

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Kristýna Dostálová

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



**Ověření přítomnosti transgenu *bphC* pro
fytoremediaci PCB a toluenu u ječmene**

Bakalářská práce

Kristýna Dostálová

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

Olomouc 2012

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

„Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně pod vedením
Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....
Kristýna Dostálová

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za věnovaný čas a trpělivost v průběhu psaní bakalářské práce, za důležité připomínky a cennou pomoc. Mé poděkování také patří Bc. Janě Vaškové za metodickou pomoc a rady při realizaci experimentů.

SOUHRN

Životní prostředí je podle definice Ministerstva životního prostředí České republiky systém složený z přírodních, umělých a sociálních složek materiálního světa. Vytváří přirozené podmínky existence organismů, včetně člověka a je předpokladem jejich dalšího přirozeného vývoje.

Pro odstranění toxických látek z životního prostředí s využitím rostlin se využívá fytoremediace. Výhodou fytoremediačních metod je, že jsou poměrně levné a ekologicky výhodné ve srovnání s ostatními degradačními postupy.

V experimentální části bakalářské práce jsem se zabývala ověřením přítomnosti transgenu *bphC* v T1 generaci jarního ječmene odrůdy Golden Promise. Transgenní rostliny byly připraveny k ověření funkce žádaného transgenu u jednoděložných rostlin. Gen *bphC* kóduje třetí enzym bakteriální degradační dráhy polychlorovaných bifenyly (PCB) aerobní cestou, čili štěpí aromatickou strukturu bifenylového kruhu. Součástí bakalářské práce je ověření účinnosti selekčního systému v *in vitro* podmínkách. Pomocí PCR byly selektovány a detekovány transgenní rostliny jarního ječmene Golden Promise generace T1 vykazující přítomnost transgenu *bphC*.

SUMMARY

The environment is defined by the Ministry of Environment of the Czech Republic as the system composed of natural, artificial and social components of the material world. It creates natural conditions for the existence of organisms, including humans and is a prerequisite for their further natural development.

Phytoremediation method using plants can be applied for removing of toxic substances from the environment. The advantage of phytoremediation methods is that they are relatively inexpensive and environmentally advantageous compared to other degradation processes.

In the experimental part of this bachelor thesis I focused on verifying the presence of the *bphC* transgene in the T1 generation of the Golden Promise spring barley. Transgenic plants were prepared to verify the function of the desired transgene in monocotyledon plants. *BphC* gene encodes the third enzyme of the bacterial aerobic degradation pathway of polychlorinated biphenyls (PCBs), i.e. cleaves the aromatic structure of biphenyl ring. The work is also to verify the effectiveness of selective system in *in vitro* conditions. Transgenic plants of spring barley Golden Promise T1 generation showing the presence of the transgene *bphC* have been selected and detected using PCR.

OBSAH

1. CÍL PRÁCE	9
2. ÚVOD	10
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1 ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ	11
3.1.1 ZNEČIŠŤOVÁNÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ	11
3.1.2 OCHRANA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ.....	12
3.2 BIODEGRADACE.....	13
3.3 FYTOREMEDIACE	13
3.3.1 FYTODEGRADACE	14
3.3.2 FYTOAKUMULACE	14
3.3.3 RHIZODEGRADACE	15
3.3.4 FYTOSTABILIZACE	15
3.3.5 RHIZOFILTRACE	15
3.3.6 FYTOVOLATILIZACE	16
3.4 PCB	16
3.4.1 BAKTERIÁLNÍ METABOLICKÁ DRÁHA DEGRADACE PCB.....	18
3.5 GEN <i>bphC</i>	18
3.6 TRANSGENNÍ ROSTLINY	19
3.6.1 VYUŽITÍ TRANSGENNÍCH ROSTLIN	19
4. MATERIÁL A METODIKA	20
4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	20
4.1.1 JEČMEN SETÝ – VÝZNAM A CHARAKTERISTIKA.....	20
4.1.2 TRANSGENNÍ ROSTLINY	20
4.2 VÝSEV A PĚSTOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍHO MATERIÁLU, ROSTLIN T1 GENERACE	21
4.3 TESTOVÁNÍ SELEKCE NEZRALÝCH EMBRYÍ V <i>IN VITRO</i> PODMÍNKÁCH	21
4.4 IZOLACE DNA Z LISTŮ.....	23
4.5 PCR	24

4.6 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA PCR PRODUKTŮ.....	25
4.7 PŘESAZENÍ A SKLIZEŇ POZITIVNÍCH ROSTLIN	26
5. VÝSLEDKY.....	27
5.1 OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU <i>bphC</i> POMOCÍ PCR V ROSTLINÁCH T1 GENERACE	27
5.2 OVĚŘENÍ MOŽNOSTI SELEKCE NEZRALÝCH EMBRYÍ V <i>IN VITRO</i> PODMÍNKÁCH NA MÉDIU S HYGROMYCINEM	30
6. DISKUSE	35
7. ZÁVĚR	37
8. LITERATURA	39
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	42

1. CÍL PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Výsev rostlinného materiálu T1 generace obsahující transgen *bphC* ve skleníku.
3. Izolace DNA z potomstva transgenních rostlin generace T1.
4. Ověření exprese zájmového a selekčního genu pomocí PCR.
5. Testování možnosti selekce transgenních rostlin v *in vitro* podmínkách.

2. ÚVOD

Stav životního prostředí je pravidelně sledován a hodnocen v rámci hodnotících a statistických zpráv, a to zejména Zprávy o životním prostředí, která je předkládána vládou Poslanecké sněmovně Parlamentu ČR a Statistické ročenky životního prostředí ČR.

Životní prostředí ohrožují hlavně perzistentní organické polutanty (mezi které se řadí i PCB). Podle Stockholmské konvence to jsou sloučeniny, které přetrvávají v životním prostředí, jsou široce rozšířené, hromadí se v tukových tkáních a jsou toxické pro člověka a další živočichy. Snaha o jejich odstranění z životního prostředí se zvýšila při studiu bakterií schopných tyto látky metabolizovat (<http://www.mzp.cz>). Ovšem mikroorganismy mají řadu nevýhod pro použití při remediaci. Nevytváří dostatečné množství biomasy, jsou náchylné na změnu podmínek, mohou být patogenní a také je nelze sledovat pouhým okem (Viktorová a kol., 2010).

K odstranění znečištění z životního prostředí, především z odpadních vod, půd a sedimentů se využívá také fytoremediace. Tato metoda je poměrně levná a ekologicky výhodná ve srovnání s ostatními technologickými postupy (Hegazy a kol., 2011). S rozvojem molekulárních technik dochází k tvorbě transgenních rostlin nesoucích mikrobiální degradační geny, což poskytuje výhody rostlinného i bakteriálního systému.

Mimo adaptace rostlin k extrémním podmínkám pěstování je to cesta jak lze zabránit znečištění životního prostředí kovy (Danh a kol., 2009).

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

Životní prostředí je místo (prostor) v němž se realizuje působení všech vnějších a vnitřních činitelů v míře, která umožňuje organismu v tomto prostoru žít, vyvíjet se a rozmnožovat (Madar a Pfeffer, 1973).

Stav životního prostředí v ČR je z hlediska dlouhodobějšího vývoje ve většině parametrů po roce 2000 stagnující. Problémy životního prostředí charakteristické pro začátek 21. století, jako jsou neuspokojivá kvalita ovzduší v sídlech a městských aglomeracích i nepříznivý stav přírodních stanovišť, přetrvávají. Zhoršená kvalita ovzduší nadále přináší zdravotní rizika pro obyvatele žijící v zasažených oblastech. Zátěž ekosystémů okyselujícími látkami v ovzduší klesá, nadále je však vysoká nadlimitní koncentrace přízemního ozonu, který má nepříznivý vliv zejména na lesní ekosystémy a výnosy zemědělských plodin.

Znečišťujícími látkami, u kterých nejčastěji dochází k překračování nejvyšších přípustných koncentrací pro ochranu lidského zdraví, jsou prašné částice a benzo(a)pyren. Prašné částice způsobují významná zdravotní rizika zejména ve spojitosti s onemocněními dýchacích cest (www.mzp.cz).

3.1.1 ZNEČIŠŤOVÁNÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Znečištění životního prostředí představuje v dnešní době závažný problém postihující v různé míře jak rozvinuté země Evropy a Severní Ameriky, tak rozvojové země třetího světa. Mezi kontaminací nejvíce postižené státy jsou pravidelně zařazovány například Čína (Cheng, 2003) a Indie (Meharg, 2004), nebo také USA (Meagher, 2000).

Vysoká míra znečištění je spojována se skutečností, že lidstvo rozvinulo do obrovských rozměrů čerpání nejrůznějších přírodních zdrojů, které však dovede spotřebovat jen částečně a nevyužité zbytky vrací do prostředí jako odpad; znehodnocuje tak ovzduší, vodu i půdu. Znečišťování ovzduší, vody i půdy je součástí širšího problému chemizace životního prostředí, tj. masového rozšiřování a aplikace nejrůznějších chemických látek. Počet druhů chemických látek, které se na světě vyrábějí rok od roku vzrůstá. Většina těchto látek je uměle vytvořena,

v přírodě se nevyskytují, a proto se obtížně začleňují do přírodních ekologických procesů, popř. v nich vyvolávají nečekané efekty. Nejsou to zdaleka jen odpady, ale i mnohé látky záměrně do prostředí uváděné, např. průmyslová hnojiva a pesticidní látky v zemědělství, chemické látky užívané v potravinářství, čisticí prostředky, plasty a nejrůznější výrobky z nich, chemické komponenty toaletních a kosmetických prostředků a rozmanité chemikálie v průmyslové výrobě (Císař a kol., 1987).

