD2* desaturasa ovlivňuje také citlivost rostlin k chladu, což souvisí se syntézou polynenasycených membránových fosfolipidů, které jsou při nízkých teplotách důležité pro udržení funkcí buňky a životaschopnosti rostlin (Yang et al., 2006).

Je však pravděpodobné, že gen *fad2* v rostlinách ovlivňuje i další funkce, u kterých souvislost s ním dosud nebyla zjištěna.

2.6.1.2 Geny pro FAD2 desaturasu

Geny pro FAD2 desaturasu reprezentují v rostlinách rozmanitou genovou rodinu. Bylo prokázáno, že např. v genomu sóji se vyskytuje nejméně sedm členů této genové rodiny ve čtyřech oblastech genomu (Tang et al., 2005; Schlueter et al., 2007). Analýza exprese odhalila, že nejméně tři z genů *fad2* jsou exprimovány v semenech a jedna „housekeeping“ forma genu ve většině pletiv (Schlueter et al., 2007).

U olivovníku byly objeveny dvě formy genu *fad2*: *OepFAD2-1* a *OepFAD2-2* (Hernández et al., 2005), ve slunečnici byly detekovány tři formy tohoto genu (Martinez-Rivas et al., 2001). Ortologní geny *fad2* byly klonovány a charakterizovány např. také u bavlníku (Zhang et al., 2009), řepky (Suresha et al., 2013) či světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.), u níž bylo objeveno dokonce jedenáct *fad2* genů (Cao et al., 2013).

S velkou pravděpodobností se vyskytuje větší počet genů pro FAD2 také u tabáku (Yang et al., 2006). Pouze jeden gen pro FAD2 byl však detekován u *Arabidopsis* (Zhang et al., 2012).

2.6.1.3 Geny pro FAD2 desaturasu u lnu setého

Fofana et al. (2004) identifikovali u lnu dvě kopie genu *fad2* exprimované ve vyvíjejících se semenech a získali jejich nekompletní sekvence. Následně byly sekvenovány kompletní FAD2 geny kódující protein 378 (Krasowska et al., 2007), resp. 382 (Khadake et al., 2009) aminokyselinami. Thambugala et al. (2013) objevili u genu *fad2a* ve lnu 21 různých alel kódujících 3 různé izoformy FAD2 a v genu *fad2b* 5 alel kódujících 4 izoformy. Bylo zjištěno, že geny *FAD2A* a *FAD2B* jsou z 82 % identické na úrovni DNA a z 87 % identické na úrovni aminokyselin. Thambugala a Cloutier (2014) popsali, že exprese genů *fad2a* a *fad2b* u lnu se zvyšuje od 8 do 24 dne po začátku kvetení a klesá se zráním. Tři alely genu *fad2a* a čtyři alely genu *fad2b* byly naklonovány (Radovanovic et al., 2014) a následně byla testována jejich exprese v kvasinkách. Obě izoformy FAD2 vykazovaly určitou aktivitu, nicméně byl pozorován průkazný rozdíl v aktivitě obou enzymů ve prospěch FAD2B. Thambugala a Cloutier (2014) i Radovanovic et al. (2014) shodně potvrdili, že v obou známých *fad2* genech nejsou žádné introny.

You et al. (2014) identifikovali u lnu vedle dvou dříve známých *fad2* genů dalších 13 genů *fad2* genové rodiny. Dvanáct z nich tvoří šest párů duplikovaných genů, některé z genů však nejsou exprimovány. Bylo zjištěno, že ani nově identifikované *fad2* geny neobsahují introny. Klíčovou roli pro obsah mastných kyselin hrají duplikované páry genů *fad2a-1/fad2a-2* a *fad2b-1/fad2b-2*, které jsou silně exprimovány.

2.6.2 *Ovlivnění obsahu mastných kyselin u lnu genetickou modifikací*

Byla již publikována řada prací týkajících se modifikace obsahu a složení mastných kyselin v oleji lnu pomocí transgenoz. Syntéza ω -3 mastných kyselin v semeni lnu byla zvýšena vnesením genu pro Δ 6-desaturasu pocházejícího z *Primula vialii* (Rui-López et al., 2009). V semenech lnu tak byla umožněna produkce stearidonové kyseliny, která se běžně vyskytuje jen u několika málo rostlinných čeledí (zejména *Boraginaceae* a *Primulaceae*). Δ 6-desaturasa z *Primula vialii* využívá jako substrát kyselinu α -linolenovou, takže u transgenních rostlin docházelo k akumulaci kyseliny stearidonové, ale ne kyseliny γ -linolenové.

Len je považován za dobrého kandidáta pro syntézu SDA (kyseliny stearidonové) díky vysokému obsahu endogenní α -linolenové kyseliny (ALA). SDA a GLA (γ -linolenová) byly akumulovány 10x více oproti kontrole v transgenním lnu obsahujícím gen pro desaturasu z brutnáku lékařského (Qiu et al., 2002). Celkové množství těchto mastných kyselin v semeni však představovalo max. 2 %, což bylo pravděpodobně způsobeno slabou aktivitou použitého promotoru (pomotor pro napin pocházející z řepky).

Zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin (MK) v semeni lnu bylo dosaženo vnesením genů pro acyl-desaturasy a elongasy z mechu (*Physcomitrella patens*), brutnáku (*Borago officinalis*) a rozsivky (*Phaeodactylum tricornutum*). Výsledkem byla vysoká akumulace ω -6 mastných kyselin obsahujících 18 atomů uhlíku a až 5 % polynenasycených MK obsahujících 20 atomů uhlíku, včetně kyseliny arachidonové a eikosapentaenové (Abbadí et al., 2004).

Byly též popsány experimenty, ve kterých ovlivnění obsahu MK ve lnu bylo spíše vedlejším produktem: např. při pokusu vytvořit len se zlepšenými antioxidačními vlastnostmi byla vnesenými geny ovlivněna i skladba mastných kyselin (Lorenc-Kukuła et al., 2005). Vytvořený konstrukt obsahoval geny pro enzymy zapojené do syntézy flavonoidů: chalkon synthasu, chalkon isomerasu a dihydroflavonol reduktasu, pocházející z *Petunia hybrida*. U transgenních rostlin byl vedle vyššího antioxidačního potenciálu a vyšší rezistence k *Fusarium culmorum* pozorován nárůst mononenasycených mastných kyselin a slabý pokles obsahu polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Také byl pozorován zvýšený podíl kyseliny stearové a olejové.

Stejný tým (Lorenc-Kukuła et al., 2009) popsal výsledky vnesení genu *ssgt1* pro glykosyl transferasu ze *Solanum soganandinum* do lnu, se záměrem zvýšit rezistenci k patogenům. V transgenních rostlinách autoři pozorovali vyšší obsah flavonoidů a vyšší hladinu *sekoisolariciresinolu* (SDG). Patrné bylo i zvýšení obsahu nenasycených MK.

Odezvou na vnesený transgen pro chalkon syntasu pocházející z rostliny *Petunia hybrida* bylo u lnu zvýšení antioxidační kapacity oleje a také zvýšená rezistence k fusáriu. V transformovaných rostlinách bylo zjištěno zvýšené množství nenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny α -linolenové (Zuk et al., 2012).

Recentně bylo poprvé popsáno cílené zvyšování obsahu kyseliny olejové prostřednictvím metod genového inženýrství za použití RNA interference genů pro *fad2* (*fad2-1* a *fad2-2*). (Chen et al., 2015). V této práci bylo pozorováno zvýšení obsahu kyseliny olejové v semeni lnu až na 80 %.

S rozvojem nových technik genového inženýrství (TALENs, CRISPR/Cas) se dá předpokládat jejich použití pro změnu obsahu mastných kyselin v plodinách.

2.6.3 *Použití RNA interference genu pro FAD2 desaturasu*

RNA interference genu *fad2* byla u lnu poprvé popsána v letošním roce (Chen et al., 2015), nicméně již dříve byla s úspěchem provedena u řady dalších rostlin.

Úspěšně proběhlo umlčení genu pro FAD2 desaturasu pomocí RNA interference u *Arabidopsis thaliana* (Stoutjesdijk et al., 2002). Ve výsledku byla u 75 % rostlin transformovaných konstruktem pro hpRNA prokázána snížená aktivita FAD2. V některých transgenních liniích byla aktivita FAD2 stejně nízká jako u mutantů s nulovou alelou. Transgenní linie byly testovány po pět generací, během kterých nebyla patrná žádná změna ve stupni silencingu. V další publikaci popisující použití RNAi umlčení genu pro FAD2 u *Arabidopsis* bylo pozorováno zvýšení obsahu kyseliny olejové z 15 % na 63 % (Belide et al., 2012).

Konstrukt pro RNA interferenci genu *fad2* byl testován také u rostlin tabáku (Yang et al., 2006). Šlo o první publikaci týkající se tkáňově specifických efektů v transgenních rostlinách při použití RNA interference genu *fad2*. Kromě stonku bylo výsledné množství kyseliny olejové v transgenních rostlinách ve všech orgánech vyšší v porovnání s netransgenními rostlinami. Navzdory silencingu však byly v rostlině pozorovány nízké úrovně *fad2* transkriptů, které mohou být dostatečné pro desaturační aktivitu.

Umlčení genu *fad2* bylo použito také ke tvorbě semen bavlníku s vysokým obsahem kyseliny olejové a stearové a současným snížením obsahu kyseliny palmitové a linoleové (Liu et al., 2002). Použití konstruktů pro RNA interferenci genu pro FAD2 desaturasu zvýšilo

obsah kyseliny olejové průměrně ze 13 % na 78 % ve více než polovině z 29 testovaných transgenních linií.

V roce 2011 byly nezávisle na sobě publikovány dvě práce popisující aplikaci RNA interference genu pro FAD2 a tím zvýšení obsahu kyseliny olejové u sóji (Chen et al., 2011 a Wagner et al., 2011). Chen et al. (2011) pozorovali jako následek RNA interference zvýšení obsahu kyseliny olejové z 16 na 55 %. Pro tvorbu konstruktů použili sekvenci genu *fad2-1* o délce 850 bp, kterou do vektoru vkládali pouze v jedné orientaci. Wagner et al. (2011) popisují zvýšení obsahu olejové kyseliny z 20 % na více než 80 %, za použití 420 bp dlouhého fragmentu, který byl do vektoru vložen ve směru sense a antisense, spolu s genem *fatb* (pro snížení obsahu kyseliny palmitové).

Zvýšení obsahu kyseliny olejové prostřednictvím transformace konstruktem pro umlčení *fad2* genu bylo dosaženo také u řepky (*Brassica napus*) (Jung et al., 2011; Tian et al., 2011) a rýže (Zaplin et al., 2013).

2.7 Potenciální rizika spojená s pěstováním a využíváním GM lnu

Jako všechny nové technologie i genové inženýrství vzbuzuje obavy, zejména ve spojení s komercializací geneticky upravených plodin. Skeptici poukazují, vedle různých možných zdravotních dopadů, zejména na potenciální nebezpečí přenosu transgenů pylem a následnou introgresi s planými příbuznými druhy, což by vedlo ke změnám biodiverzity.

Nutnou podmínkou pro pěstování transgenního lnu musí být tzv. ERA (environmental risk assessment) analýzy, tzn. testy hodnotící možný dopad na životní prostředí. Je také potřeba testovat, zda se pěstovaný GM len může stát plevelem a zkoumat dopady GMO na necílové organismy a biodiverzitu.

Popsáno bylo použití GM lnu ke krmivářským studiím. Zkrmovaná GM linie lnu se zvýšeným obsahem flavonoidů neměla žádný nežádoucí efekt na střevní mikroflóru králíků (Místa et al., 2011).

Problematika přenosu pylu mezi GM plodinami a planě rostoucími rostlinami byla zmiňována v celé řadě publikací (Beckie et al., 2003; Hall et al., 2003; Warwick a Stewart, 2005; Jhala et al., 2008, 2009, 2011). Pokud by transgen nepřinášel určitou výhodu týkající se životaschopnosti (selekční výhodu, např. toleranci k herbicidu), je nepravděpodobné, že by GM len mohl být invazivní.

Jhala et al. (2008) popsali schopnost lnu hybridizovat nejméně s devíti druhy *Linum* vyskytujícími se v Asii a Evropě, které mají stejné chromozomové číslo jako pěstovaný len

setý (n = 15). V Kanadě bylo popsáno devět druhů lnu, nicméně pouze *L. rigidum* Pursh var. *rigidum* a *L. sulcatum* Riddell mají shodné chromozomové číslo s kulturním lnem (Jhala et al. 2009).

Rakouský et al. (2004), Griga et al. (2008), Tejklová et al. (2009) a Tejklová et al. (nepublikovaná data) popsali možnosti úniku transgenů prostřednictvím nekontrolovaného křížení mezi transformovaným a netransformovaným lnem. Byly určeny frekvence přirozeného křížení mezi testovanými rostlinami a maximální vzdálenost přenosu pylu. Testování bylo zaměřeno také na mezidruhovou hybridizaci mezi *L. usitatissimum* a *L. flavum*, jediným planým druhem lnu v České republice a střední Evropě potenciálně křížitelným s kulturním lnem. Výsledky ukázaly, že pravděpodobnost nekontrolovaného křížení mezi GM lnem a *L. flavum* je extrémně nízká (Tejklová et al., nepublikovaná data).

Únik pylu je však pouze jednou z možností nechtěného úniku transgenů z GM lnu. Zkušenosti s GM odrůdou CDC Triffid ukazují, že záměna osiva běžného lnu a GM lnu či jejich smíchání může vést k zásadním ekonomickým ztrátám a obchodním překážkám.

2.7.1 *CDC Triffid*

CDC Triffid byla první a doposud jediná transgenní odrůda lnu. Z vědeckého a šlechtitelského pohledu zůstane průkopníkem mezi GM plodinami.

Triffid obsahoval gen pro toleranci k herbicidu (McHughen et al., 1997), konkrétně gen pro acetolaktát syntasů z *Arabidopsis* původně popsaný a klonovaný Haughnem et al. (1988). Polní pokusy začaly již na konci 80. let, zatímco schvalovací proces byl zahájen v roce 1994 (Viju et al., 2014), což naznačuje, že vědci měli do značné míry náskok před legislativou. Pro komerční využití v Kanadě byl schválen v roce 1998, následující rok však Evropa pohrozila zastavením dovozu lnu z Kanady (Ryan a Smyth, 2012). CDC Triffid byl následně v roce 2001 deregistrován, což byl patrně první a jediný případ deregistrace odrůdy v historii.

V roce 2009 byl však Triffid detekován v potravinách v EU a následně v dodávkách lnu z Kanady. V reakci na tuto událost Evropa zastavila dovoz lnu z Kanady (Ryan a Smyth, 2012). Vyšly mnohé publikace s návody na detekci odrůdy Triffid - jak na základě PCR (Nakamura et al., 2010), tak i kvantitativní PCR (Vanella et al., 2014).

2.8 Pěstování GM lnu – současný stav

Evropská unie je významným protagonistou v mezinárodní debatě o geneticky modifikovaných produktech. Převládá zde velmi obezřetný až skeptický přístup ke GMO. Důkazem toho je málo evidovaných ploch polních pokusů s GM plodinami, výrazně nižší počet GM plodin schválených pro uvedení do oběhu a nepoměrně nižší počet GM plodin schválených pro pěstování (pouze dvě ve srovnání s 25 ve světě). Navzdory redukovaným plochám s GM plodinami v EU, je Evropská unie velkým dovozcem GM plodin, což evropské pěstitele jednoznačně znevýhodňuje.

Polní pokusy s GM lnem byly v Evropě doposud prováděny ve třech zemích (Švédsko, Polsko, ČR). Modifikace byly provedeny s cílem změny složení oleje, obsahu flavonoidů, zvýšení elasticity (výroba bioplastů), zvýšené toleranci k herbicidům, hmyzu a houbám a zlepšení schopnosti akumulace těžkých kovů. Plocha polních pokusů s GM lnem byla v ČR v roce 2014 0,007 ha (zdroj: Ministerstvo zemědělství). Navzdory schválení pěstování v Kanadě (kultivar CDC Triffid) není žádný GM len v současnosti nikde na světě komerčně pěstován (<http://www.gmo-compass.org>).

Je jasné, že GM produkty nemohou uspět na trhu bez souhlasu společnosti. Nabízí se zejména využití GMO pro nepotravinářské účely, což by mohlo být lépe akceptováno společností – v případě lnu např. fytoremediace. Dále se nabízí nové přístupy jako cisgenoze nebo metody cílených modifikací genomu, na které by mohlo být nahlíženo „lépe“ než na klasické genetické modifikace.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce bylo vytvořit konstrukt pro transformaci lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) indukující změnu obsahu a složení oleje v semenech (konkrétně zvýšení obsahu kyseliny olejové v semeni), transformace lnu, selekce a testování získaných rostlin.

První z přístupů k dosažení tohoto cíle spočíval v inaktivaci genu *fad2* pomocí principu RNA interference. Konstrukt byl vytvořen pro expresi dvouřetězcové RNA – mezi oběma fragmenty genu pro FAD2 obsahoval intron (struktura optimální pro tvorbu vlásenky).

Pro testování funkčnosti konstruktů před samotnou transformací lnu setého byla vybrána metoda transformace modelového systému tabáku. Po transformaci lnu byly regenerované rostliny testovány histochemicky, pomocí PCR a kvantitativní PCR. Dále byly prováděny analýzy obsahu a složení oleje v semenech lnu.

Druhým přístupem bylo využití progresivní metody TALENs (Tale nucleases transcription activator-like effectors). Byla provedena transformace lnu setého TALENs konstrukty, následně probíhala selekce a testování získaných vzorků (kalusů, prýtů, rostlin) pomocí metod molekulární genetiky (enrichment PCR, sekvenování).

Pro práci byly zvoleny následující dílčí cíle:

- 1) tvorba konstruktů pro dosažení RNA interference genu *fad2* u lnu
- 2) transformace modelového systému (rostliny tabáku)
- 3) transformace lnu a regenerace transformovaných rostlin
- 4) testování rostlin transformovaných konstruktem pro vyvolání RNAi (histochemicky, pomocí PCR, kvantitativní PCR, analýzy změny obsahu a složení oleje)
- 5) agrobakteriální transformace hypokotylů s užitím konstruktů TALENs indukujících vznik mutace v genech *fad2*
- 6) transformace lnu metodou floral dip za užití konstruktů TALENs a kontrolního konstruktů obsahujícího gen *uidA*
- 7) testování explantátů/rostlin transformovaných konstrukty TALENs (PCR, enrichment PCR, sekvenování)

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Pro kontrolní transformaci byly použity rostliny tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.), linie SR-1, které byly kultivovány *in vitro*.

Pro transformaci RNAi konstruktem byla použita semena nízkolinolenové linie olejného lnu AGT 1538/07 a responzivní genotyp linie AGT 583/05 s klasickou skladbou mastných kyselin, pro transformaci konstrukty TALENs byla použita linie AGT 583/05. Pro transformaci metodou floral dip byl použit genotyp olejného lnu AGT 145.

AGT je zkratka pro šlechtitelské linie lnu společnosti Agritec. Osivo bylo poskytnuto ze šlechtitelského programu lnu firmy Agritec, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. (šlechtitelky RNDr. E. Tejklová, Ing. M. Vrbová, Ph.D.).

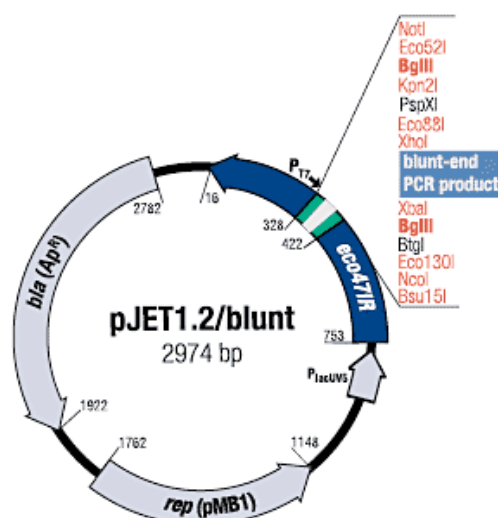
4.1.2 Bakteriální kultury

Pro namnožení plasmidů byla použita kultura kompetentních buněk *Escherichia coli* kmen Top 10. Transformace rostlin byla prováděna prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* kmenů EHA105 a GV3101.

Bakteriálních kultury (*E. coli* i *A. tumefaciens*) byly dlouhodobě uchovávány v 10 – 20% roztoku glycerolu při –80 °C.

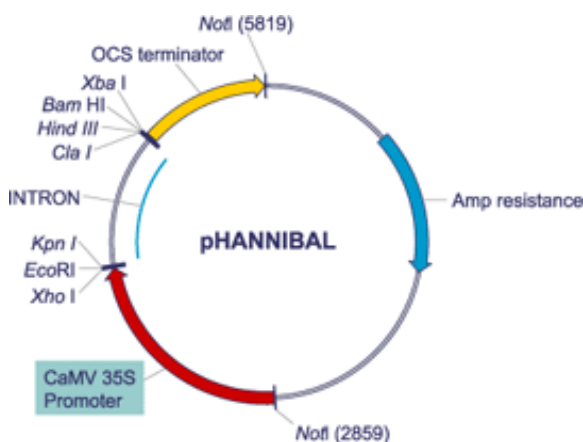
4.1.3 Použité plasmidy

Pro kontrolní sekvenaci PCR produktu genu *fad2* byl použit pJET1.2/ blunt Cloning Vector (obr. 5), který je součástí CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Litva).



Obr. 5: Schéma vektoru pJET (Fermentas, Vilnius, Litva)

Pro tvorbu expresní kazety byl použit vektor pHannibal (CSIRO, Canberra, Austrálie), který umožňuje tvorbu konstruktů pro RNA interferenci (obr. 6).

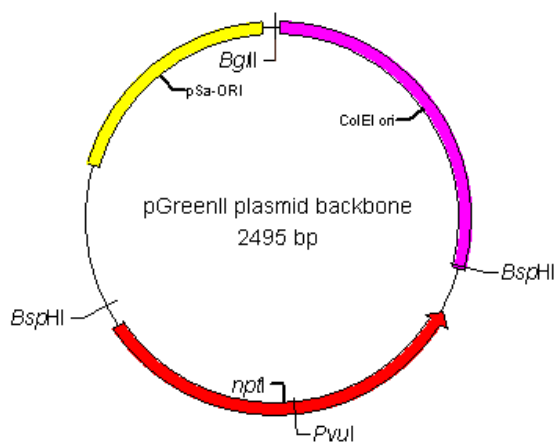


Obr. 6: Schéma vektoru pHannibal

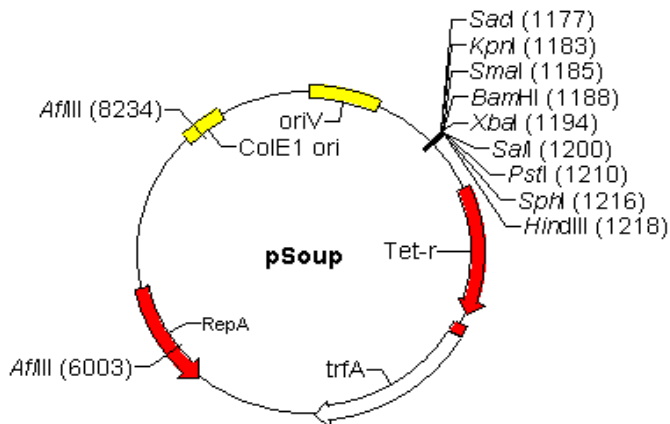
Pro tvorbu finálního konstruktu byl použit plasmid pGreenII (obr. 7), do kterého byla vložena expresní kazeta vyštěpená z pHannibal. Do klonovacího místa v oblasti T-DNA byl vložen reportérový gen *uidA*, který kóduje enzym β -glukuronidasu (GUS) s promotorem 35S. Dále byl k vnitřní straně levé hranice (LB) vložen selekční gen *bar* pro rezistenci rostlin k fosfotricinu (PPT) s promotorem nos (nopalín syntáza).

Mimo oblast T-DNA obsahuje pGreenII tradiční součásti binárních plasmidů pro transformaci rostlin jako jsou počátek replikace pSa *ori* pro replikaci v *Agrobacterium tumefaciens*, počátek replikace ColE1 pro replikaci v *Escherichia coli* a gen *nptII* pro bakteriální rezistenci k antibiotiku kanamycin.

Pomocný plasmid pSoup (obr. 8) obsahuje ColE1 *ori* pro replikaci v *E. coli*, mnohočetné klonovací místo, gen *RepA* umožňující replikaci v *A. tumefaciens* a gen pro tetracyklinovou rezistenci.

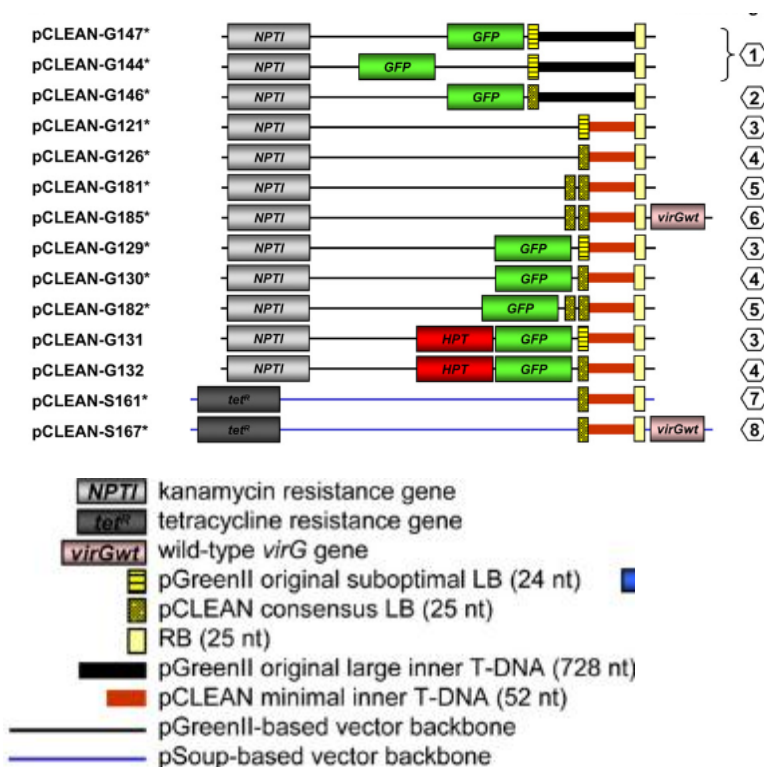


Obr. 7: Schéma vektoru pGreenII



Obr. 8: Schéma vektoru pSoup (helper plasmid)

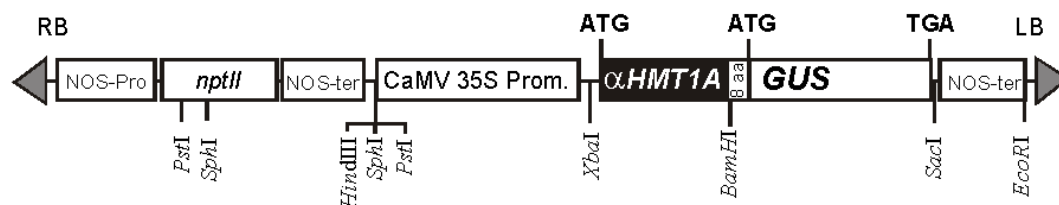
Pro tvorbu konstruktů TALENs byl využit vektorový systém pClean (Thole et al., 2007), konkrétně vektor G-126 spolu s pomocným pCLEAN S-167. Schéma vektorového systému pClean je uvedeno na obr. 9.



Obr. 9: Schéma série vektorových konstruktů pClean (Thole et al., 2007)

Jako kontrola obsahující gen *uidA* při transformaci metodou floral dip byl použit plasmid pBI α MT (Vrbová et al., 2013) vytvořený z plasmidu pBI121 (Clontech). Oblast T-DNA tohoto konstruktu je zachycena na obr. 10. Konstrukt obsahuje kazetu pro expresi fúzního

proteinu α HMT1A-GUS. α HMT1A značí α doménu savčího metalothioneinu 1A. Transformanti vzniklí s využitím tohoto konstruktu jsou ve firmě Agritec využíváni pro fytoremediační pokusy.



Obr. 10: Schéma T-DNA vektorového konstruktů pBI α MT

4.1.4 Použitá média, roztoky

Tab. 2: Použitá kultivační média pro bakterie

Název média	Komponenty/ 1l	agar	antibiotika	pH
Tekuté LB (Ausubel et al., 1992)	10 g trypton 5 g kvasničný extrakt	-	100 mg.l ⁻¹ ampicilin nebo 50 mg.l ⁻¹ kanamycin	7,2
Pevné LB (Ausubel et al., 1992)	5 g NaCl 1 ml 1 M NaOH	15g	(kanamycin + rifampicin pro <i>A. tumefacines</i>)	7,2
SOB médium (Ausubel et al., 1992)	20 g trypton 5 g kvasničný extrakt 0,5 g NaCl 0,186 g KCl	-	-	-
SOC médium (Ausubel et al., 1992)	K SOB médiu: 5 ml 2M MgCl ₂ 20 ml 1M glukosy	-	-	-

4.1.4.1 Média pro kultivaci transformovaného tabáku

MS 0/0 médium (na objem 1 l):

- 4,3 g Murashige a Skoog mikro a makro prvky (Duchefa)
- 30 g sacharosa
- 2 ml 5x B1-inositol
- 3 ml Miller`s I

5x B1-inositol (na objem 50 ml):

- 0,025 g thiamin
- 2,5 g myo-inositol
- 50 μ l 0,5 M EDTA
- Miller`s I (na objem 50 ml):
- 3 g KH₂PO₄ rozpuštěn ve vodě

MS 0,1/1 médium – kokultivační (na objem 1 l):

MS 0/0 obsahující:

- 6 g Phytoagar (Duchefa)
- 1,0 mg BAP (1 ml zás. roztoku 1mg/ml v KOH)
- 0,1 mg NAA (100 µl zás roztoku 1 mg/ml v 70% ethanolu)

pH upravené na 5,7 (pomocí KOH), sterilizace v autoklávu

MS 0,1/1 médium – selekční (na objem 1 l):

MS 0,1/1 médium – kokultivační obsahující:

- 300 mg.l⁻¹ augmentin (rozpuštěn ve vodě)
- 2 mg.l⁻¹ fosfotricinu (PPT) (rozpuštěn ve vodě)
- 500 mg.l⁻¹ timentin (rozpuštěn ve vodě)

Gamborg B5 médium (na objem 1 l):

- 3,163 g B5 Gamborg makro a mikro prvky + vitamíny (Duchefa)
- 0,5 g aktivní uhlí
- 10 g sacharosa
- 8 g Phytoagar (Duchefa)

pH upravené na 5,8

- 300 mg.l⁻¹ augmentin
- 500 mg.l⁻¹ timentin

4.1.4.2 Média pro kultivaci transformovaného lnu

Základní MS médium: pH 5,8 (Murashige a Skoog, 1962)

MS1 selekční médium

MS obsahující :

- 2 mg.l⁻¹ PPT
- 500 mg.l⁻¹ timentinu
- 200 mg.l⁻¹ augmentinu
- 1 mg.l⁻¹ BAP
- 0,02 mg.l⁻¹ NAA

MS2 selekční médium

MS obsahující:

- 2 mg.l⁻¹ PPT
- 300 mg.l⁻¹ timentinu
- 100 mg.l⁻¹ augmentinu
- 1 mg.l⁻¹ BAP
- 0,02 mg.l⁻¹ NAA

MS3 selekční médium

MS obsahující:

- 2 mg.l⁻¹ PPT
- 250 mg.l⁻¹ timentinu
- 1 mg.l⁻¹ BAP
- 0,02 mg.l⁻¹ NAA

R médium zakořeňovací

MS médium doplněné:

- 0,005 mg.l⁻¹ NAA
- 0,5 mg.l⁻¹ PPT
- 15 mg timentinu

4.1.4.3 *Roztoky použité pro histochemický GUS test*

Připraveno podle Fütterer et al. (1995).

Roztok pro histochemický GUS test:

- 100 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄
- 10 mM Na₂EDTA
- 5 mM K₄[FeII(CN)₆]
- 5 mM K₃[FeIII(CN)₆]
- 0,1% Triton X-100
- 0,3% X-Gluc

pH 7 – 8

Příprava 1 ml roztoku:

- 100 μ l 1M Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,0
- 20 μ l 0,5 M Na₂EDTA
- 100 μ l 50 mM K₄[FeII(CN)₆]
- 100 μ l 50 mM K₃[FeIII(CN)₆]
- 30 μ l zásobní roztok X-Gluc
- 10 μ l 10% Triton 100
- 640 μ l sterilní destilovaná voda

1M Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7, uchováno při -20 °C

- 6,4% objem 1M Na₂HPO₄
- 3,6% objem KH₂PO₄
- 90% objem H₂O

50 mM K₄[FeII(CN)₆], uchováno při -20 °C

- 0,211 g K₄[FeII(CN)₆] rozpuštěno v 10 ml vody a přefiltrováno přes sterilní filtr

50 mM K₃[FeIII(CN)₆], uchováno při -20 °C

- 0,165 g K₃[FeIII(CN)₆] rozpuštěno v 10 ml vody a přefiltrováno přes sterilní filtr

10% Triton X-100 (vodní roztok)

Zásobní roztok X-Gluc (Castle a Morris, 1994)

- 0,1 mg/ μ l X-Gluc rozpuštěno v N,N-dimethylformamidu

4.2 Metodika

4.2.1 Tvorba konstruktů *pWellFAD2i*

4.2.1.1 Izolace genomové DNA

Pro amplifikaci fragmentu genu *fad2* lnu setého byla použita genomová DNA linie AGT 583/05.

