

Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích

Zemědělská fakulta

Molekulární a biochemické charakteristiky geneticky  
modifikovaných rostlin ječmene

**Diplomová práce**

**Bc. Lucie Kocková**

vedoucí práce

**RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.**

České Budějovice 2012

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Molekulární a biochemické charakteristiky geneticky modifikovaných rostlin ječmene vypracovala sama na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích, 2012

Bc. Lucie Kocková

## **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu práce, RNDr. Slavomíru Rakouskému, CSc. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za metodické a odborné vedení a poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce.

Bc. Lucie Kocková

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled .....	2
2. 1. Transgenoze .....	2
2. 2. Transformace rostlin .....	3
2. 2. 1. Transformace pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	5
2. 2. 2. Mechanismus přenosu DNA.....	5
2. 3. Genetické modifikace ječmene.....	6
2. 3.1. Genom ječmene .....	6
2. 3. 2. Genetické modifikace ječmene .....	7
2. 4. Markerový gen pro $\beta$ -glukuronidázu – GUS.....	10
2. 4. 1. Metody detekce $\beta$ -glukuronidázy .....	12
2. 5. <i>Bar</i> gen .....	14
2. 6. PCR – polymerázová řetězová reakce .....	16
3. Materiál.....	17
4. Metody.....	19
4.1. Sterilní práce .....	19
4.2. Izolace DNA pro PCR .....	19
4.2.1. Optimalizace PCR .....	21
4.2. 2. Elektroforéza.....	22
4.2.3. Vizualizace vzorků .....	23
4.3. Izolace genomové DNA pro dot blot hybridizaci .....	23
4.4. Izolace RNA .....	24
4.5. Druhý postup izolace RNA.....	25
4.5.1. Odstranění genomické DNA ze vzorků .....	26
4.5.2. Přepis RNA na cDNA.....	26
4.5.3. Elektroforéza.....	27
4.5.4. Vizualizace vzorků .....	27

4.6. Histochemické stanovení $\beta$ -glukuronidázy .....	27
4.7. Dot blot hybridizace .....	28
5. Výsledky .....	29
5.1. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy u rostlin $T_3$ generace	30
5.2. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy u rostlin $T_4$ generace	31
5.3. Histochemická lokalizace enzymu $\beta$ -glukuronidázy v naklíčených semenech $T_4$ generace.....	33
5.4. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy v různých částech rostlin $T_3$ a $T_4$ generace rostlin .....	34
5.5. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy ve stoncích $T_3$ a $T_4$ generace rostlin a v mladých odnožích $T_4$ generace rostlin.....	37
5.6. Vizualizace genomové DNA ječmene.....	39
5.7. Detekce přítomnosti transgenů <i>gus</i> a <i>bar</i> v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene $T_3$ generace na základě vizualizace PCR produktů DNA .....	40
5.8. Detekce transgenů <i>gus</i> a <i>bar</i> v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene $T_4$ generace na základě vizualizace PCR produktů DNA v porovnání s negativní kontrolou ječmene.....	41
5.9. Detekce mRNA specifických pro gen <i>gus</i> pomocí PCR u rostlin $T_3$ a $T_4$ generace .....	43
5. 10. Dot blot hybridizace .....	48
6. Diskuze .....	48
7. Závěr.....	53
8. Seznam použité literatury .....	54

## Anotace

V současné době jsou v masovém měřítku pěstovány plodiny odolné vůči herbicidům a k ničení plevelů se používají širokospektrální herbicidy. Toto je většinou za předpokladu, že polní plodiny jsou také geneticky upraveny, že nesou ve svém genomu zabudovaný gen, který zodpovídá za odolnost proti příslušnému herbicidu či herbicidům. Tyto herbicidy by pak následně neměly poškodit úrodu. Odolnost plodin proti širokospektrálním herbicidům tedy záleží na genech, které byly do genomu plodiny vloženy. Velmi často se jako gen zajišťující rezistenci vkládá do genomu plodin gen *bar*. Ten zajišťuje odolnost proti širokému spektru herbicidů, jako např. glufosinátu a Bialophosu. Pro selekci transformantů a předběžné hodnocení míry exprese cílového transgenu se současně vnáší vhodný markerový gen. Často jím bývá gen pro  $\beta$ -glukuronidázu – GUS, který patří mezi nejpoužívanější reportérové systémy k průkazu exprese transgenu, a zároveň umožňuje analyzovat expresi na úrovni pletiv, buněk, i celých buněčných organel. V rámci diplomové práce byly pomocí PCR a histochemické detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy detekovány transgenní rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise, transformované geny *bar* a *gus*. Přítomnost genu *gus* byla stanovována v různých částech rostlin.

## **Annotation**

Modern agriculture often employs broad-spectrum herbicides combined with herbicide-resistant crops. Usually, this is achieved by altering the crop genome (genetic modification) by inserting of a specific gene coding for resistance to specific herbicide or group of herbicides. Applying such herbicide thus results in minor crop damage. The resistance of crops against broad-spectrum herbicides depends on the genes, which were inserted into the genome. The gene bar is often used as a resistance-providing element. It mediates resistance against a broad spectrum of herbicides, such as glufosinate and Bialaphos. For the selection of transformants and preliminary assessment of the target transgene expression level a suitable marker gene is simultaneously inserted. For this purpose, gene for bacterial  $\beta$ -glucuronidase (GUS) is often used. It is considered to be one of the most frequently used reporter systems for the assessment of transgene expression and also allows to analyze the expression on the tissue, cell and whole cell organelles levels. In this diploma thesis the PCR method and histochemical detection of the enzyme  $\beta$  – glucuronidase presence were used to detect and evaluate transgenic plants of cv. Golden Promise spring barley, modified by genes bar and gus. The presence of gus gene was determined in different parts of plants.

# 1. Úvod

Ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*) je celosvětově jednou z nejvýznamnějších kulturních plodin, která slouží jako potravina a krmivo s obsahem nutričně bohatých látek. V současné době jsou pěstovány plodiny odolné vůči herbicidům a k ničení plevelů se používají širokospektrální herbicidy. To je nejčastěji za předpokladu, že polní plodiny jsou tak geneticky upraveny, že nesou ve svém genomu zabudovaný gen, který zodpovídá za odolnost (toleranci) proti herbicidu či herbicidům. Tyto herbicidy by pak následně neměly poškodit úrodu. Širokospektrální herbicidy jako glufosinát či glyfozát mají nízkou toxicitu a při opakovaných aplikacích na plevele nedochází rychle ke vzniku rezistentních plevelů. Odolnost plodin proti širokospektrálním herbicidům tedy záleží na genech, které byly do genomu plodiny vloženy. Velmi často je do genomu plodin vkládán gen *bar* zajišťující rezistenci vůči glufosinátu (fosfinotricinu). *Bar* gen je významný i tím, že je možné ho využít i pro selekci transformovaných jedinců, tj. jako tzv. selektovatelný gen. Byl naklonován z genomické DNA *Streptomyces hygroscopicus*. *Bar* gen byl využit pro selekci potenciálních transformantů v systémech in vitro a in vivo, jakož i komerčně v GM řepce, kukuřici a dalších plodinách. K tomuto účelu je využíváno rezistence proti přípravku Bialaphos, který se velmi často používá v rostlinné molekulární biologii k selekci geneticky modifikovaných buněčných linií, které obsahují tento gen tolerance. V zemědělství způsobilo zavedení plodin odolných vůči herbicidům velký třesk. Selektivní herbicidy jsou ve vysoké poptávce.

Markerový gen pro enzym  $\beta$ -glukuronidázu – GUS patří mezi nejpoužívanější reportérové systémy k průkazu exprese transgenu.  $\beta$ -glukuronidáza (GUS) je kódována genem *gus* (dříve *uidA*) a byl izolován z bakterie *Escherichia coli* kmene K12.  $\beta$ -glukuronidáza má mnoho vlastností, díky kterým je velmi atraktivním reportérovým genem, a zároveň umožňuje analyzovat expresi na úrovni pletiv, buněk, i celých buněčných organel. K odhalení přítomnosti se často používají histochemické detekce in vitro, díky nimž lze odhalit lokalizaci genové aktivity v buňce a pletivech transformovaných.



Diplomová práce je zaměřena na studium exprese sekvencí selektovatelných a°reportérových transgenů *bar* a *uidA (gus)* v různých částech rostlin transgenního ječmene odrůdy Golden Promise.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Transgenoze

Přenos genů, neboli transgenoze mezi vzdálenými, někdy i zcela nepříbuznými organismy patří do jedné z hlavních metod genového inženýrství, to°prochází zejména v posledních 30-ti letech velmi rychlým vývojem. Bakteriální transformace byly známy již ve čtyřicátých letech 20. století a°předpokládalo se, že podobný jev musí existovat i u eukaryotních buněk. Provádělo se také mnoho pokusů s exogenní deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), ale jejich jednoznačné interpretaci bránila neadekvátní metodická výbava (Ledoux a Huart, 1968; Ledoux et al., 1974; Hess°et al., 1976). Tyto metody odstartovaly v roce 1977, kdy bylo jednoznačně prokázáno, že°půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vnáší svou DNA do rostlinného genomu. (Chilton et al., 1977). Dochází tedy k přenosu DNA z jedné buňky do druhé, tento přenos se nazývá transformace. Teprve metody genového inženýrství umožnily získat jednoznačný důkaz přenosu a°zapojení cizorodé DNA do dědičné informace rostlinných buněk (Ondřej, 2002).

Gen, který má být vnesen do buňky nebo do organismu, se nazývá transgen (přenášený gen). Organismus, který ve svém genomu obsahuje vnesený gen, se označuje jako transgenní. Pomocí transgenoze lze získat rostliny odolné k°herbicidům, hmyzím škůdcům, virovým či houbovým patogenům, ale také s novými vlastnostmi výhodnými pro zpracovatelský průmysl (modifikovaný škrob, modifikované oleje apod.). Výzkum je zároveň zaměřen na zvýšení výnosů plodin úpravou genů pro enzym fotosyntézy, fixaci vzdušného dusíku a úpravou genů pro zásobní proteiny (Snustad° a Simmons, 2009).

## 2.2. Transformace rostlin

Genové inženýrství umožnilo vývoj hospodářsky významných rostlin s°unikátními znaky a°to°způsobem, který není možný běžnými postupy. Tyto geneticky modifikované (GM) rostliny mohou být v některých aspektech skutečným přínosem. Jedná se například o kukuřici odolnou vůči hmyzím škůdcům. V budoucnu se budou využívat i geneticky modifikované organismy (GMO) s°pozměněnými vlastnostmi koncového produktu pro průmyslové využití, s lepší nutriční hodnotou nebo jako zdroje pro farmacii a medicínu. V Evropě se při uvolnění GMO do životního prostředí využívá princip předběžné opatrnosti. Legislativně jsou ošetřeny nároky na hodnocení případných rizik spojených s uvolněním jednotlivých GMO do životního prostředí a to rizika ekologická i zdravotní. Zohledňuje se jak funkce vneseného genu, tak charakter příjemce. Ekologická rizika je třeba zvažovat pro každý region zvlášť a ČR podporuje projekty zaměřené na odhad možných rizik při°uvolnění GMO do životního prostředí. Výsledky výzkumu se aplikují i pro tvorbu pravidel koexistence odlišných způsobů rostlinné výroby v ČR (Ovesná, 2005). U°kukuřice se provádí šlechtění na rezistenci, v současnosti je velmi oblíbenou modifikací Bt kukuřice, která ve°svém genomu obsahuje gen *Cry* z bakterie *Bacillus thuringiensis*, který kóduje toxin jedovatý pro°housenky zavíječe kukuřičného. Zároveň jsou současné transgenní odrůdy tolerantní k°herbicidům jako např. glyfozátu nebo glufosinátu (fosfinitricin). Transgenní sója obsahuje transgen pro rezistenci ke glyfozátu (°Ondřej a Drobník, 2002). Cukrová řepa a slunečnice je tolerantní k herbicidu chlorsulfuronu, kukuřice, řepka a sója k isoxasolu, bavlník a°řepka k oxynilu, řepka k sulfonamidu.

Za posledních několik desítek let byla vyvinuta řada metod transformace rostlin. Mnohé z těchto původních metod dosáhly značného rozšíření a jsou v současnosti běžně využívány pro široké spektrum objektů. Méně úspěšné metody jsou pro svou nízkou účinnost a obtížnou reprodukovatelnost nahrazovány zcela novými progresivními postupy. Hlavním cílem vývoje transformace rostlinných buněk je°vyvinout techniku, která bude dostatečně účinná, bude docházet k transformaci s°maximální možnou frekvencí a celý proces transformace nebude spojen se vznikem chromozomální variability, případně bude omezena na nejmenší možnou míru (Hansen a Wright, 1999). Transformace rostlin představuje cílenou změnu genetické

informace, které by nebylo možné dosáhnout přirozenými způsoby a mechanismy. K přenosu žádaného genu do genomu rostlin se používají různé metody, nejčastěji je využívána transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* a biolisticke metody transgenozy. V současnosti je snaha o provedení genetických transformací u většiny důležitých agronomických plodin. Jako výsledek se předpokládá tolerance k herbicidům, k zasolení půdy, nízkým teplotám, suchu, chemickým stresům, rezistence k hmyzím škůdcům, virům, houbovým a bakteriálním onemocněním, a zároveň je snaha o zvýšení množství lipidů, zásobních proteinů vitamínů, minerálů a dalších důležitých látek (Ondřej a Drobník, 2002). Nejznámějším příkladem je sója odolná vůči herbicidu Roundup (s účinnou látkou glyfozátém), tzv. Roundup Ready sója. Nejvýznamnějšími geneticky modifikovanými (GM) plodinami jsou obecně sója, kukuřice, bavlník a jarní řepka (kanola), jejich plochy ve světě stále narůstají. Současné techniky biochemie a molekulární biologie umožňují identifikovat biosyntetické dráhy proteinů, obranných a detoxifikačních látek. Pomáhají i objasňovat molekulární základy interakce rostliny a patogena. Rovněž je možné identifikovat geny, které kódují proteiny uvedených biosyntetických drah. Bylo tak možné izolovat geny, které podmiňují odolnost vůči herbicidům, hmyzím škůdcům nebo cytoplasmatickou sterilitu. Geny je možné izolovat z jakéhokoliv organismu, např. bakterie, a kombinovat je ve zkumavce s regulačními úseky genu z jiného organismu, např. rostliny. Současné techniky dovolují vpravení takto upraveného genu (konstrukt) do cílové buňky a z ní odvodit celistvý organismus. Vzhledem k tomu je možné měnit některé vlastnosti daného druhu (Ovesná, 2005). Významné je zvýšení obsahu karotenoidů u jarní řepky, které obsahují  $\beta$ -karoten, lutein, zeaxantin, lykopen a astaxanthin, které jsou velmi důležité pro správné vidění. Obsah karotenoidů byl u jarní řepky zvýšen až 30 krát. V salátech jsou syntetizovány vitamíny, jako např. GTP cyklohydrolyasa, která zvyšuje obsah folátu 9 krát. V kukuřici dochází k expresi hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy z huseníčku (*Arabidopsis*), čímž se zvyšuje obsah tokoferolu v semenech 3 krát. Genetickou transformací tzv. bílé kukuřice byly vyvinuty nutričně kompletní obiloviny, které by do budoucna mohly být řešením pro zajištění nutričně kompletní stravy. U bílé kukuřice se zároveň podařilo vyprodukovat 407 krát více  $\beta$ -karotenu (57 mg/g), 6,1 krát více askorbátu (106,94 mg/g) a dvakrát větší množství folátu (200mg/g) (Farre et al., 2011).