Člověk svou činností přírodu poškozují buď přímo (těžba dřeva, surovin, stavba silnic, provoz města) nebo přirozené pochody a vztahy ovlivňuje tak, že se společenstva, krajina i složky prostředí postupně mění díky následkům druhotných změn. Například při spalování sirnatého uhlí vznikají oxidy síry a dusíku, které jsou příčinou kyselých dešťů - ty pak působí na živé organismy i na neživou přírodu a dokonce na kulturní památky. Z některých výrobních procesů nebo z odpadového materiálu se do prostředí dostávají cizí nepřirozené látky. Hovoříme o chemickém znečištění toxickými látkami (Braniš, 1997).

3.1.2 OCHRANA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Ochrana přírody v ČR je řešena zákonnou normou. V současnosti platí zákon o ochraně přírody a krajiny č. 114/1992 Sb. (www.mzp.cz).

Za velmi významný a stále aktuální problém jsou považovány tzv. staré ekologické zátěže. Jako starou ekologickou zátěž považujeme závažnou kontaminaci horninového prostředí, podzemních nebo povrchových vod, ke které došlo nevhodným nakládáním s nebezpečnými látkami v minulosti. Mezi tyto látky patří ropné látky, pesticidy, chlorované a aromatické uhlovodíky, těžké kovy a také PCB. Kontaminované lokality mohou být například skládky odpadů, průmyslové a zemědělské areály, nezabezpečené sklady nebezpečných látek, bývalé vojenské základny nebo území postižená těžbou nerostných surovin.

Ochranu lidského zdraví a životního prostředí před perzistentními organickými polutanty řeší Stockholmská úmluva (Stockholm Convention), která nabyla platnosti v roce 2004. V rámci této úmluvy je uveden seznam toxických látek, které jsou zvláště škodlivé pro lidské zdraví: aldrin, chlordan, dieldrin, endrin, heptachlor, hexachlorbenzen (HCB), mirex, toxaphen, polychlorované bifenylly (PCB), dichlordifenyltrichlorethan (DDT) a polychlorované dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany (PCDD/PCDF) (www.mzp.cz).

Znečištění životního prostředí je nutné odstraňovat. Jednou z možností odstranění kontaminantů z životního prostředí jsou metody biodegradace a fytoremediace.

3.2 BIODEGRADACE

Biodegradace znamená biologické odbourávání organických látek, zejména těch, které jsou škodlivé a do životního prostředí se dostaly lidskou činností (polutanty). Předností biodegradace je ekonomická nenáročnost, možnost zpracovat odpady přímo v místě jejich výskytu (čímž odpadá riziko při jejich dopravě), možnost nepřetržitého zneškodňování a minimální narušení okolního prostředí. Odbourávání polutantů lze provádět za použití živých organismů nebo jejich produktů umožňujících detoxikovat nebo rozložit škodlivé látky. Pro tento účel se používají různé mikroorganismy, jejichž účinek lze stimulovat přidáním kyslíku, dusíku, fosforu a jiných živin, nebo ze kterých lze laboratorně vyšlechtit velmi účinné a odolné kmeny (např. pro degradaci chlorovaných uhlovodíků). Kromě toho lze využít mikroorganismy vyskytující se v přírodě (např. houba *Phanerochaete chrysosporium*, která se vyskytuje ve ztrouchnivělém dřevě). Využití mikroorganismů má však i svá omezení např. metabolismus mikroorganismů se při teplotách nižších než 19 °C zpomaluje (Kudelová a kol., 1999).

3.3 FYTOREMEDIACE

Fytoremediace (*fyto*- rostlina, *remedium* – čistit, obnovit) se také označuje jako „čištění zelení“. Využívá se k odstranění toxických látek z životního prostředí pomocí rostlin, které se vyskytují buď přirozeně, nebo jsou geneticky upravené (Flathman a Lanza, 1998). Je to jednoduchá a šetrná metoda k životnímu prostředí (Ndimele, 2010), která slouží k obnově kontaminovaných půd a vod pomocí rostlin nebo jejich kořenů. Kořeny kolonizují mikroby a rostliny samotné akumulují toxické sloučeniny v další netoxické metabolity (Suresh a Ravishankar, 2004).

Aplikace fytoremediace pro odstranění znečištění má několik překážek, které vyžadují další intenzivní výzkum. Rostliny s nízkými výnosy biomasy a zredukovaným kořenovým systémem nepodporují efektivní fytoremediaci a s největší pravděpodobností nebrání pronikání kontaminantů do vodního systému. Účinnost fytoremediace je ovlivněna také

přírodními podmínkami, toxicitou kontaminantu a celkovým stavem půdy (Danth a kol., 2009).

Pro fytořediaci je významný výběr rostlinného druhu. Za vhodné kandidáty jsou považovány trávy, které mají vláknitý kořenový systém (Kulakow a kol., 2000). V současné době se k fytořediaci nejčastěji používají tradiční rostliny (trávy, slunečnice, kukuřice, konopí, len, vojtěška, tabák, vrba, indická hořčice, topol atd.) (Macek a kol., 2008).

Fytořediální schopnost rostliny je vyjadřována pomocí biokoncentračního faktoru (BCF), tzv. bioakumulace nebo též koeficient obohacování. BCF je bezrozměrný faktor, který se počítá jako poměr dané koncentrace prvků v rostlinných pletivech ku koncentraci prvků ve vnějším prostředí. $BCF = P/E$, kde P představuje koncentraci prvků v rostlinných pletivech (mg/kg suché wt) a E představuje koncentraci prvků ve vnějším prostředí nebo v sedimentu (mg/kg suché wt). Vyšší hodnota BCF znamená lepší fytořediální schopnosti (Sutapa a Bhattacharyya, 2008).

Podle autorů Soudek a kol. (2008) se fytořediální techniky dělí na: fytodegradace, fytoakumulace, rhizodegradace, fytostabilizace, rhizofiltrace a fytovolatilizace.

3.3.1 FYTODEGRADACE

Při fytodegradaci dochází k absorpci, přeměně a odbourávání kontaminantů uvnitř rostliny. Za fytodegradaci můžeme také považovat proces snižování kontaminantů v důsledku uvolňování enzymatických metabolitů rostliny do půdy. Nejčastější využití fytodegradace je především pro odstraňování organických polutantů (PCB, PAH, výbušniny, detergenty). Při fytodegradacích je nutné zajistit, aby nedocházelo k přeměnám na produkty, které jsou více toxické než samotný polutant (Soudek a kol., 2008).

3.3.2 FYTOAKUMULACE

Při fytoakumulaci je toxická látka přijata rostlinou a akumulována v pletivech, ale není zcela rozložena; takové rostliny, např. peníze modravý (*Thlaspi caerulescens*) akumulující zinek, jsou pak sklizeny a likvidovány (Susarla a kol., 2002). Důležitým předpokladem pro

fungování metody je, aby rostlinný druh měl hyperakumulační vlastnost vůči samotnému kontaminantu. Metoda se stále častěji používá při sanaci těžkých kovů, radionuklidů, polokovů (As, Se) a nekovů (např. B), ale není příliš vhodná pro organické látky, protože mohou být rostlinou metabolizovány na ještě toxičtější sloučeninu nebo mohou být rostlinou vydýchány do ovzduší (Soudek a kol., 2008).

3.3.3 RHIZODEGRADACE

Rhizodegradace je metoda, která umožňuje snížit množství kontaminantů v zemině za pomoci kořenového systému vysázených rostlin a půdních bakterií. Kořeny vylučují do půdy mnoho organických sloučenin (např. alkoholy nebo cukry), které jsou využívány půdními bakteriemi. Při dostatku živin počet těchto mikroorganismů vzrůstá a dochází ke stimulaci jejich aktivity, a tím k odbourávání okolních polutantů a snížení množství kontaminantů v půdě (Soudek a kol., 2008).

3.3.4 FYTOSTABILIZACE

Fytostabilizace využívá rostliny ke stabilizaci polutantů v zemině. V důsledku uvolňování organických a anorganických částic rostlinou do půdy se zabraňuje uvolňování polutantů do povrchových vod nebo šíření větrnou erozí (Sarma, 2011, Soudek a kol., 2008).

Proces závisí na biologických, chemických a fyzikálních vlastnostech půdy. Je ovlivňován produkcí huminových látek, které váží kontaminant v půdě. Fytostabilizace se používá na místech, kde je potřeba obnovit vegetační pokrývku, ale kvůli vysokému znečištění nelze na postiženém území aplikovat běžnou vegetaci (Soudek a kol., 2008).

3.3.5 RHIZOFILTRACE

Rhizofiltrace se využívá při odstraňování znečišťujících látek z povrchových, splaškových nebo vyčerpaných podzemních vod pomocí kořenového systému rostlin. Dochází ke srážení kontaminantu na kořenovém systému nebo přímo k absorpci v kořenech. Velmi úspěšné je používání např. v Černobyli, kde se díky slunečnicím odstraňují isotopy Cs a Sr z povrchových vod (Soudek a kol., 2008).

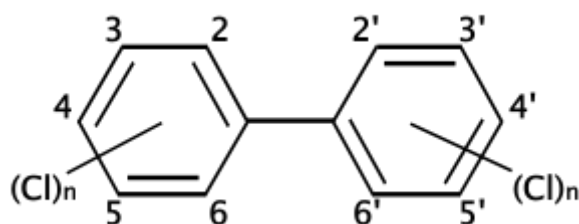
3.3.6 FYTOVOLATILIZACE

Při fytovolatilizaci neboli fyto vypařování jsou rostliny užity k extrakci určitých kovů z půdy a potom uvolněny do atmosféry pomocí vypařování (Sarma, 2011). Fytovolatilizace je metoda, při které dochází k příjmu znečišťující látky kořenovým systémem rostliny a transportu do nadzemní části. V některých případech ještě následuje biotransformace kontaminantů. Poté proběhne transpirace těkavého kontaminantu nebo těkavé formy původně netěkavé látky (Soudek a kol., 2008).