Listy rostlin byly homogenizovány v kapalném dusíku a pomocí Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) z nich byla izolována genomová DNA dle

protokolu výrobce. DNA získaná z přibližně 100 mg materiálu byla rozpuštěna ve 200 μ l elučního pufru a zamražena.

4.2.1.2 PCR amplifikace fragmentu genu *fad2*

Pro potřeby klonovacích kroků byly do PCR primerů syntézou zabudovány sekvence pro restriční místa *XhoI/EcoRI* v případě sense fragmentu a *XbaI/HindIII* v případě antisense fragmentu.

Použité primery (první dva pro antisense orientaci, druhý pár pro sense fragment) jsou zobrazeny v tabulce 3.

Tab. 3: PCR primery navržené pro amplifikaci fragmentů genu *fad2* (včetně přídatných restričních míst)

Název primeru	Sekvence (5'-3')
FAD-R2-HindIII	AAGCTTCTCATCACGATCAAGCGATCC
FAD-F2-XbaI	TCTAGAAGGTGGAAGAATGCCAGTGC
FAD-R1-EcoRI	GAATTCCTCATCACGATCAAGCGATCC
FAD-F1-XhoI	CTCGAGAGGTGGAAGAATGCCAGTGC

PCR probíhala v termálním cyklu Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Německo) v objemu 15 μ l v 0,2ml zkumavkách (TreffLab, Degersheim, Švýcarsko).

Složení reakční směsi bylo: 20 – 50 ng DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 μ M každého nukleotidu, 0,4 μ M každého primeru a 1 U Dream Taq Polymerase (Fermentas, Vilnius, Litva).

Teplotní profil PCR reakce byl: 95 °C/ 9 min + 40x (95 °C/ 45 s, 54 °C/ 1 min, 72 °C/ 90 s) se závěrečnou elongací 72 °C/ 7 min.

Produkty PCR reakce byly rozděleny na 1,5% agarózovém gelu (Serva, Duisburg, Německo) barveném ethidium bromidem, nasvíceny UV světlem a nasnímány.

Následně byly vyřezány z gelu a purifikovány pomocí Invisorb® Fragment CleanUp (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) dle protokolu výrobce.

4.2.1.3 Klonování do vektoru pJET a kontrolní sekvenace

Klonování do vektoru pJET1.2/ blunt Cloning Vector bylo provedeno pomocí kitu CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Litva) dle návodu výrobce (Sticky-End Cloning protocol).

Transformace *E. coli* byla provedena podle protokolu Transformation Protocol from Overnight Bacterial Culture pomocí kitu TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas, Vilnius, Litva).

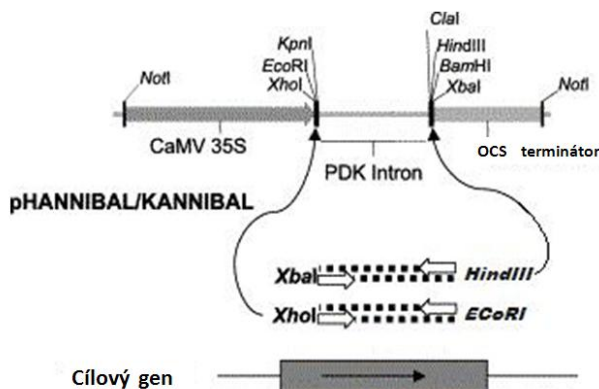
Plasmidová DNA byla izolována pomocí kitu Invisorb Spin Plasmid Mini Two (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) a její koncentrace byla změřena pomocí spektrofotometru.

Následně byla připravena sekvenční reakce o celkovém objemu 8 μ l, sestávající z 5 pmol primeru, DNA v množství 10 ng/100 bp celkové délky produktu a vody.

Směs připravená pro sekvenaci byla odeslána do Laboratoře sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Výsledné sekvence byly analyzovány v programu Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Stejným způsobem byla provedena i sekvence dalších vzorků v rámci této práce.

4.2.1.4 Klonování fragmentů genu *fad2* do *pHannibal*

Po ověření sekvence byly PCR produkty vyštěpeny pomocí restričních endonukleas, vyřezány z gelu, purifikovány a následně postupně klonovány do vektoru *pHannibal*.



Obr. 11: Schéma klonování do vektoru *pHannibal*

PCR fragment byl klonován v sense (přímé) orientaci do polylinkeru *XhoI/EcoRI/KpnI* a v antisense (komplementární) orientaci do polylinkeru *ClaI/HindIII/BamHI/XbaI*. Ligace fragmentů *fad2* byla provedena postupně pomocí přidávaných restričních míst *XhoI/EcoRI* a následně *XbaI/HindIII* se štěpeným plasmidem *pHANNIBAL* (schéma klonování je znázorněno na obr. 11).

Pro restrikcí byly použity restriční enzymy a pufrы výrobce Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Složení restričních směsí je uvedeno v tabulkách 4 a 5.

Tab. 4: Reakční směs pro štěpení plasmidů *pJET* (obsahující *fad2* fragment s restričními místy pro sense orientaci) a *pHannibal*

Reagencie	<i>pJET</i> (μ l)	<i>pHannibal</i> (μ l)
Ultračistá H ₂ O	13	14,5
Pufr Tango	4	4
Restriční enzymy	<i>XhoI</i> 0,5 <i>EcoRI</i> 0,5	<i>XhoI</i> 0,5 <i>EcoRI</i> 0,5
DNA	2	0,5
celkem	20	

Tab. 5: Reakční směs pro štěpení plasmidů pJET (obsahující fad2 fragment pro antisense orientaci) a pHannibal obsahujícího klonovaný fragment fad2 v sense orientaci

Reagencie	pJET (μl)	pHannibal (μl)
Ultračistá H ₂ O	14,5	16
Pufr Tango	2	2
Restrikční enzymy	HindIII 1 XbaI 0,5	HindIII 1 XbaI 0,5
DNA	2	0,5
celkem	20	

Po proběhnutí restrikční reakce byla provedena defosforylace vektoru pHannibal přidáním 0,5 μl alkalické fosfatasy a 2,2 μl odpovídajícího pufru, vzorek byl inkubován dalších 30 min při 37 °C.

Fragmenty byly po restrikci a elektroforéze vyříznuty z gelu a purifikovány pomocí Invisorb® Fragment CleanUp (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) dle protokolu výrobce.

Koncentrace plasmidu i inzertu byla měřena pomocí spektrofotometru. Dle koncentrace bylo optimalizováno množství DNA přidané do reakční směsi pro ligaci. Pro ligaci je vhodné použít molární poměr inzertu k vektoru 3:1 (obr. 12). Složení reakčních směsí je zaznamenáno v tabulkách 6 a 7, míchání ligačních reakcí probíhalo na ledu.

$$\frac{\text{ng plasmidu} \times \text{velikost inzertu v kb}}{\text{velikost plasmidu v kb}} \times \frac{3}{1} = \text{ng inzertu}$$

Obr. 12: Vzorec pro výpočet optimálního množství inzertu a plasmidu pro ligační reakci

Tab. 6: Složení ligační směsi při klonování sense fragmentu fad2 do vektoru pHannibal

Reagencie	Objem (μl)
T4 DNA Ligase (Promega)	1
2x Rapid Ligation Buffer	10
inzert	4
vektor	5
celkem	20

Tab. 7: Složení ligační směsi při klonování antisense fragmentu fad2 do pHannibal obsahujícího fragment fad2 v sense orientaci

Reagencie	Objem (μl)
T4 DNA Ligase (Promega)	1
2x Rapid Ligation Buffer	10
inzert	3
vektor	6
celkem	20

Reakce probíhaly 24 hod při teplotě 4 °C. Po dokončení ligace byla ligační směs purifikována kitem Invisorb® Fragment CleanUp (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) a následovala transformace, která byla v obou klonovacích krocích provedena elektroporací. Elektrokompetentní buňky *E. coli* TOP10 byly získány a elektroporace byla prováděna postupem dle Ausubela et al. (1992).

Elektrokompetentní buňky (aliquot 80 µl skladovaný při –70 °C) byly na ledu rozmrazeny a přidána ligační směs (10 µl). Směs byla 1 minutu ponechána na ledu, pak byl vzorek přenesen do elektroporační kyvety a elektroporován elektroporátorem Easyject (Equibio, Middlesex, UK) při 12,5 Kv/cm, 25 µF, 400 Ω.

Ke vzorku byl přidán 1 ml SOC média (složení je zaznamenáno v tabulce 2), vzorek přenesen do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem a kultivován 30 minut na orbitální třepačce při 60 rpm a 37 °C. Desetina objemu média (100 µl) byla rozetřena skleněnou tyčinkou na misky s pevným LB médiem s antibiotikem. Kultivace probíhala při 37 °C 18 hodin.

Testování narostlých kolonií po klonování bylo provedeno pomocí PCR. Narostlé kolonie byly přeočkovány sterilním párátkem do roztoku 50 mM MgCl₂/ 50 mM Tris, pH 7, z roztoku byly odebrány 2 µl a použity jako templát pro PCR. Reakce probíhala v celkovém objemu 15 µl, přidána byla 1 U MyTaq RED DNA Polymerase, 5x koncentrovaný My Taq Reaction buffer (Bioline, Taunton, MA, USA) a 3 µM od každého primeru. Sekvence primerů pro PCR je znázorněna v tabulce 8.

Tab. 8: Primery pro PCR testování přítomnosti inzertů v *pHannibal*

Inzert v polylinkeru XhoI/EcoRI/KpnI	Sekvence primerů (5'-3')
Primer INS1	TCCTTCGCAAGACCCTTCCT
Primer INS2	TCTTCGTCTTACATCATTGTCA
Inzert v polylinkeru ClaI/HindIII/BamHI/XbaI	Sekvence primerů (5'-3')
Primer INS3	ACAGTTGGGAAATTGGGTTTCGAAAT
Primer INS4	GAACCGAAACCGGCGGTAAG

Teplotní profil PCR reakce byl: 94 °C /3 min + 35x (94 °C /30 s, 57 °C /1 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /10 min.

Po PCR testování byly vybrané kolonie přeočkovány a ponechány přes noc při teplotě 37 °C v tekutém LB médiu doplněném ampicilinem. Následně byla izolována plasmidová DNA kitem Invisorb Spin Plasmid Mini Two (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) a bylo provedeno testování restrikcí (*HindIII* a *XbaI*; *EcoRI* a *XhoI*), jehož výsledkem byl fragment o délce 442 bp (o velikosti inzertu).

4.2.1.5 Klonování expresní kazety do vektoru pWell02

pHannibal obsahující fragmenty genu *fad2* v sense i antisense orientaci byl štěpen enzymem *NotI*. Takto byla vyštěpena oblast promotoru, genu našeho zájmu v sense a antisense orientaci s intronem a terminátorem. Tato expresní kazeta byla vložena do vektoru pWELL02.

Plasmid pWELL02 byl vytvořen z vektoru pGREEN (Hellens et al., 2000; obr. 6), do kterého byl naklonován selekční gen *nos::bar* a reportérový gen *35S::uidA*. Obsahuje vhodné restikční místo *NotI*, které bylo použito i pro restrikci inzertu. Složení restrikční směsi je uvedeno v tabulce 9.

Tab. 9: Složení restrikční směsi pro štěpení vektoru pWell02b a vyštěpení expresní kazety z vektoru pHannibal

Reagencie	pWell02b (μl)	pHannibal (μl)
Ultračistá H ₂ O	15,5	13,5
Pufr	2	2
NotI	0,5	0,5
DNA	2	4
celkem	20	

Po skončení restrikční reakce byla provedena defosforylace vektoru pWell02b přidáním 0,5 μl alkalické fosfatasy a 2,2 μl odpovídajícího pufru, vzorek byl inkubován dalších 30 minut při 37 °C.

Fragmenty byly po elektroforéze vyříznuty z gelu a purifikovány pomocí Invisorb® Fragment CleanUp (STRATEC Molecular, Berlín, Německo). Koncentrace plasmidu i inzertu byla měřena pomocí spektrofotometru a byla namíchána ligační reakce. Složení ligační směsi je znázorněno v tabulce 10.

Tab. 10: Složení ligační směsi při klonování expresní kazety do vektoru pWell02b

Reagencie	Objem (μl)
T4 DNA Ligase (Promega)	1
2x Rapid Ligation Buffer	10
inzert	6
vektor	3
celkem	20

Po purifikaci ligační směsi byla provedena transformace elektroporací stejně jako v případě klonování fragmentů *fad2* do vektoru pHannibal.

Po klonování expresní kazety do pWELL02 byly vzniklé klony testovány restrikcí. Vzorky, u kterých dle restrikční analýzy vyšly očekávané délky fragmentů, byly testovány sekvenací. Ta umožnila nejen kontrolu správnosti sekvence, ale též určení sense či antisense orientace inzertu.

Posledním krokem přípravy konstruktů byla jeho transformace do *Agrobacterium tumefaciens* spolu s pomocným vektorem pSoup.

4.2.1.6 Elektroporace plasmidu pWellFAD2i do *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetentní buňky (aliquoty 80 μ l skladovaný při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) byly na ledu rozmrazeny, byl k nim přidán 1 μ l plasmidu pWellFAD2i a 1 μ l pomocného plasmidu pSoup. Vzorek byl elektroporován elektroporátorem Easyject (Equibio, Middlesex, UK) při 12,5 Kv/cm, 25 μ F, 400 Ω .

Ke vzorku byl přidán 1 ml SOC média, vzorek přenesen do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem a kultivován 30 minut na orbitální třepačce při 60 rpm a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desetina objemu média (100 μ l) a zbytek média (stáčí se v centrifuze) byly rozetřeny skleněnou tyčinkou na misky s pevným LB médiem s antibiotiky (50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kanamycin a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ rifampicin).

Kultivace probíhala při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hod. Narostlé kolonie byly přeočkovány sterilním párátkem do 5 ml tekutého LB média bez antibiotik a kultivovány přes noc při teplotě $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ a použity pro zkušební transformaci rostlin tabáku.

Z transformovaného agrobakteria byly vytvořeny zásobní aliquoty uchovávané v roztoku glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Transformace tabáku

4.2.2.1 Transformace tabáku pomocí *A. tumefaciens*

Pro transformaci tabáku byla použita metoda transformace listových disků (Dombrowski et al., 1994). Pro transformaci bylo použito 5ml kultury *A. tumefaciens*, která byla namnožena přes noc v tekutém LB médiu bez antibiotik. Narostlé kultury byly zcentrifugovány při 3000 x g/ 20 min při pokojové teplotě a resuspendovány v LB médiu.

Ve flowboxu byly sterilním korkovrtem na zvlhčeném papíře vyraženy listové disky (bez hrubé nervatury). Tyto disky byly přeneseny na cca 1 min do suspenze *A. tumefaciens* (optická denzita – $\text{OD}_{600} > 0,7$). Následně byly vyjmuty, osušeny na filtračním papíře a přeneseny na MS 0,1/1 médium vrchní stranou listu dolů.

4.2.2.2 Kultivace transformovaného tabáku

Listové disky byly po transformaci ponechány tři dny na kokultivačním MS 0,1/1 médiu při teplotě 28 °C. Poté byly přepasážovány na selekční médium obsahující augmentin (300 mg.l⁻¹) a timentin (500 mg.l⁻¹). Během pasážování byly odebrány tři listové disky, na kterých byl proveden histochemický GUS test.

Po třech týdnech byly kalusy vytvořené z listových disků přeneseny na selekční médium s obsahem augmentinu (300 mg.l⁻¹), timentin (500 mg.l⁻¹) a také PPT (2 mg.l⁻¹).

Prýty vytvořené na kalusech byly nakonec přepasážovány na kultivační médium Gamborg B5 s augmentinem (300 mg.l⁻¹) a timentinem (500 mg.l⁻¹) pro regeneraci celistvých rostlin.

4.2.2.3 Histochemický GUS test

Histochemický GUS test byl proveden pro ověření účinnosti transformace (rozlišení transformovaných listových disků od netransformovaných) po třech dnech kultivace na kokultivačním MS médiu. Na vybrané listové disky bylo aplikováno 300 µl připraveného roztoku pro histochemický GUS test. Inkubace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Pro lepší zviditelnění modrého zbarvení byl chlorofyl z listů odstraněn pomocí 70% ethanolu.

4.2.2.4 PCR testování dopěstovaných transgeních rostlin tabáku

DNA z vybraných vzorků pozitivních při histochemické GUS detekci byla izolována pomocí kitu Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular, Berlín, Německo).

Pro PCR byly použity primery amplifikující oblast reportérového genu *uidA*. Primery jsou vedeny v tabulce 11.

Tab. 11: Primery pro PCR testování transgeních rostlin tabáku

Název primeru	Sekvence (5'-3')
GUS1	GATCGCGAAAACGTGGAAT
GUS2	TCTGCCAGTTCAGTTCGTTG

Reakční směs tvořilo 20 – 50 ng genomové DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 µM každého nukleotidu, 0,4 µM každého primeru a 1 U Dream Taq Polymerase (Fermentas, Vilnius, Litva). Teplotní profil PCR reakce byl: 94 °C /3 min + 35x (94 °C /30 s, 58 °C / 1 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /10 min. Očekávaná délka PCR produktu byla 355 bp.

4.2.3 Tvorba konstruktů TALENs

4.2.3.1 Sekvenování FAD2 genů

Výše popsáný konstrukt pro RNA interferenci byl tvořen pouze na základě dříve dostupné sekvence pro gen *fad2*, nyní označovaný jako *fad2-1*. Během roku 2014 byla publikována sekvence genu *fad2-2* u *lnu* (Radovanovic et al. 2014, Thambugala a Cloutier, 2014). V souvislosti s tvorbou TALENs (Tale nucleases trascription activator-like effectors) konstruktů pro *fad2* u *lnu* byl osekvenován gen *fad2-2* v linii *lnu*, která byla následně použita pro transformaci (responzivní linie AGT 583/05). Sekvence *fad2-1* byla již získána v souvislosti s výše popisovanou tvorbou konstruktů pro RNAi. Primery na sekvenování genu *fad2-2* (uvedené v tabulce 12) byly navrženy na základě sekvence dostupné v GenBank: JQ963159.1.

Tab. 12: Primery pro sekvenování genu *fad2-2*

Název primeru	Sekvence (5'-3')
FAD2-2AF	AATAAGGCGGACTCCGAAAC
FAD2-2AR	TTCTGCTTGGGGACAAAAAC
FAD2-2BF	GTCGCCACCACTCCAATACT
FAD2-2BR	GGTGTGCTGCAAGAAAGTGA
FAD2-2CF	TTGGGTGGTTTGTGTCTACG
FAD2-2CR	GAGTCCCGTCGAATTGGTAG

Získané PCR fragmenty byly purifikovány z gelu pomocí Invisorb® Fragment CleanUp (STRATEC Molecular, Berlín, Německo). Následně byla připravena sekvenační reakce o celkovém objemu 8 µl, sestávající z 5 pmol primeru, DNA v množství 10 ng/100 bp celkové délky produktu, vody a odeslána na sekvenování. Výsledné sekvence byly analyzovány v programu Sequence Scanner Software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

4.2.3.2 Tvorba konstruktů

Pro tvorbu konstruktů byl použit jako výchozí binární vektorový systém pCLEAN, konkrétně vektor G-126 spolu s pomocným pCLEAN S-167 (Thole at al., 2007). Tvorba konstruktů byla provedena Ing. Vojtěchem Hudzieczkem na pracovišti Biofyzikálního ústavu v Brně.

Konstrukty obsahují v oblasti T-DNA TALE kazetu (podle Cermak et al., 2011) s *FokI* katalytickou doménou (heterodimer - KKR/ELD - Doyon et al., 2011) pod 35S promotorem, která byla vytvořena cíleně pro oba *fad2* geny.

Mimo oblast T-DNA byly všechny konstrukty shodně doplněny o gen *nptI* (pro bakteriální selekci během klonování konstruktů). V T-DNA oblasti byl vedle TALE

kazety naklonován gen *bar* pod *nos* promotorem pro selekci úspěšně transformovaných rostlin.

4.2.3.3 *Elektroporace plasmidů TALENs do Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetentní buňky (alivkot 80 μ l skladovaný při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) byly na ledu rozmrazeny, byl k nim přidán vždy 1 μ l příslušného plasmidu TALENs a 1 μ l pomocného plasmidu pCleanS-167. Vzorek byl elektroporován elektroporátorem Easyject (Equibio, Middlesex, UK) při 12,5 Kv/cm, 25 μ F, 400 Ω .

Ke vzorku byl přidán 1 ml SOC média, vzorek přenesen do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem a kultivován 30 minut na orbitální třepačce při 60 rpm a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desetina objemu média (100 μ l) a zbytek média (stáčí se v centrifuze) byly rozetřeny skleněnou tyčinkou na misky s pevným LB médiem s antibiotiky (50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kanamycin a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ rifampicin).

Kultivace probíhala při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hod. Narostlé kolonie byly přeočkovány sterilním párátkem do 5 ml tekutého LB média bez antibiotik a kultivovány přes noc při teplotě $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z transformovaného agrobakteria byly vytvořeny zásobní alivkoty uchovávané v roztoku glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 *Agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů lnu*

Níže uvedená metoda agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů byla použita pro transformaci lnu konstruktem pro RNAi i konstrukty TALENs. Postupováno bylo dle metodiky agrobakteriální genetické transformace lnu vytvořené již dříve ve firmě Agritec (Vrbová, 2010). Pro transformaci konstruktem pWellFAD2i byl použit vedle agrobakteriálního kmenu EHA105 také kmen GV3101.

Sterilizovaná semena lnu byla asepticky naklíčena v kultivační komoře ($20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 dny ve tmě, potom 3 dny při 16hod fotoperiodě) ve 100ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících základní MS médium s pH 5,8 (Murashige a Skoog, 1962) s 5,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Bacto agarem (Difco, Detroit, Michigan, USA). Pro transformaci RNAi konstruktem byla použita semena nízkolinolenové linie olejného lnu AGT 1538/07 a responzivní genotyp linie AGT 583/05 s klasickou skladbou mastných kyselin, pro transformaci konstrukty TALENs byla použita linie AGT 583/05.

Z klíčenců získané segmenty hypokotylů (délka 0,5 – 1 cm) byly kultivovány 7 dnů na MS médiu s 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 6-benzylaminopurinu (BAP) a 0,02 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny α -naftyloctové (NAA). Explantáty hypokotylů byly ponořeny do suspenze agrobakteria v LB médiu (Langley a Kado, 1972).

Byl použit interval inokulace 10 min v tekutém LB médiu. Po inokulaci byly explantáty osušeny sterilním filtračním papírem, přeneseny na vrstvu sterilního filtračního papíru pokrývající MS médium bez přídavku antibiotik doplněné 3% (w/v) sacharosou, 0,8% (w/v) agarem, 1 mg.l⁻¹ BAP a 0,02 mg.l⁻¹ NAA a 7 dní kokultivovány v kultivační komoře (23 °C, při 16hod fotoperiodě).

Poté byly explantáty opláchnuty destilovanou vodou s přídavkem antibiotik (500 mg.l⁻¹ timentin, 500 mg.l⁻¹ augmentin) a převedeny na selekční médium MS1. Po třech týdnech byly všechny přežívající zelené explantáty pasážovány na čerstvé médium MS2. Po dalších třech týdnech byly explantáty pasážovány na médium MS3. Složení jednotlivých médií je uvedeno v kap. 4.1.4.2.

4.2.4.1 *Regenerace a množení transgenních rostlin*

Potenciálně transgenní To prýty získané na médiu MS3 byly zakořeněny na médiu R (MS médium doplněné 0,005 mg.l⁻¹ NAA, 0,5 mg.l⁻¹ PPT a 15 mg.l⁻¹ timentinu). Poté byly přesazeny do sterilní zeminy ve fyto komoře (23 °C, při 16hod fotoperiodě) a při intenzitě osvětlení 40 – 70 μmol m⁻² s⁻¹ (bílé zářivky) byly dopěstovány do semen.

Ve fázi kalusů a prýtů probíhal u transformací pomocí TALENs konstruktů odběr vzorků na izolaci DNA a testování pomocí enrichment PCR.

U transformantů získaných za použití RNAi konstruktů byla prováděna histochemická GUS detekce a PCR testování na přítomnost transgenů *uidA* a *bar*. Následně byla ověřena exprese vnesených genů na úrovni transkripce.

4.2.4.2 *Histochemický GUS test vzorků lnu transformovaných konstruktem pro RNAi*

Test byl prováděn pro ověření účinnosti transformace u explantátů čtyři týdny po agrobakteriální infekci, u segmentů stonků a listů z transgenních rostlin, ale také u naklíčených semen získaných z transformovaných rostlin. Vzorky byly ponořeny do připraveného roztoku pro histochemický GUS test obsahujícího substrát X-gluc, kde byly přes noc inkubovány při teplotě 37 °C. Druhý den proběhlo vyhodnocení zbarvení. Pro lepší zviditelnění modrého zbarvení byly vzorky odbarveny pomocí 70% ethanolu.

4.2.5 *Transformace lnu pomocí metody floral dip*

Pro transformaci metodou floral dip byl použit TALENs konstrukt pVO045 a kontrolní konstrukt pBIαMT, který obsahuje gen *uidA* a dává silný signál při histochemických detekcích. Transformace byla provedena dle metodiky Bastaki a Cullis (2014).

Na rozdíl od uvedené publikace byl použit kmen agrobakteria EHA105 (v publikaci byl použit kmen LBA4404), do kterého byly vloženy použité konstrukty. Agrobakterium bylo přes noc naočkováno do tekutého LB média doplněného příslušnými antibiotiky. Druhý den, po změření optické denzity suspenze ($OD_{600} > 0,5$) byla provedena centrifugace (5000 x g při pokojové teplotě). Pelet byl rozpuštěn v infiltračních médiích, tvořených 5% roztokem sacharosy ve vodě a smáčedlem Silwet L-77. Smáčedlo bylo přidáváno do jednotlivých médií v různých koncentracích – podle velikosti pupenů, které byly následně namáčeny, jak je uvedeno v tabulce 13. Po 6 dnech byla transformace opakována. Pro transformaci byl použit genotyp olejného lnu AGT 145.

Tab.13: Velikost pupat a koncentrace smáčedla pro floral dip u lnu

Velikost pupat	Koncentrace smáčedla v médiu(%)	Koncentrace smáčedla při opakované transformaci
Poupata do 2 mm	0,003	0,05
Střední fáze – poupata do 5 mm	0,05	0,03
Pozdní fáze – poupata do 1 cm.	0,03	Opakování neprobíhalo

Nádoba s rostlinami byla položena horizontálně a poupata lnu byla do roztoku ponořena na 2 minuty. Následně byly inokulované pupeny překryty plastovými pytlíky, které udržují potřebnou vlhkost. Druhý den ráno byla nádoba s rostlinami opět postavena a pytlíky byly odstraněny. Po opakované floral dip transformaci byly rostliny dopěstovány ve skleníku do semen. Rostlin vypěstované z těchto semen posloužily pro izolaci DNA použité následně pro testování přítomnosti transgenů.

4.2.6 *Testování semen/rostlin po transformaci floral dip*

4.2.6.1 *Testování rostlin po floral dip transformaci konstruktem pVO045*

Histochemické GUS testování

Semena sklizená po transformaci metodou floral dip konstruktem pBI α MT byla naklíčena na navlhčené buničině v 100ml Erlenmeyerových baňkách. Po sedmi dnech byl proveden u naklíčených semen histochemický GUS test pro ověření účinnosti transformace. Naklíčená semena byla přes noc inkubována při teplotě 37 °C v roztoku pro histochemický GUS test. Pro lepší zviditelnění modrého zbarvení byly vzorky následně odbarveny pomocí 70% ethanolu.

Testování pomocí PCR

DNA z vybraných vzorků pozitivních při histochemické GUS detekci byla izolována pomocí kitu pomocí Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular, Berlín, Německo). Po eluci byla koncentrace a kvalita DNA stanovena spektrofotometricky (Biophotometer, Eppendorf, Hamburk, Německo) a upravena na 50 ng/μl. Jako kontrola byly izolovány také dva vzorky GUS negativní. Použity byly primery ohraničující fúzi genů *uidA* a *αMT* (gen pro savčí metalothionein). Sekvence primerů je uvedena v tabulce 14.

Tab. 14: Primery pro PCR testování lnu transformovaného konstruktem *pBIαMT* metodou floral dip

Název primeru	Sekvence (5'-3')
MT_Forw	ATGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGC
GUS	TCTGCCAGTTCAGTTCGTTG

Složení reakční směsi bylo: 20 – 50 ng DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 μM každého nukleotidu, 0,4 μM každého primeru a 1 U Dream Taq Polymerase (Fermentas, Vilnius, Litva). Očekávaná délka amplifikovaného PCR produktu byla 550 bp.

Teplotní profil PCR reakce byl: 95 °C/ 9 min + 40x (95 °C/ 45 s, 60 °C/ 1 min, 72 °C/ 90 s) se závěrečnou elongací 72 °C/ 7 min.

4.2.6.2 Testování rostlin po floral dip transformaci konstruktem pVO045

Jelikož konstrukt pVO045 neobsahuje gen pro GUS, bylo provedena selekce semen za použití genu *bar* indukujícího rezistenci k fosfotricinu. Všechna semena sklizená po transformaci konstruktem pVO045 metodou floral dip byla zaseta a pěstována v GM skleníku. Po cca 20 dnech byl na potenciálně transgenní rostliny aplikován postřik obsahující fosfotricin (2 mg.l⁻¹). Postřik byl ještě 2x zopakován, vždy po týdnu. Rostliny, které nevykazovaly známky poškození herbicidem byly následně přesazeny a dopěstovány do semen. Z každé rostliny byl odebrán vzorek pro izolaci DNA. Po izolaci byly vzorky testovány pomocí enrichment PCR na indukovanou mutaci v „gene of interest“ a proběhla také PCR detekce genu *bar*.

4.2.7 Testování rostlin získaných transformací segmentů hypokotylů TALENs konstrukty

4.2.7.1 Testování pomocí PCR

K detekci GM lnu modifikovaného konstrukty pVO045, pVO046, pVO047, pVO048 a pVO049 lze využít PCR metodu s použitím primerů umožňujících amplifikaci selekčního genu *bar*.

U vzorků DNA pocházejících z prýtů, u kterých vycházel PCR test na přítomnost genu *bar* pozitivně, byl prováděn také PCR test kontaminace agrobakteriemi. Ve stádiu prýtů totiž často nebývá agrobakterium z média dokonale vymýceno a jeho přítomnost může vést k falešně pozitivním detekcím na přítomnost transgenů. Použity byly primery amplifikující agrobakteriální oblast *virG*. Sekvence primerů pro amplifikaci genu *bar* a oblasti *virG* jsou uvedeny v tabulce 15.

Tab. 15: Primery pro PCR testování prýtů po transformaci hypokotylů TALENs konstrukty

Název primeru	Sekvence (5'-3')
Bar_1	GAGTCCACCGTGTACGTCAG
Bar_2	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC
Vir-G-Forw43	AGGCGATCTCCTTAATCAATAG
Vir-G-Rev295	GATAAGAAGAACGTGTTTCAAC

Teplotní profil PCR reakce byl pro obě PCR: 94 °C /3 min + 35x (94 °C /30 s, 55 °C /1 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /10 min.

4.2.7.2 Detekce indukovaných mutací pomocí enrichment PCR

Pro detekci mutací indukovaných v transgenních rostlinách konstrukty TALENs byla nejprve izolována DNA z rostlinného materiálu (kalusů, prýtů, listů). Vzorky byly homogenizovány v kapalném dusíku a pomocí kitu Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular, Berlín, Německo) z nich byla izolována genomová DNA dle protokolu výrobce.

Koncentrace a kvalita získané DNA byla stanovena spektrofotometricky (Biophotometer, Eppendorf, Hamburk, Německo). 5 µg DNA bylo následně použito pro restriční reakci přes noc. Složení reakční směsi pro restriční reakci 1 znázorňuje tabulka 16, použité restriční endonukleazy tabulka 17.

Tab. 16: Složení reakční směsi pro restriční reakci 1 (enrichment PCR)

Reagencie	Objem (µl)
Ultračistá H ₂ O	do 20
Příslušný pufr	2
Restriční enzym	0,1
DNA	5µg
celkem	20

Tab. 17: Restriční endonukleazy pro testování transformantů dle použitých konstruktů

Použitý konstrukt	Restriční enzym pro testování
pVO045/pVO046	<i>Hpa</i> II nebo <i>Msp</i> I
pVO047	<i>Mbo</i> I nebo <i>Dpn</i> I
pVO048	<i>Bst</i> XI
pVO049	<i>Cvi</i> QI

Dalším krokem byla amplifikace lokusu našeho zájmu (PCR fragment musí obsahovat pouze jedno restriční místo přítomné v sekvenci spaceru, které bylo použito pro restriční reakci 1). K detekci indukovaných mutací u GM lnu modifikovaného konstrukty pVO045, pVO046,

pVO047 byla použita PCR amplifikace genu *fad2-1*. K detekci indukovaných mutací u lnu modifikovaného konstrukty pVO048 a pVO049 byla použita PCR amplifikace genu *fad2-2*. Primery pro amplifikaci genů a délky získaných PCR produktů jsou uvedeny v tabulce 18. Složení reakční směsi pro PCR je obsaženo v tabulce 19.