## 2.2. 1. Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* je gramnegativní bakterie, tyčkovitého tvaru, schopná pohybu. Tento organismus se běžně vyskytuje v kořenovém systému dvouděložných rostlin. Na poraněných nebo poškozených místech dvouděložných rostlin je schopná vytvářet krčkovité nádory (tumory). Schopnost tvořit tumory je u bakterie dána plazmidem Ti (Tumor-indukující), plazmid v sobě nese oblast, označovanou jako T-DNA, která je schopna se začlenit do genomu rostlinné buňky. T-DNA obsahuje geny pro cytokininy, auxiny a opiny. Podle typu opinu rozdělujeme Ti-plazmidy na agropinové, nopalínové, oktopinové a sukcinamopinové. Sekvence T-DNA může být velká 10 - 30 kb a v Ti-plazmidu se může vyskytovat v několika kopiích. Jednotlivé T-DNA jsou ohraničeny hraničními nepravidelnými repeticemi o délce 25 bp. Tyto hraniční sekvence jsou velmi důležité, neboť veškerá DNA mezi nimi může být včleněna do hostitelské DNA. Ti-plazmidy, kromě T-DNA, nesou geny pro virulenci (*vir*), které slouží k přenosu cizorodé DNA do rostlinné buňky, a také geny pro katabolismus opinů. Celková velikost Ti-plazmidu je 200 - 800 kb (Gelvin, 2003). Na přenosu T-DNA se dále podílejí geny z bakteriálního chromozómu (Douglas et al., 1982) a podle novějších poznatků také proteiny z hostitelské buňky (Mysore et al., 2000).

## 2. 2. 2. Mechanismus přenosu DNA

Principem transformace pomocí *A. tumefaciens* je přilnutí bakterie na povrch rostlinné buňky, která byla poškozena a uvolňuje fenolické látky. Právě těmito fenolickými látkami je *Agrobacterium* chemotakticky naváděno k poškozené buňce a po spojení s hostitelskou buňkou je aktivován membránový protein VirA. Ten dále aktivuje protein VirG, který spouští expresi všech genů *vir*. Následně dochází k vyštípnutí jednoho řetězce T-DNA, tento řetězec je označován jako T-řetězec, na kterém se podílejí VirD1 a VirD2, které plní funkci specifické endonukleázy (Filichkin a Gelvin, 1993). VirD2 se také naváže na 5' konec vzniklého T-řetězce (Ward a Barnes, 1988), kde spolu s dalšími Vir proteiny tvoří komplex, který přechází do hostitelské buňky přes T-pilus. Tento T-pilus je tvořen VirD4 a proteiny kódovanými operonem *virB* (Christie, 2004). V cytoplasmě hostitelské buňky je T-

řetězec pokryt proteiny VirE2, jejichž úkolem je ochrana před endonukleázami, obsaženými v cytoplasmě a také její správná orientace. Vlastní přenos T- řetězce do jádra je uskutečněn prostřednictvím intracelulárního transportního mechanismu. V tomto kroku jsou důležité proteiny VirD2 a VirE2, které mají jaderný lokalizační signál (Citovsky et al., 1994). Mechanismus integrace do genomu je dosud neznámý, přesto existuje několik modelů, které se jej snaží vysvětlit. Podle jednoho předpokladu je začlenění umožněno mechanismem pro opravu dvouřetězcových zlomů (Tzifra et al., 2004). Jiná teorie počítá s nelegitimní rekombinací jako klíčem pro integraci T-DNA do genomu (Mayerhofer et al., 1991).

T-DNA se začleňuje do DNA nezávisle na metylaci nebo aktivitě transkripčního místa. Stejnou měrou se integruje do euchromatinu nebo heterochromatinu. Mechanismus začlenění funguje tedy zcela náhodně (Kim et al., 2007). Počet začleněných T-DNA není stálý, může dojít i k mnohonásobnému začlenění. Častým jevem je vícenásobné začlenění T-DNA do jednoho lokusu. Tento stav je navozen ligací jednotlivých T-DNA ještě před integrací. Z toho vyplývá, že jednotlivé T-DNA mohou být vůči sobě i opačnými směry (De Buck et al., 2009).

*A. tumefaciens* je přirozeným patogenem dvouděložných rostlin, proto je přirozené, že jeho použití pro transformaci dvouděložných rostlin je mnohem snazší než pro transformaci jednoděložných. Pro transformaci jednoděložných rostlin byly vyvinuty alternativní metody biolisticke a elektroporační. V současnosti existují kmeny *A. tumefaciens*, které mají upravenou virulenci a mohou sloužit k transformaci nejen jednoděložných rostlin (Liu et al., 1992), ale i nahosemenných rostlin (Pazour et al., 1992) či dokonce hub (De Groot et al., 1998).

## **2. 3. Genetické modifikace ječmene**

### **2. 3.1. Genom ječmene**

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) je hospodářsky významnou rostlinou, která se využívá zejména k výrobě sladu a dále je potravinářskou, krmnou a farmaceutickou plodinou. Ječmen setý patří mezi jednoděložné rostliny, taxonomicky se řadí do čeledi *Poaceae* (lipnicovité). Rod *Hordeum* zahrnuje jeden druh kulturního ječmene (*Hordeum vulgare*) a dalších 30 druhů planého ječmene. Ječmen lze rozdělit

podle počtu chromozómů na diploidní ( $2n=14$ ), tetraploidní ( $2n=28$ ) a hexaploidní ( $2n=42$ ). Diploidní forma ječmene je označována jako kulturní ječmen a je možné ho dále dělit dle uspořádání klasu na dvouřadý nebo šestiřadý, nebo podle doby výsevu na ozimý či jarní. Téměř všichni zástupci rodu *Hordeum* mají svůj karyotyp složený z jednoho páru submetacentrických chromozómů, dvou páru chromozómů se satelitem a čtyř párů metacentrických chromozómů (Bothmer et al. 1991). Celková hmotnost DNA v haploidním jádře je 5,2 - 5,5 pg. Tato hmotnost DNA odpovídá přibližně  $5,1 - 5,3 \times 10^9$  bp (Bennett a Smith, 1976, Bennett a Leitch, 2005). Genom ječmene je rozdělen na sedm vazbových skupin. Jeden gen přibližně zabírá úsek o velikosti 123 až 212 kb, ale je důležité poznamenat, že stejně jako většina genomů i genom ječmene obsahuje místa s vyšší koncentrací genů a naopak i místa s nižší koncentrací genů. Bylo zjištěno, že všechny geny jsou lokalizovány pouze v 12 % celkové velikosti DNA. Výjimku tvoří některé geny pro zásobní proteiny a ribozomální geny (Barakat et al., 1999). Tandemově uspořádané sekvence tvoří přibližně 10 až 20 % celkové velikosti DNA (Manninen, 2000). Diploidní jádro ječmene obsahuje sedm párů chromozómů. Doporučená nomenklatura pro popis ječmenných chromozómů je odvozena podle podobnosti molekulárních a biochemických markerů na chromozómech pšenice. Nomenklatura ječmenných chromozómů je potom složena z čísla pšeničného chromozómu a písmene H, což označuje rod *Hordeum*. Označení jednotlivých chromozómů vypadá potom následovně 7H, 2H, 3H, 4H, 1H, 6H a 5H (Kleinshofs a Graner, 2001). Svými vlastnostmi a způsobem pěstování se stal ječmen modelovým organismem celé skupiny *Triticeae* (Ramsay et al., 2000). Zlepšení jeho genetických vlastností může vést k větším výnosům či zlepšené odolnosti vůči biotickému nebo abiotickému stresu.

### 2.3. 2. Genetické modifikace ječmene

První transformace modelových rostlin za účelem změny původního genetického materiálu probíhaly od 80. let dvacátého století a byly založené na vnesení požadované genetické informace (DNA) do genomu rostliny infekcí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Snaha uplatnit tuto metodu při transformaci obilovin

byla téměř dvě desetiletí neúspěšná. Tento dlouhý nezdar byl zapříčiněn tím, že bakterie nezbytná pro vnesení požadované DNA infikuje především dvouděložné rostliny, tudíž ječmen a další jednoděložné obiloviny nejsou jejími přirozenými hostiteli. Z tohoto důvodu byly vyvinuty alternativní metody umožňující integraci požadované DNA do genomu obilovin – tzv. metody pro přímé vnesení genu (DGT), kam patří např. makro- a mikroinjekce DNA, elektroporace, použití mikrovláken karbidu křemíku a transformace protoplastů. Aplikací všech těchto metod bylo potvrzeno vnesení DNA do buněk (Jones a Shewri, 2009). Nevýhodou těchto metod je zejména vysoká technická náročnost. Na rozdíl od předchozích uvedených metod umožňuje další DGT metoda, tzv. biolistická transformace, vnesení požadované DNA do takového typu buněk, ze kterých je možné nejsnáze regenerovat celou rostlinu. Mezi takové buňky patří zejména kalusové kultury nebo embryonální tkáň štítku – skutela. Toto je velice výhodné právě pro transformaci obilovin, protože u nich se často vyskytovaly obtíže při regeneraci buněčných suspenzí, které jsou využívány jako vstupní materiál pro DGT metody.

Dalším významným použitím této metody je studium dočasné exprese různých genových konstruktů. Míra exprese potom může být detekována např. stanovením enzymatické aktivity nebo pomocí koexprese reportérového genu, který umožňuje pozorovat hladinu exprimovaného proteinu pod mikroskopem. Studium dočasné exprese je důležitý nástroj pro optimalizaci různých technických parametrů pro vnesení DNA do cílové tkáně a nalezení vhodné sekvence promotoru (regulační úsek DNA zajišťující transkripci genu) poskytující nejlepší výtěžky exprimovaného proteinu. Metody biolistické transformace, které využívají obalení mikroskopických částic vnášenou DNA následně vstřelených do buněk živé tkáně, byly používány již koncem 80. let. Již v roce 1989 byla získána první transgenní rostlina kukuřice, což byl významný krok na poli genetické modifikace obilovin. Touto metodou také byly poprvé připraveny transgenní obiloviny jako pšenice a ječmen. Na obr. č. 1 je uveden historický přehled úspěšnosti transformací hlavních obilovin pomocí biolistických metod a agrobakteria.





fytázu (*phyA*) z houby *Aspergillus niger* pod  $\alpha$ -amylázovým promotorem (Brich-Petresen et. al., 2000). Z takto modifikovaného ječmene by se mělo v trávicím traktu uvolňovat mnohem více minerálních látek, kationtů a fosforu, které jsou vázané na kyselinou fytovou a vytváří komplex fyтин. Snížením obsahu fyтинu v exkrementech monogastrických živočichů dochází k výraznému snížení kontaminace povrchových vod fosfáty. V současné době je enzym fytáza přidáván do krmných směsí pro monogastrické živočichy. Technologie výroby fytázy je nákladná a náročná. Při nízkých výkupních cenách masa či jiných živočišných produktů se od tohoto trendu v mnohých velkochovech upouští a minerální látky jsou do krmných směsí přidávány samostatně. Ječmen obsahuje ve svém genomu také gen pro fytázu a to konkrétně pro 6-fytázu, která je vlastní i jiným rostlinám. Lokalizována byla na chromozómu H5 u odrůd Franklin a Yerong (Dai et al., 2011). Kyselina fytová je esterem myo-inositolu a kyseliny fosforečné a je také známa pod názvem fyтин. Je přirozeně vyskytující se sloučeninou v buňkách a rostlinných pletivech. Fyтин je v semenech syntetizován a ukládán do zásobních orgánů v endospermu a dělohách. Fytáza je enzym, který uvolňuje z vazby fosfát a kationty vázané na kyselinu fytovou. Je převážně produkována nižšími houbami. Do jisté míry se vyskytuje i v živočišných tkáních a v zrnech rostlin. V zrnech slouží k rozkladu kyseliny fytové, která je největší zásobárnou fosforu v semenech rostlin. Fytáza je produkována při klíčení rostlin, tím dochází ke štěpení fyтату a uvolněný fosfát je poté využit ke klíčení rostliny (Konietzny a Greiner, 2002).

## 2.4. Markerový gen pro $\beta$ -glukuronidázu – GUS

Systém reportérového genu pro enzym  $\beta$ -glukuronidázu byl vytvořen v roce 1987 R. A. Jeffersonem. Od té doby patří gen pro  $\beta$ -glukuronidázu mezi nejpoužívanější reportérové systémy k průkazu exprese transgenů (Jefferson et al., 1987). Tento gen se běžně vyskytuje u prokaryot a eukaryot s výjimkou rostlin.  $\beta$ -glukuronidáza (GUS) je kódována genem *gus* (dříve *uidA*) a byl izolován z bakterie *Escherichia coli* kmene K12. Enzym je tetramer s podjednotkami o molekulové hmotnosti přibližně 68 000.  $\beta$ -glukuronidáza má mnoho vlastností, díky kterým je velmi atraktivním reportérovým genem. GUS se zařazuje mezi hydrolytické enzymy a navíc je termostabilní. Tento enzym štěpí  $\beta$ -glykosidické vazby mezi kyselinou D-glukuronovou a necukernou

složkou (Jefferson et al., 1986). Nejvyšší aktivitu projevuje v přítomnosti SH-redukujících látek, jako je například  $\beta$ -merkaptoetanol, dithiothreitol. Naopak dvoumocné ionty některých kovů, Cu či Zn, působí inhibičně. Nejvyšší aktivitu má prokaryontní GUS při pH 7,0.  $\beta$ -glukuronidáza je aktivní v širokém rozsahu pH, optimální spektrum pH (5–7,5); poloviční aktivitu vykazuje, jestliže je pH rovno 4,3; hodnota pH 8,5 je považována za tzv. neutrální optimum. Zároveň je GUS odolná vůči inaktivaci teplotou do 50 °C (Jefferson et al., 1986). Poločas života při 55 °C je 2 hodiny (Vitha, 1995).  $\beta$ -glukuronidáza umožňuje analyzovat expresi na úrovni pletiv, buněk, i celých buněčných organel. GUS bývá používána pro sledování lokalizace proteinu v jádře, i přesto, že by byl vhodnější zeleně fluoreskující protein (GFP), má v tomto případě GUS některé výhody. Její velká molekulová hmotnost zabraňuje pasivní difúzi do jádra. V případě, že je gen pro GUS fúzován s genem pro GFP, a výsledný protein je z nějaké příčiny nefluorescentní, GUS si zachovává svou enzymatickou aktivitu a je detekována histochemicky. V tomto případě má GUS ve srovnání s GFP jednu nevýhodu. Touto nevýhodou je, že je možné detekovat pouze „silnou jadernou lokalizaci“ (expresi v jádře) (Blažíčková, 2010). GUS bývá také používána jako reportérový gen, kdy je možné díky jednoduché histochemické metodě stanovit, zda dochází k expresi genů ve vazbě, které se použily při transformaci.