3.4 PCB

Polychlorované bifenyly (PCB) patří mezi organické polutanty, jsou to xenobiotika, tj. látky, které do přírodního prostředí vnesl svou činností člověk a které se v ní předtím nikdy nevyskytovaly. PCB jsou bioakumulovány, dlouhodobě proto přetrvávají v životním prostředí.

PCB jsou tvořeny ze dvou benzenových jader propojených vazbou na uhlíku C1, na kterých je substituováno v polohách *ortho*, *meta* a *para* 1 až 10 atomů chloru (viz obrázek 1). Celkem existuje 209 chlorovaných derivátů bifenyly (tzv. kongenerů) (Totevová a kol., 1997).



Obrázek 1: Chemická struktura PCB (možné polohy chloru na benzenových kruzích jsou označeny čísly). Převzato z: http://en.wikipedia.org/wiki/Polychlorinated_biphenyl

PCB kongenery jsou viskózní kapaliny (vysoce chlorované směsi jsou hustší a tmavěji zbarvené), bez chuti a zápachu, mají světle žlutou barvu. Jsou rozpustné ve většině organických rozpouštědel, olejích a tucích. Mají vysokou dielektrickou konstantu a tepelnou vodivost, hustota se pohybuje od 1,182 do 1,566 kg/l. PCB snadno pronikají kůží, PVC

(polyvinylchloridem) a latexem (přírodní pryží).

(http://en.wikipedia.org/wiki/Polychlorinated_biphenyl)

PCB byly široce používány v průmyslových materiálech kvůli jejich chemické stabilitě, silným izolačním vlastnostem a vysoké úrovni tepelné vodivosti, například jako dielektrické a chladicí kapaliny v transformátorech, kondenzátorech a elektrických motorech (Macková a kol., 2009). Vyráběly se chlorací bifenyly za zvýšené teploty, katalyzátorem reakce byly soli železa. Reakční směs pak byla neutralizována, destilována a získaný produkt rafinován. Tak vznikla směs chemických individuí, lišících se stupněm chlorace a polohou substituentů. Stupeň chlorace je možné ovlivnit množstvím chloru vstupujícím do reakce (Totevová a kol., 1997).

V souvislosti s používáním PCB byla odhalena i toxicita těchto látek. Postupně bylo zjištěno, že dochází k jejich vnášení do potravních řetězců a akumulaci v žijících organismech. Z tohoto důvodu došlo ve většině zemí v sedmdesátých letech minulého století k zákazu jejich produkce. V tehdejší Československu se přestaly vyrábět až v roce 1984 (Macková a kol., 2009). Toxicita PCB není ještě přesně objasněna, pravděpodobně však velmi úzce souvisí se stupněm chlorace (čím vyšší počet substituentů, tím je i toxicita PCB vyšší), a také s umístěním chloru na bifenyly (toxické jsou zejména kongenery substituované v poloze *meta* a *para*) (Totevová a kol., 1997).

Za dobu manipulace s PCB pronikly do životního prostředí tisíce tun těchto látek, většina těchto látek je odvozena od komerčních směsí (např. AROCLOR, KANECLOR, DELOR nebo CLOPHEN), které obsahují 60 až 80 různých kongenerů (Ahn a kol., 2001; Totevová a kol., 1997).

Více než čtvrt století po zastavení produkce PCB z postižených oblastí se PCB odpařily, kondenzovaly v oblastech s nižší teplotou a tak kontaminovaly velké oblasti po celém světě. Kvůli tomuto důvodu jsou PCB stále řazeny mezi globální problémy, proto je vyvíjena snaha o jejich odstranění z životního prostředí. Hlavní metodou odstranění PCB z kontaminovaného prostředí je v současnosti spálení ve vysokých martinských pecích při vysokých teplotách (Macková a kol., 2009). Hlavním problémem této likvidace je nutnost udržení konstantní teploty, aby spalováním nedošlo ke vzniku ještě toxičtějších látek - dioxinů, tento požadavek s sebou nese značnou finanční náročnost celé technologie (Totevová a kol., 1997). Jako další

metoda odstranění PCB z životního prostředí byla intenzivně studována mikrobiální degradace (Yang a kol., 2007).

3.4.1 BAKTERIÁLNÍ METABOLICKÁ DRÁHA DEGRADACE PCB

Degradace PCB pomocí mikroorganismů je považována za jeden z nejefektivnějších postupů pro jejich odstranění z prostředí. Od roku 1973 bylo izolováno a charakterizováno množství mikroorganismů degradujících PCB, jako např. *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp. a *Rhodococcus* sp. (RHA1). Byla popsána i metabolická cesta katalytické biodegradace bifenyly (Eltis a Bolin, 1996; Sakai a kol., 2001).

V tomto procesu je nejdříve molekula polychlorovaného bifenyly oxidována na 2,3-dihydro-2,3-dihydroxychlorbifenyly (dihydrodiolová směs) pomocí vícesložkového enzymu bifenyldioxygenasy (*bphA*). Dihydrodiolová směs je pak převedena na 2,3-dihydroxybifenyly-1,2-dioxygenasu (2,3-DHBP) pomocí dihydrodioldehydrogenasy (*bphB*) a výsledný 2,3-DHBP je rozštěpen na 2,3 pozici pomocí 2,3-DHBP dioxygenasy (*bphC*). Vzniklý produkt 2-hydroxy-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienoát (HOPDA) je hydrolyzován za vzniku kyseliny chlorbenzoové a 2-hydroxy-penta-2,4-dienové kyseliny (HPD) pomocí HOPDA hydrolasy (*bphD*). Alifatická kyselina je dále metabolizována na acetyl-CoA a přes Krebsův cyklus až na CO₂ (Li a kol., 2009; Eltis a Bolin, 1996; Sakai a kol., 2001).

3.5 GEN *bphC*

Gen *bphC* kóduje třetí enzym bakteriální degradační dráhy polychlorovaných bifenyly aerobní cestou, čili štěpí aromatickou strukturu bifenylového kruhu (Viktorová a kol., 2010).

BphC je homooktamer o molekulové hmotnosti přibližně 250 kDa (Uragami a kol., 2001). Enzym je aktivní v oblasti pH 7 - 9, optimální teplota se pohybuje okolo 25 °C, ke ztrátě aktivity dochází při 65 °C (Khan a kol., 1997).

Gen *bphC* byl izolován z bifenylového operonu bakterie *Pandoraea pnomenus* (dříve *Comamonas testosteroni*) B-356 a vložen do plazmidu pQE31 (Qiagen) pomocí restrikčních míst *SacI* a *KpnI* (Hein a kol., 1998).

Nováková a kol. (2009) transformovali genem *bphC* rostliny tabáku. Cílem práce bylo zvýšení efektivity biodegradace polychlorovaných bifenyly (PCB). Připravené konstrukty obsahovaly *bphC* gen, který byl fúzovaný s GUS (gen pro β -glukuronidasu), dále pak s genem LUC (gen pro luciferasu) a s His (histidinovou kotvou). Transformace tabáku byla provedena pomocí půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Expres vnesených genů byla ověřena pomocí RT-PCR. Přítomnost proteinů *bphC*/His byla ověřena pomocí Western blot analýzy, imunochemicky pomocí myší anti-His protilátky (Nováková a kol., 2009).

3.6 TRANSGENNÍ ROSTLINY

Transgenoze rostlin je založená na vnášení genů do rostlinného genomu. Tyto metody se začaly užívat v roce 1977, kdy bylo jednoznačně prokázáno, že půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vnáší svou DNA do rostlinného genomu. Tím se transgenoze stala další metodou, kterou lze v moderním šlechtění využít. V první fázi pokusů s transformací T-DNA bakteriemi *Agrobacterium* byly inaktivovány jednotlivé geny T-DNA vnášením transpozonů. V následující fázi byla odstraněna celá T-DNA a nahrazena novými geny. Dalším zdokonalením bylo rozdělení funkcí původního plazmidu Ti na dva plazmidy. Jeden z nich nese úsek virulence a druhý T-DNA. Takový malý plazmid s T-DNA je již možné snadno upravovat (Ondřej a Drobník, 2002).

3.6.1 VYUŽITÍ TRANSGENNÍCH ROSTLIN

Snaha o odstranění polutantů z životního prostředí, popř. zabránění další kontaminace, vedla k myšlence využití transgenních rostlin k tomuto účelu. V současnosti je uplatňována snaha genetickými manipulacemi získat rostliny upravené na míru požadavkům fytořemediace. Do rostlin se za účelem zlepšení jejich fytořemediačních vlastností vnášejí geny kvasinek, bakterií a savců nebo se zvyšuje exprese již přítomných rostlinných genů. Expres těchto genů by měla zajistit zvýšení účinnosti přirozených metabolických drah a schopností rostlin (Macek a kol., 2008).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

4.1.1 JEČMEN SETÝ – VÝZNAM A CHARAKTERISTIKA

Ječmen patří k hospodářsky nejvýznamnějším zemědělským plodinám. Podle velikosti osevní plochy je čtvrtou nejrozšířenější pěstovanou obilovinou. Ve Spojených státech je 50 % určeno pro krmení dobytka a 37 % pro pivovarský průmysl (80 % na pivo, 14 % na destilovaný alkohol a 6 % na sladovnický sirup).