Tab. 18: Primery pro PCR amplifikaci pro testování indukovaných mutací po transformaci jednotlivými konstrukty (enrichment PCR testování)

Primery pro <i>fad2-1</i>	Konstrukt	Délka PCR produktu
FAD-F1: AGGTGGAAGAATGCCAGTGC	pVO045,46,47	442 bp
FAD-R1: CTCATCACGATCAAGCGATCC		
Primery pro <i>fad2-2</i>	Konstrukt	Délka PCR produktu
FAD2-F1: GTCGCCACCACTCCAATACT	pVO048	401 bp
FAD2-R1: GGTGTGCTGCAAGAAAGTGA		
FAD2-F2: AATAAGGCGGACTCCGAAAC	pVO049	446 bp
FAD2-R2: TTCTGCTTGGGGACAAAAAC		

Tab. 19: Složení reakční směsi pro PCR (enrichment PCR testování)

Reagencie	Objem (μl)
Restrikční reakce	10-20 μl
10x PCR buffer	5
dNTPs (10mM)	2
Přímý primer (10μM)	1
Zpětný primer (10μM)	1
Taq polymerasa	0,5
H ₂ O	do 50
celkem	50

Teplotní profil PCR reakce byl: 95 °C/ 9 min + 40x (95 °C/ 45 s, 54 °C/ 1 min, 72 °C/ 90 s) se závěrečnou elongací 72 °C/ 7 min.

10 μl PCR reakce bylo pro kontrolu nanášeno na agarózový gel. Zbýlých 40 μl bylo štěpeno pomocí stejného restrikčního enzymu jako v restrikční reakci 1. Složení reakční směsi pro restrikci 2 zachycuje tabulka 20.

Tab. 20: Enrichment PCR testování – složení reakční směsi pro 2. restrikční reakci

Reagencie	Objem (μl)
Ultračistá H ₂ O	4,5
Příslušný pufr	5
Restrikční enzym	0,5
PCR reakce	40
celkem	50

Reakce byla nanášena na gel. V případě správného fungování nukleasy měl být na gelu patrný neštěpený PCR fragment – obsahující mutaci v restrikčním místě. Tento neštěpený fragment měl být vyřezán z gelu a odeslán na sekvenování. V případě, že jsou na gelu patrné štěpené fragmenty, nedošlo k indukci vzniku mutace v cílovém genu. Délky PCR produktů štěpených i neštěpených fragmentů jsou uvedeny v tabulce 21.

Tab. 21: Enrichment PCR testování – délky produktů vycházejících v 2. restrikční reakci

Konstrukt	Neštěpený PCR produkt (bp)	Délka štěpených fragmentů (bp)
pVO045,46,	442	237 a 205
pVO047		130 a 312
pVO048	401	318 a 83
pVO049	446	356 a 90

4.2.8 Testování *FAD2-i* transformantů pomocí reverzně transkripční PCR

4.2.8.1 Izolace RNA

Izolace RNA za použití tekutého dusíku pomocí kitu InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (STRATEC Molecular, Berlín, Německo). RNA byla izolována z embryí ze semen převedených regenerantů krátce před vstupem do fáze zelené zralosti. Z každé rostliny byla odebrána jedna tobolka a embrya byla rozdělena do vzorků po 3 ks. Izolována byla také netransgenní kontrola.

4.2.8.2 Reverzní transkripce RNA na cDNA

Po eluci vzorků (40 µl elučního pufru) byla koncentrace a kvalita RNA stanovena spektrofotometricky (Biophotometer, Eppendorf, Hamburk, Německo), aby mohlo být odebráno optimální množství vzorku na reverzní transkripci (0,1 ng – 5 µg). Reverzní transkripce pomocí kitu Revert Aid First Strand cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) dle návodu výrobce, s použitím oligo (dT)₁₈ primeru. Před syntézou cDNA byly vzorky ošetřeny DNase I.

4.2.8.3 Reverzně transkripční PCR

Po reverzní transkripci byla s cDNA provedena PCR, zbytek vzorků byl uchován v –70 °C. Pro amplifikaci genu *fad2* byly použity primery ohraničující celý otevřený čtecí rámeček (ORF) tohoto genu o délce 1137 bp. Jako kontrola byla použita amplifikace genu pro aktin a genu *uidA*. Primery použité pro reverzně transkripční PCR jsou uvedeny v tabulce 22.

Tab.22: Primery pro reverzní transkripci vzorků transformovaných konstruktem *pWellFAD2i*

Název primeru	Sekvence (5'-3')
flax-actin-F	CGCTTGACTATGAGCAGGAGC
flax-actin-R	CCAGGGCAGTAATCTCCTTGC
gus-F	CTGATAGCGCGTGACAAAA
gus-R	GGCACAGCACATCAAAGAGA
FAD2-ATG-F	ATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCCAG
FAD2-end-R	TCATAACTTATTGTTGTACCAGAAC

Reakční směs byla tvořena: 1x Dream Taq PCR buffer, 100 µM každého nukleotidu, 0,4 µM každého primeru a 1 U Dream Taq Polymerase (Fermentas, Vilnius, Litva). Jako templát byly do reakcí přidány 2 µl získané cDNA dle návodu z kitu Revert Aid First Strand

cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Gen pro aktin a gen *fad2-1* byly amplifikovány při teplotním profilu: 95 °C/ 9 min + 40x (95 °C/ 45 s, 54 °C/ 1 min, 72 °C/ 90 s) se závěrečnou elongací 72 °C/ 7 min. Teplotní profil PCR reakce pro gen *uidA* byl: 94 °C /3 min + 35x (94 °C /30 s, 55 °C /1 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C / 10 min.

4.2.9 Testování *FAD2-i* transformantů pomocí qPCR

4.2.9.1 Testování pomocí qPCR

Primery pro qPCR (kvantitativní PCR v reálném čase) genu *fad2-1* a genu pro aktin byly navrženy tak, aby umožňovaly amplifikaci sekvence v blízkosti polyadeninové oblasti genů o délce 100 – 150 bp (primery uvádí tab. 24). Jako „housekeeping“ gen byl použit gen pro aktin. Reakční směs pro qPCR byla namíchána dle tab. 23.

Tab.23: Složení reakční směsi pro qPCR

Reagencie	Objem (μl)
Ultračistá H ₂ O	1,4
Primer F (10μM)	0,8
Primer R (10μM)	0,8
Taq polymerasa	5,0
H ₂ O	2,0
celkem	10μl

Tab.24: Sekvence primerů pro qPCR

Název primeru	Sekvence
FAD2-RT-F	GGGATGATTACCAGTTCGATGG
FAD2-RT-R	TCATAACTTATTGTTGTACCAGAAC
Flax-actin-RT-F	TTGAGTCGTTGGTTTTTGTCA
Flax-actin-RT-R	GAGATTCAAAGCAGCCAATCC

Byla použita cDNA připravená pro reverzně transkripční PCR uchovávaná při -70 °C. Pro qPCR bylo použito komerčního kitu LC 480 SYR Green I Master (Roche, Bazilej, Švýcarsko) a následujícího PCR programu: 95 °C /10 min + 39x (95 °C/ 10 s, 54 °C/ 30 s, 72 °C/ 10 s) s následnou analýzou HRM (High-resolution Melt Analysis). Pro analýzu byl použit termocykler BioRad C1000 s real-time systémem CFX96 (BioRad, Hercules, USA).

4.2.9.2 Ověření specifity amplifikace cDNA

Pro ověření specifity amplifikované cDNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza, jednotlivé vzorky byly po amplifikaci naneseny na 1,5% agarový gel. Pro ověření velikosti amplifikovaných produktů bylo využito velikostního markeru.

4.2.9.3 Zpracování a vyhodnocení výsledků qPCR

Expresa *fad2* byla testována pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase. Byla provedena relativní kvantifikace v porovnání s množstvím fluorescence referenčního genu pro aktin. Pro zajištění co největší přesnosti byly všechny vzorky analyzovány v tetraplikátech, tedy ve čtyřech opakováních. Při rozptylu vyšším než 0,7 cyklu by nebyly

hodnoty do výsledků zahrnuty. Vyhodnocení bylo provedeno v programu CFX Manager™ Software (Bio-Rad Laboratories), verze 3.1.

Výsledky kvantitativní qRT-PCR byly vyhodnoceny metodou ΔC_t . Hodnota C_t udává počet cyklů, při kterých protne křivka produktu práh citlivosti. Čím je tato hodnota nižší, tím více bylo na počátku v reakční směsi u dané amplifikované oblasti templátové DNA, tedy exprese genu byla ve vzorku vyšší. Hodnota ΔC_t byla vypočtena jako rozdíl C_t hodnoty genu zájmu a C_t hodnoty referenčního genu. Do grafu byla zanesena převrácená hodnota ΔC_t pro vyjádření exprese daného genu a hodnota 1 pro gen referenční. Relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a standardu (referenčního genu) byl vypočítán jako násobek $2^{\Delta C_t}$.

4.2.10 *Testování skladby oleje*

Stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorcích lnu bylo prováděno podle ČSN ISO 5508 (Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií), metodou založenou na esterifikaci mastných kyselin methanolem, extrakci methylesterů petroletherem a následném stanovení plynovou chromatografií. Instrumentace: GC Dani, Cologno Monzese, Itálie, kapilární kolona Famewax 30 m, nosný plyn – dusík, detektor FID. Poměrné zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo určováno pomocí chromatografického software Clarity. Příprava methylesterů mastných kyselin byla prováděna podle publikace Bhatta a Rowland (1990). Vzorek tvořilo 10 semen lnu homogenizovaných v třecí misce.

5 VÝSLEDKY

5.1 Tvorba konstruktů pro indukci RNA interference genu *fad2*

5.1.1 Navržení primerů a PCR amplifikace

Pro navržení primerů byly použity dvě sekvence genu *fad2* lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) dostupné na NCBI (DQ222824 a EU660502). Ačkoliv byly dostupné pouze sekvence pro cDNA, v dané oblasti není přítomen žádný intron – délky amplifikovaných fragmentů při použití genomové DNA jako templátu odpovídaly sekvenci cDNA.

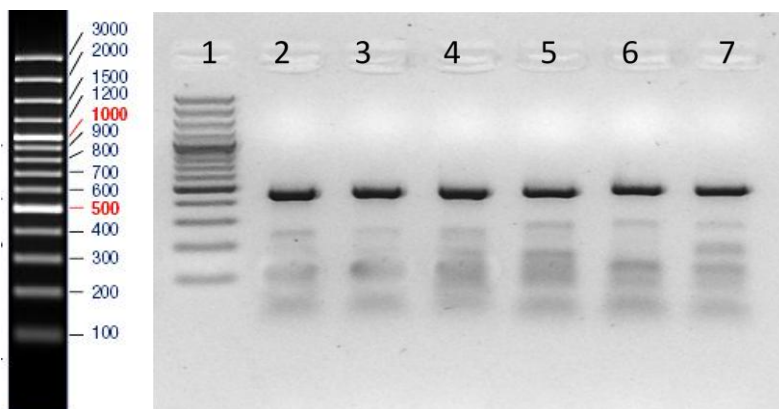
Z dostupných databází NCBI byly získány nukleotidové a aminokyselinové sekvence genů kódujících FAD2 desaturasu z následujících rostlinných druhů:

- AY660024 – *Nicotiana tabacum*
- AY805155 – *Helianthus annuus*
- AJ879071 – *Capsicum chinense*
- AY954300 – *Glycine max*
- AY642540 – *Brassica napus*
- Y10112 – *Gossypium hirsutum*
- AF030319 – *Arachis hypogaea*
- U09503, NM_112047 – *Arabidopsis thaliana*
- DQ222824, EU660502 – *Linum usitatissimum*

Byla porovnána míra homologie jak na nukleotidové, tak i aminokyselinové úrovni pomocí programů BLAST (Altschul et al., 1990) a CLUSTALW (Larkin et al., 2007). Nejvyšší míra homologie mezi různými rostlinnými druhy byla na základě srovnání dostupných sekvencí prokázána zhruba do poloviny kódující sekvence genu *fad2*. Proto byly navrženy primery amplifikující tuto část genu. Výsledný PCR produkt měl délku 442 bp (poloha 9 od iniciačního kodonu až 450) viz obr. 13 a 14. Obr. 14 je, stejně jako ostatní elektroforeogramy uvedené v této práci, doplněn schématem použitého velikostního markeru.

```
AGGTGGAAGAATGCCAGTGCCTCCATCATCCAAACCTATGAAGAGGTCTCCTTACTCAAAGCCACCATTACGCT
CGGTGAGCTCAAGAAGGCCATCCCTCCACACTGCTTCAAACGCTCAATCCCCGATCGTTTCGCCTACGTGGCGCA
CGACCTCACCATTGCAGCAATCTTCTACTACATCGCCACCACCTTACTTCCACCTCCTCCCTAGCCCTCTCAACTA
CCTCGCCTGGCCGGTCTACTGGGCCTGCCAGGGCTGCATCCTCACTGTGGCTTGAGTATGGGTGTTGGCTCACGA
ATGCGGTCACCATGCCCTTCAGCGACTACCAGTGGCTCGACGACATGGACGTCCCTCCATTCGTCCCTCCTTGTTCC
TTACTTCTCCTGGAAGCACAGCCACCGCCGCCACCATTCCAACACGGGATCGCTTGATCGTGATGAG
```

Obr. 13: Sekvence genu *fad2* použita jako inzert. Fialově jsou označeny navržené primery (bez přidaných restričních míst).



Obr. 14 : PCR produkty na agarózovém gelu (amplifikace části genu pro FAD2 desaturasu s navrženými primery). 1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2.–7. PCR produkty amplifikované pomocí navržených primerů.

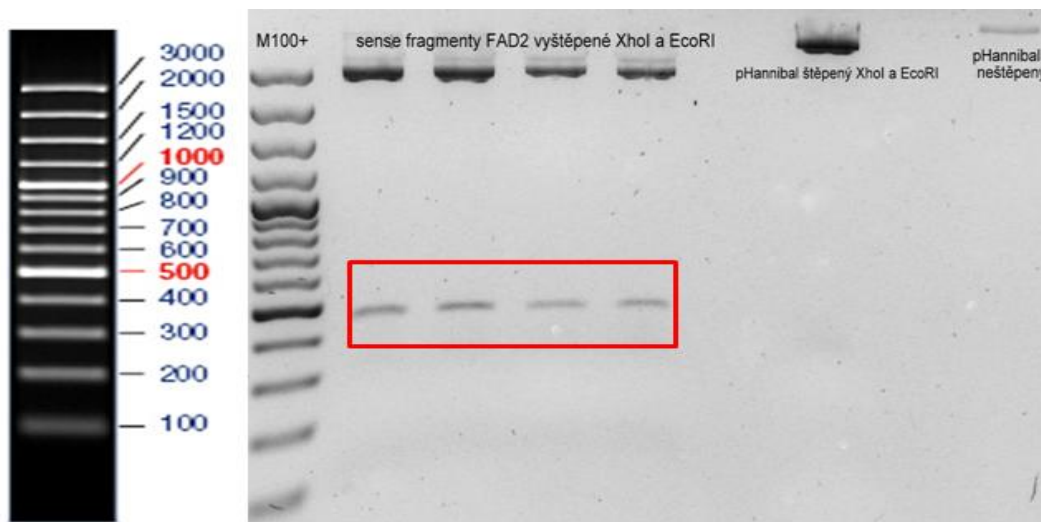
5.1.2 Klonování do vektoru pJET a ověření sekvence

Amplifikované PCR produkty byly klonovány pomocí vektoru pJET (Fermentas, Vilnius, Litva). Po izolaci plasmidové DNA byly vzorky odeslány na sekvenaci, čímž byla ověřena absence mutací u vnášených sekvencí.

5.1.3 Klonování fad2 fragmentů do vektoru pHannibal

Vybrané sekvence s ověřenými restrikčními místy byly vyštěpeny pomocí restrikčních endonukleas (obr. 15 a 18), vyříznuty z gelu a purifikovány.

5.1.3.1 Klonování fragmentu fad2 do pHannibal v sense orientaci



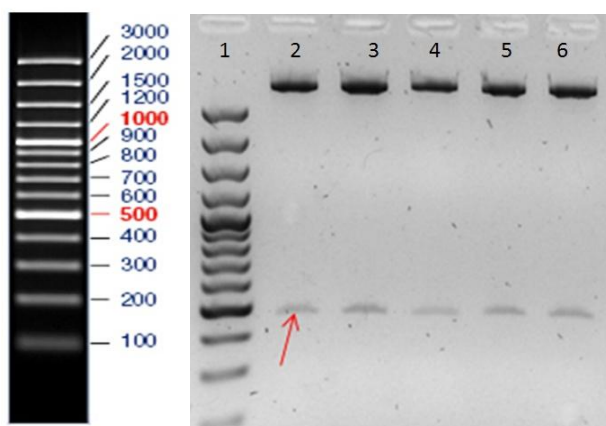
Obr. 15: Vyštěpení sense fragmentu z vektoru pJET pomocí restrikčních endonukleas XhoI/EcoRI
1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2.– 5. štěpené vektory pJET obsahující fad2 fragment, 7. štěpený vektor pHannibal , 9. neštěpený Hannibal

Po restrikci a purifikaci byl sense fragment *fad2* klonován do štěpeného vektoru pHannibal. Testování narostlých kolonií po klonování bylo provedeno pomocí PCR (viz obr. 16).



Obr. 16: Test kolonií po vložení sense fragmentu do pHannibal
1. 100 bp Quick load DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 2. – 16. Testované kolonie

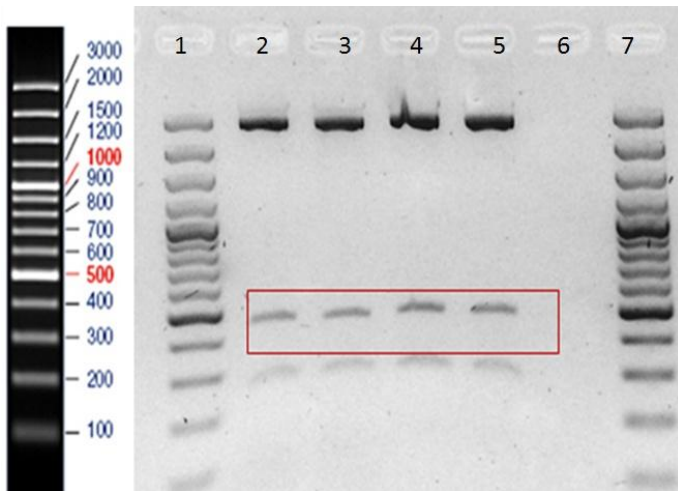
Pro další práci byly vybrány kolonie č. 6, 7, 8, 9 a 10, které byly pasážovány. Následně byla izolována plasmidová DNA vybraných vzorků a byla provedena kontrolní restrikce (obr. 17). Výsledkem byl fragment o délce 442 bp (velikost inzertu).



Obr. 17: Kontrolní restrikce pHannibal s vloženým sense fragmentem
1. jamka 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 5. pHannibal obsahující sense fragment štěpený EcoRI a XhoI

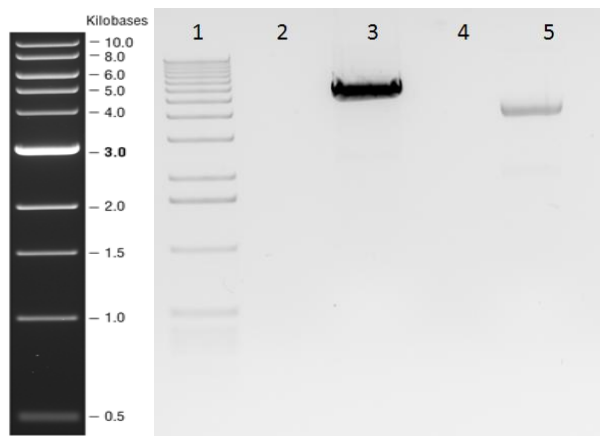
5.1.3.2 Klonování komplementárního (antisense) fragmentu do pHannibal

Antisense fragment genu *fad2* byl z vektoru pJET vyštěpen pomocí restrikčních endonukleas *XbaI* a *HindIII*. Vedle fragmentu *fad2* v očekávané délce byl vyštěpen také fragment o velikosti 205 bp (obr. 18), protože daná restrikční místa byla přítomna také ve vektoru.



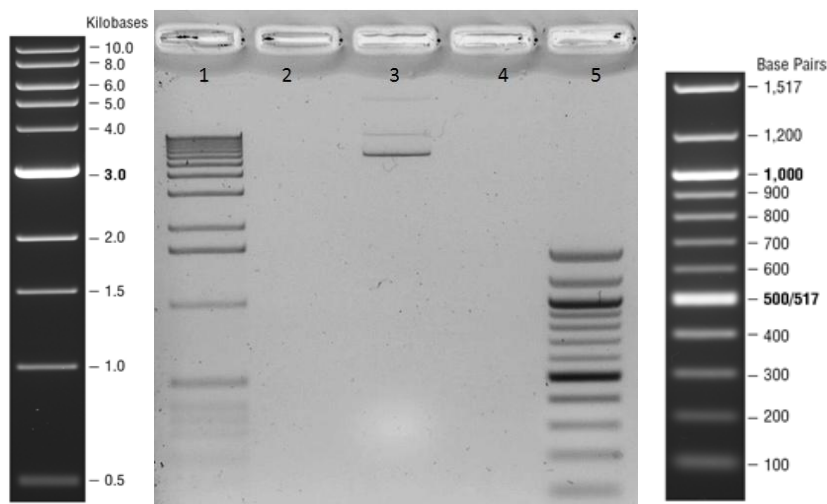
Obr. 18: Vyštěpení antisense fragmentu z vektoru pJET pomocí restričních endonukleas XbaI/ HindIII
1. a 7. jamka 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2.– 5. Štěpené vektory pJET

Vyštěpené fragmenty byly vyřezány z gelu, purifikovány klonovány do vektoru pHannibal obsahujícího již fragment *fad2* v sense orientaci. Štěpený vektor pHannibal spolu s kontrolou (neštěpený pHannibal) jsou zachyceny na obrázku 19.



Obr. 19: pHannibal štěpený XbaI a HindIII
1. 1 Kb DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 3. štěpený pHannibal, 5. pHannibal neštěpený – kontrola

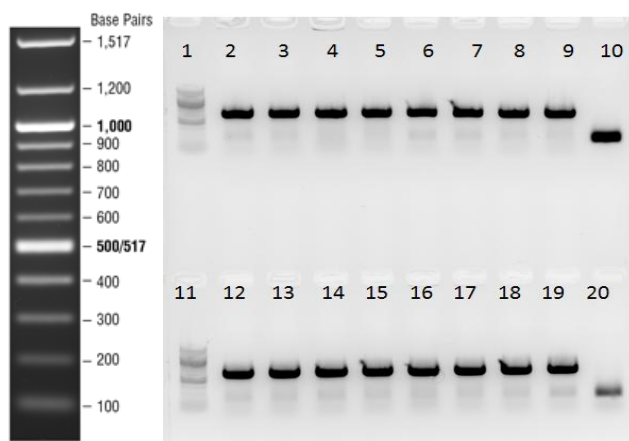
Po purifikaci inzertu a vektoru a změření jejich koncentrace byla provedena ligace. Druhý den byla ligační směs purifikována a byla provedena transformace elektroporací. Zbytek ligovaného vzorku byl použit pro elektroforézu. Na obr. 20 je patrné řetězení po ligaci a není vidět samostatný inzert, což naznačuje optimální výsledek ligace.



Obr. 20: Zbytek ligační směsi po transformaci

1. 1 Kb DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 5. 100bp Quick load DNA ladder (New England Biolabs), 3. Zbytek ligační směsi po ligaci antisense fragmentu do pHannibal

Testování narostlých kolonií po klonování bylo provedeno pomocí PCR, výsledek je zachycen na obr. 21.

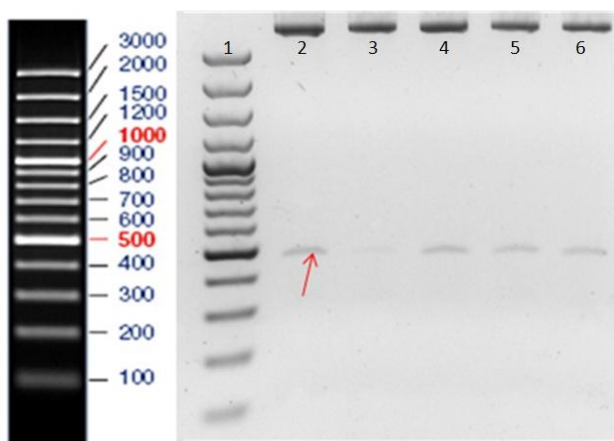


Obr. 21: PCR test narostlých kolonií po vkládání antisense fragmentu do pHannibal

Jamky 1 a 11. 100bp Quick load DNA ladder (New England Biolabs Ipswich, MA, USA), 2. – 9. a 12. – 19. testované kolonie, 10. pHannibal prázdný, 20. negativní kontrola

Pro další práci byly vybrány kolonie 2, 3, 4 a 5, které byly přeočkovány.

Následně byla izolována plasmidová DNA a byla provedena kontrolní restrikce (obr. 22), výsledkem které byl opět fragment o délce 442 bp (o velikosti inzertu).



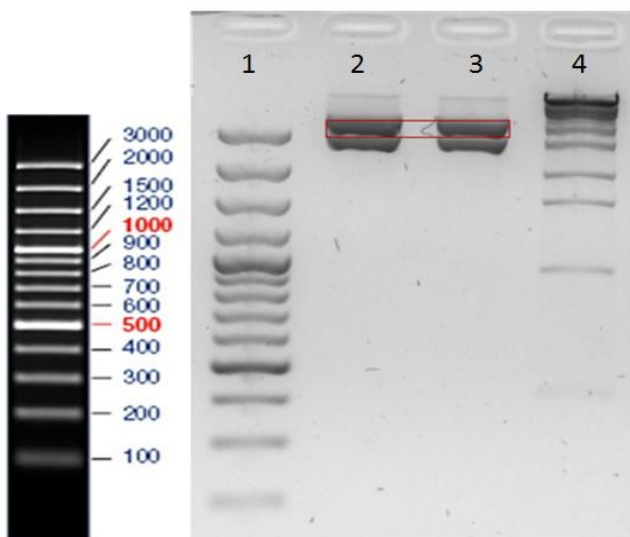
Obr. 22: Kontrolní restrikce *pHannibal* s vloženým antisense fragmentem

1. jamka 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 6. *pHannibal* obsahující antisense fragment štěpený *Xba*I a *Hind*III

5.1.3.3 Klonování expresní kazety do *pWell02*

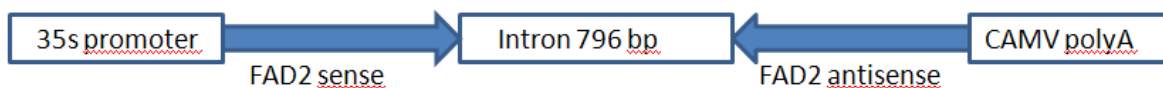
Z vektoru *pHannibal* obsahujícího fragmenty genu *fad2* v sense i antisense orientaci byla štěpena enzymem *Not*I celá expresní kazeta (fragment 3811 bp) obsahující oblast promotoru, genu našeho zájmu v sense a antisense orientaci s intronem a terminátor (schéma expresní kazety znázorňuje obr. 24).

Výsledek restrikce je zachycen na obr. 23, expresní kazeta je delší z obou vzniklých fragmentů (označena červeně). Fragment DNA byl vyříznut z gelu, purifikován a před klonováním byla změřena jeho koncentrace.



Obr. 23: Vyštěpení expresní kazety z *pHannibal* pomocí *Not*I

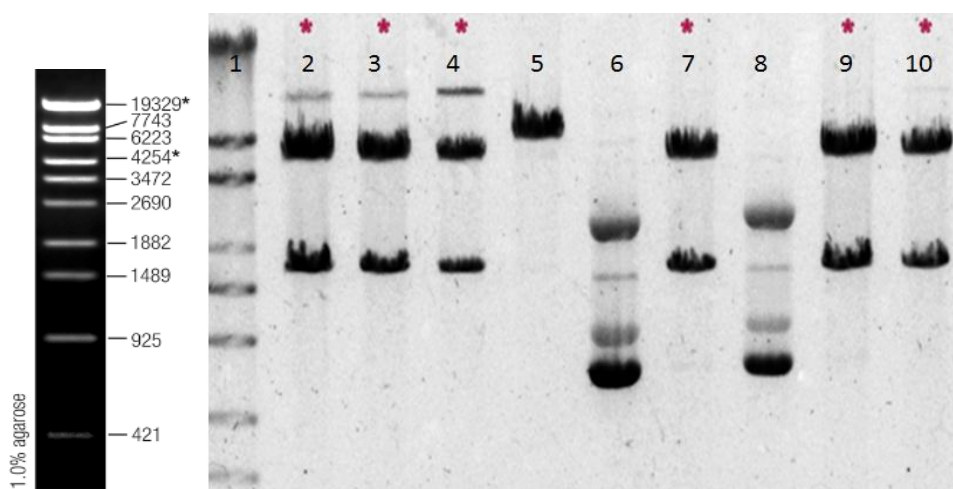
1. jamka 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2.a 3. expresní kazeta vyštěpená pomocí *Not*I z *pHannibal* obsahujícího sense a antisense fragment, 4. Lambda DNA/ *Eco*130I Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva)



Obr. 24: Schéma expresní kazety vyštěpené z *pHannibal* pomocí *NotI*

Tato expresní kazeta byla následně vložena do vektoru pWell02, odvozeného od binárního plasmidu pGreenII, obsahujícího selekční geny, reportérový gen a hraniční sekvence LB a RB.

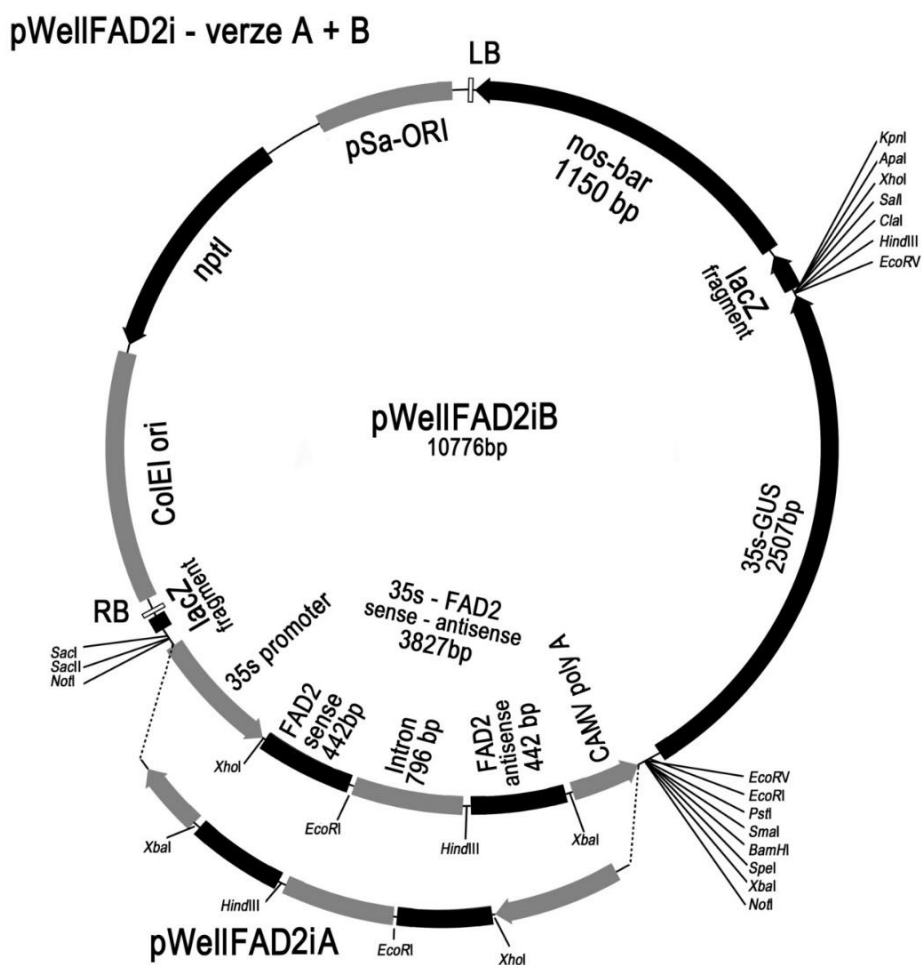
Po klonování expresní kazety do pWell02 byly vzniklé klony testovány restrikcí pomocí enzymu *NotI*. Správně vytvořené konstrukty dávají po restrikci fragmenty o délce 3845 bp (inzer) a 6949 bp (vektor), jak je patrné na obr 25.



Obr. 25: Testování plasmidů pomocí restrikce enzymem *NotI*. Vzorky označené hvězdičkou dávají po restrikci fragmenty očekávaných délek

1. *Lambda DNA/Eco 130I* (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 10. vzorky testované restrikcí

Vzorky, u kterých dle restrikční analýzy vyšly odpovídající délky produktů, byly testovány sekvenací. To umožnilo vedle kontroly správnosti sekvence určit sense či antisense orientaci inzertu ve vzorcích. Dle výsledků sekvenace se podařilo vytvořit konstrukty obsahující expresní kazetu v obou možných orientacích. Schéma nově vzniklého vektorového konstruktu pWellFAD2i v orientaci sense a antisense je znázorněno na obr. 26.