Pro transformaci rostlin se jako regulační sekvence pro gen *gus* používá promotor viru žilkové mozaiky kvěťáku CaMV 35S, který je schopný se exprimovat ve všech rostlinných orgánech (Pret'ová et al., 2001). Promotor CaMV 35S je přednostně aktivní v S fázi buněčného cyklu (Jefferson et al., 1987). Rostliny, které jsou transformovány genem pro GUS, jsou většinou normální, zdravé a schopné rozmnožování. Protein GUS je velmi stabilní, a i po dlouhé době skladování rostlinného extraktu je protein aktivní ve vysokém stupni. Za normálních podmínek se enzym GUS nevyskytuje v rostlinných pletivech (respektive u většiny vyšších rostlin nebyla detekována jeho aktivita), nebo se vyskytuje jen velmi vzácně. Citlivost testovacích metod založených na detekci GUS umožňuje ověření proběhlé transformace (Ogras a Gözükmizi, 1999). Kvůli problémům s expresí  $\beta$ -glukuronidázy i v buňkách bakterie *Agrobacterium*, byl do sekvence *gus*, vložen intron. Tento vložený intron byl odvozen z intronů rostlin. V transformovaných rostlinných buňkách je při úpravách mRNA intron vystřižen a vzniká tak aktivní enzym  $\beta$ -glukuronidáza. Zároveň by měl intron zvyšovat enzymatickou aktivitu enzymu. Díky tomuto intronu pak již není detekována aktivita v buňkách bakterií *Agrobacterium*, z toho důvodu, že prokaryotické buňky (bakterie),

nemají mechanismus vystřížení intronů eukaryotických buněk (Vancanneyt et al., 1990).

Výhody GUS (Falciatore, 2002):

- Aktivní endogenní enzym GUS chybí v mnoha organismech. V nižších i vyšších rostlinách, ve většině bakterií, řasách, houbách a mnoha druzích hmyzu je ve velké míře nebo zcela nepřítomen.
- $\beta$ -glukuronidáza katalyzuje hydrolýzu mnoha substrátů, které jsou komerčně dodávány, a je možné aktivitu měřit fluorometricky, histochemicky a spektrofotometricky.
- $\beta$ -glukuronidáza je velmi stabilní enzym, je odolný vůči detergentům, a je aktivní v širokém rozmezí pH a je rezistentní vůči tepelné inaktivaci.
- Enzym GUS toleruje fúze na N-konci, které většinou nemívají vliv na změnu jeho aktivity, GUS prochází přes membrány a díky modifikacím na amino-konci, může být GUS lokalizována v chloroplastech, mitochondriích, nebo endoplazmatickém retikulu.
- Bylo vytvořeno mnoho vektorů s GUS genem, které jsou komerčně dodávány.

## 2.4. 1. Metody detekce $\beta$ -glukuronidázy

Aktivitu enzymu GUS je možné detekovat *in vitro* i *in situ*. Technikou *in vitro* se zjišťuje obsah GUS kvantitativně, ale bez její známé lokalizace. Naopak metody používané *in situ* umožňují enzym lokalizovat, ale bez kvantitativního výsledku. K detekci  $\beta$ -glukuronidázy se využívá substrát  $\beta$ -D-glukuronid, který je katalyticky hydrolyzován GUS a touto reakcí se uvolňuje primární produkt. Tento produkt je následně detekován přímo nebo po určité přeměně následující v dalších reakcích (Vitha, 1995).

*In vitro* lze  $\beta$ -glukuronidázu velmi snadno detekovat třemi způsoby a to –

fluorometricky, histochemicky a spektrofotometricky (Jefferson et al., 1987). Fluorometrické metody se využívá ke stanovení aktivity GUS (Ogras a Gözükmizi, 1999). Histochemické analýzy se používají k odhalení lokalizace genové aktivity v buňce a pletiv transformovaných rostlin (Jefferson et al., 1987). Spektrofotometrické metody, se běžně využívají v laboratořích a slouží ke stanovení aktivity enzymu, které je vydáváno rozpadem nestabilního produktu, který vzniká hydrolyzou.

Metod, které se využívají k lokalizaci exprese *in situ* je několik, například metoda indigogenní či azokopulační. Při používání metod *in situ*, by měl být nejprve objekt fixován ve formaldehydu nebo glycerinaldehydu a měly by být vytvořeny řezy. Ale fixace se často vynechává a i vytvoření řezů není nezbytně nutné (Vitha, 1995).

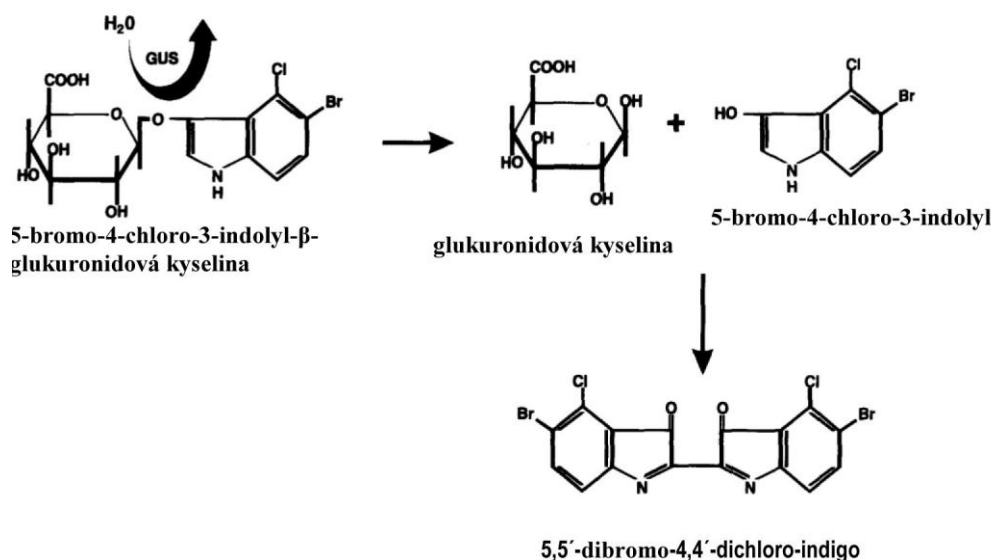
#### a. Histochemické stanovení (indigogenní metoda)

Při histochemickém stanovení se používá jako substrát 5-bromo-4chloro-3-indolylglukuronid (X-gluc), který dává vznik modrému zbarvení (Jefferson et al., 1987). Reakce probíhá ve dvou krocích. Nejdříve je substrát hydrolyzován na bezbarvý primární produkt, který difunduje z místa svého vzniku dále do okolí. Tento primární produkt je dále oxidován a dimerizován na modrý nerozpustný produkt 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo (viz obr. 2). Aby bylo docíleno rychlejšího vzniku konečného produktu, přidávají se do barvicího pufru kyanoželezitan a<sup>o</sup>kyanoželeznatan draselný. Zároveň tyto látky omezují difúzi primárního produktu a<sup>o</sup>tím získáme přesnější lokalizaci proteinu, ale jejich nevýhodou je, že také inhibují aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy (Gartland et al., 1995). Proto musí být u každého testovaného vzorku stanovena optimální koncentrace kyanoželezitanu a kyanoželeznatanu draselného v závislosti na intenzitě zbarvení a přesnosti lokalizace (Blažíčková, 2010). Objekty se mohou barvit živé nebo mírně fixované. Fixace ovšem snižuje aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy, proto je často vynechávána. Barvicí pufr obsahuje Na-fosfátový pufr, kyanoželezitan draselný, kyanoželeznatan draselný, X-gluc a detergent. Pro lepší proniknutí barvicího roztoku do pletiv lze použít vakuovou pumpu a desikátor. Barvení probíhá při 37 °C (Vitha S., 1995). Aby bylo možné pozorovat modré zbarvení, musí být odstraněn chlorofyl a další pigmenty.

K tomuto kroku se používá 70 % etanol a k projasnění je využívána infiltrace glycerolu (Blažíčková, 2010).

Efektivita transformace je hlavním ukazatelem úspěšnosti transgenoz. U<sup>o</sup>regenerovaných rostlin je nutné určit počet pozitivních rostlin na úrovni DNA, RNA a proteinu tj. kolik z celkového počtu regenerovaných rostlin bylo úspěšně transformováno. Nejčastěji používanou metodou je<sup>o</sup>PCR.

**Obr. č. 2.** : Hydrolyza glukuronidu X-gluc (převzato od Blažíčková, 2010).



## 2.5. Bar gen

*Bar* gen je významný tím, že je schopen zajišťovat toleranci rostlin vůči herbicidu fosfotricinu. Byl naklonován z genomické DNA *Streptomyces hygroscopicus* (Murakami et al., 1986). *Bar*<sup>o</sup>gen byl izolován jako překrývající se fragment *Pst*I (1.7 kb, pBG3) nebo *Bam*HI (2.0<sup>o</sup>kb, pBG4). Pomocí vektoru pUC19 byl gen *bar* klonován v *E. coli* W3110iq (Norrander et al., 1983). DNA vložená v polylinkeru pUC19 může být transkribována (přepsána) z lac promotoru do vektoru. Probíhající transkripce v *E. coli* W3110iq z lac promotoru je přirozeně silně potlačena, ale lze ji iniciovat přidáním isopropylthiogalaktosidu (IPTG). Orientace genu byla indikována klonováním fragmentu *Bam*HI z originálního izolátu streptomycet, pBG4, v obou směrech od *Bam*HI z<sup>o</sup>pUC19 se vytváří pBG195

a°pBG196. Tento gen byl dále lokalizován v°*Streptomyces lividans*. Fragменты *Sau3aI* z inzertu pBG195 byly klonovány na místě *BamHI* do expresního vektoru pU680 (Hopwood et al., 1985). Plasmid pBG106, který zajišťuje rezistenci proti herbicidu Bialaphos (L-Alanyl-L-alanyl-fosfinotricin) obsahuje inzert *Sau3aI* dlouhý 620 bp. Fragment *Sau3aI* byl také klonován z pBG195 do místa *BamHI* z pUC19. Velikost genového produktu byla poprvé studována u streptomycet zkoumáním transkripčního a translačního systému (Thompson et al., 1984). Nukleotidová sekvence v pBG106 ukazuje, že produkt genu *bar* je opatřený pojistkou v rámu 24 kd C-terminálního fragmentu proteinu aminoglykosidfosfotransferasy (Thompson a°Gray, 1983). C-terminální fúze na genu *bar* zachovává enzymatickou aktivitu (Thomson et. al., 1987). *Bar* gen byl využit pro selekci potenciálních transformantů v systémech *in vitro* a *in vivo*, jakož i komerčně v GM řepce, kukuřici a dalších plodinách. K tomuto účelu je využíváno rezistence proti Bialaphos, který se velmi často používá v rostlinné molekulární biologii k selekci geneticky modifikovaných buněčných linií, které obsahují tento gen tolerance k herbicidu. V současnosti roste důležitost odolnosti Bialaphosu pro selekci kvasinek, které jsou běžně používané v potravinářství (Tan et al., 2006). V zemědělství způsobilo zavedení plodin odolných vůči herbicidům velký třesk. Selektivní herbicidy jsou ve vysoké poptávce. V současné době jsou pěstovány plodiny odolné vůči herbicidům a k ničení plevelů se používají širokospektrální herbicidy. Toto je za předpokladu, že polní plodiny jsou tak geneticky upraveny, že nesou ve svém genomu zabudovaný gen, který kóduje odolnost proti herbicidu či herbicidům. Tyto herbicidy by pak následně neměly poškodit úrodu. Široké spektrum herbicidů jako glyfozinát či glyfozát mají nízkou toxicitu a při opakovaných aplikacích na plevele nedochází ke vzniku rezistentních plevelů. Odolnost plodin proti širokospektrálním herbicidům tedy záleží na genech, které byly do genomu plodiny vloženy. Velmi často se jako vkládající gen do genomu plodin zajišťující rezistenci vkládá právě *bar* gen. Ten zajišťuje odolnost proti širokému spektru herbicidů, jako např. glufozinátu. V roce 2003, tvořily geneticky modifikované plodiny odolné vůči herbicidům 73% z celkového počtu používaných GM plodin. Nejčastěji pěstovanými plodinami, které nesoucí geny rezistence proti herbicidům jsou kukuřice, sója, bavlna, řepka, cukrová řepa a rýže (Mayer et al., 2004).

## 2.6. PCR – polymerázová řetězová reakce

Pro detekci vložených genů v transgenních rostlinách je používána polymerázová řetězová reakce (PCR). Technika je založena na principu replikace DNA. Před samotnou PCR je nutné provést izolaci DNA o dostatečné čistotě a koncentraci. Nízká koncentrace může negativně snižovat výsledek. Otcem PCR je Kary Mullis, který v roce 1983 přišel s nápadem replikovat specifický úsek opakovaně, aby získal více DNA. Tento konkrétní úsek DNA je ohraničen dvojicí primerů, pro každý řetězec DNA jeden, které se váží na 3' konce DNA. Dvoušroubovice DNA je nejprve denaturována na dvě jednořetězcové DNA. Na homologní místa v jednořetězcové formě nasedají primery a pomocí termostabilní polymerázy jsou prodlužovány. S každým proběhnutým cyklem se zdvojnásobí množství zájmové DNA. Ve výsledku tedy platí vzorec pro výpočet počtu replik  $2^n$ , kde  $n$  představuje počet cyklů PCR. Pro úspěšnou PCR je nutné správné složení reakční směsi. Ta má několik standardních a neměnných komponent. Směs musí obsahovat templátovou DNA, optimální množství je specifické pro každý organismus podle velikosti genomu. Čím menší genom, tím méně templátové DNA. Pro plazmidy je to 0,1 – 1 ng DNA, pro bakterie 1 – 10 ng DNA a pro lidskou DNA je to 100 – 500 ng. Další nedílnou součástí jsou zmiňované primery, jejichž struktura je poměrně jednoduchá. Jedná se o oligonukleotidy o délce 18 – 25 bp. Důležitou vlastností primerů je jejich specifita pro daný gen. Pokud by nebyly dostatečně specifické, mohly by vykazovat falešné výsledky. Tato specifita je dána jejich délkou a rovnoměrným zastoupením bazí. Nesmí být komplementární na 3' koncích, aby netvořily duplexy a jejich sekvence by měla být taková, aby netvořily sekundární struktury (vlásky). Nezbytnou součástí jsou 2'-deoxyribonukleosid-trifosfáty (dNTP), které spolu s  $Mg^{2+}$  z  $MgCl_2$  tvoří rozpustný komplex, jenž interaguje s polymerázou i s primery. dNTP slouží jako stavební prvky pro syntetizované nové řetězce. Posledním nezbytným komponentem je termostabilní polymeráza, jejíž termolabilita je nezbytnou nutností pro fungování PCR, protože k denuraci DNA se používá vysoká teplota v rozmezí 94 – 97°C. První termostabilní polymerázy byly získány z termofilních bakterií. Dnes je nejčastěji používána Taq polymeráza z *Thermus aquaticus*. Kromě těchto základních složek se do reakční směsi někdy přidávají další sloučeniny pro přesnější výsledek nebo zvláště obtížně aplikovatelné

oblasti. Mezi tyto sloučeniny patří formamid, DMSO, betain, spermidin, glycerol či polyethylenglykol. PCR lze rozdělit do několika jednotlivých kroků. Prvním krokem je denaturace templátové DNA, ta je při prvním cyklu relativně dlouhá 2 – 5 minut. Tato doba je nutná k úplné denaturaci DNA. Pro další cykly tato doba klesá na 15 – 60 sekund. Dalším krokem je navázání primerů, které probíhá při teplotách 40 až 65°C. Tato teplota je závislá na teplotě tání produktů a primerů a vypočítá se ze vzorce  $T_a = 0,7 \times T_m \text{ produktu} + 0,3 \times T_m \text{ primerů} - 25$ . Lze použít jednodušší formu  $T_a = T_m \text{ primeru} - 5$ . Pokud je teplota pro nasedání primeru nastavena chybně, může docházet k nespecifickému nasedání primeru na templátovou DNA. Elongační fáze (prodlužování primerů) probíhá při teplotě 68 – 72°C. Při této fázi dochází k replikaci DNA pomocí polymerázy. Různé polymerázy mají různou rychlost. Taq polymeráza má při těchto podmínkách rychlost 60 bazí za sekundu. Délka tohoto kroku je odvozena od délky žádaného produktu. Lze říci, že se počítá s jednou minutou na jednu kilobazi. Po tomto kroku se celý proces vrací na začátek k denaturaci DNA. Při posledním cyklu je nakonec zařazena tzv. exteční fáze, ta slouží k dokončení reakce a renaturaci DNA (Snustard a Simmons, 2009).