(http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hordeum_vulgare.html)

V České republice je jarní ječmen po ozimé pšenici druhou nejvýznamnější pěstovanou plodinou. V r. 2010 byl jarní ječmen pěstován na výměře 278 718 ha a sklizeno bylo 1 088 670 tun zrna. V roce 2011 byla sklizeň jarního ječmene 1 345 940 tun, tj. o 257,2 tisíc tun více (o 23,63 %) než v roce 2010 (Český statistický úřad, <http://www.czso.cz>).

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednoděložná jarní nebo ozimá obilnina taxonomicky řazená do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Dosahuje velikosti až 1 metr, listy jsou s oušky slabě vyvinutými a skládá se z trojice klásků s velmi dlouze ovinutou pluchou, obilky jsou většinou okoralé (Hendrych, 1977). Kulturní ječmen je diploidní ($2n = 14$), podle uspořádání klasu dvouřadý nebo šestiřadý, klíčící 5 - 8 zárodečnými kořeny. Květenství je lichoklas složený z jednokvětých klásků přisedlých ve výkrojcích vřetená po trojicích. Opylení je kleistogamické, uvnitř uzavřeného květu (Vančurová a Kühn, 1966).

Ječmen je jedna z nejstarších obilnin, která vznikla v pravěku z druhu *Hordeum spontaneum* v Přední až Střední Asii, odkud se rozšířila do Afriky, ale i do Evropy již v neolitu a záhy stejně tak na východ, až do Japonska (Hendrych, 1977).

4.1.2 TRANSGENNÍ ROSTLINY

Transgenní rostlinný materiál jarního ječmene odrůdy Golden Promise byl získán v rámci diplomové práce Veroniky Liškové v období 2010 – 2011 (Lišková, 2011).

Odrůda jarního ječmene byla transformována ve dvou variantách:

- a) Genem *bphC* bez histidinové kotvy pBRACT214::*bphC*
- b) Genem *bphC* s histidinovou kotvou pBRACT214::*bphC/His*

Do vektoru pBRACT214 byl zájmový gen *bphC* naklonován s využitím GATEWAY systému a byl řízený ubiquitinovým promotorem (*ubi*). Vektor také obsahoval selekční gen *hpt* pro hygromycinfosfotransferasu, který slouží k selekci transformovaných buněk a byl pod CaMV35S promotorem. Transformace ječmene byla provedena pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Lišková, 2011).

Podrobná metodika je součástí výše uvedené diplomové práce.

4.2 VÝSEV A PĚSTOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍHO MATERIÁLU, ROSTLIN T1 GENERACE

Výsev a pěstování transgenních rostlin probíhalo ve skleníku, který je určený pro pěstování GMO rostlin v uzavřeném prostředí. Zrna generace T1 dvou pozitivních rostlin, které byly transformovány vektorem pBRACT214::*bphC* (rostlina číslo 1) a vektorem pBRACT214::*bphC/His* (rostlina číslo 2), byla vyseta do sadbovačů o velikosti 5 x 5 cm. Rostliny byly pěstovány v zahradním substrátu pro dopěstování rostlin (Rašelina Soběslav). Vysetá zrna byla 7 dní přikryta netkanou textilií, která sloužila pro udržení vlhkosti a podporovala lepší klíčení zrna. V průběhu vegetace byly rostliny pravidelně přihnojovány a ošetřovány proti škůdcům. Teplota ve skleníku po dobu vegetace byla v průběhu dne 20 °C a v noci 15 °C.

4.3 TESTOVÁNÍ SELEKCE NEZRALÝCH EMBRYÍ V *IN VITRO* PODMÍNKÁCH

Pro rychlé získání homozygotních linií byla navržena a testována možnost selekce v podmínkách *in vitro*. Na selekčním mediu s různou hladinou hygromycinu byla kultivována nezralá zygotická embrya (21 dní po opylení). K testování byla vybrána rostlina generace T1, která byla označena číslem 46. Rostlina byla transformována expresním vektorem pBRACT214::*bphC/His* a regenerovaná rostlina T0 generace vykazovala vysokou expresi na úrovni RNA (pomocí RT - PCR), (Lišková, 2011).

Sterilizace kultivovaných embryí:

Nezralá zrna izolovaná z klasů byla sterilizována sérií jednotlivých promývání: 70% ethanolem po dobu 2 min, propláchnuta sterilní vodou, 6% NaClO po dobu 4 min a závěrem propláchnuta 4krát sterilní vodou.

Nezralá zygotická embrya byla extirpována po třech týdnech po opylení pod binokulární lupou ve flow boxu za sterilních podmínek. Pomocí skalpelu a pinzet bylo vyjmuto embryo a umístěno na kultivační médium Murashige a Skoog (složení viz tabulka 1) s polovičním obsahem makro a mikro elementů (½ MS), (Duchefa) MO222. Médium obsahovalo antibiotikum (hygromycin), jako selekční agens. Hygromycin byl přidán ve dvou různých koncentracích (50 mg/l a 75 mg/l). Explantáty byly kultivovány v kultivační místnosti s 16 hodinovou světelnou periodou a teplotou 18 - 20 °C. Po pěti dnech bylo možné pozorovat první list a kořeny.

Tabulka 1: Složení Murashige Skoog media M0222 (pH 5,8)

Sloučenina	množství na 1l (v mg)
Makroelementy	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
H ₃ BO ₃	6,2
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄	180,54
CaCl ₂	332,02
Mikroelementy	
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Chelate solution Na ₂ EDTA	36,7
Vitamíny	
Thiamin (B1)	10
Pyridoxin (B6)	1
Kyselina nikotinová	1
Glycin	1
Myo-inositol	100
Další součásti MS média	
Sacharosa	30 g
Phytoagar	6 g

Rostliny byly z Petriho misek přesázeny do květináčů se zeminou. V růstové fázi 13 ve stádiu tří listů byla provedena izolace DNA z nejmladšího listu a následně detekce transgenu *bphC* pomocí PCR.

4.4 IZOLACE DNA Z LISTŮ

Izolace genomické DNA z listů rostlin byla provedena dle Edwards a kol. (1991) a upravena pro podmínky Laboratoře rostlinných biotechnologií, Centrum regionu Haná, PřF UP v Olomouci.

1. Mladý list o velikosti asi 5 - 7 cm byl rozdrčen v mikrozkuhavce vychlazenou izolační tyčinkou. Mikrozkuhavka byla chlazená v tekutém dusíku.
2. K rozdrčenému materiálu bylo přidáno 400 μ l extrakčního pufru (složení viz tabulka 2). Směs byla vortexována 5 s.
3. Extrakce vzorku probíhala 60 min při laboratorní teplotě a poté byl extrakt centrifugován po dobu 2 min ($rcf = 14550$).
4. K 300 μ l supernatantu odebraného do nové mikrozkuhavky bylo přidáno stejné množství (300 μ l) vychlazeného izopropanolu. Směs byla promíchána a ponechána při laboratorní teplotě 2 min.
5. Centrifugace vzorku 5 min ($rcf = 14550$). Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 300 μ l 70% EtOH.
6. Centrifugace 5 min, ($rcf = 2152$).
7. Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen v laminárním boxu.
8. DNA byla rozpuštěna v 50 μ l PCR H_2O .

Tabulka 2: Složení extrakčního pufru

Sloučenina	Množství na 100 ml
200 mM Tris HCl (pH 7,5)	20 ml 1M
250 mM NaCl	5 ml 5M
25 mM EDTA	5 ml 0,5 M
0,5% SDS	500 μ l
Sterilní destilovaná voda	doplnit do 100 ml

4.5 PCR

Přítomnost genu *bphC* v transgenních rostlinách byla zjišťována za pomoci PCR amplifikace s použitím specifických primerů (sekvence viz tabulka 3).

Tabulka 3: Sekvence použitých primerů

Reakce	Název primeru	Gen	Sekvence (5'-3')	Výrobce
PCR	F- <i>bphC</i> -pCR8 primer	<i>bphC</i>	ATG AGC ATC AAG AGC TTG GG	GENERI BIOTECH
	F- <i>bphC</i> -pCR8-His primer	<i>bphC</i> /His	GAG AGG ATC TCA CCA TCA CC	
	R- <i>bphC</i> -pCR8 primer	<i>bphC</i> i <i>bphC</i> /His	TCA CGA ATT CCT TCG CAC CG	

Pracovní postup:

1. Do mikroskopavky byla napipetována směs H₂O, REDTaq Ready mix (Sigma, kat. č. 031M6197), primer F a primer R (viz tabulka 4).
2. Do jednotlivých mikroskopavek bylo rozpipetováno 16 µl reakční směsi a přidáno 4 µl genomické DNA (koncentrace vzorků DNA 300ng/µl).
3. Do analýzy byly zařazeny i kontrolní vzorky; jako negativní kontrola (C-) byla použita genomická DNA izolovaná z netransgenní rostliny; jako pozitivní kontrola byl použit plazmid, kterým byly rostliny transformovány; a jako kontrola reakce byla použita H₂O.
4. Vzorky pro PCR byly krátce vortexovány, stočeny na stolní minicentrifuze a poté vloženy do termocykleru (PTC-200, MS Research).
5. Byla provedena PCR amplifikace, podle následujícího programu:
 1. Aktivační denaturace: 94 °C 3 min
 2. 32 cyklů: Denaturace: 94 °C 1 min
Nasedání primerů: 58 °C 1 min
Extenze: 72 °C 1 min 30 s
 3. Finální extenze: 72 °C 7 min

Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi

Reakční směs	Mix 1x	Vzorek
dd H ₂ O	5 µl	16 µl
REDTaq ReadyMix	10 µl	
primer F	0,5 µl	
primer R	0,5 µl	
templátová DNA		4 µl
celkem		20 µl

4.6 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA PCR PRODUKTŮ

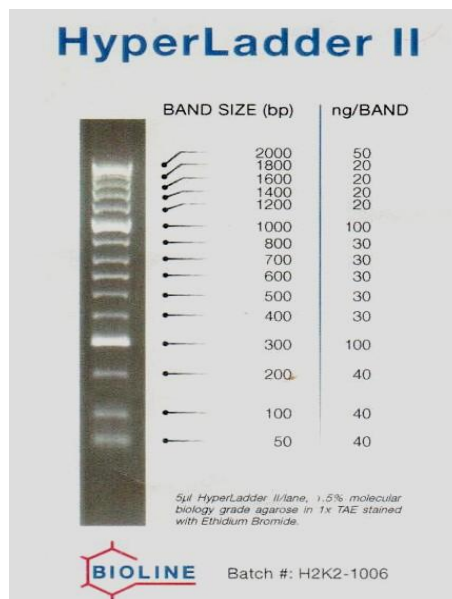
Produkty PCR amplifikace byly separovány a vizualizovány pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu.