Obr. 26: Schéma nově vytvořeného konstruktů pWellFAD2i s oběma orientacemi začlenění inzerty

5.1.3.4 Vkládání výsledného konstruktů do *Agrobacterium tumefaciens*

Posledním krokem před vlastní transformací rostlin byla elektroporace vytvořeného konstruktů do požadovaného kmene *Agrobacterium tumefaciens* spolu s pomocným vektorem pSoup.

Narostlé kolonie *A. tumefaciens* byly přeočkovány do tekutého LB média bez antibiotik, kultivovány přes noc a použity pro zkušební transformaci rostlin tabáku.

5.1.4 Transformace rostlin tabáku pomocí *A.tumefaciens*

5.1.4.1 Transformace tabáku

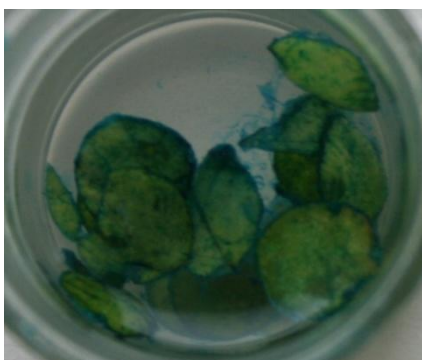
Tabák virginský posloužil jako modelová rostlina pro transformaci pomocí *A. tumefaciens* s vneseným plasmidem pWellFAD2i (konstrukty TALENs, vytvořené později v rámci této práce, neobsahují gen *uidA*, takže jejich funkčnost na tabáku testována nebyla). Byla použita metoda transformace listových disků dle Dombrowski et al. (1994).

Listové disky byly po transformaci kultivovány 3 dny na kokultivačním médiu, následně byl proveden histochemický GUS test dle Fütterer et al. (1995).

Náhodně vybrané listové disky byly ponořeny do připraveného roztoku pro histochemický GUS test obsahujícího barvivo X-gluc. Po 24 hodinách bylo patrné modré zbarvení disků, potvrzující přítomnost a expresi genu *uidA* pro β -glukuronidasu. Tento enzym štěpí barvivo X-gluc za vzniku intenzivně modré sraženiny 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro indiga.

Listové disky byly nejvíce zbarveny v místech poranění, tedy na okrajích po vyřezání a také tam, kde bylo způsobeno poškození pinzetou. V těchto místech nasedá bakterie *A. tumefaciens* na buněčné stěny a předává úsek T-DNA rostlinným buňkám. Pozitivním GUS testem byla prokázána úspěšnost transformace listových disků tabáku (viz. obr. 27) a tím také vhodnost použití konstruktů k transformacím lnu.

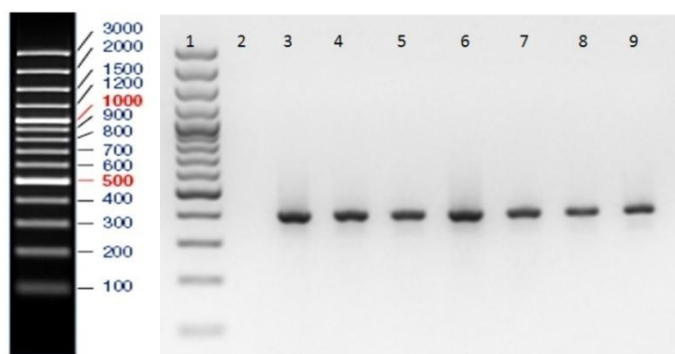
Listové disky byly dále kultivovány na selekčním médiu a byly dopěstovány do rostlin.



Obr. 27: Histochemický GUS test transformovaných listových disků tabáku

5.1.4.2 PCR testování regenerovaných transgeních rostlin tabáku

DNA z regenerovaných transformovaných rostlin byla použita pro testování přítomnosti transgenů pomocí metody PCR. Výsledky PCR potvrdily přítomnost genu *uidA*. V testovaných transgenních vzorcích tabáku vyšel fragment o délce 355 bp, jak je patrné na obr. 28.



Obr. 28: PCR testování regenerovaných rostlin tabáku na přítomnost transgenů *uidA*
1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 3. – 9. amplifikované PCR produkty o délce 355bp

5.2 Tvorba konstruktů TALENs

5.2.1 Sekvenování genů *fad2*

Sekvence *fad2-1* byla již získána v souvislosti s konstruktem pro RNAi. V souvislosti s tvorbou TALENs (Tale nucleases transcription activator-like effectors) konstruktů pro *fad2* u lnu byl osekvenován také recentněji popsáný gen *fad2-2* (Radovanovic et al. 2014; Thambugala a Cloutier, 2014) v linii lnu, která byla následně použita pro transformaci (responzivní linie AGT 583/05). Primery na sekvenování genu *fad2-2* byly navrženy na základě sekvence dostupné v GenBank: JQ963159.1. Ač byla dostupná sekvence jen pro cDNA *fad2-2*, sekvenace prokázala, že gen stejně jako *fad2-1* neobsahuje introny, což bylo potvrzeno i v publikaci Thambugala a Cloutier (2014).

5.2.2 Tvorba konstruktů

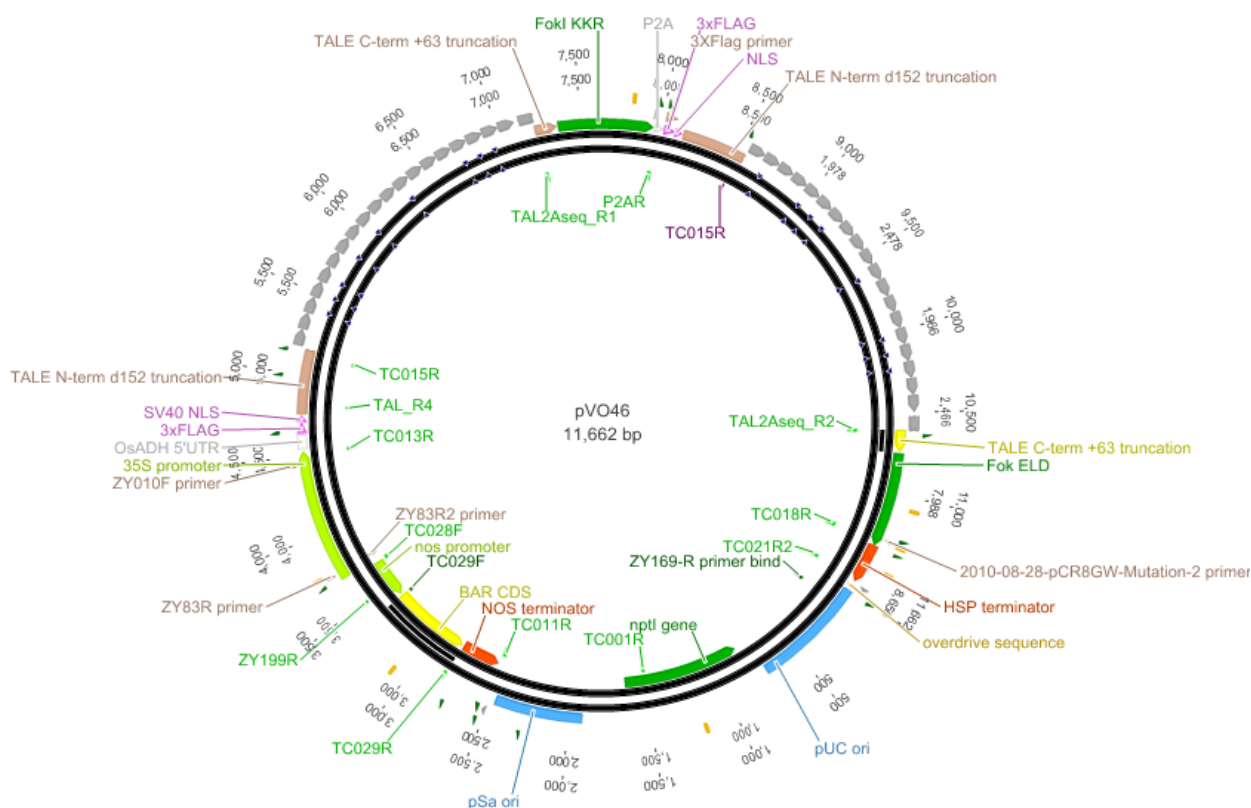
Na základě sekvencí genů *fad2-1* a *fad2-2* byly navrženy konstrukty TALENs cílené na každý gen zvlášť. Sekvence obou genů jsou natolik odlišné, že se jevílo jako nevhodné cílit je stejným TALENs konstruktem. Sekvence genů *fad2-1* a *fad2-2* spolu s vyznačenými cílovými místy pro jednotlivé konstrukty jsou uvedené v přílohách práce.

Celkem bylo vytvořeno pět různých konstruktů, tři cílené na gen *fad2-1* a dva konstrukty pro gen *fad2-2*. Tyto konstrukty byly naklonovány na pracovišti Biofyzikálního ústavu v Brně Ing. Vojtěchem Hudzieczekem. Všechny vytvořené konstrukty nesly gen pro rezistenci ke kanamycinu pro bakteriální selekci (*nptII*) a současně v oblasti T-DNA gen pro selekci úspěšně transformovaných rostlin (*bar*). Konstrukty byly cíleny na gen *fad2-1* (v případě konstruktů pVO045, pVO046, pVO047); a na gen *fad2-2* (v případě pVO048 a pVO049). Jednotlivé konstrukty se lišily rozpoznávací sekvencí pro působení restričních endonukleas, jak je patrné z tabulky 25. Konstrukty pVO045 a pVO046 se mezi sebou odlišovaly pouze jedním nukleotidem v rozpoznávací sekvenci (měly rozdílnou délku „spaceru“, barevně zvýrazněno v tabulce 25), zatímco ostatní konstrukty byly cíleny na zcela rozdílné sekvence.

Tab.25: Rozpoznávací sekvence pro působení jednotlivých TALENs konstruktů

Konstrukt	Gen	Rozpoznávací sekvence pro působení restričních endonukleas
pVO045	<i>fad2-1</i>	TAGCCCTCTCAACTACCTCG Cg ctggccggtctaCTGGCCTGCCAGGGCTGC
pVO046		TAGCCCTCTCAACTACCT CG ctggccggtctaCTGGCCTGCCAGGGCTGC
pVO047		TGTTTCAAACGCTCAATCccccgatcggtcgCCTACGTGGCGTACGACCTCA
pVO048	<i>fad2-2</i>	TGCGCTCTACAAGCTTGCTGTcgccaagggactggcTTGGGTGGTTTGTGTCTACG GA
pVO049		TCCTCCACTCATGCCTCAtggtaccctactCTCGTGGAAAGCACAGCCA

Na obrázku 29 je uvedeno schéma konstruktů pVO046 použitého pro transformaci. Mapy všech TALENs konstruktů jsou uvedeny v přílohách práce.



Obr. 29: Schéma použitého konstruktů pVO046

5.2.3 Elektroporace plasmidů TALENs do *Agrobacterium tumefaciens*

Posledním krokem před transformací hypokotylů lnu byla elektroporace pěti vzniklých TALENs konstruktů do *Agrobacterium tumefaciens* kmene EHA105 spolu s pomocným vektorem pCleanS-167.

Narostlé kolonie *A. tumefaciens* byly přeočkovány do tekutého LB média bez antibiotik a kultivovány přes noc. Byly vytvořeny zásobní alikvoty, které byly následně použity pro transformaci lnu.

5.3 Agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů lnu

Segmenty hypokotylů získané ze sterilních klíčenců byly kultivovány 7 dnů na MS médiu s přísadkou 6-benzylaminopurinu (BAP) a kyseliny α -naftylctoové (NAA). Explantáty hypokotylů byly následně na 10 min ponořeny do suspenze agrobakteria v LB médiu. Po kokultivaci byly explantáty na MS médiu 7 dní kultivovány v kultivační komoře.

Poté byly opláchnuty destilovanou vodou s přísadkou antibiotik a převedeny na selekční médium (MS1). Po třech týdnech byly všechny přežívající zelené explantáty pasážovány

na čerstvé selekční médium MS2, po dalších třech týdnech pak na médium s přídavkem MS3. Na obrázcích 30 a 31 jsou zachyceny momenty z agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů.



Obr. 30 a 31: Vlevo segmenty hypokotylů lnu po týdenní kokultivaci s agrobakterií, vpravo při následném oplachu

V rámci každé transformace byly zároveň s inokulovanými explantáty pěstovány kontrolní vzorky, jednak netransformované explantáty na médiu bez přídavku antibiotik a zároveň netransformované (neinokulované) explantáty na selekčním médiu, tak aby bylo možno pozorovat úspěšnost jednotlivých experimentů již v *in vitro* podmínkách

Potenciálně transgenní T₀ prýty byly zakořeněny na médiu R a poté přesazeny do sterilní zeminy ve fytozkušnici a dopěstovány do semen.

5.3.1 Transformace segmentů hypokotylů lnu konstruktem pWellFAD2i

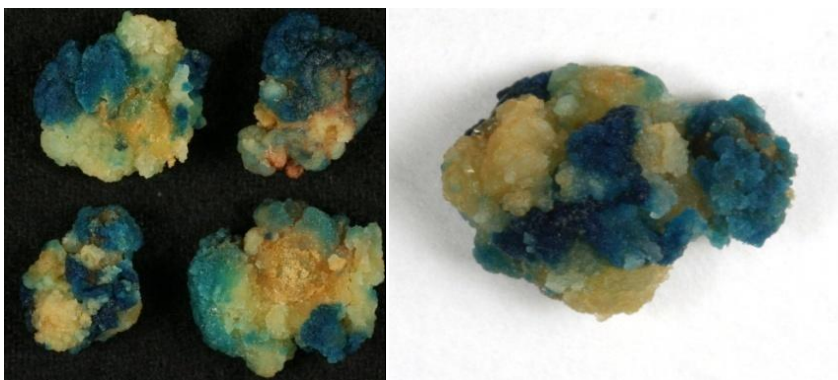
Pro transformaci konstruktem pWellFAD2i prostřednictvím dvou různých kmenů agrobakterií (EHA105 a GV3101) byla použita semena nízkolinolenové linie olejného lnu AGT 1538/07 a linie s běžným obsahem a složením mastných kyselin AGT 583/05. Během roku 2014 byly založeny celkem čtyři transformační pokusy s tímto konstruktem. V každé pokusné sérii se pracovalo s 250 segmenty hypokotylů lnu. V uvedeném rozsahu provedených transformací se podařilo získat pouze transformanty linie AGT 583/05, která se již dříve osvědčila jako responzivní genotyp vhodný pro transformace.

5.3.1.1 Histochemický GUS test kalusů po transformaci hypokotylů

Po transformaci konstruktem pWellFAD2i pro vyvolání RNA interference, který obsahoval gen *uidA*, probíhala po transformaci hypokotylů histochemická GUS analýza. Explantáty byly analyzovány čtyři týdny po agrobakteriální infekci. Histochemický GUS test byl proveden dle Fütterera et al. (1995).

Na cca 90 % testovaných kalusů byly po 24 hodinách kultivace pozorovány modře zbarvené oblasti, které mohou vést k regeneraci transgenních prýtů. Silná GUS exprese byla

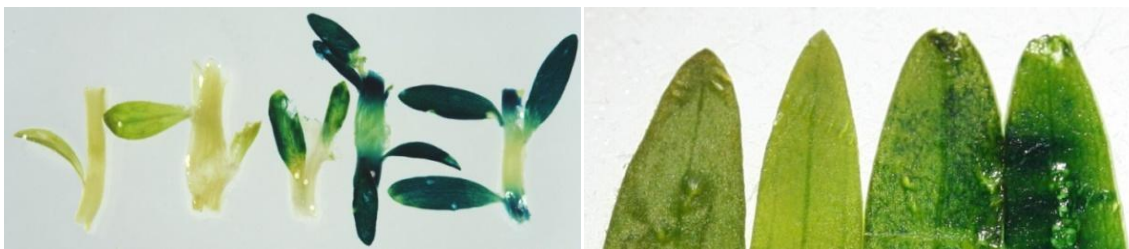
považována za důkaz účinnosti transformace. Příklad výsledku histochemického GUS testování kalusů je uveden na obr. 32 a 33.



Obr. 32 a 33: Histochemický GUS test kalusů transformovaných konstruktem *pWellFAD2i*

5.3.1.2 Histochemický GUS test regenerovaných rostlin po transformaci konstruktem *pWellFAD2i*

Další GUS testování bylo provedeno u regenerovaných rostlin. Pro test byly použity části listů a segmenty stonků, jak je znázorněno na obr. 34 a 35.



Obr 34 a 35: GUS analýza segmentů stonků a listů rostlin transformovaných konstruktem *pWellFAD2i*

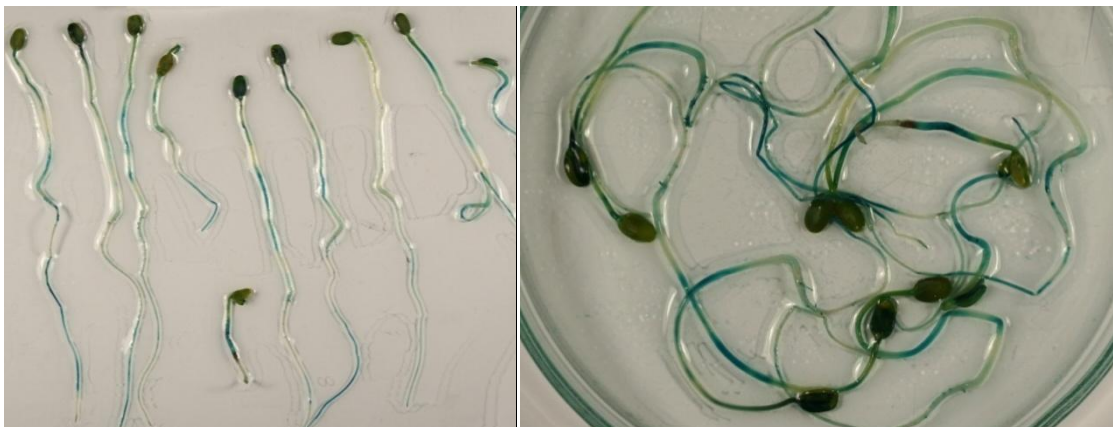
Vzorky, na kterých byla patrná po kultivaci silná GUS exprese, byly považovány za transformované a následně testovány pomocí PCR na přítomnost reportérového a selekčního genu (*uidA*, *bar*).

Transformované rostliny detekované histochemickým GUS testem, pozitivní PCR detekcí přítomnosti transgenů a rostoucí na selekčním médiu, byly přesazeny do zeminy a dopěstovány do semen. Transformované rostliny byly dále testovány reverzně transkripční PCR a qPCR.

5.3.1.3 Histochemický GUS test u semen sklizených z regenerantů

Semena (generace T₁) získaná z transgenních linií transformovaných konstruktem *pWellFAD2i* byla nesterilně naklíčena. Testováno bylo celkem 19 linií, z nichž každá pocházela ze samostatného explantátu. Použito bylo 20 semen z každé linie. Klíčenci byli ponořeni do připraveného roztoku pro histochemický GUS test obsahujícího barvivo X-gluc, kde byli ponecháni přes noc. Druhý den proběhlo vyhodnocení zbarvení. Bylo patrné modré

zbarvení vzorků (obr. 36 a 37), potvrzující přítomnost a expresi genu *uidA* pro β -glukuronidasu. Pro další testování bylo vybráno sedm linií (označeny 1 – 7) vykazujících GUS expresi u všech barvených klíčenců – tedy neštěpících. Tyto linie byly použity pro míry exprese genu *fad2* a stanovení obsahu MK.



Obr.36 a 37: Histochemický GUS test klíčenců T_1 generace linií lnu transformovaných konstruktem *pWellFAD2i*

5.3.2 Testování *FAD2-i* transformantů pomocí reverzně transkripční PCR

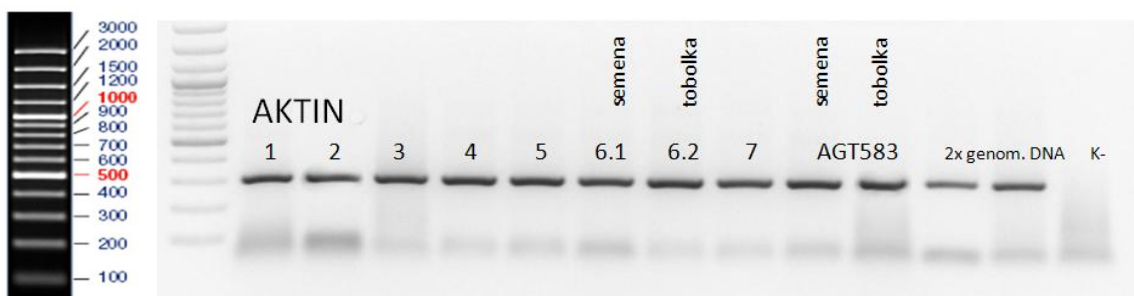
5.3.2.1 Izolace RNA

Z embryí ze semen převedených regenerantů T_0 krátce před vstupem do fáze zelené zralosti byla provedena izolace RNA. Použity byly vybrané transgenní linie (1 – 7) a netransgenní kontrola. U jednoho ze vzorků (linie č. 6) a netransgenní kontroly (AGT 583/05) byla RNA izolována také z celých tobolek. Po izolaci byla spektrofotometricky stanovena koncentrace vzorků, aby pro reverzní transkripci mohlo být použito optimální vstupní množství RNA.

5.3.2.2 Reverzně transkripční PCR

Po reverzní transkripci byla provedena PCR, jejíž výsledky zachycují obr. 38, 39 a 40. Jako kontrola byla použita amplifikace genu pro aktin a genu *uidA*. Amplifikovány byly vzorky cDNA z vybraných transgenních linií a také vzorky genomové DNA odrůdy Raciol (netransformované) a cDNA z netransgenní linie AGT 583/05.

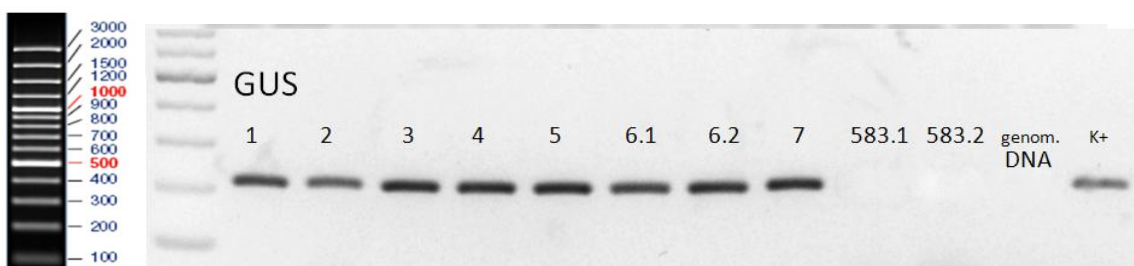
V případě kontrolní amplifikace genu pro aktin (obr. 38) vyšly u vzorků ze všech transgenních linií PCR produkty v očekávané délce, čímž byla potvrzena kvalita získané cDNA. V případě vzorku č. 6 a netransgenní kontroly AGT 583/05 byla vedle cDNA z embryí semen amplifikována také cDNA izolovaná z celé tobolky. Jako kontrola byla použita genomová DNA, jako negativní kontrola reakce s H_2O namísto templátu. Délka amplifikovaného produktu byla 303 bp.



Obr. 38: Reverzně transkripční PCR genu pro aktin – vzorky z embryí semen a tobolek lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i

Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 1. – 7. amplifikované vzorky cDNA transgenních linií, AGT 583/05 – netransgenní kontrola, genomová DNA – pro kontrolu kvality vyizolované cDNA, vpravo negativní kontrola (H₂O místo templátu)

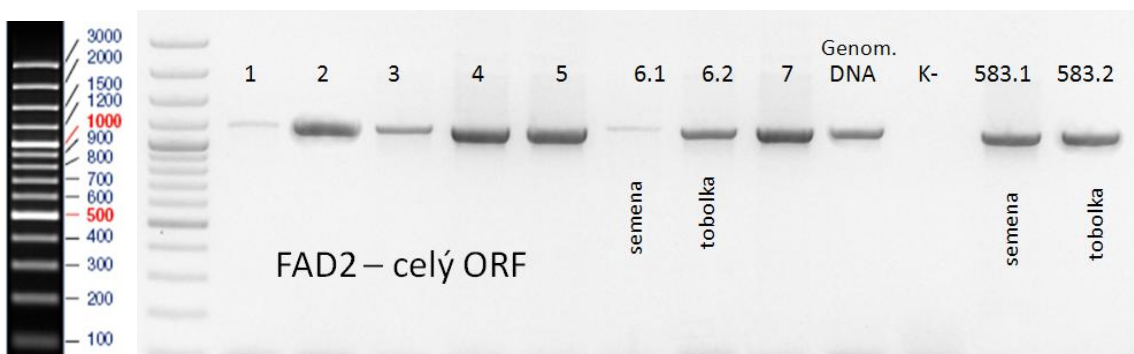
Taktéž reverzně transkripční PCR genu pro GUS vyšla dle očekávání. Produkt o velikosti 211 bp byl úspěšně amplifikován u všech vzorků s výjimkou netransgenních kontrol (obr. 39).



Obr. 39: Reverzně transkripční PCR genu uidA – vzorky z embryí semen a tobolek lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i

Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 1.– 7. amplifikované vzorky cDNA transgenních linií, 2x AGT 583/05 – cDNA z netransgenní kontroly, genomová DNA z netransformované rostliny, vpravo pozitivní kontrola (DNA transgenního lnu z dřívějších pokusů)

Pro amplifikaci sekvence genu *fad2* byly použity primery ohraničující celý otevřený čtecí rámec (ORF) tohoto genu. Amplifikovaná sekvence měla délku 1137 bp. Jako kontrola byla použita cDNA izolovaná z netransgenní linie AGT 583/05 a také genomová DNA odrůdy Raciol (netransformované). Výsledek reakce je zachycen na obr. 40.



Obr. 40: Reverzně transkripční PCR genu *fad2* – vzorky z embryí semen a tobolek lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i

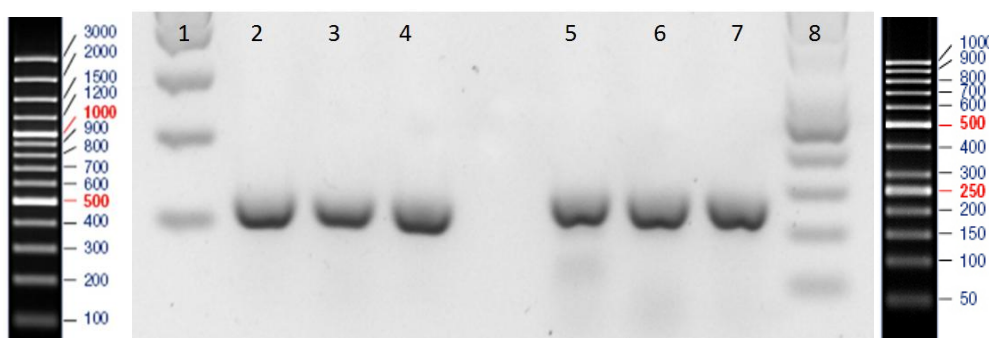
Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 1. – 7. amplifikované vzorky cDNA rostlin transgenních linií, genomová DNA, negativní kontrola (H₂O místo templátu), AGT 583/05 – amplifikované vzorky cDNA z netransformované linie

Sníženou expresi genu *fad2* na základě výsledků RT-PCR vykazovaly vzorky linií označených čísly 1 a 6. Nižší exprese byla patrná také u vzorku číslo 3. U linie č. 6 byla patrná nižší exprese u embryí ze semen než u vzorku izolovaného z celé tobolky. Vzorky cDNA byly dále použity pro další testování pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR).

5.3.3 Testování *FAD2-i* transformantů pomocí qPCR

5.3.3.1 Ověření specifity primerů

Primery pro gen *fad2-1* a gen pro aktin byly navrženy tak, aby se amplifikovala oblast v blízkosti polyadeninového 3' konce genů o délce 100 – 150 bp. Specifita navržených primerů byla ověřena pomocí PCR a elektroforetické separace v agarózovém gelu. Jak je patrné na obr. 41, primery jsou specifické, amplifikuje se jen jeden produkt.



Obr. 41: Ověření specifity primerů navržených pro qPCR

1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 4. vzorky cDNA amplifikované s primery pro gen *fad2-1*, 5 – 7. vzorky amplifikované s primery pro aktin, 8. GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva)

5.3.3.2 Exprese genu *fad2-1* u transformantů

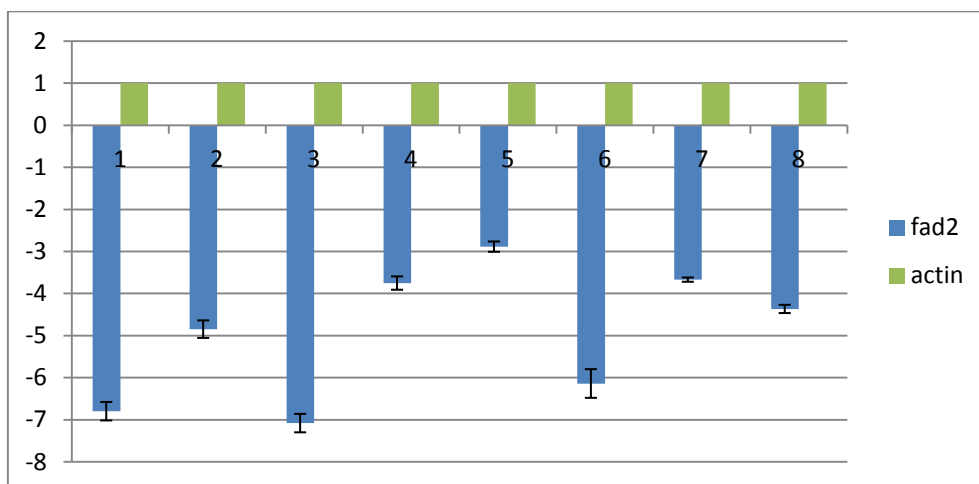
Expresa *fad2* byla testována pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR či qRT-PCR). Byla provedena relativní kvantifikace, kdy se množství fluorescence testovaného vzorku porovnávalo s množstvím fluorescence referenčního vzorku (genu pro aktin) jako vnitřní kontroly. Pro zajištění co největší přesnosti, byly vzorky analyzovány v tetraplikátech. Vyhodnocení exprese kandidátních genů bylo stanoveno dle metody ΔCt .

Hodnota Ct udává počet cyklů, při kterých protne křivka produktu práh citlivosti. ΔCt byla vypočtena jako rozdíl Ct hodnoty genu zájmu a Ct hodnoty referenčního genu. Relativní rozdíl v počtu kopií ampikonu vzorku a standardu (referenčního genu) byl vypočítán jako $2^{\Delta\text{Ct}}$ a je pro jednotlivé vzorky (sedm vybraných transgenních linií) a netransgenní kontrolu (linie AGT 583/05) uveden v tabulce 26.

Tab. 26: Hodnoty ΔCt pro gen *fad2-1* u jednotlivých vzorků a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu ($2^{\Delta Ct}$)

Číslo linie	ΔCt <i>fad2-</i>	$2^{\Delta Ct}$
1	6,796	111,122
2	4,847	28,780
3	7,079	135,205
4	3,752	13,743
5	2,886	7,392
6	6,138	70,424
7	3,670	12,729
8 (AGT 583/05)	4,367	20,635

Pro qPCR byly použity vzorky cDNA izolované z embryí semen jednotlivých transgenních linií (linie 1 – 7) použitých dříve pro reverzně transkripční PCR. Průměrné hodnoty exprese genu *fad2-1* u testovaných vzorků transgenního lnu a netransgenní kontroly (vz. 8) zachycuje obr. 42.



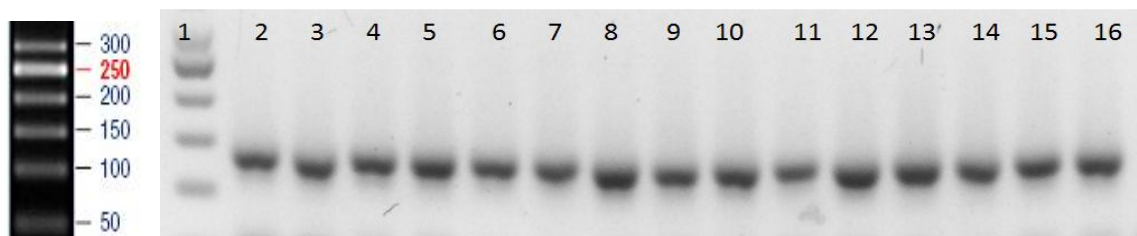
Obr. 42: Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu *fad2-1* u testovaných vzorků
Vzorky č. 1 – 7: průměrné hodnoty exprese genu *fad2-1* u jednotlivých testovaných transgenních linií, 8. exprese *fad2-1* u netransgenní kontroly

Jak je patrné, byla u genu *fad2-1* naměřena ve srovnání s referenčním genem pro aktin nízká exprese. Z grafu lze vyčíst, že exprese *fad2-1* byla u vzorků transgenních linií označených čísly 1, 3 a 6 nižší než u netransgenní kontroly. Tyto výsledky korespondují také se závěry reverzně transkripční PCR.