### 3. Materiál

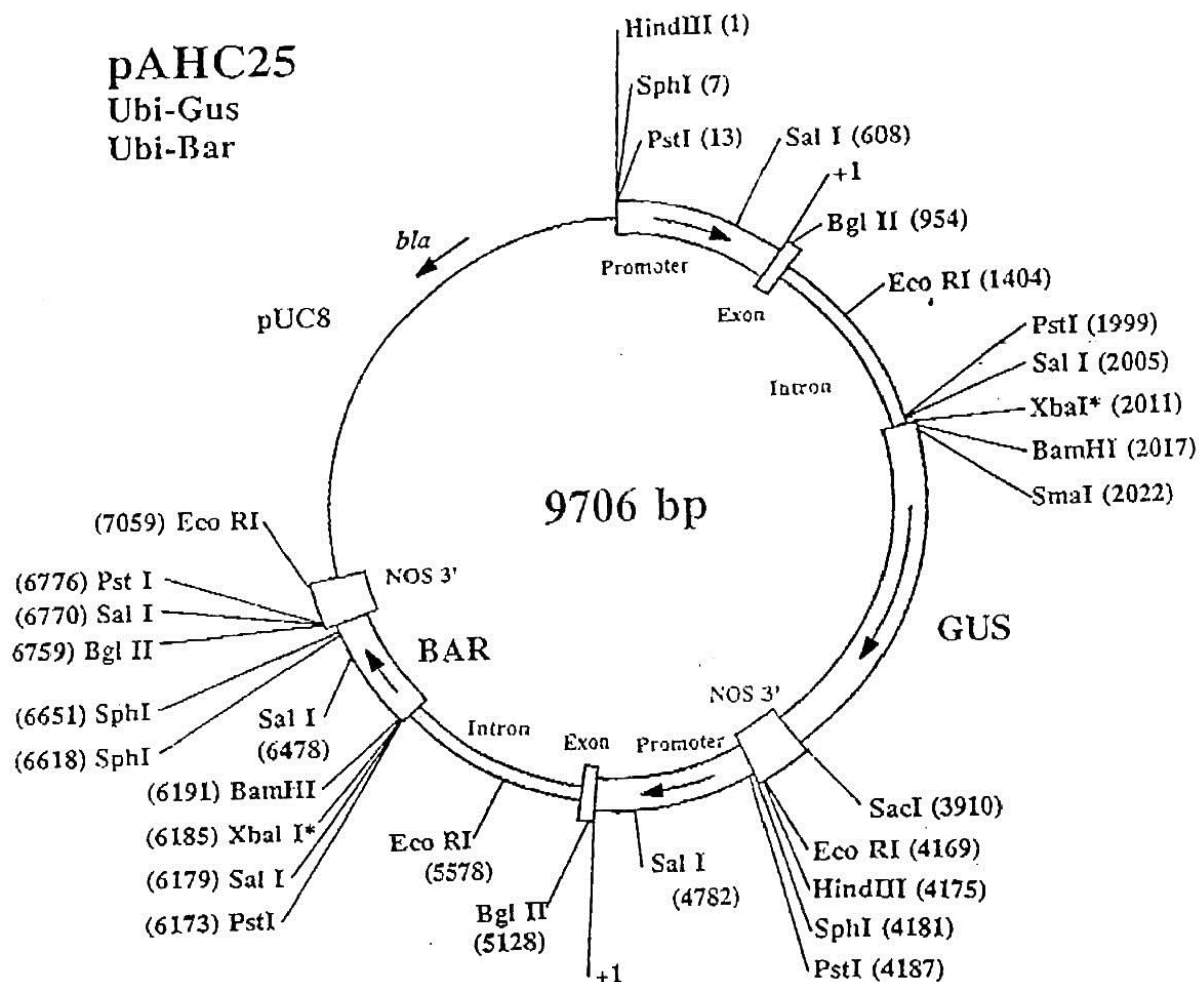
Jako výchozí rostlinný materiál pro ověření přítomnosti a exprese sekvencí selektovatelných a reportérových transgenů *bar* a *uidA* (*GUS*) v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene byly používány transgenní rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise a kontrolní (near-izo) linie výchozí odrůdy Golden Promise. Obilky byly poskytnuty ing. Ludmilou Ohnoutkovou, Ph.D. ze společného pracoviště Ústavu experimentální botaniky, v.v.i. AV ČR a katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého (UP) v Olomouci. V případě transgenního ječmene se jedná o dihaploidní linii ( $2n=14$ )  $T_3$  generace s označením LW-GP-BG-DH15, která byla odvozena z materiálu transformovaného metodou „particle bombardment“ s použitím DNA plazmidu pAHC25 (Christensen a Quail 1996). Vektorový plazmid pAHC25 (obr. 3) nese modelové geny pro selekci transgenních rostlin herbicidem fosfotricinem (*bar*) a markerový gen *uidA* pro bakteriální  $\beta$ -glukuronidázu (*GUS*), oba jsou řízeny promotory genu pro ubiquitin. Podle sdělení ing. Ohnoutkové byla přítomnost transgenů *bar* a *uidA* prokázána



polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a příslušnými testy (postřik rostlin herbicidem, histologický průkaz) v části populací předchozích generací  $T_0 - T_2$ . Na úrovni  $T_0$  generace byla na UP v Olomouci metodou androgeneze převedena genetická výbava transformovaného regeneranta na homozygotní úroveň. Rostliny byly poté předeny do půdy a dále pěstovány ve speciálním skleníku pro GMO. Autogamizací a výběrem pozitivních jedinců byly získávány jednotlivé linie následných generací, mezi nimi i naše pokusná linie DH15 (zkrácené označení). Celkem bylo z UP získáno 5 ks klasů s obilkami v různém stupni zralosti. Výsev semen byl proveden ve dvou termínech 25.2.2011 a 14.9.2011.

Obilky byly zprvu vysety na navlčený filtrační papír umístěný na Petriho misky. Po vyklíčení obilek byly klíčící zrna vyseta do půdy (25.2.2011 a 14.9.2011) a s květináči umístěna do speciálního skleníku pro GM rostliny, kde byly průběžně sledovány a opečovávány. V průběhu vegetačního období byly rostliny 3x hydroponicky přihnojeny hnojivem Wuxal a preventivně ošetřeny 6.5.2011 proti houbovým chorobám přípravkem Previcur 607 SL v dávce 3 ml/l při aplikaci na list a souběžně 1,5 ml/l do půdy. Po nárůstu dostatečného množství biomasy bylo provedeno odebrání vzorků (5.4.2011, 12.4.2011, 3.5. 2011, 10.6.2011, 3.7.2011, 26.7.2011, 15.8.2011, 13.9.2011, 7.11.2011, 5.12.2011, 30.1.2011, 13.2.2012, 20.2.2012) pro izolace DNA a RNA a také pro histochemické stanovení GUS. Poté, co rostliny ukončily vegetační období byly z nich odebrány zralé klásky a jednotlivé obilky opět vysety pro kontrolní detekce na úrovni  $T_4$  generace.

Obr. 3. Vektorový plazmid pAHC25



## 4. Metody

### 4.1. Sterilní práce

Sklo a veškeré nástroje byly sterilovány v autoklávu (120°C, 0,1 MPa, 30 min).

### 4.2. Izolace DNA pro PCR

Genomická DNA pro PCR byla izolována postupem, upraveným pro podmínky Laboratoře.

1. Navážíme asi 30mg rostlinky, umístíme do eppendorfky
2. Důkladně rozdrtíme tkáň sterilním homogenizátorkem na prášek

3. 700  $\mu$ l 2% CTAB
4. 14  $\mu$ l 1% merkaptoethanol
5. Vortex
6. Termomixer 63°C , 30min.
7. Centrifugace 13600 ot/min (rpm), 4min., supernatant do nových Epp.
8. 500  $\mu$ l chloroform : isoamylchloroform (24:1)
9. Dobře uzavřené zkumavky 2–3 ×převrátíme
10. Centrifugujeme při 14000 rpm, 6min.
11. Supernatant velmi opatrně odebrat (nenabrat nic z vrstvy pod) přepipetujeme do nových Epp.
12. 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu (z mrazáku)
13. 2x převrátíme a necháme stát v mrazáku v –20 °C 30 min

-----stop krok-možno nechat v mrazáku do rána-----

14. Centrifugace 14000 rpm, 3 min.
15. Supernatant vylejeme a převrácenou Epp. Vysušíme na filtračním papíru, aby kapka nestekla zpět (pozor na pelet!)
16. 300  $\mu$ l 96% vychlazeného ethanolu
17. Inkubujeme 15 min. Při 37 °C
18. Centrifugace 14000 rpm, 3 min.
19. Supernatant opatrně vylejeme
20. 200  $\mu$ l vychlazeného 70% ethanolu a necháme 5 min. stát
21. Centrifugace 14000 rpm, 3 min.
22. Supernatant vylejeme, Epp. vysušíme na filtračním papíru
23. Necháme oschnout pelet v otevřených Epp. (asi hodinu)
24. Vysušený pelet rozpustíme asi v 50  $\mu$ l redestilované vody

### 4.2.1. Optimalizace PCR

Pro identifikaci přítomnosti sekvencí selektovatelných a reportérových transgenů *bar* a *uidA* (*GUS*) rostlin byla použita metoda PCR. Reagencie pro PCR reakci byly připravovány pro objem 20  $\mu$ l. Dle tab.1.a tab.2. byl do eppendorfky připraven PCR mix pro daný počet vzorků. Pro přípravu vzorků na analýzu byl použit PPP Master Mix (Taq- Pyrole DNA Polymeráza PCR Master Mix s 5 mM  $MgCl_2$ ) (Top-Bio s.r.o., ČR). Tento Master Mix se dodává 2krát koncentrovaný: 150 mM Tris-HCL, pH 8,8, 40mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,02 % Tween 20, 5 mM  $MgCl_2$ , 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dTTP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dTTP, 100U/ml Taq Pyrole DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

#### Sekvence použitých primerů

Gus-f 5 'CAACGTCTGCTATCAGCGCGAAGT 3'

Gus-R 5 "TATCCGGTTCGTTGGCAATACTCC 3 '

Bar-f 5'GGTCTGCACCATCGTCAACC 3'

Bar-R 5'GTCATGCCAGTTCCTCCGTGCT 3'

**Tab.1.** Složení reakční směsi pro PCR při použití primerů GUS-f, GUS-R

Reagencie	Objem pro jednu reakci
dH <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l
Primer GUS	0,5 $\mu$ l
Primer GUS	0,5 $\mu$ l
PPP Master Mix	10 $\mu$ l
Celkový objem	19 $\mu$ l

**Tab.2.** Složení reakční směsy pro PCR při použití primerů BAR-f, BAR-R

Reagencie	Objem pro jednu reakci
dH <sub>2</sub> O	8 µl
Primer BAR	0,5 µl
Primer BAR	0,5 µl
PPP Master Mix	10 µl
Celkový objem	19 µl

Do každé eppendorfky bylo pipetováno 19 µl PCR mixu a 1µl templátové DNA.

1. Po napipetování vzorek zvortexujeme a krátce centrifugujeme
2. Následně provedeme kvantitativní PCR

PCR reakce probíhaly v termocykleru BIOER XP.

**Profil reakce pro reportérový transgen GUS:** cyklus probíhal 33×

1. počáteční denaturace:..... 94 °C.....5 min.
2. denaturace během cyklu: ..... 94 °C.....50 s
3. nasedání primerů: .....60 °C.....50 s
4. extenční fáze: .....72 °C.....55 s
5. konečná extenze: .....72 °C..... 5 min.
6. závěrečná fáze: ..... 4 °C.....∞

**Profil reakce pro selektovatelný transgen *bar*:** reakce probíhala se stejnými teplotami i časy jako předchozí pouze s tím rozdílem, že cyklus se opakoval 30×

#### **4.2.2. Elektroforéza**

Produkt PCR byl rozdělen a detekován elektroforetickou separací na 1,2 % agarózovém gelu. Gel byl připraven smícháním agarózy (Agarose electrophoresis grade, výrobce Invitrogen), 1xTBE (složení na objem 1l: 10,8 g TRIS, 5,5 ml kyseliny borité, 4 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) pufru a ethidium bromidu pro vizualizaci DNA.

### 4.2.3. Vizualizace vzorků

PCR produkty byly vizualizovány barvením agarózového gelu ethidium bromidem. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí digitálního fotoaparátu Canon Power Shot A640 a zpracovány digitální obrazovou analýzou v programu TotalLab (Nonlinear Dynamics, Velká Británie).

### 4.3. Izolace genomové DNA pro dot blot hybridizaci

Genomová DNA pro dot blot hybridizaci byla izolována pomocí stejného postupu jako izolace DNA pro PCR s rozdílem práce s vyšší navázkou.

1. Navážíme asi 900 mg rostlinky, rozdrtíme tloučkem v třecí misce
2. Vložíme do falkonky
3. 21 ml 2% CTAB
4. 0,42 ml 1% merkptoethanol
5. Vortex
6. Termomixer 63 °C, 30 min.
7. Centrifugace 8000 rpm, 8min., supernatant do nových falkonek
8. 15 ml chloroform: isoamylchloroform (24:1)
9. Dobře uzavřené falkonky 2–3 převrátíme
10. Centrifugujeme 7500 rpm, 12 min.
11. Supernatant velmi opatrně odebrat (nenabrat nic z vrstvy pod) přepipetujeme do nových falkonek
12. 15 ml vychlazeného isopropanolu (z mrazáku)
13. 2x převrátíme a necháme stát v mrazáku v -20 °C 30 min  
-----stop krok-možno nechat v mrazáku do rána-----
14. Centrifugace 7500 rpm, 12 min.
15. Supernatant vylejeme a převrácenou Epp. Vysušíme na filtračním papíru, aby kapka nestekla zpět (pozor na pelet!)

16. 9 ml 96% vychlazeného ethanolu
17. Inkubujeme 15 min. Při 37 °C
18. Centrifugace 8000 rpm, 8 min.
19. Supernatant opatrně vylejeme
20. 6 ml vychlazeného 70% ethanolu a necháme 5min. stát
21. Centrifugace 8000 rpm, 8 min.
22. Supernatant vylejeme, falkonky vysušíme na filtračním papíru
23. Necháme oschnout pelet v otevřených falkonkách (asi hodinu)
24. Vysušený pelet rozpustíme asi v 300 µl redestilované vody

#### **4.4. Izolace RNA**

RNA byla izolována pomocí kitu Tri Reagent RT- DNA.