Pracovní postup:

1. Bylo naváženo 2,5 g agarózy (Agaróza SERVA kat. č. 11404), smícháno s 250 ml TAE pufru (složení viz tabulka 5). Agaróza byla rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě, po zchladnutí bylo přidáno 6,3 µl fluorescenčního barviva ethidium bromidu (koncentrace 0,5 µg/ml).
2. Gel byl nalit do elektroforetické vaničky, byl vložen hřebínek a gel ponechán ztuhnout.
3. Do jednotlivých jamek byly napipetovány 4 µl jednotlivých vzorků PCR reakce.
4. Jako velikostní standard byl použit HyperLadder II (Bioline) (viz obrázek 2).
5. Po ukončení separace byl gel umístěn na UV transluminátor a produkty byly zviditelněny v procházejícím UV světle a dokumentovány (G:BOX, program GeneSnap, SYNGENE).

Tabulka 5: Složení 50x koncentrovaného TAE pufru (pH 8,5)

Sloučenina	Množství na 1 l
Tris báze	242 g
Octová kyselina	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
Sterilní destilovaná voda	doplnit do 1 l



Obrázek 2: Velikostní standard HyperLadder II (Bioline)

4.7 PŘESAZENÍ A SKLIZEŇ POZITIVNÍCH ROSTLIN

PCR pozitivní transgenní rostliny byly ze sadbovacích válečků přesazeny do květináčů se zahradním substrátem (Rašelina Soběslav). Po celou dobu vegetace byly rostliny pěstovány ve skleníku v teplotním režimu: 20 °C ve dne/ 15 °C v noci. Zrno každé rostliny bylo postupně sklizeno a uchováno v chladničce při 4 °C.

5. VÝSLEDKY

Cílem bakalářské práce bylo:

- 1) Na základě předešlých výsledků ověřit přítomnost transgenu *bphC* pomocí PCR v rostlinách T1 generace, určit poměr pozitivních a negativních rostlin.
- 2) Ověřit možnosti selekce nezralých embryí v *in vitro* podmínkách na médiu s hygromycinem.

5.1 OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU *bphC* POMOCÍ PCR V ROSTLINÁCH T1 GENERACE

K ověření přítomnosti transgenu *bphC* pomocí PCR bylo celkem vyseto 174 zrn potomstev transgenních rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise, které pocházely ze dvou rostlin označených jako R1 a R2.

Rostlina R1 byla transformována vektorem pBRACT214::*bphC* bez histidinové kotvy a vyseto bylo 74 zrn T1 generace. PCR produkt transgenu *bphC* měl velikost 882 bp.

Rostlina R2 byla transformována pBRACT214::*bphC/His*, kazeta genu *bphC* obsahovala histidinovou kotvu. Vyseto bylo 100 rostlin. PCR produkt transgenu *bphC/His* měl velikost 930 bp.

Výsledky PCR analýzy:

Ze 74 testovaných rostlin T1 generace rostliny R1 s transgenem *bphC* byl transgen detekován u 31, což je 42 % pozitivních rostlin.

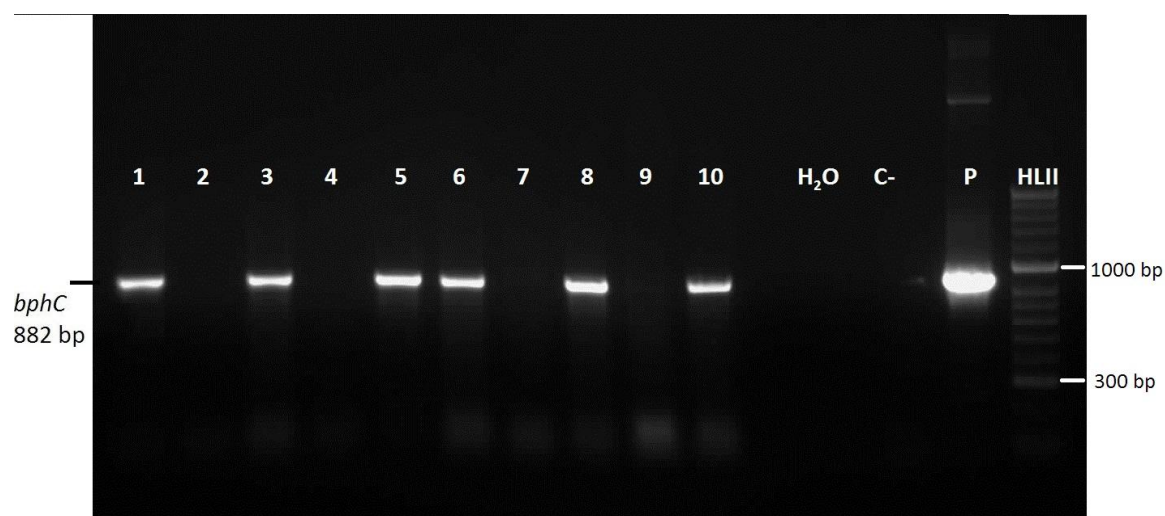
Ze 100 testovaných rostlin T1 generace rostliny R2, které byly testovány na přítomnost transgenu *bphC* s histidinovou kotvou, nebyla zjištěna žádná pozitivní rostlina.

Příklady výsledků elektroforetické separace PCR jednotlivých analyzovaných produktů transgenů genu *bphC* jsou znázorněny na obrázku 3 a 4. Počty zjištěných pozitivních a negativních rostlin jsou uvedeny v tabulce 6.

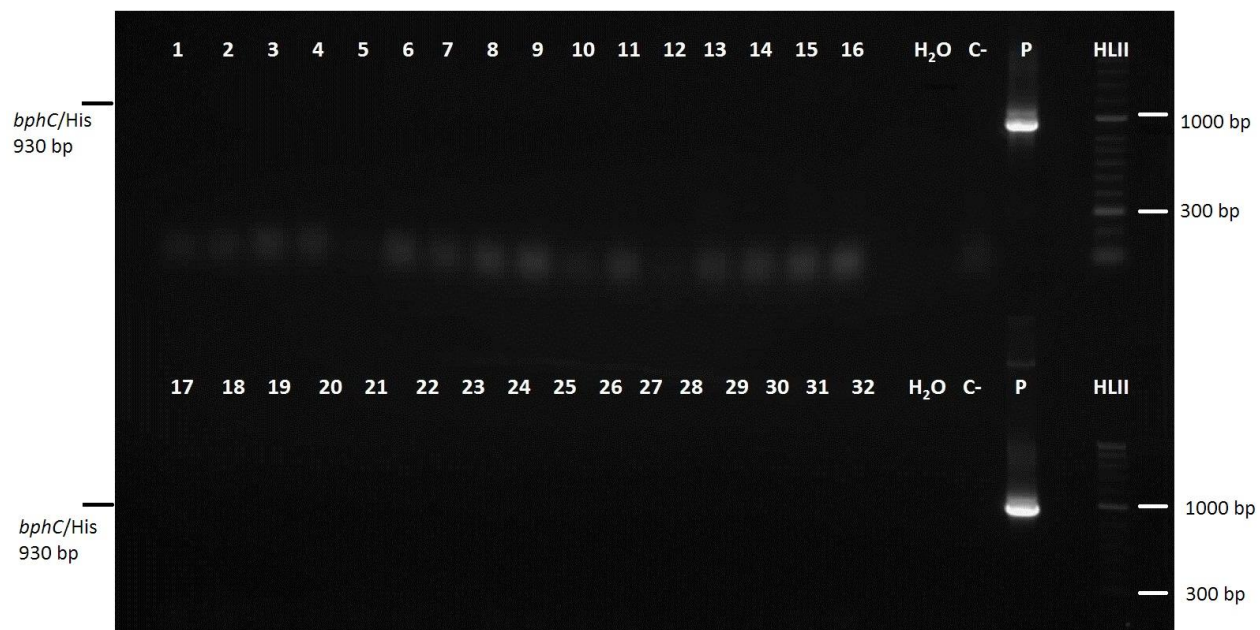
Tabulka 6: Poměr pozitivních a negativních rostlin u potomstva dvou transgenních rostlin R1-*bphC* a R2-*bphC/His* generace T1, detekovaných pomocí PCR

Číslo rostliny	Rostlina s transgenem	Celkový počet	Počet pozitivních	Počet negativních	Celkové % pozitivních
R1	<i>bphC</i>	74	31	43	42 %
R2	<i>bphC/His</i>	100	0	100	0 %

Pozitivní rostliny byly přesázeny a negativní vyhozeny.