U vzorku č. 2 byla pozorována průměrná exprese jen velmi mírně nižší než u netransgenní kontroly. U zbylých vzorků (4, 5 a 7) byla pozorována vyšší exprese *fad2-1* proti netransgenní kontrole, což naznačuje, že RNA interference genu *fad2-1* u těchto vzorků nebyla indukována.

5.3.3.3 Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR

Produkty z qPCR byly vizualizovány na agaróзовé elektroforéze pro vyloučení amplifikace nespecifických produktů. Jak je patrné z obr. 43, amplifikovány byly pouze specifické fragmenty *fad2-1* z cDNA testovaných vzorků lnu o délce 131 bp.



Obr. 43: Ověření specifické amplifikace produktů při qRT-PCR

1. GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 16. amplifikované fragmenty *fad2-1*

5.3.4 Složení oleje a skladba mastných kyselin u transformantů

Stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorcích lnu je prováděno podle ČSN ISO 5508 (Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií). Vzorek tvořilo vždy 10 semen lnu, která byla homogenizována v třecí misce. Výsledek stanovení pro jednotlivé linie uvádí tab. 27.

Tab. 27: Obsahy jednotlivých mastných kyselin v testovaných vzorcích lnu

Vzorky č. 1 – 7: jednotlivé testované transgenní linie transformované konstruktem *pWellFAD2i*, 8. netransgenní kontrola AGT 583/05

Číslo vzorku	Palmitová (%)	Stearová (%)	Olejová (%)	Linolová (%)	Linolenová (%)
1	7,8	1,8	30,3	22,5	37,8
2	6,3	1,7	30,8	21,1	40,3
3	6,4	1,7	38,0	21,4	32,5
4	7,0	1,8	35,6	20,2	35,3
5	6,7	1,6	37,6	21,2	33,0
6	6,4	1,8	33,6	21,6	36,5
7	6,5	1,9	34,8	21,9	35,0
8 (kontrola)	6,6	1,7	37,3	20,1	34,2

Ve vzorcích s pracovním označení 1, 3 a 6, které dle výsledků RT-PCR a qPCR vykazovaly změny v expresi *fad2-1* nebyla pozorována změna ve složení jednotlivých mastných kyselin vůči kontrole či vzorkům nevykazujícím snížení exprese. Možné vysvětlení by mohlo být v „nahrazení funkce“ genu *fad2-1* genem *fad2-2* či dalšími *fad2* geny, což je podrobněji uvedeno níže v diskusi.

Patrný je vyšší obsah kyseliny olejové ve všech vzorcích včetně netransgenní kontroly, což bylo s velkou pravděpodobností způsobeno pěstováním ve skleníku při vyšších letních teplotách.

5.3.5 Transformace segmentů hypokotylů lnu konstrukty TALENs

Pro transformace s užitím konstruktů TALENs byla použita linie lnu AGT 583/05. Bylo provedeno celkem 5 sérií transformací, ve kterých byly postupně použity jednotlivé konstrukty. V každé pokusné sérii se pracovalo s 250 segmenty hypokotylů lnu. Ty byly transformovány revitalizovanou kulturou *Agrobacterium tumefaciens*, kmen EHA105 nesoucím plasmidy pVO045, pVO046, pVO047, pVO048 nebo pVO049, v objemu 100 ml.

Konstrukty neobsahovaly gen *uidA*, proto byla využívána výhradně selekce úspěšně transformovaných explantátů na základě genu *bar*. Kultura *in vitro* regenerantů byla udržována na médiu s fosfotricinem. Selekcce měla vést k vyloučení netransgenních sektorů, pokud došlo k regeneraci chimérických pupenů.

Prýty rostoucí z transformovaných kalusů byly pasážovány na selekční médium (obr. 44). Právě po přepasážování prýtů byly zaznamenány největší ztráty, patrně způsobené faktem, že ačkoliv jsou kalusy umístěny na selekčním médiu, vznikají prýty často z vitálnějších netransgenních sektorů a netransformovaných buněk.

Prýty, které na selekčním médiu úspěšně zakořenily, byly přesazeny do zeminy a jsou pěstovány pro získání semen (obr. 45). Doposud se podařilo získat celkem 12 rostlin přesazených do zeminy.

Z regenerantů rostoucích na selekčních médiích/ zakořeněných prýtů/ rostlin přesazených do zeminy byly odebírány vzorky pro PCR testování přítomnosti transgenů (*bar*) a enrichment PCR testující přítomnost mutace v genu *fad2-1* (či *fad2-2*, dle použitého konstruktu).



Obr. 44 a 45: Transformace konstrukty TALENs

Vlevo přepasážované prýty po transformaci konstruktem pVO046 na médiu s fosfotricinem, vpravo rostliny linie AGT 583/05 transformované konstrukty TALENs přesazené do zeminy (dopěstování do semen)

5.3.6 Transformace lnu pomocí metody floral dip

5.3.6.1 Vlastní transformace metodou floral dip

Pro transformaci metodou floral dip byl použit TALENs konstrukt pVO045 a kontrolní konstrukt pBI α MT, který obsahuje gen *uidA*. Podle použitého konstruktu a velikosti pupenů, které byly transformovány, byly stonky po transformaci označeny příslušnou značkou.

Nádoba se lny byla položena horizontálně a poupata lnu byla ponořena do roztoku agrobakteria. Následně byly transformované pupeny překryty plastovými pytlíky, které udržují vlhké prostředí optimální pro agrobakterium (obr. 46 a 47). Druhý den ráno byla nádoba s rostlinami opět postavena a pytlíky byly odstraněny. Po opakované floral dip transformaci byly rostliny dopěstovány do semen, což trvalo zhruba 2 měsíce.



Obr. 46 a 47: Transformace lnu metodou floral dip za použití konstruktu pBI α MT (transformované pupeny překryté plastovými pytlíky, které udržují optimální vlhké prostředí)

5.3.6.2 Histochemické GUS testování floral dip transformantů

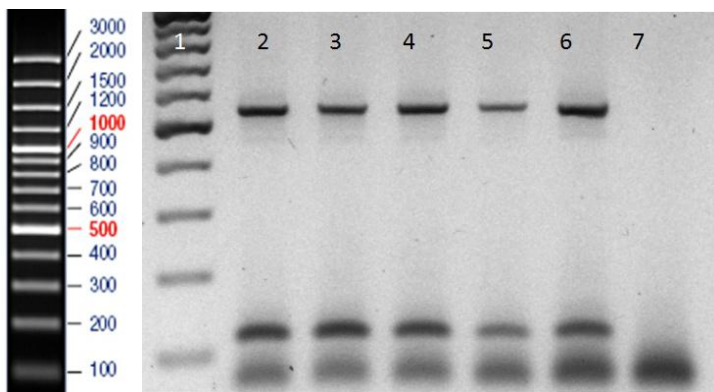
Semena sklizená z rostlin transformovaných kontrolním konstruktem pBI α MT metodou floral dip byla naklíčena a byl u nich proveden histochemický GUS test pro ověření účinnosti transformace (obrázek 48). Naklíčená semena byla přes noc inkubována při teplotě 37 °C v GUS roztoku obsahujícím X-gluc, druhý den proběhlo vyhodnocení zbarvení. Modré zbarvení u vysokého procenta klíčenců potvrdilo úspěšnost transformace. Z 250 získaných semen se asi 30 % vzorků (70 ks) jevílo jako GUS pozitivních.



Obr. 48: Histochemická GUS detekce u semen a klíčnicích rostlin po kontrolní floral dip transformaci konstruktem pBI α MT

5.3.6.3 Testování floral dip transformantů pomocí PCR

Po izolaci DNA z náhodně vybraných histochemicky GUS pozitivních vzorků transformovaných konstruktem pBI α MT byla provedena PCR detekce fúze vnášených transgenů. Amplifikována byla oblast genů *uidA* a α MT v délce 550 bp. PCR detekce prokázala, že vzorky, které se jeví jako histochemicky GUS pozitivní, obsahují zmíněné geny. Příklad pozitivní PCR detekce fúze transgenů *uidA* a α MT je uveden na obr. 49.



Obr. 49: PCR detekce transgenů po floral dip transformaci konstruktem pBI α MT
1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 6. amplifikované fragmenty fúze genů *uidA* a pBI α MT, 7. negativní kontrola

5.3.6.4 Testování rostlin po floral dip transformaci konstruktem pVO045

Jelikož konstrukt pVO045 neobsahuje gen pro GUS, pro vyhledání transgenních rostlin byla semena získaná po floral dip transformaci selektována prostřednictvím genu *bar* umožňujícího toleranci transformantů k herbicidu. Semena sklizená po transformaci (celkem cca 500) byla zaseta a pěstována v GM skleníku (obr. 50). Na potenciálně transgenní rostliny byl aplikován postřik obsahující fosfinitricin, který byl následně dvakrát zopakován. Přeživší rostliny byly přesazeny a dopěstovány do semen. Celkem bylo takto dopěstováno 66 rostlin, což znamená asi 13 % z celkového počtu testovaných semen.

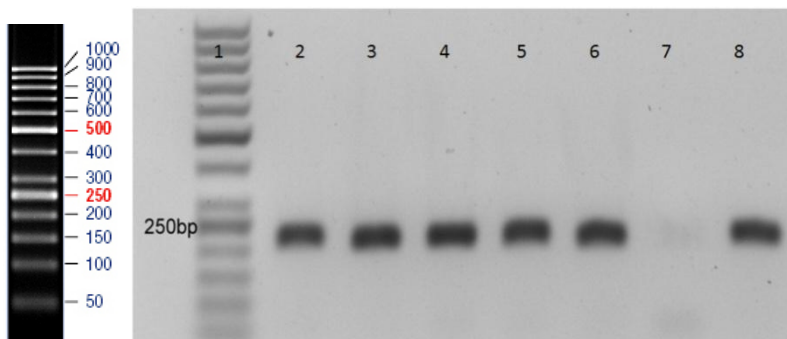


Obr. 50: Testování potenciálních floral dip transformantů (foto před postřikem)

5.3.7 Detekce rostlin úspěšně transformovaných konstrukty TALENs

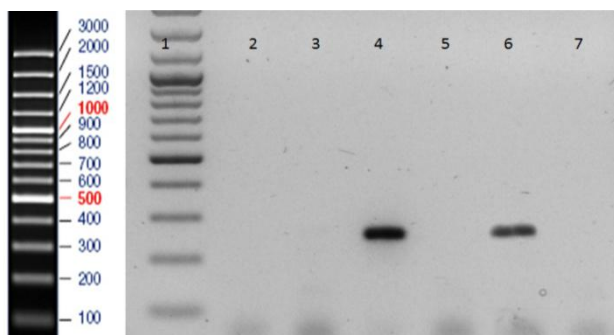
5.3.7.1 Detekce selekčního genu metodou PCR

K detekci GM lnu modifikovaného konstrukty TALENs (transformovaného s využitím postupu floral dip nebo získaného transformací hypokotylů) byla aplikována PCR metoda s použitím primerů umožňujících amplifikaci selekčního genu *bar*. Očekávaná délka amplifikovaného fragmentu byla 243 bp. Příklad pozitivní detekce transgenu *bar* ve vzorcích transformovaných konstrukty TALENs je uveden na obrázku 51. V případě transformace floral dip byl transgen *bar* metodou PCR detekován u všech 66 rostlin, které byly vyselektovány postřikem.



Obr. 51: PCR detekce transgenů po floral dip transformaci konstruktem pVO0045
1. GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 6. PCR fragmenty detekovaného genu *bar*, 7. negativní kontrola, 8. pozitivní kontrola

V případě transformace segmentů hypokotylů byly testovány vzorky během různých fází regenerace. U vzorků DNA pocházejících z prýtů (po agrobakteriální transformaci hypokotylů), u kterých vycházel PCR test na přítomnost genu *bar* pozitivně, byl prováděn také PCR test kontaminace agrobakteriem. Ve stádiu prýtů totiž často nebývá agrobakterium z média dokonale odstraněno a jeho přítomnost může vést k falešně pozitivním detekcím na přítomnost transgenů. Použity byly primery amplifikující fragment o velikosti 270 bp v oblasti *virG*. Příklad PCR detekce vzorku kontaminovaného agrobakteriem je uveden na obr. 52.



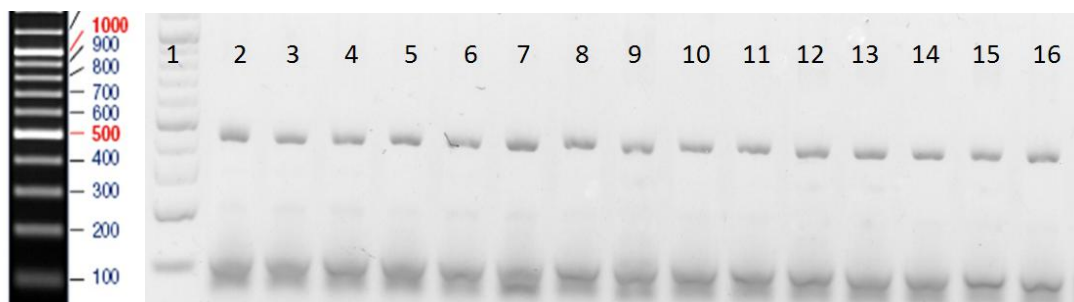
Obr. 52: PCR testování agrobakteriální kontaminace prostřednictvím primerů amplifikujících oblast virG
1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2, 3 a 5. vzorky negativní, 4. vzorek s pozitivní detekcí kontaminace agrobakteriem, 6. pozitivní kontrola, 7. negativní kontrola

PCR metodou byla přítomnost genu *bar* potvrzena u 12 rostlin, které se podařilo přesadit do zeminy a jsou pěstovány do semen.

5.3.7.2 Detekce indukovaných mutací pomocí enrichment PCR

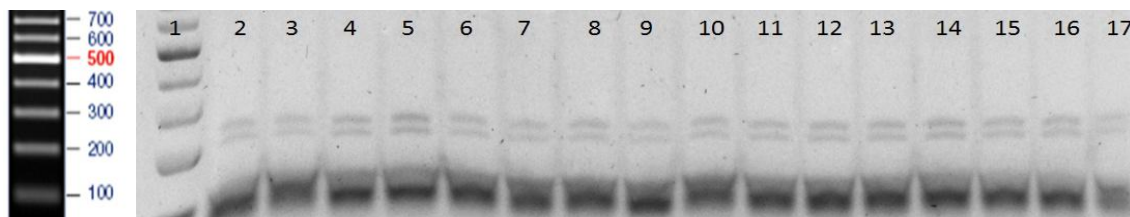
Pro detekci mutací indukovaných v transgenních rostlinách konstrukty TALENs byla nejprve izolována DNA z rostlinného materiálu (kalusů, prýtlů, listů). 5 µg izolované DNA bylo následně použito pro restrikční reakci přes noc. Pro restrikci byl vždy použit restrikční enzym odpovídající příslušnému použitému konstruktu.

Dalším krokem byla amplifikace lokusu našeho zájmu. K detekci indukovaných mutací u GM lnu modifikovaného konstrukty pVO045, pVO046, pVO047 byla použita PCR amplifikace genu *fad2-1*. K detekci indukovaných mutací u lnu modifikovaného konstrukty pVO048 a pVO049 byla použita PCR amplifikace genu *fad2-2*. 10 µl PCR reakce bylo vždy pro kontrolu nanášeno na agarózový gel (obr. 53).



Obr. 53: Výsledky PCR amplifikace genu *fad2-1* (dílčí krok testování pomocí enrichment PCR)
1. jamka 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 16. amplifikované fragmenty gelu *fad2-1* u jednotlivých testovaných vzorků (442 bp)

Zbýlých 40 µl reakce bylo štěpeno pomocí stejného restrikčního enzymu jako v první restrikční reakci. Po proběhnutí reakce byla reakční směs nanášena na gel (obr 54). Pokud nukleasa fungovala správně, měl být na gelu patrný neštěpený PCR fragment – obsahující mutaci v restrikčním místě. Tento neštěpený fragment měl být vyřezán z gelu a odeslán na sekvenování.



Obr. 54: Výsledek 2.restrikční reakce (finální krok testování pomocí enrichment PCR)

1. 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), 2. – 17. fragmenty genu *fad2-1* štěpené enzymem *HpaII* o délce 237 a 205 bp

Doposud nebyl detekován neštěpený produkt, který by potvrdil úspěšnou indukci mutace pomocí konstruktů TALENs. Vzorky transformované konstruktem pVO045/ pVO046 dávaly po restrikci fragmenty o délce 237 a 205 bp (obr 54.), potenciální transformanti získaní s použitím konstruktu pVO047 fragmenty o délkách 130 a 312 bp. Také u vzorků transformovaných konstruktem pVO048 a pVO049 se amplifikací genu *fad2-2* a následnou restrikcí nepodařilo detekovat neštěpený fragment, pouze štěpené fragmenty o délce 318 a 83 bp, resp. 356 a 90 bp. U vybraných vzorků byla nepřítomnost mutace potvrzena také kontrolním sekvenováním.

Indukované mutace v genech *fad2* nebyly objeveny navzdory tomu, že PCR detekce potvrdila v rostlinách přítomnost selekčního genu *bar* a to jak u rostlin/explantátů transformovaných pomocí metody floral dip, tak pomocí agrobakteriální transformace segmentů hypokotylů.

V současné době pokračují transformační pokusy s využitím konstruktů TALENs s cílem získat rostliny s mutací v genech *fad2-1/ fad2-2*.

6 DISKUSE

Tato práce vznikla jako součást projektu KONTAKT MŠMT LH12226 „Komplexní studium genetické variability druhu *Linum usitatissimum* L., vzájemná výměna genetických zdrojů kolekcí České republiky a Ruské federace s cílem zvýšení jejich užitné hodnoty a využití pro tvorbu odrůd s všestranným uplatněním“ (2012 – 2015). Využito bylo také metodických zkušeností získaných v projektu QI91A229: „Konvenční a molekulárně-genetické přístupy při tvorbě luskovin“ (2009 – 2013).

Práce byla zaměřena na zvyšování obsahu kyseliny olejové v semeni olejného lnu pomocí metod genové modifikace. Tradiční olejné lněné semeno obsahuje 50 – 70 % linoleové kyseliny, což činí lněný olej nevhodným pro potravinářské využití kvůli jeho nízké oxidační stabilitě. Vysoký obsah kyseliny linolenové je spojen se žluknutím a silným zápachem během skladování (Banik et al., 2011). Vysoký obsah olejové kyseliny je častým cílem šlechtění olejných plodin, důvodem je její stabilita, možnost širokého průmyslové využití i pozitivní zdravotní dopady její konzumace. Vyšší stabilita oleje se stala v poslední době požadavkem konzumentů i zpracovatelů oleje. Vedle využití v potravinářství jsou oleje s vysokým obsahem kyseliny olejové díky vyšší oxidační stabilitě používány také v průmyslu, například jako maziva (Chen et al., 2015).

První desaturace v biosyntetické dráze vedoucí ke vzniku kyseliny linolenové je vnesení dvojitě vazby pomocí desaturasy SAD (stearol-acid carrier protein desaturase), která desaturuje stearát na mononenasyčenou olejovou kyselinu. V druhém desaturačním kroku FAD2 desaturasa katalyzuje kyselinu olejovou na polynenasycenou mastnou kyselinu linolovou vytvořením druhé dvojně vazby. Ve třetím desaturačním kroku FAD3 desaturasa umožňuje konverzi kyseliny linolové na kyselinu linolenovou (Banik et al., 2011).

Počáteční hypotéza našeho záměru spočívala v umlčení/ indukci vzniku mutace v genu pro FAD2 desaturasu (také omega-6 desaturasu), čímž by mělo dojít ke zvýšení obsahu kyseliny olejové na úkor obsahu kyseliny linolové.

Tvorba konstruktů pro vyvolání interference genu *fad2*

Konstrukt pro vyvolání interference *fad2* byl připraven na bázi binárního plasmidu pGreenII (Hellens et al., 2000). Pro selekci a detekci transformovaných regenerantů byla použita kazeta nesoucí selekční gen *bar* pro rezistenci k fosfotricinu a reportérový gen *uidA* umožňující histochemický důkaz transformace pomocí GUS testu.

Fragment genu *fad2* klonovaný do expresní kazety ve směru sense a antisense měl délku 442 bp. Vybrána a amplifikována byla oblast genu *fad2*, ve které byla na základě srovnání dostupných sekvencí pozorována nejvyšší míra homologie mezi různými rostlinnými druhy.

Selekční a reportérový gen byly v T-DNA umístěny až za expresní kazetou indukující vznik vlásky, což zvyšuje pravděpodobnost, že histochemicky GUS pozitivní rostlina tolerantní vůči selekčnímu médiu bude obsahovat a exprimovat i vnášený gen. T-DNA je totiž inkorporována do genomu rostliny od RB k LB, přičemž nemusí proběhnout vložení celého úseku T-DNA.

Výsledný plasmid byl testován restrikční analýzou, sekvenováním a následně transformací modelové rostliny (tabáku). Restrikční analýza prokázala správnost začlenění vnášených genů a histochemicky byla potvrzena také exprese genu pro GUS v tabáku.

Po transformaci segmentů hypokotylů lnu byl během histochemického GUS testování patrný rozdíl ve výsledcích pozorovaných ihned po kokultivaci a v pozdějších fázích kultivace explantátů. Tento jev je způsoben transientní expresí, kdy je transgen vnesen pouze do cytoplazmy rostlinných buněk, ale nedochází ke stabilnímu začlenění do jejich jádra.

Pro transformaci byly použity nízkolinolenová linie AGT 1538/07 a responzivní genotyp AGT 583/05. Použity byly kmeny agrobakteria GV3101 a EHA105. Získat se však podařilo pouze transformanty a responzivní linie AGT 583/05 transformované agrobakteriemi EHA105. Metodika pro transformaci lnu byla na našem pracovišti již dříve optimalizována (Vrbová, 2010) a optimální výsledky jsou dle dosavadních zkušeností u lnu dosahovány právě při transformaci linie AGT 583/05 (vykazující vysokou transformační efektivitu) kmenem EHA105.

Získané transformované rostliny byly testovány histochemickou GUS detekcí, pomocí PCR, reverzně transkripční PCR, qPCR a po dopěstování semen bylo testováno také složení oleje. Byly získány linie s pozitivními výsledky histochemického GUS testování, ve kterých byla prokázána také přítomnost selekčního genu v genomu. U linií s pracovním označením 1, 3 a 6 bylo dle výsledků RT-PCR a qPCR pozorováno rovněž snížení exprese *fad2-1*. Při testování obsahu mastných kyselin však nebyla pozorována změna ve složení jednotlivých mastných kyselin vůči kontrole či vzorkům nevykazujícím snížení exprese. Možné vysvětlení by mohlo být v „nahrazení funkce“ genu *fad2-1* genem *fad2-2* či dalšími *fad2* geny.

Při pěstování transgenních vzorků společně s kontrolou v GM skleníku při vyšších letních teplotách bylo pozorováno zvýšení obsahu kyseliny olejové ve všech vzorcích včetně netransgenní kontroly. To koresponduje s výsledky publikovanými v práci Fofany et al. (2006), kde je popsáno, že exprese *fad2* a aktivita FAD2 desaturasy mohou být

ovlivňovány prostředím, přičemž teplé a suché podmínky vyústily ve vyšší hodnoty kyseliny olejové na úkor obsahu PUFA.

RNA pro testování exprese byla izolována z embryí semen regenerantů převedených do zeminy krátce před vstupem do fáze zelené zralosti. Dle dostupných publikací stoupá exprese *fad2* v semenech lnu na maximální hodnoty mezi 12 – 16 dnem po začátku kvetení (DAA – days after anthesis) a pak pozvolna klesá až do zralosti semen (Fofana et al., 2006; Banik et al., 2011), proto se tato fáze zdála být pro testování rozdílů v expresi *fad2* vhodná.

Ač se nezdařil záměr zvýšení obsahu kyseliny olejové technikou RNA interference, je možné přesto získané vzorky použít pro další studie. Obsahují selekční gen pro GUS a reportérový gen *bar*, takže mohou být použity pro testování stability transgenu v dalších generacích nebo pro tzv. ERA (environmental risk assessment) analýzy.

Kontrastem k našemu výsledku je řada publikací týkajících se RNA interference genu *fad2* u rozličných plodin, kde zvýšení obsahu kyseliny olejové bylo pozorováno. Například u *Arabidopsis thaliana* (Stoutjesdijk et al., 2002, Belide et al., 2012) bylo popsáno zvýšení obsahu kyseliny olejové z 15 % na 63 %. U bavlníku bylo popsáno zvýšení obsahu kyseliny olejové tímto způsobem ze 13 % na 78 % ve více než polovině z testovaných transgenních linií. RNA interferencí genu pro FAD2 bylo dosaženo zvýšení obsahu kyseliny olejové u sóji ze 16 na 55 % (Chen et al., 2011), resp. na více než 80 % (Wagner et al., 2011). Zvýšení obsahu kyseliny olejové prostřednictvím transformace konstruktem pro umlčení *fad2* genu bylo dosaženo také u řepky (*Brassica napus*) (Jung et al., 2011; Tian et al., 2011) a rýže (Zaplin et al., 2013).

U lnu byla první práce týkající se RNA interference genu *fad2* publikována až v letošním roce (Chen et al., 2015). V této publikaci je prezentována agrobakteriální transformace kalusů lnu získaných z prašnickové kultury (Chen a Dribnenki, 2003; Chen et al., 2008) konstruktem obsahujícím fragmenty z genů pro FAD2 u lnu (v práci označené jako LuFAD2A a LuFAD2B). Délka fragmentů vkládaných do konstruktu v jednom směru byla 488bp *fad2-1* a 531bp pro *fad2-2*. Pro gen *fad2-1* byla použita sekvence odlišná od oblasti genu, která byla použita pro tvorbu expresní kazety v naší práci. Pro tvorbu expresní kazety byl, shodně jako v naší práci, použit vektor pHannibal (CSIRO, Canberra, Austrálie). Na rozdíl od našeho pokusu byly však použity promotor a terminátor pro linie s cílenou expresí v semeni lnu (Patent WO/2001/016340). Jako výsledek popisují Chen et al. (2015) zvýšení obsahu kyseliny olejové až na 80 %, současně popisují pokles obsahu kyseliny linolové na 10,1 %. V obsahu ostatních mastných kyselin, včetně kyseliny linolenové, nebyly změny pozorovány. Byly zjištěny různé hodnoty kyseliny olejové u jednotlivých transformantů a linií. Tato variabilita

v expresi může být způsobena počtem kopií transgenu a také pozičním efektem, což bylo popsáno již dříve u jiných druhů (např. u *Arabidopsis thaliana* v publikaci Stoutjesdijk et al., 2002).

Klíčovou roli při transformaci hraje použitý promotor. Konstitutivní CaMV 35S promotor byl úspěšně aplikován v mnoha publikacích týkajících se transformace lnu (např. Wrobel et al., 2004; Wrobel-Kwiatowska et al., 2007a; Lorenc-Kukula et al., 2007; Badere et al., 2014). Na druhou stranu bylo u lnu publikováno použití specifických promotorů, které byly následně patentovány. Vedle promotoru pro linin popsaného v recentním článku týkajícím se RNA interference *fad2* genů u lnu (Chen et al., 2015) patří mezi patentované též promotor *sad2* (z genu pro stearyl-acyl carrier protein desaturase 2) (Jain et al., 1999). Patentován byl také promotor *cn11* (z genu pro conlinin) pro specifickou expresi v semeni lnu (Truksa et al., 2003).

Dle Drexlera et al. (2003) se vedle klasicky používaného CaMV 35S také promotory LeB4 (promotor pro legumin pocházející z *Vicia faba* L.) a USP, „unknown seed protein“ jevíly jako vhodné pro využití ve transformaci lnu. Testována byla také transkripční aktivita promotoru genu pro pinoresinol-lariciresinol reduktasu (*luplr*) za užití reportérového genu pro GUS během vývoje semen lnu (Hano et al., 2006). Promotor USP s expresí specifickou pro semena, izolovaný z *Vicia faba* (Bäumlein et al., 1991), který je velmi aktivní od raných vývojových stádií semene, byl také úspěšně použit pro transformaci lnu (Rui-López et al., 2009).

Nejefektivnějším promotorem pro silencing *fad2* by byl vlastní *fad2* promotor, což souvisí s ideální expresí v určitém čase a místě. Nedá se vyloučit, že neúspěch použití našeho konstruktů pro vyvolání RNA interference *fad2* genu byl způsoben či do značné míry ovlivněn právě použitím konstitutivního 35S promotoru. Použitím 35S promotoru však bylo v minulosti úspěšně dosaženo zvýšení obsahu kyseliny olejové metodou RNA interference genu *fad2* u tabáku (Yang et al., 2006). Pro tvorbu expresní kazety byl v uvedené práci použit pKannibal s kanamycinovou rezistencí, sesterský vektor námi použitého plasmidu pHannibal (CSIRO, Canberra, Austrálie). Výsledek RT-PCR demonstroval pokles *fad2* transkriptů ve všech testovaných orgánech s výjimkou květů. Byl prokázán signifikantní nárůst množství olejové kyseliny zejména v lipidech listů a v semenech transgenních rostlin. Navzdory silencingu však byly v transgenních rostlinách pozorovány nízké úrovně *fad2* transkriptů, které mohou být dle autorů dostatečné pro desaturační aktivitu. Proto je pravděpodobné, že s použitím specifického promotoru by došlo k ještě významnějšímu zvýšení obsahu kyseliny olejové.

U mnoha rostlinných druhů bylo zjištěno, že FAD2 desaturasa je kódována více geny. V genomu sóji se vyskytuje nejméně sedm členů této genové rodiny (Schlueter et al., 2007), dvě formy genu *fad2* byly objeveny u olivovníku (Hernández et al., 2005), tři ve slunečnici (Martinez-Rivas et al., 2001). Ortologní geny *fad2* byly klonovány a charakterizovány např. také u bavlníku (Zhang et al., 2009), řepky (Suresha et al., 2013) či světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.), u níž bylo objeveno dokonce jedenáct *fad2* genů (Cao et al., 2013). S velkou pravděpodobností se vyskytuje větší počet genů pro FAD2 také u tabáku (Yang et al., 2006). Pouze jeden gen pro FAD2 byl však doposud detekován u *Arabidopsis* (Zhang et al., 2012).

U lnu byly identifikovány dvě kopie genu *fad2* exprimované ve vyvíjejících se semenech a získány jejich nekompletní sekvence (Fofana et al., 2004; Khadake et al., 2009). Recentně byla potvrzena skutečnost, že se ve lnu vyskytují dva odlišné geny *fad2* a byla publikována sekvence druhého *fad2* genu (Thambugala et al., 2013; Thambugala a Cloutier, 2014; Radovanovic et al., 2014). Jelikož byl náš vektor pro vyvolání RNA interference u lnu vytvořen již před publikováním těchto informací, byl cílen pouze na gen *fad2*, označovaný nyní jako *fad2-1* nebo *fad2A*. Druhý popsaný gen *fad2* (*fad2-2*) byl využit až následně pro tvorbu konstruktů TALENs.

Nejnovější publikace však potvrzují domněnku, že se v genomu lnu vyskytuje ještě vyšší počet genů pro FAD2 desaturasu. You et al. (2014) identifikovali vedle dvou dříve známých *fad2* genů dalších 13 genů *fad2* genové rodiny. Dvanáct z nich tvoří šest párů duplikovaných genů, některé z genů však nejsou exprimovány. Klíčovou roli pro obsah mastných kyselin pak hrají duplikované páry genů *fad2a-1/fad2a-2* a *fad2b-1/fad2b-2*, které jsou vysoce exprimovány. Tato skutečnost naznačuje, že by k zvýšení obsahu kyseliny olejové mělo stačit umlčení těchto dvou párů, způsobem použitým úspěšně v publikaci Chen et al. (2015). Je možné, že výsledek naší transformace byl negativně ovlivněn právě cíleným umlčením pouze jednoho genu pro *fad2*. Nicméně pokud je popisované zvýšení obsahu kyseliny olejové při umlčení obou *fad2* genů natolik značné, mělo by přesto dojít alespoň k mírnému zvýšení obsahu kyseliny olejové vůči netransgenní kontrole.

Jako neoptimálnější přístup za použití RNA interference se jeví umlčení obou klíčových genů pro FAD2 za použití vhodného promotoru pro expresi v semenech lnu. Dle Chena et al. (2015) by pak další zvýšení olejové kyseliny u rostlin s umlčeným genem *fad2* mohlo zajistit umlčení genu *fatb* (fatty acyl-ACP thioesterasa B) nebo také silencing genu pro enzym PDCT (fosfatidylcholin: diacylglycerol cholinfosfotrasferasa).

Kromě RNA interference se mohou uplatnit pro zvýšení obsahu kyseliny olejové ve lnu i další přístupy molekulární genetiky jako např. metoda TALENs použitá také v této práci, či jiné aktuálně používané techniky cílené modifikace genomu.