1. Navážíme 50 mg rostlinného pletiva
2. Rozdrtíme ve třecích miskách za pomoci tekutého dusíku
3. Přidáme 1 ml roztoku Tri Reagent
4. Inkubovat 5 min při laboratorní teplotě
5. Centrifugace 12000 rpm, 10 min., 4 °C a přelít supernatant do nové eppendorfky
6. 200 µl chloroformu, promíchat a inkubovat v pokojové teplotě 15min.
7. Centrifugace 12000 rpm, 10 min., 4 °C, přepipetovat vodnou fázi do nové epp.
8. 500 µl isopropanolu, vortexovat 5-10 vteřin, inkubovat při pokojové teplotě 5-10 min.
9. Centrifugace 12000 rpm, 10 min., 4 °C a odstranit supernatant

10. k peletu přidat 1ml 70% ethanolu a centrifugovat při 7500 rpm, 5 min., 4 °C a vylít ethanol (dosušit na sterilním filtračním papíru). Promytí se doporučuje 2–3 opakovat.

11. RNA peledu dosušíme na vzduchu a rozpustíme ji v nuclease free vodě (30µl, 10 min.)

RNA můžeme krátkodobě uchovat v mrazáku při –80 °C nebo ihned pokračovat přepisem na cDNA.

#### **4.5. Druhý postup izolace RNA**

Na 1g listu se použije 10 ml Trisolu

- 30 mg listu homogenizovat za přítomnosti tekutého dusíku, přenést do eppendorfky a dat do mrazáku na –80 °C
- Vyndat na suchém ledu a ihned přidat 1 ml Trisolu (60 °C), vortexovat a nechat inkubovat 5 min při 60 °C
- Separace- centrifugace 10 min., 8000 rpm, 4 °C, přenést supernatant do nových eppendorfek
- 200 µl chloroformu, vortexovat, nechat inkubovat 2–3 min. při laboratorní teplotě a centrifugovat 10 min., 8000 rpm, 4 °C
- Přesrážení – přenést vodnou fázi do nové epp. A a přidat 0,5 objemu isopropanolu a 0,5 objemu 0,8 M citronanu sodného / 1,2 M NaCl, promíchat a nechat inkubovat při pokojové teplotě 10 min., centrifugace 14000 rpm, 10 min., 4 °C
- Promývání – 1ml 70% ethanolu, centrifugace 14000 rpm, 10min., 4 °C, slít, 5–10 min. nechat oschnout pelet
- Rozpustit pelet ve 20 µl DEPT-MQ



#### 4.5.1. Odstranění genomické DNA ze vzorků

Při izolaci RNA je častým problémem její kontaminace DNA, kterou je nutno odstranit. Návod na odstranění DNA ve vzorcích RNA na webových stránkách [www.fermentas.cz](http://www.fermentas.cz).

1. Připravit směs - pro jeden vzorek: 6  $\mu$ l RNA
  - 2  $\mu$ l 5xReakční pufr s HgCl<sub>2</sub>
  - 2  $\mu$ l voda (nuclease free)
  - 0,1  $\mu$ l Dnase I, Rnase free (100/ $\mu$ l)
2. Inkubovat při 37 °C, 30 min.
3. 1  $\mu$ l 50 mM EDTA pH 8.0 a inkubovat 10 min. při 65 °C
4. Pokračovat přepisem na cDNA

#### 4.5.2. Přepis RNA na cDNA

Pro přepis RNA na cDNA byl použit kit Reverse-Aid<sup>TM</sup> M-MuLv Reverse Transkriptase .

1. 1  $\mu$ l RNA smíchat s 1  $\mu$ l oligo dT primer a doplnit vodou do 12,5  $\mu$ l
2. Jemně promíchat a inkubovat při 65 °C, 5 min., následně schladit na ledu
3. Přidat: 5 $\times$  Reakční pufr.....4  $\mu$ l
  - RiboLockRNase inhibitor.....0,5  $\mu$ l
  - DNTP Mix.....2  $\mu$ l
  - Reverse Aid M-MuLv transcriptase.....1  $\mu$ l

---

Celkový objem 20  $\mu$ l

Promícháme špičkou a necháme inkubovat 60 min. V 42 °C. Reakci zastavíme zahřátím na 70 °C, 10 min. ( PCR blot).

4. cDNA můžeme uchovávat v –20 °C. Na PCR reakci se použije 1 µl cDNA do 20 µl reakce

#### **4.5.3. Elektroforéza**

Se vzorky přečištěné RNA a cDNA byla provedena PCR reakce dle stejného schématu jako u PCR reakce pro DNA. PCR produkt byl detekován elektroforetickou separací na 1,2 % agarózovém gelu. Gel byl připraven ve stejném složení jako při použití gelu pro separaci PCR produktů DNA.

#### **4.5.4. Vizualizace vzorků**

Stejný postup jako při vizualizaci vzorků předchozích PCR produktů.

### **4.6. Histochemické stanovení $\beta$ -glukuronidázy**

Působením  $\beta$ -glukuronidázy na substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid (X-Gluc) vzniká intenzivně modré zbarvení v místě enzymové aktivity.

Na 1 ml pufru 0,107 mg X-Gluc a 3,6 µl DMF ( dimethyl formamid )

X-Gluc: 8 mg X-Gluc rozpustit v 270 µl dimethyl formamidu a přidat 75 ml 50mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.0. Připravuje se vždy čerstvý.

1. Do každého oddílu mikroadestičky napipetujeme 5 ml X-Gluc a do roztoku vložíme čerstvě odstřiženou část listu
2. Destičku vložíme do exikátoru a pomocí vodní vývěvy infiltrujeme 15 min, zastrkáme vzorky na dno destičky, vyženeme vytvořené bubliny a

ještě jednou infiltrujeme 15 min. Poté necháme vzorky inkubovat 24 hod. při 37 °C

3. Zelené části listu se odbarví pomocí denaturovaného 96 % ethanolu

#### **4.7.Dot blot hybridizace**

Při dot blot hybridizaci byla použita genomová DNA izolovaná z 900 mg rostlinného materiálu, pro zajištění vysoké koncentrace DNA v roztoku. Hybridizace se skládá z několika kroků, které byly prováděny tři po sobě následující dny.

##### **1 den:**

##### **Příprava pufrů**

Pro hybridizaci byly připraveny následující druhy pufrů: hybridizační pufr, primární promývací pufr (Primary wash buffer), sekundární promývací pufr (Secondary wash buffer) a SSC pufr.

##### **Příprava sondy**

Byl zvolen vzorek DNA, se kterým byla provedena PCR, PCR produkt byl následně elektroforeticky rozdělen na 1,2% agarózovém gelu. Pro přípravu sondy byl použit kit QIAquick Gel Extraction kit (Quiagen, Spolková Republika Německo).

##### **2 a 3 den:**

Druhý den byl začat proces hybridizace a třetí den došlo k vyhodnocování výsledků.

## 5. Výsledky

Cílem této práce bylo ověřit pomocí molekulárních a histochemických charakteristik přítomnost sekvencí selektovatelných a reportérových transgenů *bar* a *uidA* (*GUS*) v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene. Zjistit podíl transgenních „PCR - pozitivních“ jedinců v populaci a pravidelnost přenosu transgenů do další generace. Dále vyhodnotit míru exprese v různých částech rostlin. Pro studii bylo celkem použito 12 geneticky modifikovaných rostlin ječmene a jedna negativní kontrola téhož druhu. Analýzám využívajícím metodu PCR předcházela výběr vhodných primerů, které poskytují kvalitní PCR produkt pro provedení restriční štěpení. Pro tuto studii byly vybrány primery Gus-f, Gus-R, Bar-f, Bar-R viz. tab. 3. Velikost amplifikovaného úseku DNA při požití primerů Gus-f, Gus-R je cca. 770 bp a při použití primerů Bar-f, Bar-R cca. 421 bp. Po proběhnutí PCR reakce s vybranými primery byla s produkty PCR reakce provedena detekce na 1,2% agarózovém gelu pomocí elektroforézy.

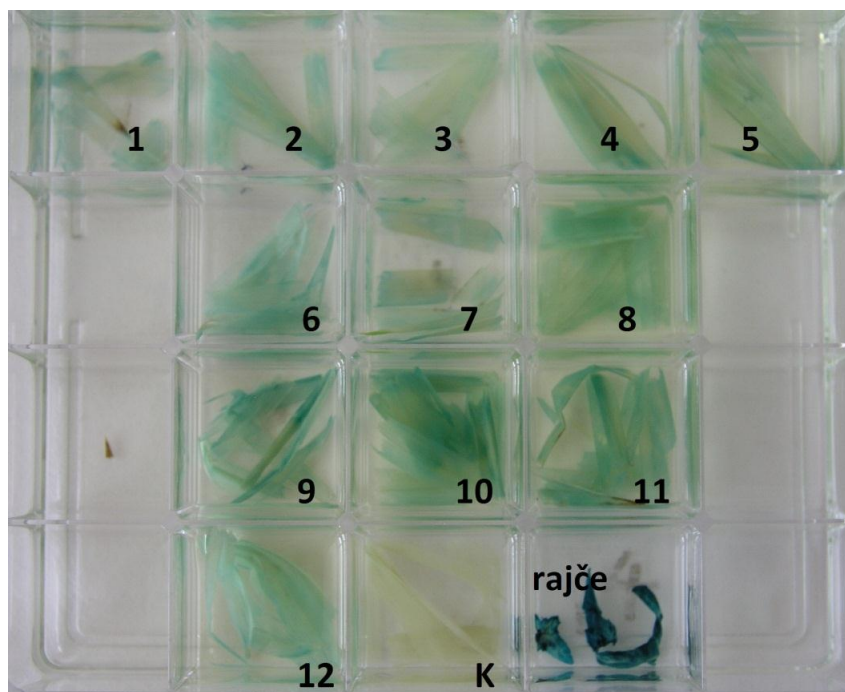
**Tab. 3.** Sekvence primerů (sekvence primerů pro gen *bar* a gen *gus* byly získány od ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. UP v Olomouci, které se dlouhodobě zabývá genetickými modifikacemi ječmene).

<i>BAR</i> gen (resistentní k herbicidům)	5'-GGT CTG CAC CAT CGT CAA CC- 3'
	5'- GTC ATG CCA GTT CCC GTG CT- 3'
<i>GUS</i> gen (reporterový gen)	5'-GGA ATT GAT CAG CGT TGG TG- 3'
	5'-TAG ATA TCA CAC TCT GTC TG- 3'

### 5.1. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy u rostlin T<sub>3</sub> generace

První známky exprese genu *uidA* byly detekovány ve všech rostlinách, již první den po vakuové infiltraci (s výjimkou negativní kontroly). Infiltrace byla prováděná v roztoku fosfátového pufru (50mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.0) s přidavkem X-Gluc a dimethylformamidu (přesné složení pufru viz. Metodika). Působením  $\beta$ -glukuronidázy na substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid (X-Gluc) vzniká intenzivně modré zbarvení v místě enzymové aktivity. Po vakuové infiltraci byly vzorky inkubovány 24 hod. při 37 °C a následně byly zelené části listů odbarvovány pomocí 96% ethanolu, který způsobí degradaci chlorofylu. Části rostlin, které se odbarvovaly v ethanolu byly každý den sledovány a vyhodnocení přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy se uskutečnilo vždy po téměř úplném odbarvení chlorofylu. Doba, za kterou se uskutečnilo odbarvení chlorofylu se lišila v jednotlivých částech listu a také záleželo na stáří listu. Mladší části listů se odbarvovaly rychleji, a zároveň se v mladších částech listu detekovalo intenzivnější modré zbarvení.

**Obr. 4. Detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u rostlin T<sub>3</sub> generace**



1-12: GMO rostliny  
K: negativní kontrola ječmene  
Rajče: pozitivní kontrola rajčete

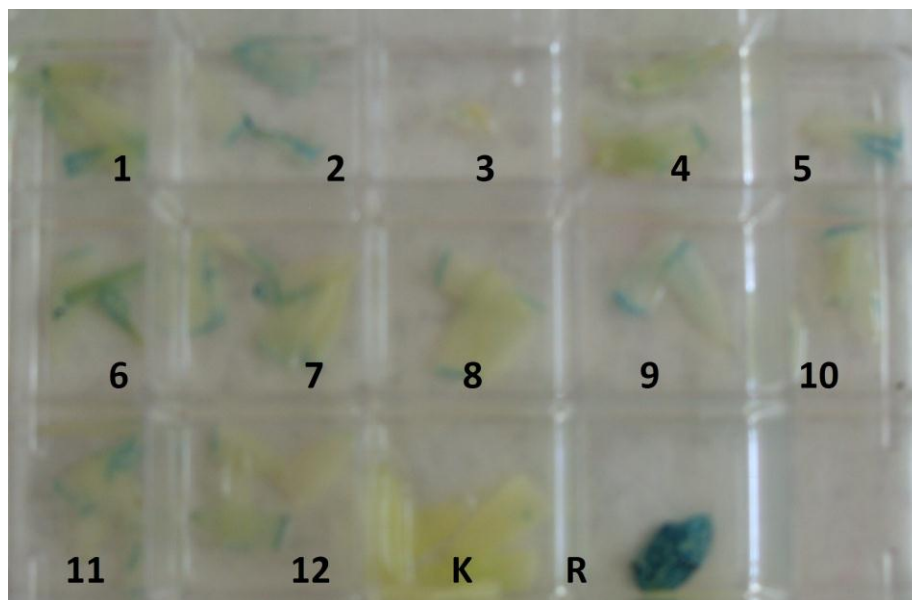
Pro histochemické stanovení  $\beta$ -glukuronidázy u rostlin  $T_3$  generace byly použity části listů geneticky modifikovaných rostlin ječmene, na obrázku označené čísly 1–12, negativní kontrola ječmene (cv. Golden Promise) je označena velkým písmenem K a pozitivní kontrola GM rajčete vykazující vysokou aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy. Vyhodnocování přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy bylo provedeno 3. den po odbarvování v ethanolu. Rostliny byly v té době ve stáří 2.měsíce. Při této analýze byly potvrzeny původní předpoklady o typu genetické modifikace, míře projevu *gus* genu a stupni genetické homogenity studovaného GM ječmene. Došlo k odlišení negativní kontroly a geneticky modifikovaných rostlin ječmene a pozitivní kontroly rajčete. Všechny geneticky modifikované rostliny 1–12 vykazovaly aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy vyznačující se typickým namodralým zabarvením, zabarvení se nacházelo ve všech listech na téměř celé jejich ploše. V tomto testu došlo k odlišení genotypů dle výše jejich aktivity. Rostliny 9, 10 a 11 vykazovaly vyšší aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy, než ostatní rostliny 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 12, přičemž rostliny 1 a 3 vykazovaly nejnižší aktivitu. Ve srovnání s GM rajčetem je míra exprese *gus* genu v rostlinách ječmene výrazně nižší. Negativní kontrola ječmene nevykazovala žádné známky modrého zabarvení, vyznačovala se jemně nažloutlou barvou. Toto zabarvení bylo způsobeno degradací chlorofylu působením ethanolu. K degradaci chlorofylu došlo u všech zkoumaných rostlin.