Obrázek 3: PCR analýza genu *bphC* u rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise, T1 generace, dráhy 1 – 10, H₂O (kontrola kontaminace), C- (negativní kontrola), P (plazmid, pozitivní kontrola), HLII (DNA HyperLadder II – BIOLINE, kat. č. BIO – 333039)



Obrázek 4: PCR analýza genu *bphC/His* u rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise, T1 generace, dráhy 1 - 32, H₂O (kontrola kontaminace), C- (negativní kontrola), P (plazmid, pozitivní kontrola), HLII (DNA HyperLadder II – BIOLINE, kat. č. BIO – 333039)

5.2 OVĚŘENÍ MOŽNOSTI SELEKCE NEZRALÝCH EMBRYÍ V *IN VITRO* PODMÍNKÁCH NA MÉDIU S HYGROMYCINEM

A) Kultivace netransgenních embryí

Pro ověření účinnosti koncentrace hygromycinu byla nejdříve kultivována netransgenní nezralá zygotická embrya odrůdy Golden Promise. Extirpovaná embrya byla izolována z jedné rostliny, která byla pěstována ve skleníku. Velikost nezralých embryí byla od 1,8 do 2 mm. Pro testování byly připraveny tři varianty kultivačního média a z nich dvě obsahovaly různé koncentrace hygromycinu:

- 1) Kontrola ½ MS - bez hygromycinu
- 2) ½ MS, 50 mg/l hygromycinu
- 3) ½ MS, 75 mg/l hygromycinu

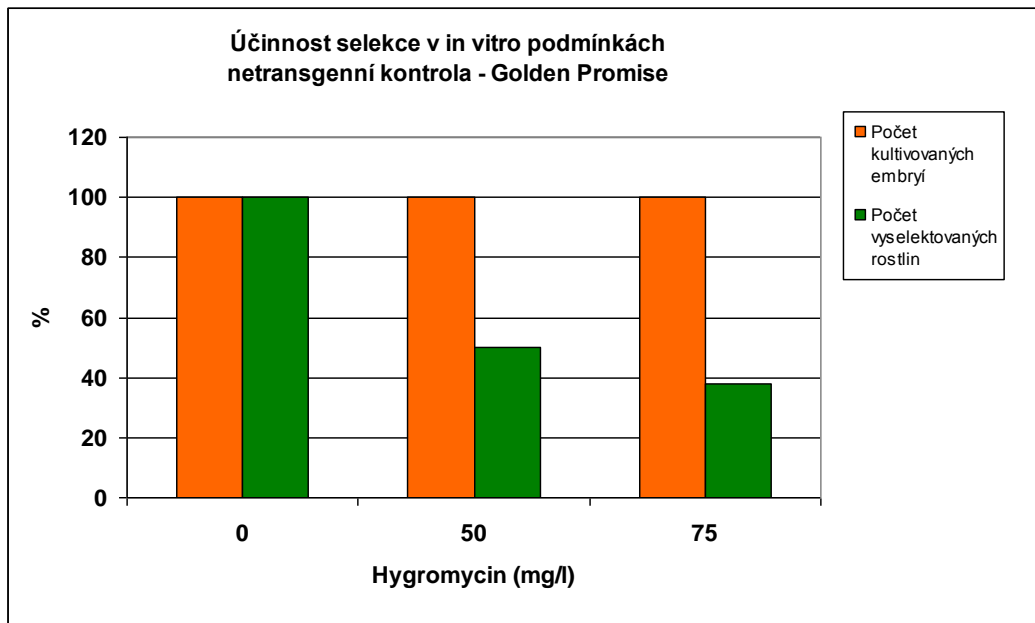
Petriho misky s embryi byly umístěny do kultivační místnosti s 16 hodinovou světelnou periodou při teplotě 18 – 20 °C.

Účinnost selekce byla stanovena poměrem mezi počtem kultivovaných embryí a vyselektovaných rostlin.

Pro stanovení vhodné koncentrace hygromycinu bylo na každé variantě média kultivováno 16 embryí. Na médiu, které obsahovalo 50 mg/l hygromycinu vyrostlo 8 rostlin, což je 50 %. Na médiu, které obsahovalo 75 mg/l hygromycinu vyrostlo 6 rostlin, což je 38 %. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 7 a obrázku 5.

Tabulka 7: Účinnost koncentrace hygromycinu na netransgenní rostliny

Hygromycin (mg/l)	Počet kultivovaných embryí	Selekce	
		Počet rostlin	%
0	16	16	100
50	16	8	50
75	16	6	38

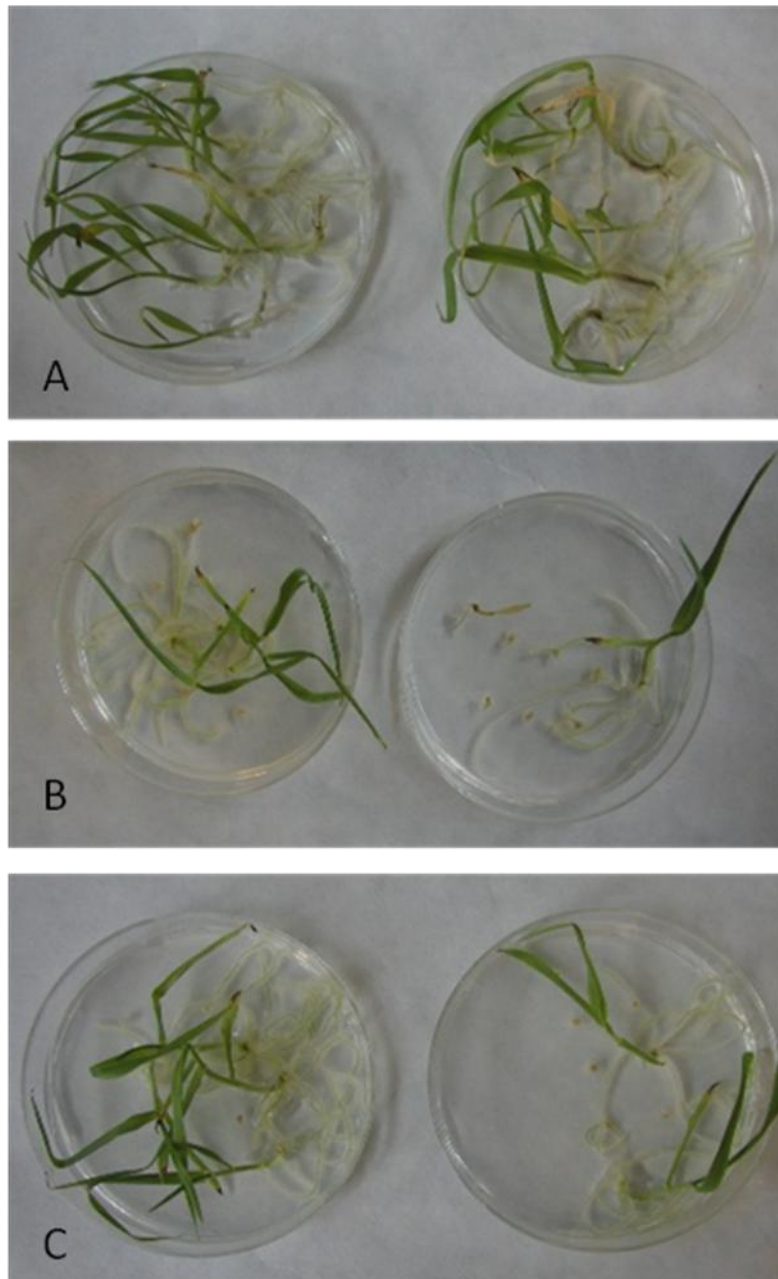


Obrázek 5: Účinnost hygromycinové selekce

B) Kultivace transgenních embryí

Na stejných variantách médií byla kultivována nezralá zygotická embrya o velikosti od 1,8 do 2 mm. Nezralá zygotická embrya pocházela z rostliny číslo 46, T0 generace, která byla transformována vektorem pBRAC214::*bphC*/His, obsahující transgen *bphC* s histidinovou kotvou.

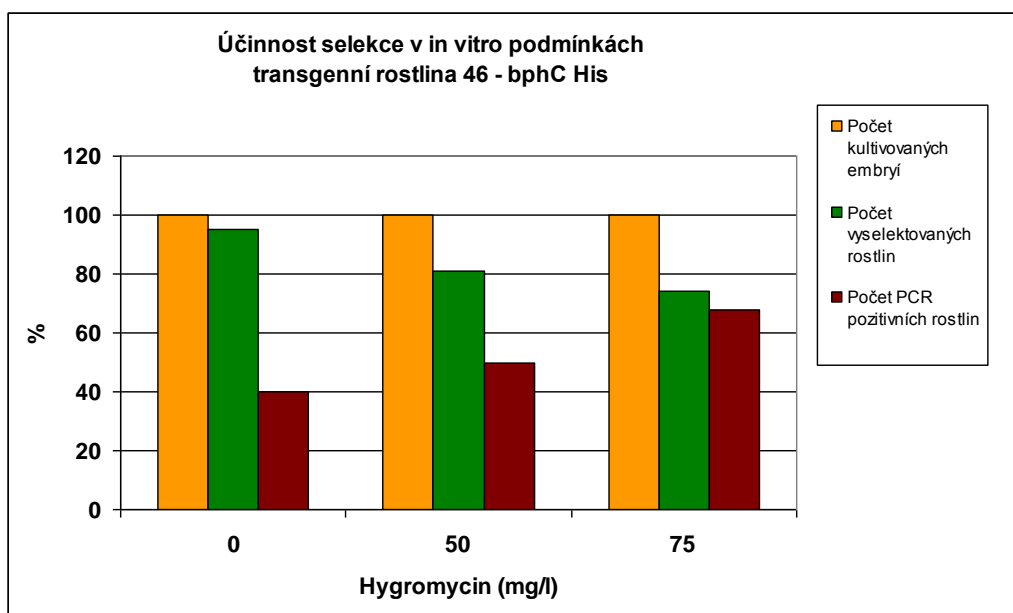
Na první variantě média (0 mg/l hygromycinu) bylo kultivováno 20 nezralých zygotických embryí, z nichž regenerovalo 19 rostlin (viz obrázek 6A), což je 95 %. Na druhé variantě média (50 mg/l hygromycinu) z 20 kultivovaných nezralých zygotických embryí, rostlo 16 rostlin, což je 80 % (viz obrázek 6B) a na třetí variantě (75 mg/l hygromycinu) bylo kultivováno 70 nezralých zygotických embryí a rostlo 52 rostlin, což je 74 % (viz obrázek 6C). Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 8 a obrázku 7.