Vedle metod genových modifikací se pro zvýšení obsahu olejové kyseliny u lnu nabízí také konvenční techniky vytváření nových genotypů jako například indukovaná mutagenese ethylmethansulfonátem (EMS). Tento přístup byl ve firmě Agritec úspěšně použit pro vytvoření linií s nízkým obsahem kyseliny α -linolenové a zvýšeným obsahem kyseliny olejové (Tejklová, 1995; Pavelek et al., 2011). Další možností by bylo nalezení nefunkční mutované alely *fad2*. Ta byla již objevena u světlice barvířské (Knowles et al., 1989, Liu et al. 2013), sóji (Pham et al., 2010) a ve slunečnici (Schuppert et al., 2006). Jelikož je obsah olejové kyseliny ve lnu ovlivněn více *fad2* geny (Thambugala et al., 2013; Thambugala a Cloutier, 2014; Radovanovic et al., 2014), stejně jako u jiných rostlin (Hernández et al., 2005; Martinez-Rivas et al., 2001; Zhang et al., 2009; Suresha et al., 2013; Cao et al., 2013), bylo by však náročné zkombinovat mutace v každém *fad2* genu, aby byly homozygotní.

Transformace lnu konstrukty TALENs

Vedle použití výše popsaného konstruktů pro vyvolání RNAi jsme se v této práci rozhodli využít také progresivních metod – tzv. „targeted genome editing“, pomocí kterých je možné upravit gen zájmu na specifickém místě v genomu. Výhoda metod „targeted genome editing“ oproti klasické transgenózi spočívá v tom, že nedochází k náhodným inzercím transgenů. Tyto metody jsou v genomice rostlin intenzivně využívány v posledních dvou letech. V této práci byla konkrétně použita technika TALENs (Tale nucleases transcription activator-like effectors). U lnu doposud její použití nebylo popsáno v žádné publikaci. Tento fakt by významně zvyšoval publikovatelnost výsledků i to v případě, pokud by byla objevena mutace indukovaná konstruktem TALENs, která by neměla vliv na fenotyp.

V případě funkčnosti konstruktů TALENs by po úspěšné transformaci lnu měla vzniknout v genu *fad2-1* (či *fad2-2*) mutace, čímž měla by být snížena jeho funkčnost, a tudíž i desaturace kyseliny olejové na kyselinu linolovou. V semenech lnu by tak vznikl olej podobný skladbou mastných kyselin oleji olivovému – s vysokým podílem kyseliny olejové.

Dříve vytvořený konstrukt pWellFAD2i pro indukci RNA interference nesl fragment původně jediného známého *fad2* genu u lnu, označovaného nyní jako *fad2-1*. V roce 2014 byla publikována sekvence druhého *fad2* genu u lnu, nazvaného *fad2-2* (Radovanovic et al. 2014, Thambugala a Cloutier, 2014). Na základě sekvencí genů *fad2-1*

a *fad2-2* byly navrženy konstrukty TALENs. Sekvence obou *fad2* genů jsou však natolik odlišné, že se jevílo jako nevhodné cílit je stejným TALENs konstruktem. Jako kompromis byly tedy vytvořeny konstrukty pro indukci mutací v každém *fad2* genu zvlášť, ačkoliv dle dřívějších zkušeností a publikací se jevílo jako lepší strategie indukce mutací v obou genech najednou. Konstrukty byly cíleny na gen *fad2-1* (v případě konstruktů pVO045, pVO046, pVO047) a na gen *fad2-2* (konstrukty pVO048 a pVO049).

U jednotlivých konstruktů byla předpokládána různá míra účinnosti TALE kazety, proto bylo pro transformaci použito pět různých variant konstruktů, které mají různá rozpoznávací místa. Použití většího množství konstruktů mohlo vést k zajímavému srovnání účinnosti jednotlivých konstruktů pro indukci mutací, ale také srovnání efektu těchto indukovaných mutací při fenotypovém projevu.

Konstrukty neobsahovaly reportérový gen *uidA*, proto nebyly použity ke kontrolní transformaci tabáku, ale přímo pro transformaci hypokotylů lnu. Pro transformaci responzivního genotypu lnu AGT 583/05 byl použit agrobakteriální kmen EHA105 dle optimalizované metodiky (Vrbová, 2010). Transformované explantáty rostoucí na selekčním médiu byly testovány pomocí PCR a enrichment PCR, umožňující rychlou detekci mutace v místě našeho zájmu. Pomocí PCR bylo zjištěno, že byly získány transformované rostliny obsahující selekční gen *bar*, nicméně dle výsledků enrichment PCR a sekvenace žádný z testovaných vzorků neobsahoval kýženou mutaci indukovanou v genu *fad2-1/fad2-2* TALENs konstruktem.

Jak již bylo zmíněno, prozatím neexistuje publikace týkající se využití technologie TALENs u lnu. Zajímavé závěry však vyplývají z publikace Haun et al. (2014), kdy bylo cílenou mutagenézou s využitím technologie TALENs dosaženo výrazného zvýšení obsahu kyseliny olejové u sóji.

U sóji, na rozdíl od lnu, jsou oba geny pro FAD2 desaturasu do značné míry shodné, proto mohly být ve zmíněné publikaci cíleny jedním TALENs konstruktem. Autoři použili celkem čtyři TALENs konstrukty a pozorovali, že se jednotlivé z nich významně liší v efektivitě při použití. Transformací se podařilo získat 35 transgenních rostlin, 19 z nich bylo testováno na přítomnost mutací v genech *fad2* indukovaných TALENs konstruktem. Podařilo se objevit čtyři rostliny, ve kterých byl indukován vznik mutace v obou *fad2* genech. U rostlin obsahujících homozygotní mutaci pozorovali autoři zvýšení obsahu olejové kyseliny z 20 na 80 %. V publikaci Haun et al. (2014) byla, stejně jako v naší práci, TALEN expresní kazeta pod promotorem 35S. Transformace byla provedena pomocí *A. rhizogenes*.

Za pozornost stojí také skutečnost, že při tvorbě konstruktů v publikaci Haun et al. (2014) byl použit pouze selekční a nikoliv reportérový gen. Autoři tak činili ve snaze vytvořit snadněji „transgene free“ rostliny. V potomstvu transformantů obsahujících kýžené mutace testovali přítomnost selekčního markerového genu a také pravou hraniční oblast T-DNA pomocí kombinací primerů. Tyto oblasti se nepodařilo amplifikovat, z čehož autoři usuzují, že u potomstva došlo k vysegregování těchto oblastí. Získání rostlin s kýženou mutací, nicméně beze stop „cizí“ DNA v genomu vede k úvahám nad možnou změnou legislativy pro použití technologií programovatelných nukleas. Je otázkou, zda jsou tyto rostliny GMO, byť vznikly genetickou modifikací.

Z výše uvedených důvodů byl v námi používaných konstruktech přítomen pouze selekční gen *bar*, zatímco reportérový gen byl vynechán, ve snaze „zmenšit“ oblast T-DNA. Pravdou však zůstává, že přítomnost reportérového genu přináší při transformaci výhodu a dle našich dosavadních zkušeností zvyšuje pravděpodobnost a rychlost získání transformantů.

Využití technologií cílené modifikace genomu

V posledních letech se značně rozšiřuje využití metod tzv. cílené modifikace genomu „Targeted genome modification“ – TGM či také GEEN („genome editing with engineered nucleases“), za pomoci kterých je možné modifikovat genom na specifickém místě a zabránit náhodné inzerci transgenu, což je odlišuje od tradičních metod transgenoz. Tyto přístupy (CRISPR, TALENs, ZFNs) jsou proto často skloňovány jako alternativa k metodám klasického šlechtění rostlin a také běžně užívaných transgenních přístupů. Nacházejí uplatnění ve výzkumu, biotechnologiích i genové terapii a můžeme nadále předpokládat expanzi v jejich využití.

A to i přesto, že nedávno publikované výsledky o využití metody CRISPR způsobily znepokojení v komunitě vědců zabývajících se genovými modifikacemi živočichů, resp. genetickými modifikacemi obecně (Lunshof, 2015). Objev MCR – mutagenní řetězové reakce u drozofily jako následku spojeného s používáním technologie CRISPR (Gantz a Bier, 2015) může být voda na mlýn pro odpůrce GMO a může vést k problémům s akceptováním metody CRISPR zejména v EU, kde je dlouhodobě prezentována politika negativní vůči GMO.

Metody cílené modifikace genomu se však (až na výše popsanou kauzu týkající se CRISPR) zdají být méně kontroverzní než klasické metody genového inženýrství. Je možné tímto způsobem připravit rostliny, nesoucí mutaci v genu našeho zájmu (která by mohla vzniknout i spontánně) a naopak neobsahují v genomu žádné stopy „cizorodé“ DNA. Belhaj et al. (2013) například optimisticky uvádí, že existuje šance, že by výše zmíněné technologie

mohly být klasifikovány jako non-GM přístup, což by mělo pozitivní dopad pro biotechnologie a šlechtění rostlin zejména v Evropě.

Dle pracovní skupiny pro nové genové techniky při Výboru kompetentních autorit a také stanoviska ČK GMO z roku 2013 vedou metody použití programovatelných nukleas ke vzniku GMO spadajících do působnosti směrnice 2001/18/EC. Zároveň bylo ve stanovisku ČK GMO řečeno, že i když tyto techniky mohou způsobit nezáměrné změny v genomu přijímající rostliny, bude těchto změn méně než při použití mutageneze v konvenčním šlechtění. (http://www.mzp.cz/cz/stanoviska_ck_gmo). Je zde také uveden dovětek týkající se metody TALENs, který naznačuje určitou možnost, že by v budoucnu takto vytvořené rostliny/organismy za určitých podmínek mohly být považovány za non-GMO: „Na rozdíl od techniky zinkových prstů je nutné v případě TALEN použít expresi fúzního genu z plasmidu, který se však v organismu nereplikuje a v principu by neměl být integrován do genomu recipienta. Potud nejsou splněny předpoklady pro vznik GMO. Záleží však na velikosti vnášené DNA a jejím původu (resp. na informačním obsahu ve vztahu k donoru genetické informace)“.

Transformace lnu metodou floral dip

Transformace lnu touto metodou byla provedena dle publikace Bastaki a Cullis (2014). Ve zmíněné publikaci byl použit agrobakteriální kmen LBA4404, zatímco v rámci předkládané disertační práce byl pro floral dip transformaci použit kmen agrobakterie EHA105, běžně užívaný na pracovišti Agritec pro transformaci segmentů hypokotylů lnu. Bastaki a Cullis (2014) demonstrovali fungování metody floral dip na dvou velmi rozdílných odrůdách lnu. První byl responzivní genotyp přadného lnu nazvaný Stormont Cirrus, druhý pokus byl proveden s odrůdou olejného lnu Bethune (v publikaci popisována jako neresponzivní k transformacím). V rámci mé práce byla metodou floral dip pokusně transformována šlechtitelská linie olejného lnu firmy Agritec nazvaná AGT145.

Bastaki a Cullis (2014) docílili metodou floral dip u obou použitých odrůd úspěšné transformace. U odrůdy Stormont Cirrus popisují dosažení překvapivě vysoké transformační efektivity (50 – 60%), což je číslo nesrovnatelně vyšší oproti popsané úspěšnosti floral dip metody u *Arabidopsis thaliana* (získáno max. 1 % transformantů dle publikace Bent et al., 2006), stejně jako s výsledky publikovanými u dalších rostlin (Mu et al., 2012; Yasmeen et al., 2009).

Pro floral dip transformaci lnu byl v rámci této práce použit TALENs konstrukt pVO045, který však, jak již bylo zmíněno dříve, neobsahoval po vzoru publikace Haun et al. (2014)

reportérový gen. Proto byla testována také transformace kontrolním konstruktem pBI α MT obsahující signální gen *uidA*, který bývá silně exprimován.

Semena získaná po floral dip transformací konstruktem pVO045 byla vyseta a selektována prostřednictvím genu *bar* umožňujícího toleranci transformantů k herbicidu. Rostliny, které odolaly opakovanému postřiku fosfinitricinem byly přesazeny a testovány na přítomnost transgenů/mutací indukované technikou TALENs metodou PCR/enrichment PCR. Výsledky ukázaly, že vzorky obsahovaly transgen pro *bar*, nicméně žádná z rostlin neobsahovala mutaci indukovanou konstruktem TALENs v genu *fad2-1*. Genem *bar* bylo natransformováno 66 rostlin, což značí vzhledem k počtu testovaných semen zhruba 13% úspěšnost transformace.

Semena sklizená po transformaci kontrolním konstruktem pBI α MT obsahujícím gen *uidA* byla naklíčena a histochemicky testována. Asi 30 % vzorků (70 ks) se jeví jako GUS pozitivních. V několika náhodně vybraných vzorcích byla přítomnost genu *uidA* potvrzena také prostřednictvím PCR. Pozorovaná 30% úspěšnost je sice nižší než popisovaná v článku Bastaki a Cullis (2014), nicméně i tak se jedná o nezvykle vysokou transformační efektivitu.

Nižší pozorovaná úspěšnost při transformaci konstruktem pVO045 (13 %) mohla souviset se selekcí transformovaných rostlin prostřednictvím postřiku. Je možné, že chimérické rostliny, které by v případě přítomnosti reportérového genu vykazovaly určitý histochemický GUS signál, byly herbicidem eliminovány.

Je také třeba vzít v úvahu, že byl testován jiný kmen agrobakterie a jiná odrůda než v původní publikaci. Je pravděpodobné, že s užitím responzivnějšího genotypu *lnu* pro transformaci a také při další optimalizaci metody (např. srovnání různých kmenů agrobakterií, odlišné doby kokultivace) by bylo možno dosáhnout ještě vyšší transformační efektivitu.

Výhodou metody floral dip proti běžně užívaným metodám transformace *lnu* je její jednoduchost, nižší náklady a vyšší transformační efektivita. Díky vysokému počtu relativně snadno získaných transformantů by tak po další optimalizaci mohla nahradit stávající postupy při transformaci *lnu*.

7 ZÁVĚR

Vznik kyseliny linolové konverzí z kyseliny olejové v semeni lnu zajišťuje enzym FAD2 desaturasa. Genovou manipulací je možné přerušit tvorbu tohoto enzymu, což se projeví zvýšením obsahu kyseliny olejové, ze které kyselina linolová přirozeně vzniká a současně snížením kyseliny linolové. Vysoký obsah olejové kyseliny je častým cílem šlechtění olejných plodin. Důvodem je stabilita olejové kyseliny, možnost jejího širokého průmyslového využití a zejména pozitivní zdravotní dopady její konzumace. Tato práce byla zaměřena na snížení exprese genu *fad2* (fatty acid desaturase 2) ve lnu (*Linum usitatissimum* L.) a tím současně zvýšení obsahu kyseliny olejové v semeni.

V průběhu práce byl vytvořen konstrukt pWellFAD2i pro transformaci lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) ve variantách A a B dle orientace vložené expresní kazety. Konstrukt nesl pod konstitutivním 35S promotorem fragment genu *fad2* v sense/antisense orientaci s intronem, což je struktura optimální pro expresi douřetězcové RNA, umožňující RNA interferenci (známý mechanismus post-transkripčního umlčování genů).

Správnost sekvence vytvořeného plasmidu byla potvrzena restriční analýzou a následným sekvenováním. Po ověření sekvence byl konstrukt vložen do *Agrobacterium tumefaciens* a jeho funkčnost byla otestována transformací listových disků tabáku. Konstrukt byl následně použit pro agrobakteriální transformaci segmentů hypokotylů lnu setého.

Získané transformované rostliny byly histochemicky GUS pozitivní. V jejich genomu byly pomocí PCR detekovány geny *uidA* a *bar*. Dle výsledků reverzně transkripční PCR a qPCR byly u některých transgenních linií patrné rozdíly v expresi *fad2* ve srovnání s kontrolou. Analýza obsahu a složení oleje však neprokázala zvýšení obsahu kyseliny olejové v semenech.

V rámci této práce byly pro transformaci lnu použity také nově vytvořené konstrukty TALENs (Tale nucleases trascription activator-like effectors). Jedná se o programovatelné nukleasy, účinnou skupinu chimérických enzymů, používaných u celé řady organismů k indukcii dvouřetězcových zlomů. Po úspěšné transformaci měla dle předpokladu vzniknout v genu *fad2-1* (či *fad2-2*) mutace, přičemž měl být zkoumán její vliv na funkčnost genu.

Pro transformaci segmentů hypokotylů bylo použito celkem pět různých TALENs konstruktů, tři pro indukcii vzniku mutace v genu *fad2-1* (konstrukty pVO045, pVO046, pVO047); dva pro vznik mutace v genu *fad2-2* (konstrukty pVO048 a pVO049). Byly získány transformované rostliny obsahující selekční gen *bar*, nicméně dle výsledků enrichment PCR a sekvenace žádná z testovaných rostlin neobsahovala mutaci indukovanou v genu *fad2-1/fad2-2* TALENs konstruktem.

TALENs konstrukt pVO045 spolu s kontrolním konstruktem pBI α MT obsahujícím gen *uidA* byl použit také pro zkušební transformaci lnu metodou floral dip. Dle výsledků získaných histochemickou a PCR detekcí genu pro GUS u vzorků transformovaných konstruktem pBI α MT je metoda floral dip použitelnou alternativou pro transformaci lnu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABBADI A., DOMERGUE F., BAUER J., NAPIER J.A., WELTI R., ZÄHRINGER U., CIRPUS P., HEINZ E. (2004): Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. *Plant Cell*, 16: 2734 – 2748.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W. AND LIPMAN D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403 – 410.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A. (1992): Short protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, USA.
- BADERE R.S. (2014): Linseed improvement: a glance at the major developments in recent years. In: MAKDE K.H., PAWAR S.E. (eds.): Prof. A. D. Choudhary Commemoration - A Glimpse of Current Vistas in Plant Science Research. Edition I, Hislop College Publication Cell, Nagpur, 75 – 92.
- BANIK M., DUGUID S.D., CLOUTIER S. (2011): Fatty acid desaturase 3A gene controls linolenic acid content in high, moderate and low linolenic acid genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.), *Genome*, 54: 471 – 483.
- BASIRAN N., ARMITAGE P., SCOTT R.J., DRAPER J. (1987): Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*: Regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Reports*, 6: 396 – 399.
- BASTAKI N. K., CULLIS C. A. (2014): Floral-dip transformation of flax (*Linum usitatissimum*) to generate transgenic progenies with a high transformation rate. *Journal of Visualised Experiments* (94), e52189, doi:10.3791/52189.
- BÄUMLEIN H., BOERJAN W., NAGY I., BASSÜNER R., VAN MONTAGU M., INZÉ D., WOBUS U. (1991): A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Molecular & General Genetics*, 225: 459 – 67.
- BECKIE H.J., S.I. WARWICK, H. NAIR, AND G. SEGUIN-SWARTZ (2003): Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecological Applications*, 13: 1276 – 1294.
- BELHAJ K., CHAPARRO-GARCIA A., KAMOUN S., NEKRASOV V. (2013): Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9: 39.
- BELIDE S., PETRIE J.R., SHRESTHA P. , SINGH S.P. (2012): Modification of seed oil composition in *Arabidopsis* by artificial microRNA-mediated gene silencing. *Frontiers in Plant Science*, 3: 168.
- BENT A. (2006): *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology*, 343: 87 – 103.
- BEVAN M. (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12: 8711 – 8721.
- BHATTY R.S., ROWLAND G.G. (1990): Measurement of α -linolenic acid in the development of edible oil flax. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 67: 364 – 367.
- BJELKOVÁ M., VACULÍK A., ŠMIROUS, P. (2010): Vliv výsevní normy, formy hnojení a herbicidní ochrany na výnos olejného lnu. Sborník z konference „Prosperující olejniny“ 2010. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN: 978-80-213-2128-1.

- BRETAGNE- SAGNARD B., CHUPEAU Y. (1996): Selection of transgenic flax plants is facilitated by spectinomycin. *Transgenic Research*, 5: 131 – 137.
- BOCH J., SCHOLZE H., SCHORNACK S., LANDGRAF A., HAHN S., KAY S., LAHAYE T., NICKSTADT A., BONAS U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326: 1509 – 12.
- BROWN A.C. (1958): A physiological basis for the autonomous growth of the crown gall tumor cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44: 344 – 349.
- CAO S., ZHOU X.R., WOOD C.C., GREEN A.G., SINGH S.P., LIU L., LIU Q. (2013): A large and functionally diverse family of *Fad2* genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *BMC Plant Biology*, 13: 5.
- CASTLE L.A., MORRIS R.O. (1994): Transient expression assays using GUS constructs and fluorometric detection for analysis of T-DNA transfer. In: GELVIN, S.B., SCHILPEROORT, R.A. eds. *Plant molecular biology manual*, Kluwer academic publishers, Dordrecht.
- CERMAK T., DOYLE E.L., CHRISTIAN M., WANG L., ZHANG Y., SCHMIDT C., BALLER J.A., SOMIA N.V., BOGDANOVA A.J., VOYTAS D.F. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39: 7879.
- CZUJ T., ZUK M., STARZYCKI M., AMIR R., SZOPA J. (2009): Engineering increases in sulfur amino acid contents in flax by overexpressing the yeast *Met25* gene. *Plant Science*, 177: 584 – 592.
- DOMBROWSKI J.E., GOMEZ L., CHRISPPEELS J., RAIKHEL N.V. (1994): Targeting of proteins to the vacuole. In: GELVIN S.B., SCHILPEROORT R.A. eds. *Plant molecular biology manual*. Kluwer academic publishers, Dordrecht.
- DONG J.Z., MCHUGHEN A. (1993): An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 88: 61 – 71.
- DOYON Y., VO T. D., MENDEL M. C., GREENBERG S. G., WANG J., XIA D. F., MILLER J. C., URNOV F. D., GREGORY P. D., HOLMES M. C. (2011): Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nature Methods* 8: 74 – 79.
- DREXLER H. S., SCHEFFLER J. A., HEINZ E. (2003): Evaluation of putative seed-specific promoters for *Linum usitatissimum*. *Molecular Breeding*, 11: 149 – 158.
- DURAI S., MANI M., KANDAVELOU K., WU J., PORTEUS M.H., CHANDRASEGARAN S. (2005): Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*; 33: 5978 – 5990.
- ENGELKE D. R. (2003): *RNA Interference (RNAi): The Nuts and Bolts of RNAi Technology*. DNA Press, 242 s., ISBN 0966402782.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M.K., KOSTAS S.A., DRIVER S.E., MELLO C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391: 806 – 11.
- FOFANA B., DUGUID S., CLOUTIER S. (2004): Cloning of fatty acid biosynthetic genes β -ketoacyl CoA synthase, fatty acid elongase, stearyl-ACP desaturase and fatty acid desaturase and analysis of expression in the early developmental stages of flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Plant Science*, 166: 1487 – 1496.

- FOFANA B., CLOUTIER S., DUGUID S., CHING J., RAMPITCH C. (2006): Gene expression of stearyl-ACP desaturase and $\Delta 12$ fatty acid desaturase 2 is modulated during seed development of flax (*Linum usitatissimum*) Lipids, 41: 705 –7 12.
- FUJISAWA M., WATANABE M., CHOI S.,K., TERAMOTO M., OHYAMA K., MISAWA N. (2008): Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene crtB. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105: 636 – 641.
- FÜTTERER J., GISEL A., IGLESIAS V., KLÖTI A., KOST B., MITTELSTENSCHIED O., NEUHAUS G., NEUHAUS-URL G., SCHROTT M., SHILLITO R., SPANGENBERG G., WANG Z.Y. (1995): Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants. In: POTRYKUS I., SPANGENBERG G. Gene transfer to plants. Springer-Verlag, Berlin.
- GANTZ V. M., BIER E. (2015): The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations. Science, 34: 442 – 444.
- GELVIN S.B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the „gene-jockeying“ tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 16 – 37.
- GILL K.S. (1987): Linseed. Publications and Information Division, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 386 s.
- GOODNER B., HINKLE G., GATTUNG S., MILLER N., BLANCHARD M., QUOROLLO B., GOLDMAN B.S., CAO Y., ASKENAZI M., HALLING C., MULLIN L., HOUMIEL K., GORDON J., VAUDIN M., IARTCHOUK O., EPP A., LIU F., WOLLAM C., ALLINGER M., DOUGHTY D., SCOTT C., LAPPAS C., MARKELZ B., FLANAGAN C., CROWELL C., GURSON J., LOMO C., SEAR C., STRUB G., CIELO C., SLATER S. (2001): Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science, 294: 2323 – 2328.
- GRIGA M., TEJKLOVÁ E., SEIDENGLANZ M. (2008): Assessment of possible risks associated with release of genetically modified flax and linseed (*Linum usitatissimum* L.) into environment of the Czech Republic. In: 10th Intern. Symp. Biosafety of Genetically Modified Organisms, Symposium Handbook: Biosafety Research of GMOs: Past Achievements and Future Challenges. Wellington, New Zealand, 105.
- GURUSHIDZE M., HENSEL G., HIEKEL S., SCHEDEL S., VALKOV V., KUMLEHN J. (2014): True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-Nuclease in haploid cells. PLoS One. 2014; 9: e92046.
- HALFORD N. G. (2011): Genetically modified crops (2nd edition) Imperial College Press London, ISBN 1848168381.
- HALL L.M., GOOD A.G., BECKIE H.J, WARWICK S.I. (2003): Gene flow in herbicide resistant canola (*Brassica napus*): The Canadian experience. In: LELLEY T., BALÁZS E., TEPFER M. (ed.) Ecological impact of GMO dissemination in agroecosystems. Facultas Verlagsund Buchhandels AG, Vienna, Austria, 57 – 66.
- HAMMOND, M., CAUDY, A.A., HANNON, G. J. (2001): Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Reviews Genetics, 2: 110 – 119.
- HANO C., MARTIN I., FLINIAUX O., LEGRAND B., GUTIERREZ L., ARROO R.R., MESNARD F., LAMBLIN F., LAINÉ E. (2006): Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. Planta, 224: 1291 – 301.

- HAUGHN G., SMITH J., MAZUR B., SOMERVILLE, C. (1988): Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Molecular and General Genetics*, 211: 266 – 271.
- HAUN W., COFFMAN A., CLASEN B. M., DEMOREST Z.L., LOWY A., RAY E., RETTERATH A., STODDARD T., JULLERAT A., CEDRONE F., MATHIS L., VOYTAS F. D., ZHANG F. (2014): Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 934 – 940.
- HELLENS R. P., EDWARDS E. A., LEYLAND N. R., BEAN S., MULLINEAUX P. M. (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42: 819 – 832.
- HEPBURN A.G., CLARKE L.E., BLUNDY K.S., WHITE J. (1983): Nopaline Ti-plasmid, pTiT37, T-DNA insertions into a flax genome. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 2: 211 – 24.
- HERNANDEZ M.L., MANCHA M., MARTINEZ-RIVAS J. M. (2005): Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturase (FAD2) from olive. *Phytochemistry*, 66: 1417 – 1426.
- HOEKEMA A., HIRSCH P.R., HOOYKAAS P.J.J., SCHILPEROORT R.A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179 – 180.
- HRAŠKA M., RAKOUSKÝ S., ČURN V. (2006): Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 303 – 318.
- CHEN K., GAO C. (2013): TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *Journal of Genetics & Genomics*, 40: 271 – 9.
- CHEN W., SONG K., CAI Y., LI W., LIU B., LIU L. (2011): Genetic modification of soybean with a novel grafting technique: downregulating the *FAD2-1* gene increases oleic acid content. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29: 866 – 874.
- CHEN Y., DRIBNENKI P. (2003): Doubled haploid production and genetic transformation. International patent applications WO 03/041491 A2.
- CHEN Y., SINGH S., RASHID K.Y., DRIBNENKI P., GREEN A. (2008): Pyramiding of alleles with different rust resistance specificities in *Linum usitatissimum* L. *Molecular Breeding*, 21: 419 – 430.
- CHEN Y., ZHOU X.R., ZHANG, Z.J., DRIBNENKI P., SINGH S., GREEN A. (2015): Development of high oleic oil crop platform in flax through RNAi-mediated multiple FAD2 gene silencing. *Plant Cell Reports* 34: 643 – 653.
- CHILTON M.D, DRUMMOND M.H., MERLO D.J., SCIAKY D, MONTOYA A.L., GORDON M.P., NESTER E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263 – 271.
- CHILTON M.D, DRUMMOND M.H, MERLO D.J., SCIAKY D. (1978): Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature*, 275: 147 – 149.
- CHOULIKA A., PERRIN A., DUJON B., NICOLAS J.F. (1994): The yeast I-Sce I meganuclease induces site-directed chromosomal recombination in mammalian cells. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences III.*; 317: 1013 – 9.

- CHRISTIAN M., QI Y., ZHANG Y., VOYTAS D.F. (2013): Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *Genes/Genomes/Genetics*, 3: 1697 – 1705.
- JAIN R.K., THOMPSON R.G., TAYLOR D.C, MACKENZIE S.L., MCHUGHEN A., ROWLAND G.G., TENASCHUK D., COFFEY M. (1999): Isolation and characterization of two promoters from linseed for genetic engineering. *Crop Science*, 39: 1696 – 1701.
- JHALA A.J., HALL L. M., HALL J. C. (2008): Potential hybridization of flax with weedy and wild relatives: an avenue for movement of engineered genes? *Crop Science*, 48: 825 – 840.
- JHALA A.J., BHATT H., TOPINKA K., HALL L.M. (2011): Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist? *Heredity*, 106: 557 – 566.
- JHALA A.J., WESELAKE R. J., HALL L. M. (2009): Genetically engineered flax: potential benefits, risks, regulations, and mitigation of transgene movement. *Crop Science*, 49: 1943 – 1954.
- JEFFERSON R.A., KAVANAGH T.A., BEVAN M.W. (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901 – 3907.
- JOERSBO M., DONALDSON I., KREIGBERG J., PETERSON S.G., BRUNSTEDT J., OKKELS F., T. (1998): Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding*, 4: 111 – 117.
- JORDAN M.C., MCHUGHEN A., (1987): Selection for chlorsulfuron resistance in flax (*Linum usitatissimum*) cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 131: 333 – 338.
- JORDAN M.C., MCHUGHEN A. (1988): Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Reports*, 7: 281 – 284.
- JOUNG J.K., SANDER J.D. (2012): TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14: 49 – 55.
- JUNG J.H., KIM H., GO Y.S., LEE S.B., HUR C.G., KIM H.U., SUH M.C. (2011): Identification of functional BrFAD2-1 gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents. *Plant Cell Reports*, 30: 1881 – 1892.
- KHADAKE R.M., RANJEKAR P.K., HARSULKAR A.M. (2009): Cloning of a novel omega-6 desaturase from flax (*Linum usitatissimum* L.) and its functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology*, 42: 168 – 174.
- KNOWLES P. F. (1989): Safflower. In: *Oil Crops of the World* (DOWNEY R.K., ROBBELEN G., ASHRI A., eds.). New York, 363 – 374.
- KRASOWSKA A., DZIADKOWIEC D., POLINCEUSZ A., PLONKA A., ŁUKASZEWICZ M. (2007): Cloning of flax oleic fatty acid desaturase and its expression in yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84: 809 – 816.
- LAMBLIN F., AIMÉ A., HANO C., ROUSSY I., DOMON J.M., DROOGEN-BROECK B. VAN, LAINÉ E. (2007): The use of the phosphomannose isomerase gene as alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell Reports*, 26: 765 – 772.

- LANGLEY R.A., KADO C.I. (1972): Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoquandine and relationship of *A.tumefaciens* mutants to crown gall induction. *Mutation Research*, 14: 277 – 286.
- LARKIN M. A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. (2007): ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23: 2947 – 2948.
- LEE L.Y., GELVIN S.B. (2008): T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, 146: 325 – 332.
- LI J.F., NORVILLE J.E., AACH J., MCCORMACK M., ZHANG D., BUSH J., CHURCH G.M., SHEEN J. (2013): Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31: 688 – 91.
- LI T., LIU B., CHEN C.Y., YANG B. (2014): TALEN utilization in rice genome modifications. *Methods*, 69: 9 – 19.
- LIANG Z., ZHANG K., CHEN K., GAO C. (2014): Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41: 63 – 8.
- LING H.Q., BINDING H. (1997): Transformation in protoplast cultures of *Linum usitatissimum* and *L. suffruticosum* mediated with PEG and with *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology*, 151: 479 – 488.
- LINK G. K., EGGERS J. (1941): Hyperauxiny in crown gall of tomato. *Botanical Gazette*, 103: 87 – 106.
- LIU Q., CAO S., ZHOU X.-R., WOOD C., GREEN A., SINGH S. (2013): Nonsense-mediated mRNA degradation of *CtFAD2-1* and development of a perfect molecular marker for *olol* mutation in high oleic safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 2219 – 2231.
- LIU Q., SINGH S., GREEN A. (2002): High-oleic and high-stearic cottonseed oils: Nutritionally Improved Cooking Oils Developed Using Gene Silencing. *The Journal of American College of Nutrition*, 21: 205 – 211.
- LORENC-KUKUŁA K., AMAROWICZ R., OSZMIANŃSKI J., DOERMANN P., STARZYCKI M., SKAŁA J., ZUK M., KULMA A., SZOPA J. (2005): Pleiotropic effect of phenolic compounds content increases in transgenic flax plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3685 – 92.
- LORENC-KUKUŁA K., WRÓBEL-KWIATKOWSKA M., STARZYCKI M., SZOPA J. (2007): Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. *Physiological and Plant Molecular Pathology*, 70: 38 – 48.
- LORENC-KUKUŁA K., ZUK M., KULMA A., CZEMPLIK M., KOSTYN K., SKALA J., STARZYCKI M., SZOPA J. (2009): Engineering flax with the GT family 1 *Solanum soganandinum* glycosyltransferase SSGT1 confers increased resistance to *Fusarium* infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 6698 – 705.
- LUNSHOF J. (2015): Regulate gene editing in wild animals. *Nature*, 521: 127.
- MAHFOUZ M.M., LI L., SHAMIMUZZAMAN M., WIBOWO A., FANG X., ZHU J.K. (2011): *De novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with

novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 108: 2623 – 8.