## **5.2. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy u rostlin $T_4$ generace**

Rostliny  $T_4$  generace byly získány po autogamii rostlin  $T_3$  generace. Následně byla z jednotlivých rostlin  $T_3$  generace odebrána zralá semena z klasů a pod stejnými čísly následně vyseta. Detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy rostlin  $T_4$  generace byla provedena stejným způsobem jako u rostlin  $T_3$  generace. Stejně jako u předchozí analýzy bylo provedeno vyhodnocování přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy 3. den po odbarvování v ethanolu a rostliny byly v té době ve stáří přibližně 2.měsíce. První známky exprese genu *uidA* byly detekovány ve všech rostlinách také již první den po vakuové infiltraci (s výjimkou negativní kontroly). Vakuová infiltrace byla prováděná v pufru o stejném složení jako při stanovení

přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy rostlin  $T_3$  generace a následně byly také odbarvovány 96% ethanolem.

**Obr. 5. Detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u rostlin  $T_4$  generace**



1-12: GMO rostliny  
K: negativní kontrola ječmene  
R: pozitivní kontrola

Pro histochemické stanovení enzymu  $\beta$ -glukuronidázy transgenů rostlin  $T_4$  generace byly použity části listů rostlin geneticky modifikovaných rostlin ječmene na obrázku označené čísly 1–12, negativní kontrola ječmene označená velkým písmenem K a pozitivní kontrola rajčete označená velkým písmenem R. Pozitivní kontrola rajčete vykazovala vysokou aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy. Stejně jako v předchozí generaci došlo k odlišení negativní kontroly, geneticky modifikovaných rostlin a pozitivní kontroly rajčete. V tomto testu došlo k odlišení genotypů dle výše jejich aktivity, avšak oproti rostlinám  $T_3$  generace byla zjištěna mnohem nižší aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy, protože rostliny  $T_4$  generace nevykazovaly takovou míru modrého zbarvení jako rostliny v  $T_3$  generaci. K zbarvení došlo sice u všech vzorků, ale pouze na řezných částech listů, nicméně aktivita  $\beta$ -glukuronidázy byla potvrzena. Rostlina č. 3 vykazovala nejnižší aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy oproti ostatním geneticky modifikovaným rostlinám ječmene. Pouze na řezné ploše asi o velikosti 1 mm byla vidět modrá skvrnka. Druhou nejnižší aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy vykazovala rostlina č. 12. U ostatních geneticky modifikovaných

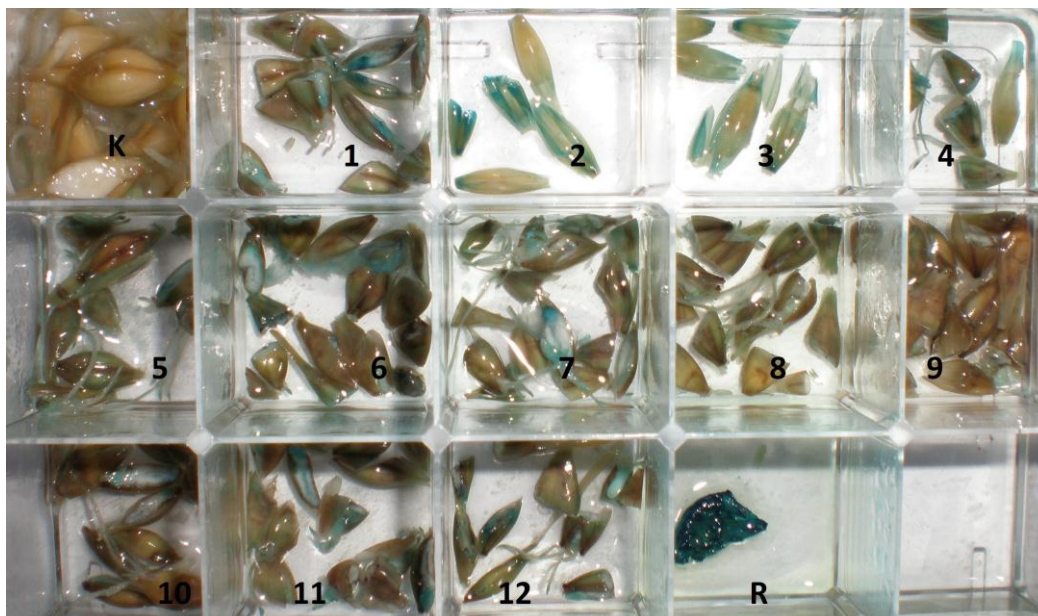
rostlin ječmene byla téměř stejná aktivita enzymu, která byla znárodněná modrým zbarvením na řezných plochách listů. Ve srovnání s<sup>o</sup>GM rajčetem je míra exprese GUS genu v T<sub>4</sub> rostlinách ječmene výrazně nižší, stejně jako u<sup>o</sup>rostlin T<sub>3</sub> generace. V souladu s původním předpokladem negativní kontrola postrádala přítomnost modrého zbarvení, tedy aktivitu β-glukuronidázy.

### **5.3. Histochemická lokalizace enzymu β-glukuronidázy v naklíčených semenech T<sub>4</sub> generace**

Semena T<sub>4</sub> generace geneticky modifikovaných rostlin ječmene byla získána po autogamii rostlin T<sub>3</sub> generace. Po uzrání semen v klasech byly klasy T<sub>3</sub> generace sklizeny. Pro detekci byla semena nechána 2 dny klíčit na filtračním papíru, vyklíčené kořínky byly dlouhé přibližně 0,5 cm. Naklíčená semena byla buď podélně nebo příčně rozříznuta a poté byla provedena detekce přítomnosti enzymu β-glukuronidázy, jejíž postup se shodoval s postupy při stanovování aktivity enzymu v listech. Pouze u semen variant č. 2 a 3 nedošlo k vyklíčení semen, což bylo nejspíše způsobeno nízkým obsahem zásobních živin v semenech. Po vakuové infiltraci byla semena inkubována 24hod. při 37°C a následně byl pufr vyměněn za ethanol a následovalo další sledování semen. Po umístění semen do ethanolu docházelo k přibývání intenzity a zvětšování plochy modrého zbarvení u semen každý den. První známky exprese genu *uidA* byly detekovány ve všech semenech geneticky modifikovaných semen ječmene, již první den po vakuové infiltraci, stejně jakou při detekci v listech T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace. U negativní kontroly k zbarvení nedošlo a nebyla tím tak potvrzena přítomnost enzymu β-glukuronidázy.



**Obr. 6. Detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v naklíčených semenech  $T_4$  generace**



K: negativní kontrola ječmene  
1-12: GMO zrna ječmene  
R: pozitivní kontrola ječmene

Pro histochemické stanovení  $\beta$ -glukuronidázy naklíčených semen  $T_4$  generace byla použita semena geneticky modifikovaných rostlin ječmene, na obrázku označené čísly 1–12, negativní kontrola ječmene je označena velkým písmenem K a pozitivní kontrola GM rajčete vykazující vysokou aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy, označená písmenem R. V tomto testu došlo k odlišení genotypů dle výše jejich aktivity. Semena 5, 8, 9 a 10 vykazovala mnohem nižší aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy, než ostatní geneticky modifikovaná semena ječmene. I přesto, že semena genotypů č. 2 a 3 nevyklíčila, vykazovala spolu se semeny č. 1 nejvyšší aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v porovnání s ostatními geneticky modifikovanými semeny ječmene. Ve srovnání s GM rajčetem je míra exprese GUS genu v semenech ječmene výrazně nižší.

#### **5.4. Histochemická detekce přítomnosti enzymu $\beta$ -glukuronidázy v různých částech rostlin $T_3$ a $T_4$ generace rostlin**

Přítomnost enzymu  $\beta$ -glukuronidázy se stanovovala ve třech různých částech rostlin  $T_3$  a  $T_4$  generace. Pro detekci byly z každé rostliny odebrány části listů pokaždé ze spodní, střední a horní části rostliny. Postup stanovení přítomnosti

enzymu  $\beta$ -glukuronidázy se shodoval s předchozími detekcemi. Vyhodnocování přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy bylo provedeno 4. den po odbarvování v ethanolu. Rostliny  $T_3$  i  $T_4$  generace byly v té době přibližně ve stáří 6 měsíců. Zabarvení listů bylo vyhodnocováno na základě pěti parametrů: Prvním hlediskem bylo, zda došlo k zabarvení celého listu, druhé se týkalo zabarvení řezných ploch (ŘP), třetí zabarvení poškozených částí (PČ, zde je poškozenými částmi míněno, poškození které vzniklo při snaze, aby části listů držely na dně destičky v průběhu infiltrace), čtvrté se týkalo zabarvení špičky listů a páté nepřítomnosti („nulového“) zabarvení. Histochemická detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v různých částech rostlin  $T_3$  a  $T_4$  generace rostlin byla v několika opakováních a souhrn výsledků je v tab. 3. V tabulce jsou shrnuty jednotlivé parametry. V tabulce jsou pod sebou seřazeny jednotlivé genotypy rostlin, kde jako první je část listu odebíraná ze spodní části rostliny, jako druhá je část listu odebíraná ze střední části rostliny a jako třetí je část listu odebíraná z horní části rostliny, obvykle z vrcholových listů. V tabulce je barevně odlišení rostlin  $T_3$  a  $T_4$  generace, rostliny  $T_3$  generace jsou v tabulce označeny modře a rostliny  $T_4$  generace jsou označeny černě.

**Tab. 3. Vyhodnocení parametrů při stanovení přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v různých částech rostlin  $T_3$  a  $T_4$  generace rostlin**

	Celé listy	ŘP	PČ	Špička listu	Bez zabarvení
<b><math>K_D, K_S, K_H</math></b>					<b>ano</b>
<b><math>1_D</math></b>		<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	
<b><math>1_S</math></b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>			
<b><math>1_H</math></b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	
<b><math>2_D</math></b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	
<b><math>2_S</math></b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	
<b><math>2_H</math></b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	

	Celé listy	ŘP	PČ	Špička listu	Bez zabarvení
4 <sub>D</sub>	ano	ano	ano	ano	
4 <sub>S</sub>	ano	ano	ano		
4 <sub>H</sub>	ano	ano	ano		
6 <sub>D</sub>		ano	ano	ano	
6 <sub>S</sub>	ano	ano	ano		
6 <sub>H</sub>	ano	ano	ano	ano	
7 <sub>D</sub>	ano	ano			
7 <sub>S</sub>	ano	ano	ano	ano	
7 <sub>H</sub>	ano	ano	ano	ano	
10 <sub>D</sub>	ano	ano			
10 <sub>S</sub>	ano	ano			
10 <sub>H</sub>	ano	ano	ano	ano	
12 <sub>D</sub>	ano	ano	ano	ano	
12 <sub>S</sub>	ano	ano	ano	ano	
12 <sub>H</sub>	ano	ano	ano		
K <sub>D</sub> , K <sub>S</sub> , K <sub>H</sub>					ano
1 <sub>D</sub>	ano	ano	ano		
1 <sub>S</sub>	ano	ano			
1 <sub>H</sub>	ano	ano	ano		
9 <sub>D</sub>	ano	ano		ano	

	Celé listy	ŘP	PČ	Špička listu	Bez zbarvení
9 <sub>S</sub>	ano	ano	ano		
9 <sub>H</sub>	ano	ano			
10 <sub>D</sub>	ano	ano	ano		
10 <sub>S</sub>	ano	ano	ano		
10 <sub>H</sub>	ano	ano	ano		

**K:** negativní kontrola T<sub>4</sub> generace

**1, 2, 4, 6, 7, 10, 12:** GMO rostliny T<sub>4</sub> generace

**K:** negativní kontrola T<sub>3</sub> generace

**1, 9, 10:** GMO rostliny T<sub>3</sub> generace

**Dolní index D:** D=dolní, části listů byli odebrány z dolní části rostliny

**Dolní index S:** S=střední, části listů byli odebrány ze střední části rostliny

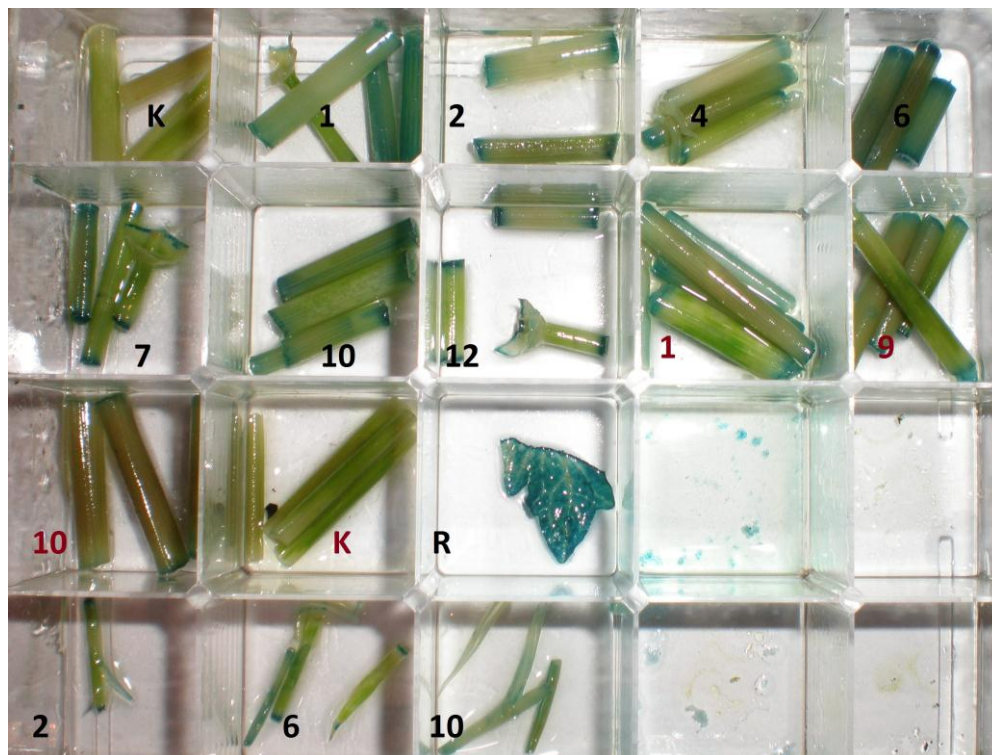
**Dolní index H:** H=horní, části listů byli odebrány z horní části rostliny

U negativních kontrol K<sub>D</sub>, K<sub>S</sub>, K<sub>H</sub> T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace nedošlo k zbarvení a nebyla tím tak potvrzena přítomnost enzymu β-glukuronidázy. U všech GM rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace byla prokázána přítomnost enzymu β-glukuronidázy. U všech rostlin došlo k zbarvení celých listů kromě dolních listů rostlin č. 1 a 6, což bylo nejspíše způsobeno tím, že tyto listy byly při odběru poměrně suché a mohlo dojít k dekadaci enzymu. U všech GM rostlin došlo k zbarvení řezných ploch a pokud došlo k poškození listů v průběhu infiltrace, tak bylo detekovatelné zbarvení i u všech rostlin s poškozenými částmi. K zbarvení špičky listu došlo také pokaždé pokud ji bylo možné z rostlin odebrat a následně analyzovat. Vzhledem k tomu, že aktivita enzymu β-glukuronidázy byla stanovena ve všech rostlinách T<sub>4</sub> generace lze usuzovat, že je velká stabilita přenosu exprese *gus* do dalších generací.

### **5.5. Histochemická detekce přítomnosti enzymu β-glukuronidázy ve stoncích T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace rostlin a v mladých odnožích T<sub>4</sub> generace rostlin**

Stonky pro stanovení přítomnosti enzymu β-glukuronidázy byly odebrány z vrcholových částí rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace, tak aby nedošlo k úhynu rostlin.