Obrázek 6: Kultivace nezralých zygotických embryí T1 generace transgenních rostlin *bphC/His*. A – kultivační medium bez hygromycinu, B – kultivační medium s obsahem hygromycinu v koncentraci 50 mg/l a C – kultivační medium s obsahem hygromycinu v koncentraci 75 mg/l (Foto autor)

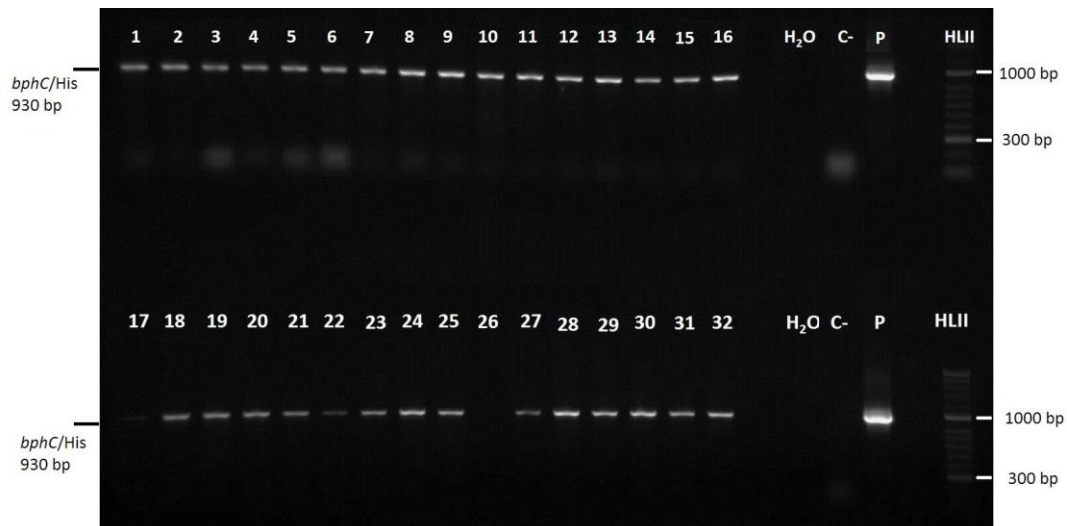
Tabulka 8: Selektce nezralých zygotických embryí obsahujících transgen *bphC/His*, rostliny č. 46, T1 generace, na třech různých koncentracích hygromycinu kultivovaných *in vitro*

Hygromycin (mg/l)	Počet kultivovaných embryí	Selektce		PCR pozitivní rostliny	
		Počet rostlin	%	Počet rostlin	%
0	20	19	95	8	40
50	20	16	80	10	50
75	70	52	74	48	68



Obrázek 7: Účinnost selektce v *in vitro* podmínkách na médiu s hygromycinem u transgenního potomstva rostliny č. 46

U všech 87 regenerovaných rostlin po hygromycinové selektci byla provedena PCR detekce transgenu *bphC/His*. Z tohoto počtu 66 rostlin obsahovalo žádaný transgen. Příklad výsledku PCR reakcí je znázorněn na obrázku 8.



Obrázek 8: PCR analýza genu *bphC/His* u rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise, generace T1, selektovaných z nezralých embryí v podmínkách *in vitro*, dráhy: 1 - 32, H₂O (kontrola kontaminace), C- (negativní kontrola), P (plazmid, pozitivní kontrola), HLII (DNA HyperLadder II – BIOLINE, kat. č. BIO – 333039)

Všechny získané pozitivní rostliny byly přesázeny do zeminy a dopěstovány (viz obrázek 9) a bylo získáno potomstvo.



Obrázek 9: Rostliny ječmene GP transformované vektorem pBRAC214::*bphC/His*, T1 generace, (po analýze PCR) přesazené do zeminy (Foto autor)

6. DISKUSE

Transformace rostlin je složitý děj, při němž jsou geny izolovány z různých organismů a vnášeny do organismů jiných. Jedná se o komplexní proces, při němž musíme zvolit vhodnou strategii klonování a dobře vybrat destinační vektory. Kultivace v *in vitro* podmínkách, indukce kalusu a regenerace kalusu je druhově a odrůdově velmi specifická. Ječmen obecně patří mezi rekalcitrantní druhy rostlin a je obtížně transformovatelný. Odrůda jarního ječmene Golden Promise je pro svou schopnost indukce kalusu a regenerace v *in vitro* podmínkách používána jako modelová rostlina pro transformaci i přesto, že se efektivita transformace pohybuje kolem 10 %. Zvýšení počtu transgenních rostlin v budoucnu bude možné dosáhnout zlepšením vektorových systémů a vyhledáním nových responzibilních genotypů, dobře vytvářejících kalus (somatická embrya) s dobrou regenerační kapacitou. Další možností by také mohlo být zvládnutí metod transformace plastidů u obilovin. Výhodou tohoto typu transformace je uniparentální přenos tzn., že vnesené geny nejsou přenášeny do další generace pylem a také je prokázána vyšší stabilita transformace.

Získání stabilní transgenní linie s žádaným transgenem je nutným předpokladem pro zahájení fyziologických, biochemických a chemických experimentů, které zpravidla slouží k ověření funkce transgenů. Podle mendelových zákonů je u samosprašných rostlin fenotypový štěpný poměr v F1 generaci 3:1 a genotypový štěpný poměr 1:2:1. U transgenních rostlin tento poměr není zpravidla dodržen. Segregace genů a jejich stabilita je ovlivňována mnoha faktory, především příjemcem genu, povahou transgenů a interakcí mezi nimi. Ani v dalších generacích F2 a F3 není segregace genů mendelisticky děděna a u různých transgenních událostí je odlišná. Předpokládá se, že 10 až 50 % je dědičnost ovlivňována „nemendelistickou segregací“. Je proto nutné získat dostatečný počet transgenních rostlin již v T0 generaci a následně provádět důslednou selekci nezávislých transgenních linií. Získání homozygotní transgenní linie u obilovin je dlouhodobý proces, který může být zkrácen využitím metody androgeneze, ale i tato metoda je druhově a genotypově velmi specifická (Yin a kol., 2004).

PCR metodou bylo vybráno dostatečné množství transgenních rostlin, a to jak na úrovni kultivací nezralých embryí v *in vitro* podmínkách, tak i na úrovni rostlin. Z rostlin T1 generace obsahujících 0 mg/l a 50 mg/l hygromycinu bylo kultivováno 20 embryí a s obsahem 75 mg/l hygromycinu bylo kultivováno 70 embryí, ale nikdy nebylo vyselektováno všech 100 % pozitivních rostlin. Z toho je zřejmé, že žádné z potomstev linií

není zatím homozygotní. Získané pozitivní rostliny budou dále využity k následným experimentům.

Použití *in vitro* selekce je rychlé a snadno se tak dá získat dostatečné množství transgenních rostlin. Nezanedbatelné je také zkrácení vegetační doby a doby dormance mezi dvěma generacemi.

Metoda selekce nezralých zygotických embryí transgenních obilovin v *in vitro* podmínkách nebyla dosud nikde popsána.

7. ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce, která se zabývala ověřením přítomnosti transgenu *bphC* pro fytoremediaci PCB a toluenu u ječmene v T1 generaci, bylo pomocí PCR analyzováno celkem 261 rostlin. Z tohoto počtu bylo 187 rostlin transformováno vektorem pBRACT214::*bphC*/His a 74 rostlin transformováno vektorem pBRACT214::*bphC* (bez histidinové kotvy). Destinační vektor pBRACT214, který byl použit pro transformaci ječmene obsahoval selekční gen *hpt* (hygromycinfosfotransferase), který vykazoval rezistenci k hygromycinu.

Pro testování možnosti selekce v *in vitro* podmínkách byly navrženy dvě koncentrace hygromycinu: 50 mg/l a 75 mg/l, které byly ověřeny na netransgenním materiálu odrůdy Golden Promise. Na médiu s koncentrací 50 mg/l rostlo 50 % rostlin, na médiu s vysokou koncentrací hygromycinu 75 mg/l rostlo 38 % netransformovaných rostlin. Dalo se tedy předpokládat, že i při selekci T1 generace bude docházet k růstu netransgenních rostlin a nebude docházet k 100% selekci.