MAKAROVA K.S., GRISHIN N.V., SHABALINA S.A., WOLF Y.I., KOONIN E.V. (2006): A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct* 1:7 doi:10.1186/1745-6150-1-7.

MARTINEZ-RIVAS J. M., SPERLING P., LUHS W., HEINZ E. (2001): Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding*, 8: 159 – 168.

MARX V. (2012): Genome-editing tools storm ahead. *Nature Methods*, 9: 1055 – 1059.

MCHUGHEN A.G. (1989): *Agrobacterium* mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. *Plant Cell Reports*, 8: 445 – 449.

MCHUGHEN A. (2000): Transgenic linseed flax (*Linum usitatissimum*). In: Bajaj Y.P.S (ed.): *Transgenic Crops I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 46: 338–351.

MCHUGHEN A., HOLM F. (1991): Herbicide resistant transgenic flax field test: Agronomic performance in normal and sulfonylurea-containing soils. *Euphytica*, 55: 49 – 56.

MCHUGHEN A., HOLM F.A. (1995): Development and preliminary field testing of a glufosinate-ammonium tolerant transgenic flax. *Canadian Journal of Plant Science*, 75: 117 – 120.

MCHUGHEN A., ROWLAND G.G., HOLM F.A., BHATTY R.S., KENASCHUK E.O. (1997): CDC Triffid transgenic flax. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 641 – 643.

MIŠTA D., KRÓLICZEWSKA B., ZAWADZKI W., PECKA E., STEININGER M., HULL, S., ZUK M., SZOPA J. (2011): The effect of Linola and W92/72 transgenic flax seeds on the rabbit caecal fermentation - *in vitro* study. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14: 557 – 564.

MLYNÁROVÁ L., BAUER M., NAP J.P., PREŤOVÁ A. (1994): High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax. *Plant Cell Reports*, 13: 282 – 285.

MOJŽIŠ B. (1988) *Len, jeho historie, pěstování, zpracování a užití*. Nakladatelství technické literatury Praha, 736 s.

MU G., CHANG N., XIANG K., SHENG Y., ZHANG Z., PAN G. (2012): Genetic transformation of maize female inflorescence following floral dip method mediated by *Agrobacterium*. *Biotechnology*, 11: 178 – 183.

MUSIALAK M., WRÓBEL-KWIATKOWSKA M., KULMA A., STARZYCKA E., SZOPA J. (2008): Improving retting of fibre through genetic modification of flax to express pectinases. *Transgenic Research*, 17: 133 – 147.

NAKAMURA K., AKIYAMA H., YAMADA C., SATOH R., MAKIYAMA D., SAKATA K., KAWAKAMI H., MANO J., KITTA K., TESHIMA R. (2010): Novel method to detect a construct-specific sequence of the acetolactate synthase gene in genetically-modified flax CDC Triffid (FP967). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33: 532 – 4.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473 – 497.

- NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279 – 289.
- PAVELEK M., TEJKLOVÁ E., BJELKOVÁ M. (2011): Results of linseed breeding in the Czech Republic. 61. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 1 – 3, ISBN 978-3-902559-53-1.
- PAVELEK M., TEJKLOVÁ E., ONDŘEJ M., VRBOVÁ M. (2012): Developments in fibrous flax breeding and cultivation. In: KOZLOWSKI R. (ed.): *Handbook of Natural Fibres*, Vol. 1: Properties and Factors Affecting Breeding and Cultivation. Oxford, Woodhead Publishing Ltd.: 393 – 468.
- PENNISI E. (2012): The tale of the TALEs. *Science*, 338: 1408 – 1411.
- PHAM A.T., LEE J.D., SHANNON J.G., BILYEU K.D. (2010): Mutant alleles of *FAD2-1A* and *FAD2-1B* combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. *BMC Plant Biology*, 10: 195.
- PREŤOVÁ A., OBERT B., BARTOŠOVÁ Z. (2007): Flax. In: PUA E.CH., DAVEY M.R. (eds): *Transgenic Crops VI. Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Heidelberg, Springer: 129 – 148.
- PRIMROSE S., TWYMAN R. (2006): *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. Oxford: Wiley-Blackwell, 672 s. ISBN 978-1-4051-3544-3.
- QIU X., HONG H.P., DATLA N., MACKENZIE S.L., TAYLER C.D., THOMAS L.T. (2002): Expression of borage Δ -6 desaturase in *Saccharomyces cerevisiae* and oilseed crops. *Canadian Journal of Botany*, 80: 42 – 49.
- RADOVANOVIC N., THAMBUGALA D., DUGUID S., LOEWEN E., CLOUTIER S. (2014): Functional characterization of flax fatty acid desaturase FAD2 and FAD3 isoforms expressed in yeast reveals a broad diversity in activity. *Molecular Biotechnology*, 56: 609 – 20.
- RAKOUSKÝ S., ONDŘEJ M., SEHNAL F., HABUŠTOVÁ O., HUSSEIN H.M., OVESNÁ J., KUČERA L., KOCOUREK F., ŘÍHA K., DOSTÁLOVÁ R., SEIDENGLANZ M., TEJKLOVÁ E., GRIGA M. (2004): Transgenic plant products and their introduction into the environment and crop protection systems, a risk assessment. In: NAP, J.-P., ATANASSOV, A., STIEKEMA, W.J. (eds.): *Genomics for biosafety in plant biotechnology*. IOS Press, Amsterdam, 173 – 184.
- RAKOUSKÝ S., TEJKLOVÁ E. (1999a): Methods and prospects of flax transgenesis. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 35: 125 – 129.
- RAKOUSKÝ S., TEJKLOVÁ E., WIESNER I., WIESNEROVÁ T., KOCÁBEK T., ONDŘEJ M. (1999b): Hygromycin B – An alternative in flax transformant selection. *Biologia Plantarum*, 42: 361–369.
- RAKOUSKÝ S., TEJKLOVÁ E., WIESNER, I. (2001): Recent advances in flax biotechnology in the Czech Republic. *Natural Fibres* (1 Spec. ed.): 151 – 155.
- RENOUARD S., CORBIN C., LOPEZ T., MONTGUILLON J., GUTIERREZ L., LAMBLIN F., LAINÉ E., HANO CH. (2012): Abscisic acid regulates pinoresinol–lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Planta*, 235: 85 – 98.

- RENOUARD S., TRIBALATC M. A., LAMBLIN F., MONGELARD G., FLINIAUX O., CORBIN C., MAROSEVIC D., PILARD S., DEMAÏLLY H., GUTIERREZ L., HANO C., MESNARD F., LAINÉ E. (2014): RNAi-mediated pinoresinol lariciresinol reductase gene silencing in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed coat: consequences on lignans and neolignans accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1372 – 7.
- RYAN C., SMYTH S. (2012): Economic implications of low level presence in a zero tolerance European import market: The case of Canadian Trifid flax. *AgBioForum*, 15: 21 – 30.
- RUI-LÓPEZ N., HASLAM R.P., VENEGAS-CALERÓN M., LARSON T.R., GRAHAM I.A., NAPIER J.A., SAYANOVA O. (2009): The synthesis and accumulation of stearidonic acid in transgenic plants: a novel source of heart-healthy omega-3 fatty acids. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 704 – 716.
- SHAN Q., WANG Y., LI J., ZHANG Y., CHEN K., LIANG Z., ZHANG K., LIU J., XI J.J., QIU J.L., GAO C. (2013): Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31: 686 – 8.
- SHENG J., CITOVSKY V. (1996): *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence protein, will travel. *Plant Cell*, 8: 1699 – 1710.
- SHUKLA V.K., DOYON Y., MILLER J.C., DEKELVER R.C., MOEHLE E.A., WORDEN S.E., MITCHELL J.C., ARNOLD N.L., GOPALAN S., MENG X., CHOI V.M., ROCK J.M., WU Y.Y., KATIBAH G.E., ZHIFANG G., MCCASKILL D., SIMPSON M.A., BLAKESLEE B., GREENWALT S.A., BUTLER H.J., HINKLEY S.J., ZHANG L., REBAR E.J., GREGORY P.D., URNOV F.D. (2009): Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459: 437 – 41.
- SHYSHA E.N., KORKHOVYU V.I., BAYER G.I.A., GUZENKO E.V., LEMESH V.A., KARTEL N.A., YEMETS A. I., BLUME YA.B. (2013): Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.) with chimeric GFP-TUA6 gene for visualisation of microtubules. *Cytology and Genetics*, 47: 3 – 11.
- SCHLUETER J.A., VASYLENKO-SANDERS I.F., DESHPANDE S., YI J., SIEGFRIED M., ROE B.A., SCHLUETER S.D., SCHEFFLER B.E., SHOEMAKER, R.C. (2007): The FAD2 gene family of soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. *The Plant Genome (A Supplement to CropScience)*, 47, 10.2135/cropsci2006.06.0382tpg.
- SCHUPPERT G.F., TANG S.X., SLABAUGH M.B., KNAPP S.J. (2006): The sunflower high-oleic mutant Ol carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Molecular Breeding*, 17: 241 – 256.
- SIMOPOULOS A.P. (1991): Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 438 – 463.
- SMITH E. F., TOWNSEND C. O. (1907): A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25: 671 – 673.
- SURESHA G.S., KUMAR S., SANTHA I.M. (2013): Functional expression of *Brassica juncea* oleate desaturase gene (*Bjfad2*) in *Escherichia coli*. *Biologia* 68: 599 – 605.
- STOUTJESDIJK P.A., SINGH S.P., LIU Q., HURLSTONE C.J., WATERHOUSE P.A., GREEN A.G. (2002): hpRNA- mediated targeting of the *Arabidopsis FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiology*, 129: 1723 – 1731.

- TANG G. Q., NOVITZKY W. P., GRIFING H. C., HUBER S. C., DEWEY R. E. (2005): Oleate desaturase enzymes of soybean: Evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *The Plant Journal*, 44: 433 – 446.
- TEJKLOVÁ E. (1995): Induced mutagenesis in flax (*Linum usitatissimum* L.). In: *Breeding for Fiber and Oil Quality in Flax*. Proc. 3rd Meeting of Internat. Flax Breeding Res. Group, St. Valéry en Caux, France, 42 – 50.
- TEJKLOVÁ E., SEIDENGLANZ M., GRIGA M. (2009): Evaluation of risk assessment associated with release of genetically modified flax (*Linum usitatissimum* L.) into the environment in the Czech Republic. In: SEHNAL, F., DROBNÍK, J. (eds.): *White book of genetically modified crops. EU regulations and research experience from the Czech Republic*. Biology Centre AS CR, České Budějovice, p. 74.
- THAMBUGALA D., DUGUID S., LOEWEN E., ROWLAND G., BOOKER H., YOU F. M., CLOUTIER S. (2013): Genetic variation of six desaturase genes in flax and their impact on fatty acid composition. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 2627 – 2641.
- THAMBUGALA D., CLOUTIER S. (2014): Fatty acid composition and desaturase gene expression in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Applied Genetics*, 55: 423 – 32.
- THOLE V, WORLAND B, SNAPE JW, VAIN P (2007): The pCLEAN dual binary vector system for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Physiology*, 145: 1211 – 1219.
- TIAN B.M., SUN D.D., LIAN Y.L., SHU H.Y., LING H., ZANG X., WANG B.N., PEI Z.Q. (2011): Analysis of the RNAi targeting FAD2 gene on oleic acid composition in transgenic plants of *Brassica napus*. *African Journal of Microbiology Research*, 5: 817 – 822.
- TOWNSEND J.A., WRIGHT D.A., WINFREY R.J., FU F., MAEDER M.L., JOUNG J.K., VOYTAS D.F. (2009): High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 459: 442 – 5.
- TRUKSA M., MACKENZIE S.L., QIU X. (2003): Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 141 – 147.
- VAN LAREBEKE N., ENBLER G., HOLSTERS M., VAN DEN ELSACKER S., ZAENEN I., SCHILPEROOT R. A., SCHELL J. (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall- inducing ability. *Nature*, 252: 169 – 170.
- VAN LAREBEKE N., GENETELLO C., SCHELL J., SCHILPEROORT R.A., HERMANS A. K., HERNALSTEENS J. P., VAN MONTAGU M. (1975): Acquisition of tumour-inducing ability of non-oncogenic *agrobacteria* as a result of plasmid transfer. *Nature*, 255: 742 – 743.
- VAN DER KROL A.R., MUR L.A., BELD M., MOL J.N., STUITJE A.R. (1990): Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2: 291 – 299.
- VANELLA R., WESTON A., BRODMANN P., KUBLER E. (2014): Development of an event-specific assay for the qualitative and quantitative detection of the genetically modified flax CDC Triffid (FP967). *Food Control*, 41: 128 – 133.
- VIJU C., YEUNG MT, KERR W.A. (2014): Zero tolerance for GM flax and the rules of trade. *The World Economy*, 37: 137 – 150.

- VRBOVÁ M. (2010): Metodika agrobakteriální genetické transformace lnu (*Linum usitatissimum* L.). Agritec Plant Research s.r.o, ISBN: 978-80-87360-04-0.
- VRBOVÁ M., KOTRBA P., HORÁČEK J., SMÝKAL P., ŠVÁBOVÁ L., VĚTROVCOVÁ M., SMÝKALOVÁ I., GRIGA M. (2013): Enhanced accumulation of cadmium in *Linum usitatissimum* L. plants due to overproduction of metallothionein α -domain as a fusion to β -glucuronidase protein. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112: 321 – 330.
- VRBOVÁ M., TEJKLOVÁ E., SMÝKALOVÁ I., SMÝKAL P., GRIGA M. (2008a): The optimization of *Agrobacterium*-mediated and biolistic genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.). In: *Physiol. Plant. Vol. 133, Abstracts XVI FESPB Conference, Tampere, Finland, P07-068.*
- VRBOVÁ M., TEJKLOVÁ E., SMÝKALOVÁ I., SMÝKAL P., GRIGA M. (2008b): The comparison of genetic transformation approaches in flax (*Linum usitatissimum* L.) for improved heavy metal tolerance and accumulation. In: *Book of Abstracts of 4th European Bioremediation Conference, Chania, Crete, Greece, p. 292 (full text on CD).*
- WAGNER N., MROCZKA A., ROBERTS P. D., SCHRECKENGOST W., VOELKER T. (2011): RNAi trigger fragment truncation attenuates soybean *FAD2-1* transcript suppression and yields intermediate oil phenotypes. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 723 – 728.
- WARWICK, S.I., STEWART C.N., JR. (2005): Crops come from wild plants – How domestication, transgenes, and linkage together shape fertility. In: GRESSEL J.B. (ed.) *Crop Fertility and Volunteerism*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 9 – 30.
- WENDT T., HOLM P.B., STARKER C.G., CHRISTIAN M., VOYTAS D.F., BRINCH-PEDERSEN H., HOLME I.B. (2013): TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology*, 83: 279 – 85.
- WESLEY S.V., HELLIWELL C.A., SMITH N.A., WANG M.B., ROUSE D.T., LIU Q., GOODING P.S., SINGH S.P., ABBOTT D., STOUTJESDIJK P.A., ROBINSON S.P., GLEAVE A.P., GREEN A.G., WATERHOUSE P.M. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, 27: 581 – 590.
- WIJAYANTO T., MCHUGHEN A. (1999): Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment. *In Vitro Cellular and Development Biology*, 6: 456 – 465.
- WRÓBEL-KWIATKOWSKA M., ZEBROWSKI J., STARZYCKI M., OSZMIANSKI J., SZOPA J (2007a): Engineering of PHB synthesis causes improved elastic properties of flax fibers. *Biotechnology Progress*, 23: 269 – 277.
- WRÓBEL-KWIATKOWSKA M., STARZYCKI M., ZEBROWSKI J., OSZMIANSKI J., SZOPA J. (2007b): Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *Journal of Biotechnology*, 128: 919 – 934.
- WRÓBEL M., ZEBROWSKI J., SZOPA J. (2004): Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *Journal of Biotechnology*, 107: 41 – 54.
- XU R., LI H., QIN R., WANG L., LI L., WEI P., YANG J. (2014): Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 7: 5.
- YANG M., ZHENG G., ZHANG F., XU Y. (2006): FAD2-silencing has pleiotropic effect on polar lipids of leaves and varied effect in different organs of transgenic tobacco. *Plant Science*, 170: 170 – 177.

- YASMEEN A., MIRZA B., INAYATULLAH S., SAFDAR N., JAMIL M., ALI S., CHOUDHRY M. F. (2009): In Planta transformation of tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27: 20 – 28.
- YOU F.M., LI P., KUMAR S., RAGUPATHY R., LI Z.N., FU Y.B., CLOUTIER S. (2014): Genome-wide identification and characterization of the gene families controlling fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.), *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 7: 310 – 326.
- ZAMBRYSKI P., JOOS H., GENETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M., SCHELL J. (1983): Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*, 2: 2143 – 2150.
- ZAPLIN E.S., LIU Q., LI Z.Y., BUTARDO V.M., BLANCHARD C.L., RAHMAN, S. (2013): Production of high oleic rice grains by suppressing the expression of the OsFAD2-1 gene. *Functional Plant Biology*, 40: 996 – 1004.
- ZEANEN I., VAN LEBEREKE N., TEUCHY H., VAN MONTAGU M., SCHELL J. (1974): Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular. Biology*, 86: 109 – 127.
- ZHAN X.C., JONES D.A., KERR A. (1988): Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology*, 11: 551 – 9.
- ZHANG D.Y., PIRTLE I.L., PARK S.J., NAMPAISANSUK M., NEOGI P., WANJIE S.W., PIRTLE R.M., CHAPMAN K.D. (2009): Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase(FAD2-4) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 462 – 471.
- ZHANG J., LIU H., SUN J., LI B., ZHU Q., CHEN S., ZHANG H. (2012): *Arabidopsis* fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth. *PLOS ONE*, 7: e30355.
- ZHANG, Y., ZHANG, F., LI, X., BALLER, J.A., QI, Y., STARKER, C.G., BOGDANOVE, A.J., VOYTAS, D.F. (2013): Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiology*, 161: 20 – 27.
- ZUK M., PRESCHA A., STRYCZEWSKA M., SZOPA. J. (2012): Engineering flax plants to increase their antioxidant capacity and improve oil composition and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 5003 – 5012.
- ZUPAN J., MUTH T.R., DRAPER O., ZAMBRYSKI P (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights, *The Plant Journal*, 23: 11 – 28.

PŘÍLOHY

Seznam příloh

Příloha 1: Sekvence genů *fad2-1* a *fad2-2* spolu s vyznačenými cílovými místy pro jednotlivé konstrukty

Příloha 2: Sekvence konstruktů pWellFAD2i použitého pro transformaci lnu

Příloha 3: Schéma konstruktů pVO045 použitého pro transformaci lnu

Příloha 4: Schéma konstruktů pVO046 použitého pro transformaci lnu

Příloha 5: Schéma konstruktů pVO047 použitého pro transformaci lnu

Příloha 6: Schéma konstruktů pVO048 použitého pro transformaci lnu

Příloha 7: Schéma konstruktů pVO049 použitého pro transformaci lnu

Příloha 1: Sekvence genů *fad2-1* a *fad2-2* spolu s vyznačenými cílovými místy pro jednotlivé konstrukty

>gi|387135437|gb|JQ963117.1| *Linum usitatissimum* cultivar ACC NO 4/47 fatty acid desaturase 2 (FAD2) gene, complete cds

ATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCCAGTGCCTCCATCATCCAAACCTATGAAGAGGTCTCCTTACTCAAAGC
 CACCATTACAGCTCGGTGAGCTCAAGAAGGCCATCCCTCCACA CTGTTTCAAACGCTCAATCCCCGATC
 GTTCG CCTACGTGGCGTACGACCTCA CCATTGCAGCAATCTTCTACTACATCGCCACCCTTACTTCCAC
 CTCTCCC TAGCCCTCTCAACTACCTCG CCTGGCCGGTCTA CTGGGCCTGCCAGGGCTG CATCCTCACTG
 GAGTATGGGTGTTGGCTCACGAATGCGGTCCACATGCCTTCAGCGACTACCAGTGGCTCGACGACATGGT
 TGGCTTCGTCTCCATTGCTCCCTCCTTGTTCCTTACTTCTCTCTGGAAGCACAGCCACCGCCGCCACCAT
 TCCAACACGGGATCGCTTGATCGTGATGAG GTGTTTGTCCCAAGCAGAAGGCCGAAATCGGGTGGTACT
 CCAAGTACCTTAACAACCCACCTGGCCGTGTGATCACATTGGCCGTACATTAACGCTCGGTTGGCCCTCT
 GACTTGGCATTCAACGCTCTCCGGGAGACCATATGACCGGTTGCGATGCCATTTTGACCCCTCACGGTCCG
 ATTTACAATGATCGCGAGCGTATGGAGATATACCTATCCGACGCAGGGATATTCACCGTGTGCTACATCC
 TATACAGACTCGTCTCACGAAAGGACTCGTTGGGTCGTGTCCATATACGGAGTCCCCTATTGATAGT
 GAATGGATTCTAGTCTCATCACTTTCTTGCAGCACACGCATCCTTCTCTTCCGCACTACAAGTCTCTCC
 GAATGGGACTGGATGCGAGGCGCCCTCTCGACCGTGGATCGAGACTACGGGTTACTCAACACCGTGTTC
 ACAACATACCGATACACATGTCGCGCACCATCTCTTCCACGATGCCTCATTACCACGCGATGGAGGC
 TACCAAGGCGATCAAGCCGGTTCTCGGGGAGTATTACCAGTTCGATGGGACTCCCTTTGTGAAGGCCATG
 TGGAGGAGGCAAAGGAGTGCATCTATGTGCGAGCCGGATGAAGGCGACCCAGCCAAGGCGTGTCTGGT
 ACAACAATAAGTTATGA

pVO047
 pVO045/46
 pWellFAD2i

>gi|387135501|gb|JQ963159.1| *Linum usitatissimum* cultivar PADMINI fatty acid desaturase 2-2 (FAD2-2) gene, partial cds

CCATCGAATAAGGCGGACTCCGAAACCTTTAAGCGTCTCCTTACTCAAACCTCCCTTCACTCTTGGTG
 AGATCAAGAAAAGCCGTCCTCCACACTGCTTCAAAGGTCCATCCCCCGCTCGTTCCTTACGTGGCTTA
 TGACCTCACCATAGCCGCCATCTTCTACTACATCGCCACCCTTACATCCACCTCCTCCCCAATCCTCTC
 TCCTACGTGGCGTGGCCGATCTACTGGGCCTGCCAAGGCTGCGTCTCCTCACTGGTGTCTGGGTCTAGCCC
 ACGAATGCGGTCACCATGCCTTCAGCGACTACCAATGGCTCGACGACTTGGTCCGGCTTTG TCCTCCACTC
 ATGCCTCA TGGTACCCTACTT CTCGTGGAAGCACAGCC ACCGTCGCCACCCTCCAATACTGGGTCCCTC
 GAACGAGACGAGGTTTTTGTCCCAAGCAGAAATCAGCCATTGGCTGGCACTCAAAGTACCTCAACAACC
 CACCTGGCCGTGTGCTCACACTTGCAGTCACTCTCACTCTCGGCTGGCCTTTGTACTTGGCATTCAACGT
 CTCTGGAAGGCCGTACGACCGGTTCCCTGCCATTACGATCCATAAATCCCCATCTACAACGACCGCGAG
 CGAACGGAGATATTCTTCTCCGATGCTGGCATCCTTGCTGTGAGCTT TCGCCTCTACAAGCTTGCTGTCTG
 CCAAGGGACTGGC TTGGGTGGTTTGTGTCTACGGA GTTCCACTCCTTGTAGTGAATGGATTCCCTTGTCTT
 GATCACTTTCTTGCAGCACACCCACCCATCATTGCCGCACTACAAATCCTCCGAATGGGACTGGCTGAGA
 GGTGCTCTGGCGACCATGGACAGAGACTACGGGTTTCTGAACACGGTGTTCATAACATCACGGATACCC
 ACGTGGCGCACCACTGTCTCGACGATGCCTCATTACCATGCAATGGAAGCTACAAAGGCGATCAAGCC
 GGTATTGGGAGAGTACTACCAATTCGACGGGACTCCATT

pVO049
 pVO048

Příloha 2: Sekvence konstruktů *pWellFAD2iA* použitého pro transformaci *lnu*

T-DNA je ohraničena restrikními místy **BgIII**

```
TTTTTATCCCCGGAAGCCTGTGGATAGAGGGTAGTTATCCACGTGAAACCGCTAATGCCCCGCAAAGCCTTGA
TTCACGGGGCTTTCGGCCCCGCTCCAAAACTATCCACGTGAAATCGCTAATCAGGGTACGTGAAATCGCTAA
TCGGAGTACGTGAAATCGCTAATAAGGTCACGTGAAATCGCTAATCAAAAAGGCACGTGAGAACGCTAATAGC
CCTTTCAGATCAACAGCTTGCAAACACCCCTCGCTCCGGCAAGTAGTTACAGCAAGTAGTATGTTCAATTAGC
TTTTCAATTATGAATATATATATCAATTATGGTGCCTTGGCTTGTGGACAATGCGCTACGCGCACCGGCT
CCGCCCCTGGACAACCGCAAGCGGTTGCCACCGTCGAGCGCCAGCGCCTTTGCCACAACCCGGCGGCCGGC
CGCAACAGATCGTTTTATAAAATTTTTTTTTTTGAAAAAGAAAAGCCCGAAAGGCGGCAACCTCTCGGGCTTC
TGGATTTCCGATCCCCGGAATTAGAGATCTTGGCAGGATATATTGTGGTGTAACTTTATCAGCTTGCATGCCG
GTCGATCTAGTAACATAGATGACACCGCGCGGATAATTTATCCTAGTTTGGCGGCTATATTTGTTTTCTAT
CGCGTATTAATGTATAATTTGCGGGACTCTAATCAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCAATGATTACATGT
TAATTATTACATGCTTAACGTAATTCAACAGAAAATTAATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAA
TCTTAAGAAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCTGACTTAGGGGTACATCAGATTTCCGGTGACGGG
CAGGACCGGACGGGGCGGACCGGACGGCTGAAGTCCAGTGCAGAAAACCCACGTATGCCATGCCGTTCCCGTGC
TTGAAGCCGGCCCGCCGACGATGCCACGGGGGCATATCCGAGCGCCTCGTGCATGCGCACGCTCGGGTCTG
TGGGCAGCCCGATGACAGCGACCACGCTCTTGAAGCCCTGTGCCTCCAGGGACTTCAGCAGGTGGGTGTAGAG
CGTGAGCCCGTCCCGTCCGCTGGTGGCGGGGGGAGACGTACACGGTTGACTCGGCCGTCAGTCTAGGGCG
TTGCGTGCCTTCCAGGGACCCGCTAGGCGATGCCGGCGACCTCGCCGTCACCTCGGCGACGAGCCAGGGAT
AGCGCTCCCGCAGACGGACGAGGTCGTCCGTCCACTCCTGCGGTTCCGTCGGCTCGGTACGGAAGTTGACCGT
GCTTGTCTGGATGTAGTGGTTGACGATGGTGCAGACCGCCGGCATGTCCGCCCTCGGTGGCACGGCGGATGTCC
GCCGGGCGTCTTCTGGGCTCATGGTAGATCCCCCTCGATCGAGTTGAGAGTGAATATGAGACTCTAATTGGA
TACCGAGGGGAATTTATGGAACGTCAGTGGAGCATTTTTGACAAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTGACCTTA
GGCGACTTTTGAACCGCAATAATGGTTTCTGACGATGTGCTTAGCTCATTAACCTCCAGAAAACCCGGCTGA
GTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAAGTTCAAAACGTTAAAACGGCTTGTCCCAGCTCATCGGCGGGGGTC
ATAACGTGACTCCCTTAATTTCTCATGTATCGATAACATTAACGTTTACAATTTGCGGCCATTCGCCATTCAGG
CTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGGCTCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTG
CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACAGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATT
GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGAT
ATCGATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAAATTTATTTGATAGAAGTATTTTACAAT
ACAAATACTACTAAGGGTTTCTTATATGCTCAACACATGAGCGAAACCTATAAGAACCCTAATTTCCCTTA
TCGGAAACTACTACACATTTATTTATGGAGAAAAATAGAGAGATAGATTTGTAGAGAGAGACTGGTGATTT
CAGCGTACCGAATTAATTCGCTAGAGCCAGGAGAGTTGTTGATTTCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGGTTTTTC
ACCGAAGTTTCATGCCAGTCCAGCGTTTTTGCAGCAGAAAAGCCCGACTTCGGTTTGGCGTCCGAGTGAAG
ATCCCTTTCTTGTACCAGCAACGCGCAATATGCCCTTGCAGGTCGCAAAAATCGGCGAAATTCATACCTGTT
CACCGACGACGGCGCTGACGCGATCAAAGACGCGGTGATACATATCCAGCCATGCACACTGATACTCTTCACT
CCACATGTCCGTGTACATTTAGTGCAGCCCGGTAACGTATCCAGCCGTTTCGGTGATGATAATCGGCTGA
TGCAGTTTCTCTGCCAGGCCAGAAGTTCTTTTTCCAGTACCTTCTCTGCCGTTTCAAATCGCCGCTTTGGA
CATAACATCCGTAATAACGGTTCAGGCACAGCACATCAAAGAGATCGCTGATGGTATCGGTGTGAGCGTCGCA
GAACATTACATTGACGCAAGTGTATCGGACGCGTCCGGTTCGAGTTTACGCGTTGCTTCCGCCAGTGGCGAAATA
TTCCCGTGCCTTGCAGGACGGTATCCGGTTCGTTGGCAATACCCACATCACCACGCTTGGGTGGTTTTTGT
CACGCGCTATCAGCTCTTTAATCGCCTGTAAGTGCCTTGTGAGTTTCCCGTTGACTGCCTCTTCGCTGTA
CAGTTCTTTCCGGCTTGTGGCCGCTTCGAAACCAATGCCATAAGAGAGGTTAAAGCCGACAGCAGCAGTTTCA
TCAATCACCACGATGCCATGTTTCATCTGCCAGTTCGAGCATCTCTTTCAGCGTAAGGGTAATGCGAGGTACGGT
AGGAGTTGGCCCCAATCCAGTCCATTAATGCGTGGTTCGTGCACCATCAGCACGTTATCGAATCCTTTGCCACG
TAAGTCCGCATCTTCATGACGACCAAAGCCAGTAAAGTAGAACGGTTTTGTGGTTAATCAGGAACGTTGGCCC
TTCACTGCCACTGACCGGATGCCGACGCGAAGCGGGTAGATGTCACACTCTGTCTGGCTTTTGGCTGTGACGC
ACAGTTCATAGAGATAACCTTCAACCGGTTGCCAGAGGTGCGGATTCACCAGTTGCAAAAGTCCCGCTAGTGCC
TTGTCAGTTGCAACCACCTGTTGATCCGCATCAGCAGTTCAACGCTGACATCACCATTGGCCACCACCTGTC
CAGTCAACAGACCGCTGTTTACAGTCTTGGCGACATGCGTACCACGGTGTGTCGTCACCCAGGTGTTTCG
GCGTGGTGTAGAGCATTACGCTGCGATGGATCTCCGGCATAGTTAAAGAAATCATGGAAGTAAGACTGCTTTT
TCTTGGCGTTTTTCGTCGGTAATCACCATTTCCGGCGGGATAGTCTGCCAGTTTCAGTTTCGTTGTTTACACAAAC
GGTGATACGTACTCTTTCCCGCAATAACATACGGCGTGACATCGGCTTCAAATGGCGTATAGCCGCCCTGA
TGCTCCATCACTTCTGATTATTTGACCCACACTTTGCCGTAATGAGTGACCGCATCGAAACGCAGCAGGATAC
GCTGGCCTGCCAACCTTTCCGGTATAAAGACTTCGCGCTGATACCAGACGTTGCCCGCATAATTACGAATATC
TGCATCGGCGAACTGATCGTTAAAACGCTGGCACAGCAATTTGCCCGGCTTTCTTGTAAACGCGCTTTCCAC
CAACGCTGATCAATTCACAGTTTTTCGCGATCCAGACTGAATGCCACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTAC
GGGTTGGGGTTTTCTACAGGACGTAACATAAGGGAGTGACCTACCAGCTTGGGCTGTCTCTCAAATGAAAT
```