**Obr. 7. Detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy ve stoncích T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace rostlin a v mladých odnožích T<sub>4</sub> generace rostlin**



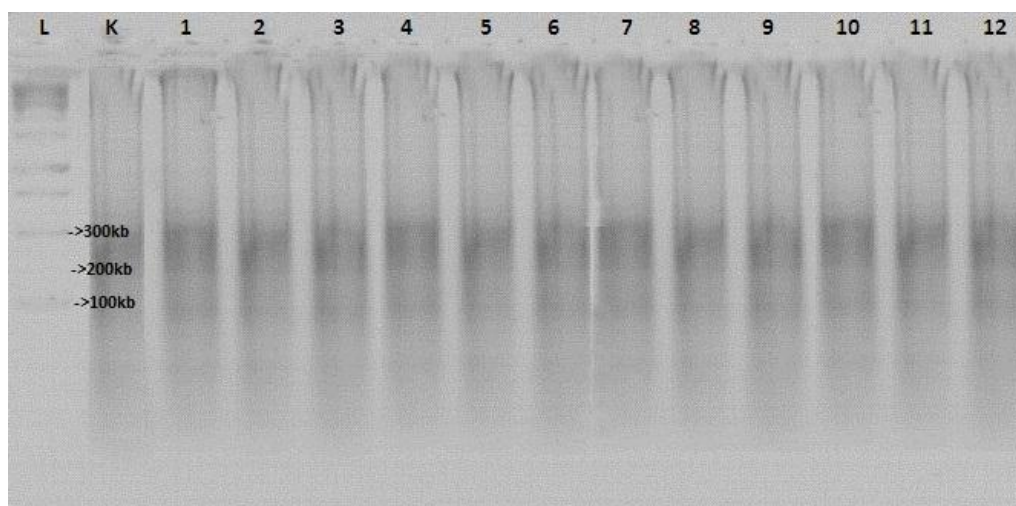
**K:** negativní kontrola T<sub>4</sub> generace  
**1, 2, 4, 6, 7, 10, 12:** stonky GMO rostlin T<sub>4</sub> generace  
**1, 9, 10:** stonky GMO rostlin T<sub>3</sub> generace  
**K:** negativní kontrola T<sub>3</sub> generace  
**R:** pozitivní kontrola rajčete  
**2, 6, 10:** mladé odnože T<sub>4</sub> generace

V tomto testu došlo k odlišení genotypů dle výše jejich aktivity. U<sup>o</sup>negativních kontrol T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace nedošlo k zabarvení a nebyla tím tak potvrzena přítomnost enzymu  $\beta$ -glukuronidázy. U všech GMO stonků T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub> generace byla potvrzena přítomnost enzymu  $\beta$ -glukuronidázy. Ve stoncích č. 1 a 6 T<sub>4</sub> generace byla potvrzena nejvyšší aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy, zatímco ve stoncích č. 10 T<sub>3</sub> generace byla potvrzena nejnižší aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy. To, že v rostlině č. 10 byla zjištěna nejnižší aktivita enzymu může být způsobeno tím, že rostliny T<sub>3</sub> generace byly při odběru vzorků výrazně strašší, než T<sub>4</sub> generace a lze předpokládat, že u T<sub>3</sub> generace již docházelo k rozpadu enzymu, proto klesala i jeho aktivita. Pozitivní kontrola rajčete vykazovala vysokou aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy. Postup metody i analýza probíhala podle stejných parametrů jako při předchozích histochemických detekcích přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy.

## 5.6. Vizualizace genomové DNA ječmene

Po izolaci DNA ze vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene č. 1-12 a<sup>o</sup>negativní kontroly (nemodifikovaného ječmene cv. Golden Promise) byla provedena kontrola správnosti postupu izolace na základě vizualizace nukleových kyselin na 1,2 % agarózovém gelu pomocí elektroforézy.

**Obr. 8. Vizualizace genomové DNA**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

K: negativní kontrola ječmene

1-12: DNA GMO rostlin

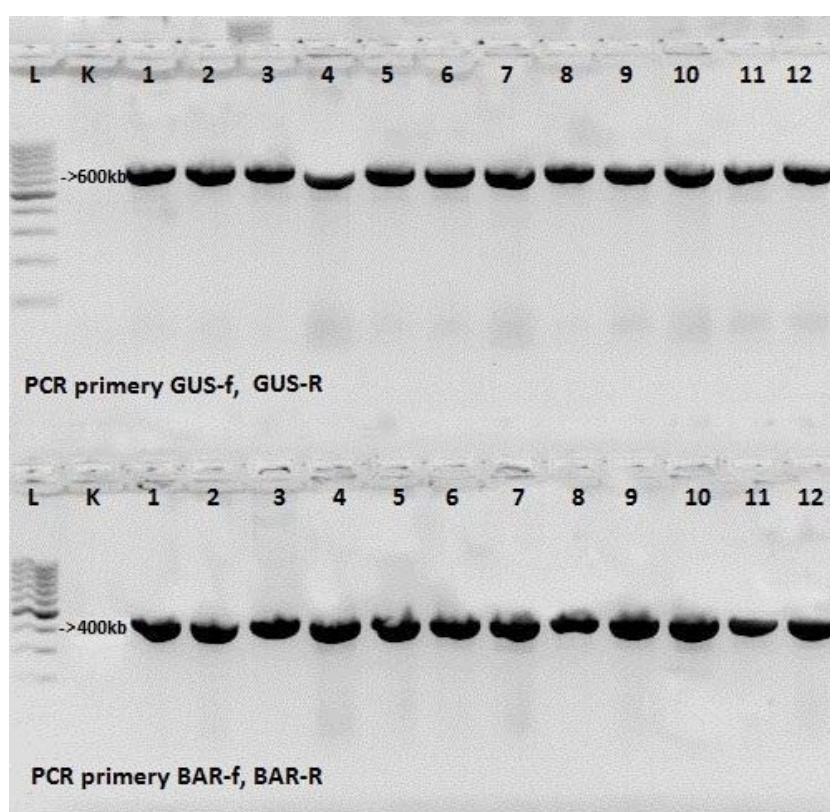
V prvním sloupci gelu je 100bp standard hmotnosti DNA (Lader), označen velkým písmenem L. V druhém sloupci je negativní kontrola označená velkým písmenem K. Ve<sup>o</sup>sloupcích 3-14 jsou vzorky geneticky modifikovaných rostlin ječmene 1–12. U<sup>o</sup>všech vzorků byla potvrzena přítomnost DNA a následně byly vzorky použity pro amplifikaci DNA pomocí PCR metody. U všech vzorků izolované genomové DNA se nacházel nejvyšší podíl genomové DNA ve velikostech 100 kb – 300 kb. Hmotnost převládajících DNA štěpů je přibližně 100 kb, 200 kb a<sup>o</sup>300 kb. Jak je patrné z obrázku č. 5., v pozicích štěpů menších, než 100 kb se nachází jen malá část z celkové DNA.



## 5.7. Detekce přítomnosti transgenů *gus* a *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>3</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA

Po izolaci DNA ze vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene T<sub>3</sub> generace (1-12) a<sup>o</sup> negativní kontroly byla provedena PCR reakce s primery Gus-f, Gus-R a Bar-f, Bar-R.

**Obr. 9. Detekce transgenů *gus* a *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>3</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA v porovnání s negativní kontrolou ječmene**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

K: negativní kontrola ječmene

1-12: DNA GMO rostlin (horní polovina primery GUS-f, GUS-R, dolní polovina BAR-f, BAR-R)

V horní polovině obrázku lze vidět produkty transgenů *gus* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>3</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA. Při metodě PCR byly použity primery Gus-f a Gus-R. V prvním sloupci je 100bp standard hmotnosti DNA (Lader), který je označen velkým písmenem L. Ve druhém sloupci je negativní kontrola, kde není viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *gus* (*uidA*) v rostlině. Ve sloupcích 3–14 jsou

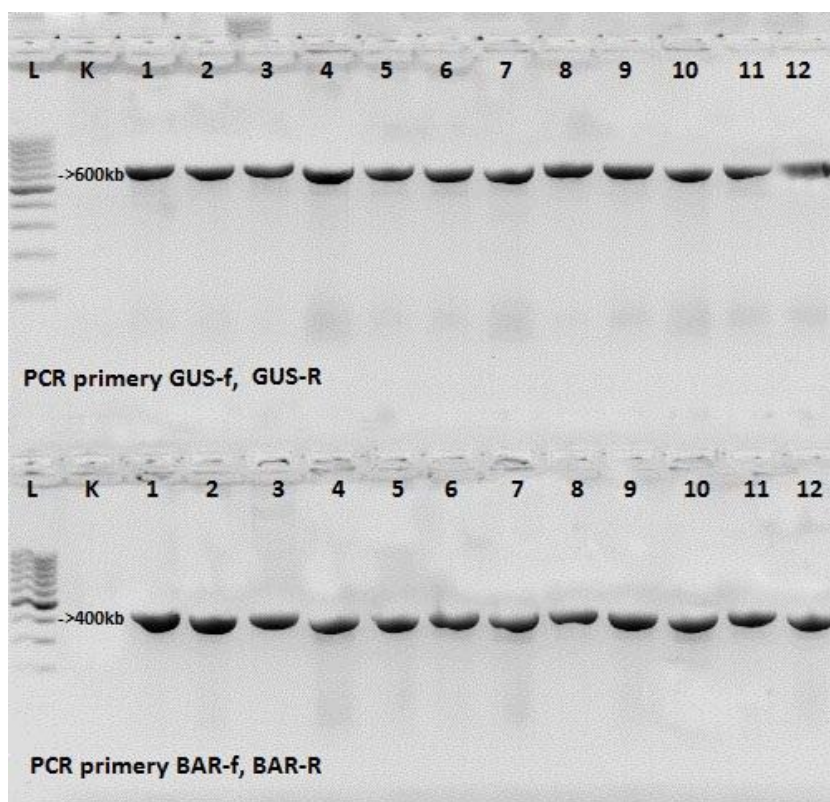
vzorky geneticky modifikovaných rostlin ječmene genotypů 1–12. U všech vzorků jsou viditelné proužky o velikosti cca 600 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Přítomnost těchto proužků potvrzuje přítomnost genu *uidA* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>3</sub> generace. V dolní polovině obrázku lze vidět produkty transgenů *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene a negativní kontroly ječmene T<sub>3</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA. Při metodě PCR byly použity primery Bar-f a Bar-R. V prvním sloupci je 100bp standard hmotnosti DNA (Lader), který je označen velkým písmenem L. Ve druhém sloupci je negativní kontrola, není viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *uidA* v nemodifikované rostlině. V řádcích 3–14 jsou vzorky geneticky modifikovaných rostlin ječmene 1–12. U všech vzorků jsou viditelné proužky o velikosti cca. 400 kb, tato velikost je znázorněna šipkou. Přítomnost těchto proužků potvrzuje přítomnost genu *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>3</sub> generace.

### **5.8. Detekce transgenů *gus* a *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>4</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA v porovnání s negativní kontrolou ječmene**

Po izolaci DNA ze vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene T<sub>4</sub> generace (1–12) a negativní kontroly byla provedena PCR reakce s primery Gus-f, Gus-R a Bar-f, Bar-R stejně jako u T<sub>3</sub> generace rostlin.



**Obr. 10. Detekce transgenů *gus* a *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>4</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA v porovnání s negativní kontrolou ječmene**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

K: negativní kontrola ječmene

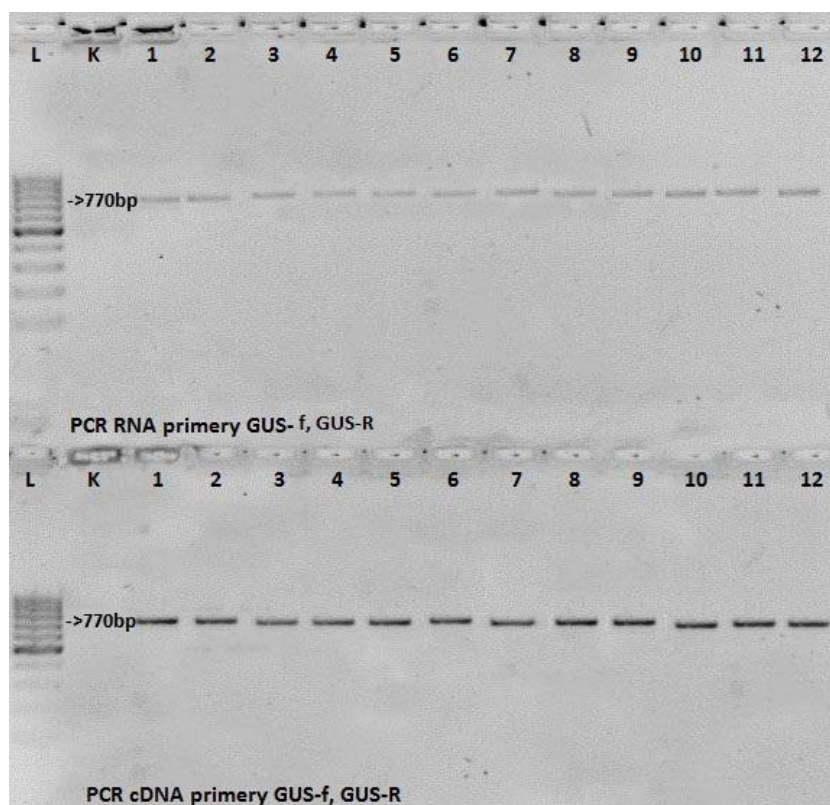
1-12: DNA GMO rostlin (horní polovina primery GUS-f, GUS-R, dolní polovina BAR-f, BAR-R)

Vzorky určené pro detekce transgenů *gus* a *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene a negativní kontroly ječmene T<sub>4</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA byly analyzovány stejným způsobem jako PCR produkty T<sub>3</sub> generace. Výsledky PCR produktů T<sub>4</sub> generace se shodují s výsledky PCR produktů T<sub>3</sub> generace, zároveň bylo použito stejné řazení vzorků na gelu jako u vzorků T<sub>3</sub> generace rostlin. U všech studovaných genotypů ječmene T<sub>4</sub> generace byla metodou PCR prokázána přítomnost jak transgenů *gus*, tak současně i *bar*.

## 5.9. Detekce mRNA specifických pro gen *gus* pomocí PCR u rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace

Pro izolaci RNA byly v této studii použity 2 různé postupy izolace. Izolovaná RNA byla následně přepsána do cDNA. První způsob izolace byl proveden pomocí kitu Tri Reagent RT-DNA, druhý způsob pomocí trizolu (viz. Materiál a metody).