Při selekci transgenních potomstev T1 generace (bylo testováno 20 rostlin) na médiu s 50 mg/l hygromycinu vyrostlo 80 % rostlin a z těchto rostlin bylo 50 % PCR pozitivních. Při koncentraci 75 mg/l hygromycinu v kultivačním médiu rostlo 74 % rostlin (bylo testováno 70 rostlin), z těchto rostlin bylo 68 % rostlin pozitivních, účinnost selekce byla vysoká. Z dosažených výsledků vyplývá, že se dá poměrně snadným způsobem provádět selekce rostlin i v T1 generaci.

Další výhodou selekce v *in vitro* je zkrácení vegetačního období další generace rostlin. Na selekčním médiu je vhodné kultivovat nezralá zygotická embrya 21 dní po opylení, která jsou již dostatečně vyvinutá, a jejich izolace je poměrně snadná. Nezanedbatelné je také zkrácení období dormance, kterou je nutné po sklizni dodržet. Např. u ječmene je to období od 21 do 28 dnů.

Hlavním úkolem bakalářské práce bylo vyselektovat pozitivní rostliny, které byly transformovány vektory pBRACT214::*bphC*/His a pBRACT214::*bphC* a získat dostatek osiva pro další, následné experimenty. Pro další experimenty je k dispozici zrno 31 rostlin s genem *bphC* a 66 rostlin s genem *bphC*/His, T2 generace.

Testováním selekce v *in vitro* podmínkách se podařilo stanovit vhodnou koncentraci selekčního agens - hygromycinu. Vhodná koncentrace hygromycinu podle výsledků vyšla 75 mg/l. Tento systém selekce rostlin - nezralých zygotických embryí odebraných z rostlin T0 umožňuje rychle získat žádané transgeny.

8. LITERATURA

Odborné publikace:

- Ahn, Y.B., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T. (2001): Survival of a GFP-labeled polychlorinated biphenyl degrading psychrotolerant *Pseudomonas* spp. in 4 and 22 °C soil microcosms. *Microbial. Ecology* 42: 614-623.
- Bower, H.J. (1979): Heavy metals in the sediments of foundary cover cold spring New York. *Environ. Sci. Technol.* 13: 683-689.
- Braniš, M. (1997): *Základy ekologie a ochrany životního prostředí*. Praha: Informatorium. ISBN 80-86073-03-3.
- Císař, V. (1987): *Člověk a životní prostředí*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství . ISBN 14-191-87.
- Danh, L.T., Truong, P., Mammucari, R., Tran, T., Foster, N. (2009): Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: A choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *Int. J. Phytorem.* 11: 664-691.
- Eltis, L.D., Bolin, J.T. (1996): Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* 178: 5930-5937.
- Flathman, P.E., Lanza, G.R. (1998): Phytoremediation: Current views on an emerging green technology. *Soil Sediment Contamin. Int. J.* 71: 415-432.
- Hegazy, A.K., Abdel-Ghani, N.T., El-Chaghaby, G.A. (2011): Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8: 639-648.
- Hein, P., Powlowski, J., Barriault, D., Hurtubise, Y., Ahmad, D., Sylvestre, M. (1998): Biphenyl-associated meta-cleavage dioxygenases from *Comamonas testosteroni* B-356. *Can. J. Microbiol.* 44: 42-49.
- Hendrych, R. (1997): *Systém a evoluce vyšších rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství Praha. ISBN 14-794-79.
- Cheng, S. (2003): Heavy metal pollution in China: Origin, pattern and control. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 10: 192-198.
- Khan, A.A., Wang, R., Nawaz, M., Cerniglia, C.E. (1997): Nucleotide sequence of the gene encoding dihydrodiol dehydrogenase (*bphB*) and expression of an active recombinant His-tagged *bphB* gene product from a PCB degrading bacterium, *Pseudomonas putida* OU83. *FEMS. Microbiol. Lett.* 154: 317-324.
- Kudelová, K., Jodlovská, J., Šarapatka, B. (1999): *Odpady*. Univerzita Palackého, Olomouc. ISBN 80-244-0046-4.

- Kulakow, P.A., Schwab, A.P., Banks, M.K. (2000): Screening plant species for growth on weathered, petroleum hydrocarbon-contaminated sediment. *Int. J. Phytorem.* 2: 297-317.
- Kumulu-Johnson, C.A., Ndimele, P.E., Akintola, S.L., Jibuike, C.C. (2010): Copper, zinc and iron concentrations in water, sediment and *Cynotherissa mento* from Ologe Lagoon, Lagos, Nigeria: A preliminary survey. *Afr. J. Aquat. Sci.* 35: 87-94.
- Li, A., Qu, Y., Zhou, J., Ma, F. (2009): Enzyme-substrate interaction and characterization of a 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Dyella ginsengisoli* LA-4. *FEMS. Microbiol. Lett.* 292: 231-239.
- Lišková, V. (2011): Transformace ječmene genem *bphC* pro fytořemediaci PCB. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Macek, T., Kotrba, P., Svatoš, A., Nováková, M., Demnerová, K., Macková, M. (2008): Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Trends in biotechnol.* 26: 146-152.
- Macková, M., Prouzová, P., Stursa, P., Ryšlavá, E., Uhlík, O., Beranová, K., Rezek, J., Kurzawova, V., Demnerová, K., Macek, T. (2009): Phyto/rhizoremediation studies using long-term PCB-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 16: 817-829.
- Madar, Z., Pfeffer, A. (1973): Životní prostředí. Praha: Orbis. ISBN 510-21-855.
- McKay, D.B., Prucha, M., Reineke, W., Timmis, K.N., Pieper, D.H. (2003): Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6. *J. Bacteriol.* 185: 2944-2951.
- Meagher, R.B. (2000): Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biol.* 3: 153-162.
- Meharg, A.A. (2004): Arsenic in rice – understanding a new disaster for South-East Asia. *Trends Plant Sci.* 9: 415-417.
- Ndimele, P.E. (2010): A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbon. *Pak. J. Biol. Sci.* 13: 715-722.
- Ndimele, P.E., Jimoh, A.A. (2011): Water hyacinth (*Eichlornia crassipes* (Mart.) Solms.) in phytoremediation of heavy metal polluted water of Ologe Lagoon, Lagos, Nigeria. *Research J. of Environ. Sci.* 5: 424-433.
- Nováková, M., Macková, M., Chrástilová, Z., Viktorová, J., Szekeres, M., Demnerová, K., Macek, T. (2009): Cloning the bacterial *bphC* gene into *Nicotiana tabacum* to improve the efficiency of PCB phytoremediation. *Biotechnol. and Bioengineering* 102: 29-37.
- Ondřej, M., Drobník, J. (2002): Transgenozė rostlin. Akademia. ISBN 80-200-0958-2.
- Sarma, H. (2011): Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *J. of Envir. Sci. and Technol.* 4: 118-138.

- Soudek, P., Petrová, Š., Benešová, D., Kotyza, J., Vaněk, T. (2008): Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chem. Listy* 102: 346-352.
- Suresh, B., Ravishankar, G.A. (2004): Phytoremediation-a novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24: 97-124.
- Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S.C. (2002): Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Engineering* 18: 647-658.
- Sutapa, B., Bhattacharyya, A.K. (2008): Heavy metal accumulation in wheat plant grow in soil amended with industrial sludge. *Chemosph.* 70: 1264-1272.
- Totevová, S., Prouza, M., Brenner, V., Demnerová, K. (1997): Bakteriální degradace PCB. *Chem. Listy* 91: 858-866.
- Uragami, Y., Senda, T., Sugimoto, K., Nagarajan, V., Masai, E., Fukuda, M., Mitsui, Y. (2001): Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated *bphC*, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase. *J. Inorg. Biochem.* 83: 269-279.
- Vančurová, R., Kühn, F. (1966): *Zemědělská botanika 3: Systematika rostlin*. SZN, Praha.
- Viktorová, J., Nováková, M., Macková, M., Demnerová, K., Macek, T. (2010): Transgení rostliny obsahující bakteriální dioxygenasu. *Listy cukrovarnické a řepařské* 11: 406.
- Yang, X.Q., Liu, X.Q., Song, L.Y., Xie, F.H., Qian, S.J. (2007): Characterization and functional analysis of novel gene cluster involved in biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain R04. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2214-2224.
- Yin, Z., Plader, W., Malepszy, S. (2004): Transgene inheritance in plants. *J. Appl. Genet.* 45: 127-144.

Internetové zdroje:

- Český statistický úřad – Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin 2011 (dostupné online: <http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/p/2102-12>; cit: 2012-04-02)
- Chemické vlastnosti PCB (dostupné online: http://en.wikipedia.org/wiki/Polychlorinated_biphenyl; cit: 2011-12-15)
- Ministerstvo životního prostředí České republiky (dostupné online: <http://www.mzp.cz> ; cit: 2012-06-03)
- Obrázek chemické struktury PCB (dostupné online: http://en.wikipedia.org/wiki/Polychlorinated_biphenyl; cit: 2012-02-04)
- Purdue University. Ječmen setý – význam a charakteristika (dostupné online: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hordeum_vulgare.html; cit: 2012-03-16)

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

2,3-DHBD	2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasa
CI	kalus-indukční médium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB	extrakční pufr
GMO	geneticky modifikované organismy
GP	Golden Promise
His	histidin
HOPDA	2-hydroxy-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienoát
HPD	kyselina 2-hydroxy-penta-2,4-dienová
hpt	hygromycinfosfotransferase gen
MŽP	ministerstvo životního prostředí
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PCR	polymerázová řetězová reakce
PVC	polyvinylchlorid
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	Real-time PCR
T-DNA	transferová DNA
ubi	ubiquitinový promotor
wt	hmotnost