BgIII

Nos::bar

35S::uidA

GAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGA
 TGTCACATCAATCCACTTGCCTTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGG
 GGGTCCATCTTTGGGACCACTGTCGGCAGAGGCATCTTGAATGATAGCCTTTCCCTTATCGCAATGATGGCAT
 TTGTAGGAGCCACCTTCTTTTCTACTGTCTTTTCGATGAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGAATCCGAGGA
 GGTTCCTCCGAAATACCTTGTGTTGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTGACATT
 TTTGGAGTAGGGGTACGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCCTAGAGCGGCCGCTCGACGA
 ATTAATTCCAATCCCACAAAAATCTGAGCTTAACAGCACAGTTGCTCCTCTCAGAGCAGAATCGGGTATTCAA
 CACCCTCATATCAACTACTACGTTGTGTATAACGGTCCACATGCCGGTATATACGATGACTGGGGTGTACAA
 AGCCGGACAAACAGCGGTTCCTCCGGAGTTGCACACAAGAAATTTGCCACTATTACAGAGGCAAGAGCAGCAGC
 TGGCCGTACACAACAAGTCAGCAACAGCAGGTTGAACTTCATCCCCAAAGGAGAAGCTCAACTCAAGCCC
 AAGAGCTTTGCTAAGGCCCTAACAAAGCCACCAAAGCAAAAAGCCACTGGCTCACGCTAGGAACCAAAGGC
 CCAGCAGTGATCCAGCCCCAAAAGAGATCTCCTTTGCCCGGAGATTACAATGGACGATTTCTCTATCTTTA
 CGATCTAGGAAGGAAGTTCGAAGGTGAAGGTGACGACACTATGTTACCCTGATAATGAGAAGGTAGCCTC
 TTCAATTTAGAAAAGTGTGACCCACAGATGGTTAGAGAGGCCACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCT
 ACCCGAGTAACAATCTCCAGGAGATCAAATACCTTCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAGATTCCAGGAC
 TAATTGCATCAAGAACACAGAGAAAACATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTTCCAGTATGGACGATTCAA
 GGCTTGCTCATAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAGGTAGTTCCTACTGAATCTAAGG
 CCATGCATGGAGTCTAAGATTCAAATCGAGGATCTAACAGAACTCGCCGTGAAGACTGGCGAACAGTTCATAC
 AGAGTCTTTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACTCTGGTCTACTC
 CAAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGATAATTTCCGGGA
 AACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCT
 ACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGCTATCATTCAAGATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGG
 ACCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGT
 GACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAA
 GTTCATTTCAATTTGGAGAGGACAGCTCGAGTCCACCTTCTTACGGTACCGGAGGTAGTGGTATTTGGATACTT
 CTCAGAGAAATGAGTTCGGTGGTAAAGTGCAGCCACTCGAGTCTTCCGGTAAGGAGGTGTGACAAAGTTT
 GCAAGTTAGGGGGTAGCAAGCGGATGCACCGCATGCTGGAGTGGTAACGTCGTTAGAAGATGATGTAGCGGT
 GGTGAATGAAGGTGGAGGAGGATCGGGAGGTTGATGGAGCGGACCAGGCCAGATGACCCGGACGGTCCCGAC
 GTAGGAGTGACCTCATACCCACAACCAGTGTCTTACGCCAGTGGTACGGAAGTCGCTGATGGTACCAGGCTG
 CTGTACCAACCAGGAGGAGGTAAGCAGGGAGGAACAAGGAATGAAGAGGACCTTCGTTGCGGTGGCGCGCG
 TGGTAAGGTTGTGCCCTAGCGAACTAGCACTACTCTGAATTCGGTACCCCAATTGGTAAGGAAATAATTTATTT
 CTTTTTCTTTTAGTATAAAAATAGTTAAGTGATGTTAATTAGTATGATTATAATAATATAGTTGTTATAATTT
 GTGAAAAAATAATTTATAAATATATTTGTTTACATAAAACATAGTAATGTAAAAAATATGACAAGTATGAT
 GTAAGACGAAGAAGATAAAAAGTTGAGAGTAAGTATATTTTAAATGAATTTGATCGAACATGTAAGATGAT
 ATACTAGCATTAAATATTTGTTTAAATCATAATAGTAATCTAGCTGGTTTATGATTAATTAATATCAATGATAA
 AATACTATAGTAAAAATAAGAATAAATAAATAAATAAATTTTTTTATGATTAATAGTTTATTATATAATTT
 AAATATCTATAACCATTACTAAATATTTTAGTTTAAAAGTTAATAAATATTTTGTAGAAATCCAATCTGCTT
 GTAATTTATCAATAAAACAAAATATTTAAATAACAGCTAAAGTAACAAAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAA
 TCTAATGTAACAAAACATAATCTAATGCTAATAATAACAAAGCGCAAGATCTATCATTTTATATAGTATTTT
 TCAATCAACATTTCTTATTAATTTCTAAAATAACTTGTAGTTTATTAACCTCTAAATGGATTGACTATTAAT
 TAAATGAATTAGTGAACATGAATAAAACAAGGTAACATGATAGATCATGTCTATGTTATCATTTGATCTTAC
 ATTTGGATTGATTACAGTTGGGAAATGGGTTCGAAATCGATTAAGCTTCTCATCAGCATCAAGCGATCCCGT
 TTGGAATGGTGGCGCGGTGGCAGTGTCTCCAGGAGAAGTAAGGAACAAGGAGGCAAGTGGAGGACGAAGC
 CAACCATGCTCGAGCCACTGGTAGTCTGTAAGGCATGGTACCCGATTCGTGAGCCAACCCCATACTCC
 AGTGAGGATGCTGACCCCTGGCAGGCCAGTAGACCGCCAGGCGAGGTTGTTGAGAGGGCTAGGGAGGAGGTGG
 AAGTAAGTGGTGGCGATGTAGTAGAAGATTGCTGCAATGGTGGGTCGTACGCCACGTAGGCCAACGATCGGG
 GGATTGAACGTTTGAACAGTGTGGAGGAATGGCCTTCTTGGAGTCCACCGAGCGTGAATGGTGGCTTTGAGTA
 AGGAGACCTCTTCATAGGTTTGGATGATGGAGGCACTGGCATTCTTCCACCTTCTAGAGTCTCCTGCTTTAATGA
 GATATGCGAGACGCTATGATCGCATGATATTTGCTTTCAATTCGTTGTGTCACGTTGTAAAAAACCTGAGCA
 TGTGTAGCTCAGATCCTTACCGCCGTTTCGGTTTCAATGAATATATCACCCGTTACTATCGTATTTTT
 ATGAATAATATTTCTCCGTTCAATTTACTGATTGTACCCTACTACTTATATGTACAATATTTAAATGAAAACAA
 TATATTGTGCTGAATAGGTTTATAGCGACATCTATGATAGAGCGCCACAATAACAAACAATTTGCGTTTTATTA
 TTACAAATCCAATTTTAAAAAAGCGGCAGAACCAGTCAAACCTAAAAGACTGATTACATAAATCTTATTCAA
 ATTTCAAAGGCCCCAGGGCTAGTATCTACGACACACCAGCGGCGAACATAAACCCTTCACTGAAGGGAACT
 TCCGGTTCCCCGCCGGCGCGCATGGGTGAGATTCCTTGAAGTTGAGTATTGGCCGTCCGCTTACCAGAAAGTT
 ACGGGCACCATTCAACCCGGTCCAGCACGGCGGGCGGGTAACCGACTTGTGCCCCGAGAATTTATGCAGCATTT
 TTTTTGGTGTATGTGGGCCCAAATGAAGTGCAGGTCAAACCTTGACAGTGACGACAAATCGTTGGGCGGGT
 CAGGGCGAATTTTGCACAACATGTTCGAGGCTCAGCAGGACCTGCAGGCATGCAAGCTAGCTTACTAGTGTG
 CATATTTCTATAGTGTACCTAAATCGCGGCCGACCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGGAGG
 TTAATTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCAC
 ACAACATACGAGCCGGAAGHCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTCACATTAATTG

NoI

35S
promotor

XhoI

fad2 sense

EcoRI

Intron

HindIII

fad2
antisense

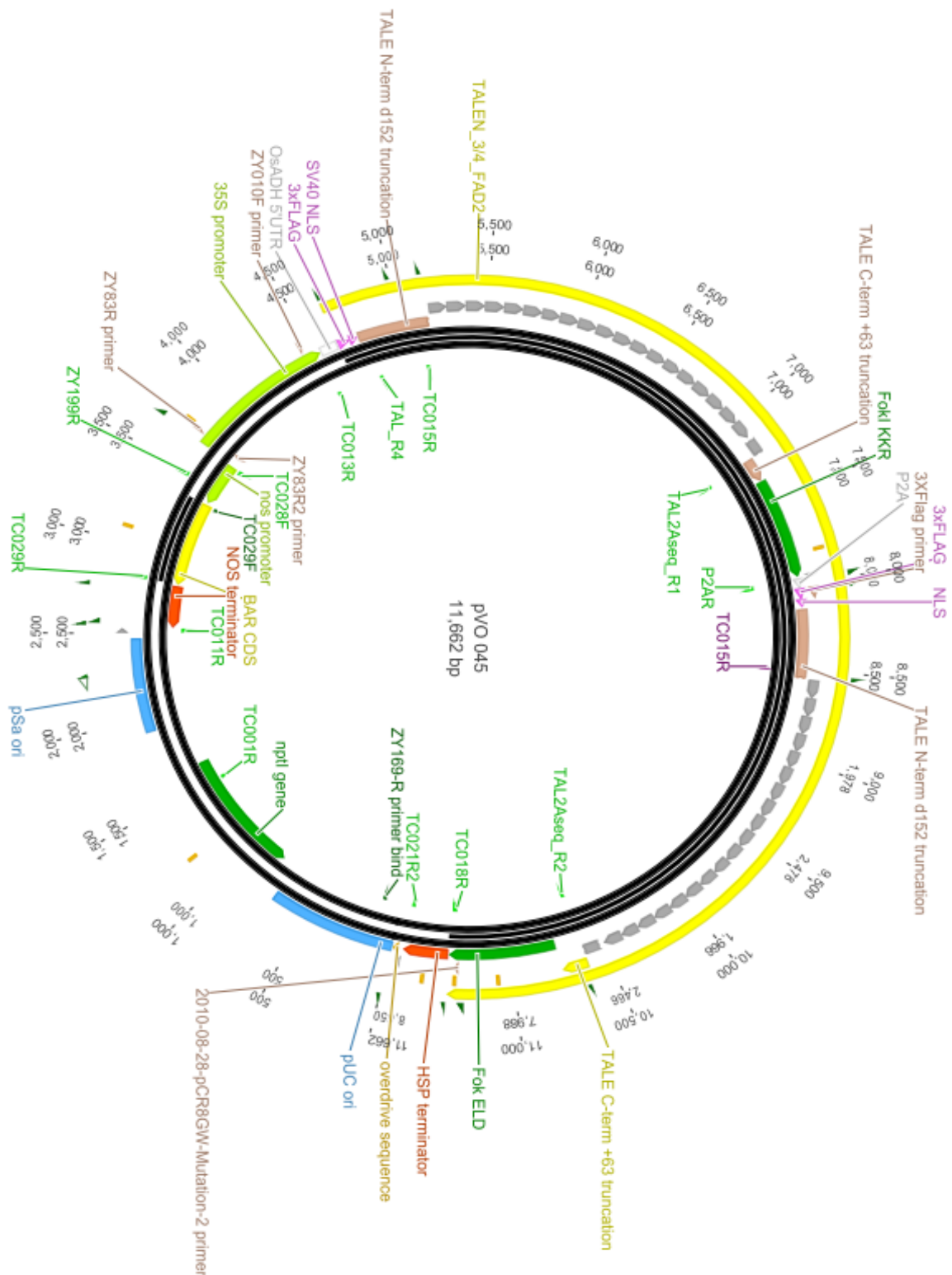
XbaI

OCS
terminator

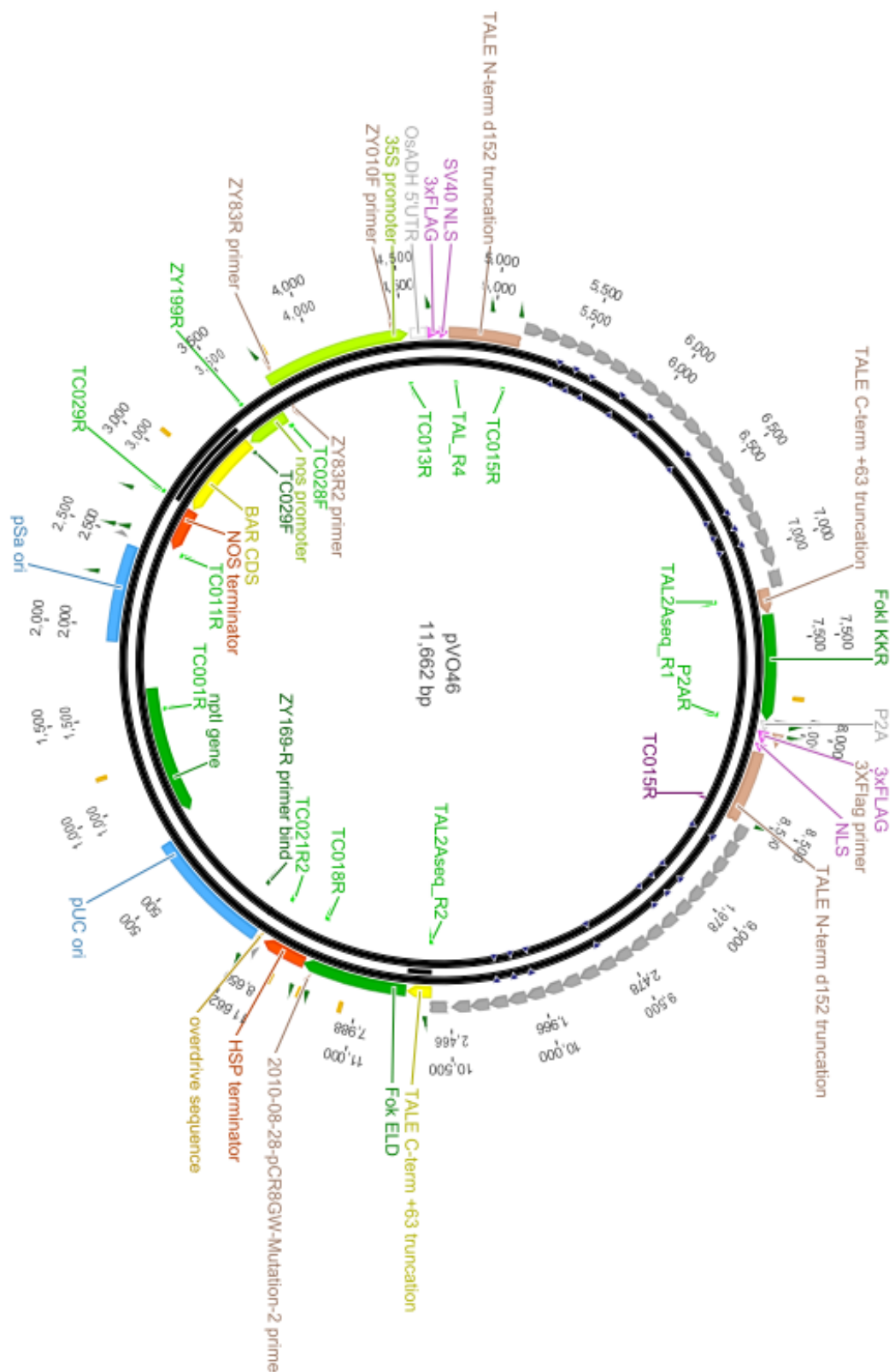
NoI

CGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC
GGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGG
CTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGAAGGCCCTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACTAAGTCGCTGTATGTGTTTTGTTTGGAGATCTCAT
GTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC
AGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCGCTCCTGTTCGACCCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGC
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGTAAGACAGCACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGT
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAATCAGCTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGTGTAAC
ATTGGTCTAGTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAAT
ACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGA
TCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAA
GGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTTATGCATTTCTTT
CCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATT
CGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAA
TGCTGTTTTCCCTGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTC
GGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACAACATTTGGCAACGCTACCTT
TGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGGTAGATTGTGCGACCTGATTGCC
GACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTTGAGCAA
GACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTC
ATGATGATATATTTTTATCTTGTCGAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTGTTGAATAAA
TCGAACTTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAA
AAGTTCAAAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGG
ATGATGGGGCGATTACAGGCGATCCCCATCCAACAGCCCGCGTTCGAGCGGGCT

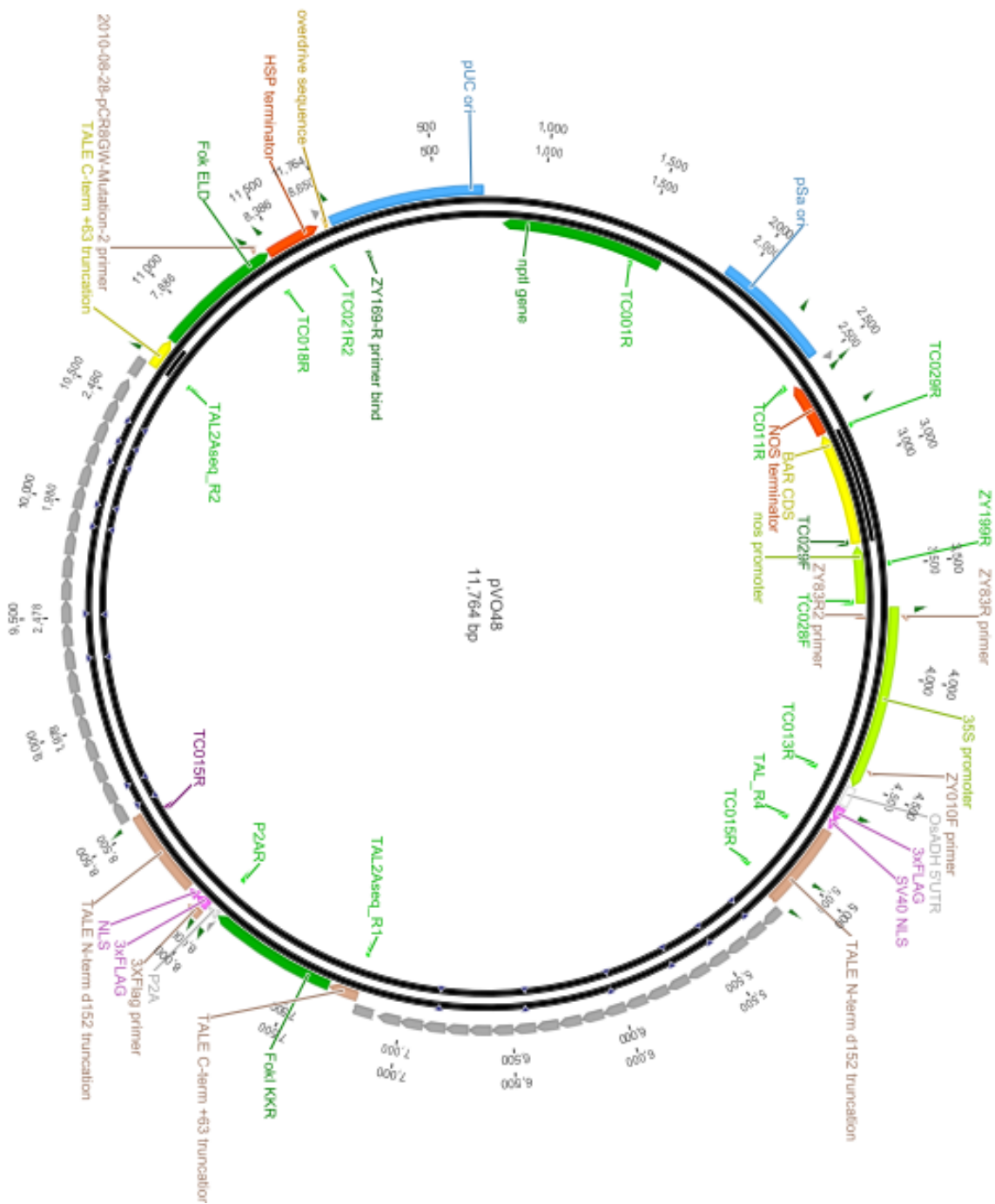
BglII



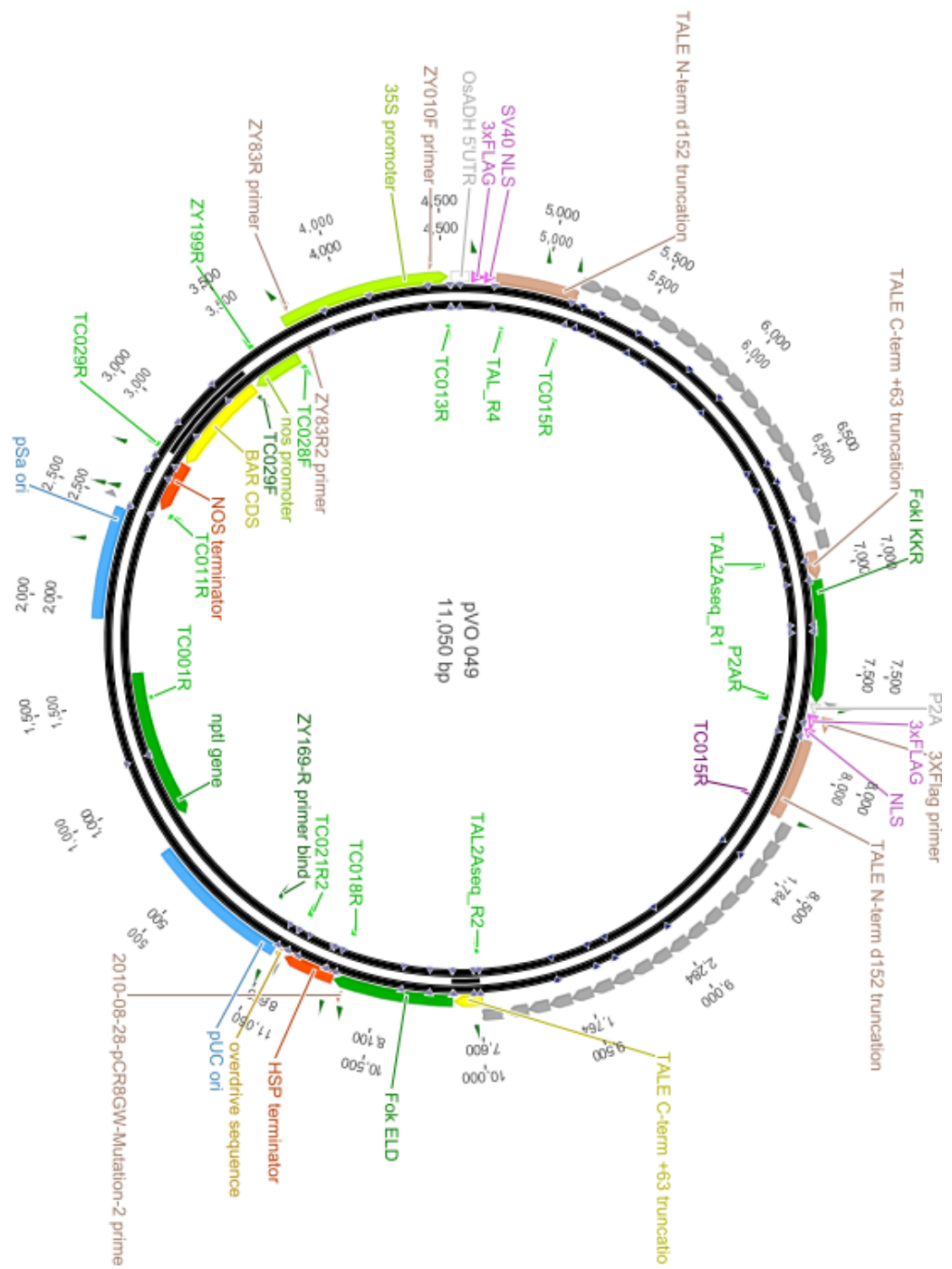
Příloha 3: Schéma konstruktů pVO045 použitého pro transformaci *lnu*



Příloha 4: Schéma konstruktů pVO046 použitého pro transformaci lnu



Příloha 6: Schéma konstruktů pVO048 použitého pro transformaci *lnu*



Příloha 7: Schéma konstruktů pVO049 použitého pro transformaci lnu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Strukturní vzorce kyseliny α -linolenové, linolové a olejové..	10
Obr. 2: Schéma transformace rostlinných buněk pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	13
Obr. 3: Metody transformace lnu.	18
Obr. 4: Průběh RNA interference	19
Obr. 5: Schéma vektoru pJET	32
Obr. 6: Schéma vektoru pHannibal	33
Obr. 7: Schéma vektoru pGreenII	33
Obr. 8: Schéma vektoru pSoup	34
Obr. 9: Schéma série vektorových konstruktů pClean	34
Obr. 10: Schéma T-DNA vektorového konstruktů pBI α MT	35
Obr. 11: Schéma klonování do vektoru pHannibal	40
Obr. 12: Vzorec pro výpočet optimálního množství inzertu a plasmidu pro ligační reakci	41
Obr. 13: Sekvence genu <i>fad2</i> použitá jako inzert.	56
Obr. 14: PCR produkty na agarózovém gelu (amplifikace části genu pro FAD2 desaturasu s navrženými primery)	57
Obr. 15: Vyštěpení sense fragmentu z vektoru pJET pomocí restričních endonukleas <i>XhoI/EcoRI</i>	57
Obr. 16: Test kolonií po vložení sense fragmentu do pHannibal	58
Obr. 17: Kontrolní restrikce pHannibalu s vloženým sense fragmentem	58
Obr. 18: Vyštěpení antisense fragmentu z vektoru pJET pomocí restričních endonukleas <i>XbaI/HindIII</i>	59
Obr. 19: pHannibal štěpený <i>XbaI</i> a <i>HindIII</i>	59
Obr. 20: Zbytek ligační směsi po transformaci	60
Obr. 21: PCR test narostlých kolonií po vkládání antisense fragmentu do pHannibal	60
Obr. 22: Kontrolní restrikce pHannibalu s vloženým antisense fragmentem	61
Obr. 23: Vyštěpení expresní kazety z pHannibal pomocí <i>NotI</i>	61
Obr. 24: Schéma expresní kazety vyštěpené z pHannibal pomocí <i>NotI</i>	62
Obr. 25: Testování plasmidů pomocí restrikce enzymem <i>NotI</i>	62
Obr. 26: Schéma nově vytvořeného konstruktů pWellFAD2i s oběma orientacemi začlenění inzertu	63
Obr. 27: Histochemický GUS test transformovaných listových disků tabáku	64
Obr. 28: PCR testování regenerovaných rostlin tabáku na přítomnost trans genu <i>uidA</i>	64

Obr. 29: Schéma použitého konstruktů pVO046.....	66
Obr. 30 a 31: Vlevo segmenty hypokotylů lnu po týdenní kokultivaci s agrobakteriemi, vpravo při následném oplachu.....	67
Obr. 32 a 33: Histochemický GUS test kalusů transformovaných konstruktem pWellFAD2i.....	68
Obr. 34 a 35: GUS analýza segmentů stonků a listů rostlin transformovaných konstruktem pWellFAD2i.....	68
Obr. 36 a 37: Histochemický GUS test klíčenců ze semen linií lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i.....	69
Obr. 38: Reverzně transkripční PCR genu pro aktin – vzorky z embryí semen a tobolek lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i.....	70
Obr. 39: Reverzně transkripční PCR genu <i>uida</i> – vzorky z embryí semen a tobolek lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i.....	70
Obr. 40: Reverzně transkripční PCR genu <i>fad2</i> – vzorky z embryí semen a tobolek lnu transformovaných konstruktem pWellFAD2i.....	70
Obr. 41: Ověření specifity primerů navržených pro qPCR.....	71
Obr. 42: Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu <i>fad2-1</i> u testovaných vzorků.....	72
Obr. 43: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery.....	73
Obr. 44 a 45: Transformace konstrukty TALENs.....	74
Obr. 46 a 47: Transformace lnu metodou floral dip za použití konstruktů pBI α MT.....	75
Obr. 48: Histochemická GUS detekce naklíčených rostlin po kontrolní floral dip transformaci konstruktem pBI α MT.....	76
Obr. 49: PCR detekce transgenů po floral dip transformaci konstruktem pBI α MT.....	76
Obr. 50: Testování potenciálních floral dip transformantů (foto před postřikem).....	77
Obr. 51: PCR detekce transgenů po floral dip transformaci konstruktem pVO045.....	77
Obr. 52: PCR testování agrobakteriální kontaminace prostřednictvím primerů amplifikujících oblast virG.....	78
Obr. 53: Výsledky PCR amplifikace genu <i>fad2-1</i> (dílčí krok testování pomocí enrichment PCR).....	78
Obr. 54: Výsledek 2. restrikční reakce (finální krok testování pomocí enrichment PCR).....	79

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Historické milníky v transgenozí lnu	23
Tab. 2: Použitá kultivační média pro bakterie	35
Tab. 3: PCR primery navržené pro amplifikaci fragmentů genu <i>fad2</i>	39
Tab. 4: Reakční směs pro štěpení plasmidů pJET a pHannibal.....	40
Tab. 5: Reakční směs pro štěpení plasmidů pJET a pHannibal obsahujícího klonovaný fragment <i>fad2</i> v sense orientaci	41
Tab. 6: Složení ligační směsi při klonování sense fragmentu <i>fad2</i> do vektoru pHannibal	41
Tab. 7: Složení ligační směsi při klonování antisense fragmentu <i>fad2</i> do pHannibal obsahujícího fragment <i>fad2</i> v sense orientaci.....	41
Tab. 8: Primery pro PCR testování přítomnosti inzertů v pHannibal	42
Tab. 9: Složení restriční směsi pro štěpení vektoru pWell02b a vyštěpení expresní kazety z vektoru pHannibal.....	43
Tab. 10: Složení ligační směsi při klonování expresní kazety do vektoru pWell02b	43
Tab. 11: Primery pro PCR testování transgenních rostlin tabáku	45
Tab. 12: Primery pro sekvenování genu <i>fad2-2</i>	46
Tab. 13: Velikost poupat a koncentrace smáčedla pro floral dip u lnu	49
Tab. 14: Primery pro PCR testování lnu transformovaného konstruktem pBI α MT metodou floral dip	50
Tab. 15: Primery pro PCR testování prýtlů po transformaci hypokotylů TALENs konstrukty	51
Tab. 16: Složení reakční směsi pro restriční 1 (enrichment PCR)	51
Tab. 17: Restr.endonukleasy pro testování transformantů dle použitých konstruktů.....	51
Tab. 18: Primery pro PCR amplifikaci pro testování indukovaných mutací po transformaci jednotlivými konstrukty (enrichment PCR testování).....	52
Tab. 19: Složení reakční směsi pro PCR (enrichment PCR testování)	52
Tab. 20: Enrichment PCR testování – složení reakční směsi pro 2.restriční reakci	52
Tab. 21: Enrichment PCR testování – délky produktů vycházejících v 2. restriční reakci	53
Tab. 22: Primery pro reverzní transkripci vzorků transformovaných konstruktem pWellFAD2i	53
Tab. 23: Složení reakční směsi pro qPCR	54
Tab. 24: Sekvence primerů pro qPCR	54
Tab. 25: Rozpoznávací sekvence pro působení jednotlivých TALENs konstruktů	65

Tab. 26: Hodnoty ΔC_t pro gen <i>fad2-1</i> u jednotlivých vzorků.....	72
Tab. 27: Obsahy jednotlivých mastných kyselin v testovaných vzorcích lnu.....	73

SEZNAM ZKRATEK

ALA	kyselina α -linolenová
α MT1	α -řetězec savčího metalotioneinu
BAP	6-benzylaminopurin
<i>bar</i>	selekční gen pro rezistenci rostlin k fosfotricinu
CAT	chloramfenikol acetyltransferasa
cDNA	komplementární DNA
ČK GMO	Česká komise pro nakládání s GMO
CRISPR/ Cas	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated
DAA	den po začátku kvetení („day after anthesis“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouřetězcový zlom
dsRNA	dvouřetězcová RNA
EMS	ethylmethansulfonát
ERA	analýzy dopadu na životní prostředí (environmental risk assessment)
EU	Evropská unie
FAD2	desaturasa mastných kyselin 2 (fatty acid desaturase 2)
FATB	fatty acyl-ACP thioesterasa B
GEEN	modifikace genomu programovatelnými nukleasami („genome editing with engineered nucleases“)
GFP	green fluorescent protein
GLA	kyselina γ -linolenová
GM	geneticky modifikovaný
GMO	geneticky modifikovaný organismus
GOI	gen našeho zájmu („gene of interest“)
hpRNA	vlásenková (hairpin) RNA
<i>hpt</i>	gen pro hygromycin fosfotransferasu
HR	homologní rekombinace
LB	levá hraniční sekvence T-DNA
<i>luplr</i>	gen pro pinoresinol-lariciresinol reduktasu
<i>lux</i>	gen pro luciferasu
MK	mastné kyseliny
mRNA	mediátorová RNA

MS	médium Murashige a Skoog
NAA	kyselina α -naftyloctová
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	nehomologní spojování volných konců
<i>nptI</i>	gen pro neomycinfosfotferasu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDCT	fosfatidylcholin: diacylglycerol cholinfosfotferasa
<i>pmi</i>	gen pro fosfomanosa isomerasu
PPT	fosfinotricin
PTGS	post-transkripčního umlčování genů
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
qRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase; (také qPCR)
RB	pravá hraniční sekvence T-DNA
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA interference
RT-PCR	reverzně-transkripční PCR
SAD	stearoyl-acyl carrier protein desaturase
SDA	kyselina stearidonová
SDG	sekoisolariciresinol
siRNA	malé interferující RNA (small interfering)
<i>SsGT1</i>	gen pro glykosyl transferasu ze <i>Solanum soganandinum</i>
TALENs	„Tale nucleases trascription activator-like effectors“
T-DNA	transferová DNA
TGM	cílené modifikace genomu („Targeted genome modification“)
Ti	„tumor inducing“ plasmid
T _L	levý úsek T-DNA oktopinového typu
T _R	pravý úsek T-DNA oktopinového typu
<i>uidA (GUS)</i>	gen pro β -glukuronidasu (β -glukuronidasa)
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukuronid
ZFNs	nukleasy „zinc-finger“