**Obr. 11. Detekce mRNA specifických pro gen *gus* pomocí PCR u rostlin T<sub>3</sub> generace za použití kitu Tri Reagent RT-DNA**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

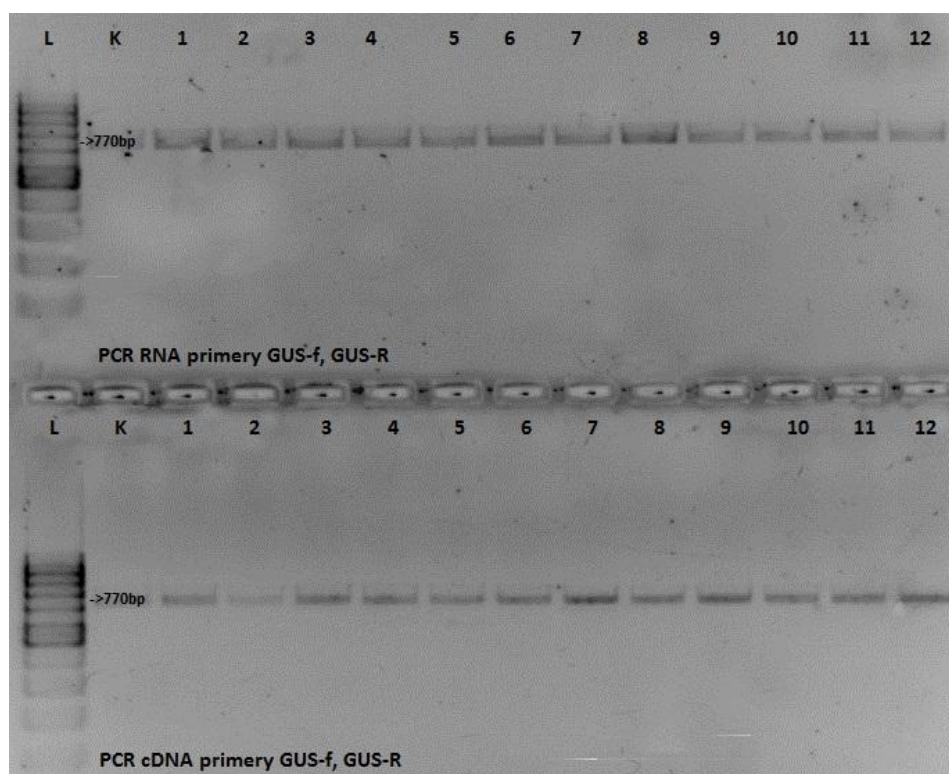
K: negativní kontrola ječmene

1-12: horní polovina RNA GMO rostlin (primery GUS-f, GUS-R), dolní polovina cDNA GMO rostlin ( primery GUS-f, GUS-R)

V horní polovině obrázku lze vidět PCR produkty transgenů *gus* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene a negativní kontroly ječmene T<sub>3</sub> generace na základě elektroforetického rozdělení PCR produktů izolované RNA. Při metodě PCR byly použity primery Gus-f a Gus-R. V prvním sloupci je 100bp standard hmotnosti DNA (Lader), který je označen velkým písmenem L. Ve druhém sloupci je negativní kontrola, není viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *uidA*

v° negativní rostlině. V řádcích 3–14 jsou vzorky geneticky modifikovaných rostlin ječmene 1–12. U všech vzorků jsou viditelné velmi slabé proužky naznačující velmi nízkou koncentraci DNA, proužky odpovídají velikosti produktů cca. 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Přítomnost těchto proužků znamená, že byla nedostatečně odstraněna genomická DNA ze°vzorků, která se vyizolovala současně s RNA a následně nebyla dostatečně odstraněna DNázou. V dolní polovině obrázku lze vidět produkty transgenů *gus* analyzované v°geneticky modifikovaných rostlinách ječmene a negativní kontrole ječmene T<sub>3</sub> generace na°základě vizualizace PCR produktů cDNA. Při metodě PCR byly použity primery Gus-f a°Gus-R. Produkty cDNA byly získány přepisem z RNA v průběhu metody PCR. V prvním sloupci je 100bp standard hmotnosti DNA (Lader), který je označen velkým písmenem L. Ve°druhém sloupci je negativní kontrola, není viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *bar (uidA)* v nemodifikované rostlině. V řádcích 3–14 jsou vzorky cDNA geneticky modifikovaných rostlin ječmene 1–12. U všech je viditelný proužek o velikosti cca 770 bp, tato velikost je°znázorněna šipkou. U vzorků 2, 3, 4, 6 a 7 je výrazně slabší proužek, než u ostatních vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene, což naznačuje, že obsah RNA v těchto vzorcích byl nižší, než u ostatních.

**Obr. 12. Detekce mRNA specifických pro geny *gus* pomocí PCR u rostlin T<sub>3</sub> generace za použití trisolu**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

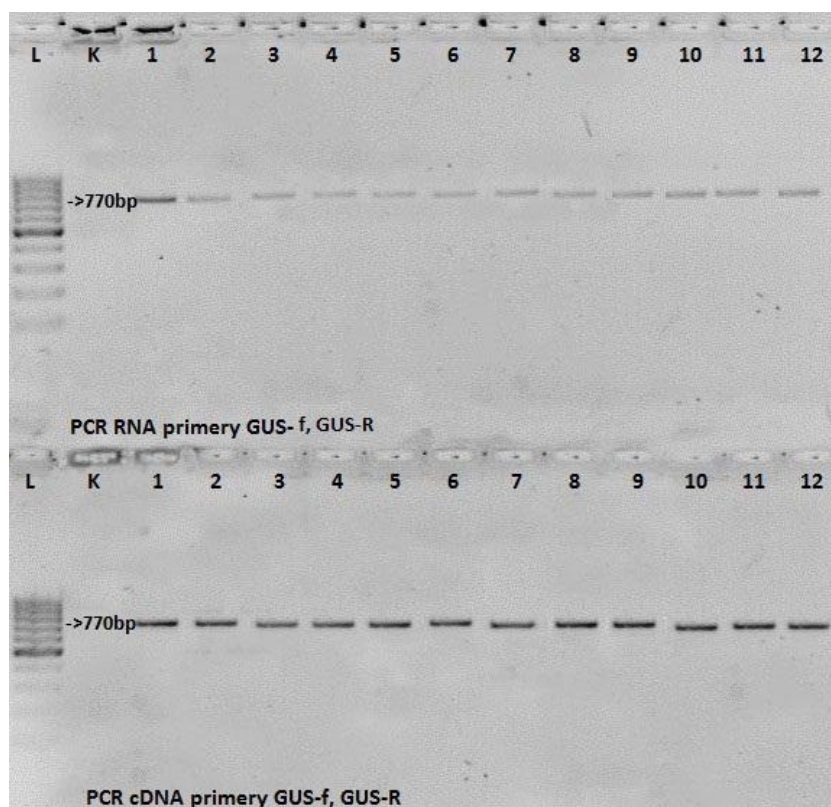
K: negativní kontrola ječmene

1-12: horní polovina RNA GMO rostlin (primery GUS-f, GUS-R), dolní polovina cDNA GMO rostlin ( primery GUS-f, GUS-R)

V horní polovině obrázku lze vidět produkty transgenů *gus* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene a negativní kontroly ječmene T<sub>3</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů RNA. Při metodě PCR byly použity primery Gus-f a Gus-R. V prvním sloupci je 100 bp standard hmotnosti DNA (Lader), který je označen velkým písmenem L. Ve druhém sloupci je negativní kontrola, není viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *uidA* v<sup>o</sup> negativní rostlině. V<sup>o</sup>řádcích 3–14 jsou vzorky geneticky modifikovaných rostlin ječmene 1–12. U všech vzorků v<sup>o</sup>řádcích 3–14 jsou viditelné velmi slabé proužky naznačující velmi nízkou koncentraci DNA, proužky mají velikost cca 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Přítomnost těchto proužků znamená, že byla nedostatečně odstraněna genomická DNA ze vzorků, která se vyizolovala současně s RNA. V<sup>o</sup> dolní polovině obrázku lze vidět produkty transgenů *gus* v<sup>o</sup> geneticky

modifikovaných rostlinách ječmene a negativní kontroly ječmene T<sub>3</sub> generace na<sup>o</sup> základě vizualizace PCR produktů cDNA. Při metodě PCR byly použity primery Gus-f a<sup>o</sup>Gus-R. Produkty cDNA byly získány přepisem z RNA v průběhu metody PCR. V prvním sloupci je 100 bp standard hmotnosti DNA (Lader), který je označen velkým písmenem L. Ve druhém sloupci je negativní kontrola, není viditelný žádný proužek svědčící o<sup>o</sup>přítomnosti genu *uidA* v negativní rostlině. V řádcích 3–14 jsou vzorky cDNA geneticky modifikovaných rostlin ječmene 1–12. U všech rostlin v řádcích 3–14 je viditelný proužek o velikosti cca 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. U vzorku 2 je výrazně slabší proužek, než u ostatních vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene, což naznačuje, že obsah cDNA v tomto vzorku byl nižší, než u ostatních.

**Obr. 13. Detekce mRNA specifických pro geny *gus* pomocí RT-PCR u rostlin T<sub>4</sub> generace za použití kitu Tri Reagent RT- DNA**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

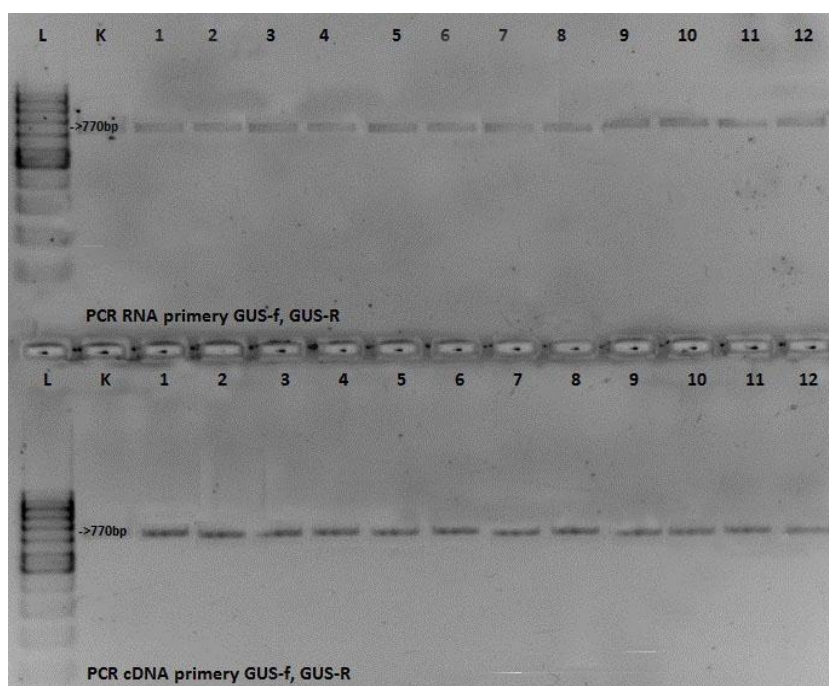
K: negativní kontrola ječmene

1-12: horní polovina RNA GMO rostlin (primery GUS-f, GUS-R), dolní polovina cDNA GMO rostlin ( primery GUS-f, GUS-R)



Rozmístění vzorků T<sub>4</sub> generace na gelu a použití metody je stejné jako u obr. 8. (vzorků T<sub>3</sub> generace). V horní polovině obrázku není u negativní kontroly viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *uidA* v negativní rostlině. U všech vzorků RNA v řádcích 3–14 jsou viditelné velmi slabé proužky naznačující velmi nízkou koncentraci DNA. Vzorek č. 1 má nepatrně výraznější proužek, než ostatní vzorky 2–14, což je nejspíše způsobeno vyšší koncentrací kontaminující DNA ve vzorku RNA, která byla nedostatečně odstraněna při přečišťování RNA od DNA. Proužky mají velikost cca 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Přítomnost těchto proužků znamená, že byla nedostatečně odstraněna genomická DNA ze vzorků, která se vyzolovala současně s RNA a následně byla nedostatečně odstraněna DNázou. Rozmístění vzorků v dolní polovině je shodné s rozmístěním vzorků v horní polovině obrázku pouze s tím rozdílem, že ve vzorcích 3–4 není RNA, ale cDNA. Produkty cDNA byly získány přepisem z RNA v průběhu metody PCR. U všech rostlin v řádcích 3–14 je viditelný proužek o velikosti cca 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Ve vzorcích 2–7 jsou slabší proužky, než u ostatních vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene, což naznačuje, že obsah cDNA v těchto vzorcích byla nižší, než u ostatních.

**Obr. 14. Detekce mRNA specifických pro geny *gus* pomocí PCR u rostlin T<sub>4</sub> generace za použití trisolu**



L: 100bp standard hmotnosti DNA (Lader)

K: negativní kontrola ječmene

1-12: horní polovina RNA GMO rostlin (primery GUS-f, GUS-R), dolní polovina cDNA GMO rostlin ( primery GUS-f, GUS-R)

Rozmístění vzorků T<sub>4</sub> generace na gelu a použití metody je stejné jako u obr. 9. (vzorků T<sub>3</sub> generace). V horní polovině obrázku není u negativní kontroly viditelný žádný proužek svědčící o přítomnosti genu *uidA* v negativní rostlině. U všech vzorků v řádcích 3–14 jsou viditelné velmi slabé proužky, avšak svou intenzitou jsou zanedbatelné. Proužky mají velikost cca 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Rozmístění vzorků v dolní polovině je shodné s rozmístěním vzorků v horní polovině obrázku pouze s tím rozdílem, že ve vzorcích 3–14 není RNA, ale cDNA. Produkty cDNA byly získány přepisem z RNA v průběhu metody PCR. U všech rostlin v řádcích 3–14 je viditelný proužek o velikosti cca 770 bp, tato velikost je znázorněna šipkou. Ve vzorku č. 12 je nepatrně slabší proužek, než u ostatních vzorků geneticky modifikovaných rostlin ječmene, což naznačuje, že obsah cDNA v tomto vzorku byla nižší, než u ostatních.

## 5. 10. Dot blot hybridizace

Z důvodu metodické chyby nebyl získán pozitivní výsledek z dot blot hybridizace.

## 6. Diskuze

Transformace rostlin přináší řadu výhod, ale také nabízí nové možnosti studia transgenní exprese. V současnosti je zjevná snaha získat polní plodiny, které díky vloženým genům nesou určitou výhodu pro pěstitele i spotřebitele (Mollier et al., 1995). Při všech transformačních metodách dojde k začlenění inzertu do genomu pouze u části rostlin. Proto je nutné selektovat rostliny, u kterých k transformaci došlo. Přítomnost inzertu se v selektovaných rostlinách obvykle potvrzuje pomocí PCR. Pomocí PCR lze snadno a rychle zjistit, jestli rostlina obsahuje inzert nebo ne. Pro účely PCR stačí malé množství DNA, proto k její izolaci stačí malé množství rostlinného materiálu (Blažíčková, 2010). Podmínky PCR se podařilo optimalizovat,

aby ji bylo možné použít při skríninku transformantů. Pro PCR byla DNA ječmene izolována metodou podle Edwards et al., 1991 a ta byla upravena pro podmínky laboratoře. Tato metoda umožňuje rychlou izolaci DNA, ale za cenu její nižší čistoty. Pro PCR je však její kvalita obvykle dostatečná. Během skríninku rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace byla u všech předpokládaných transformantů potvrzena přítomnost inzertu. Nebyly odhaleny žádné rostliny bez inzerce, které by metodou PCR poskytovaly falešně pozitivní výsledky. Pomocí PCR lze zjistit zda rostlina obsahuje inzert, avšak neposkytuje informaci o tom, kolik kopií inzertu se začlenilo. Počet a uspořádání T-DNA může mít vliv na expresi transgenů. Transformace pomocí *A. tumefaciens* vede k začlenění menšího počtu kopií než přímé metody transformace a bývá méně často spojena s komplexními přestavbami transgenů. Poměrně často však dochází k začlenění několika kopií T-DNA do jednoho lokusu jako přímé nebo obrácené repetice. Tyto lokusy bývají často spojeny s umlčováním exprese. Stabilně exprimované lokusy obvykle obsahují jednoduše uspořádané T-DNA ohraničené alespoň na jedné straně rostlinnou DNA (Iglesias et al, 1997). Proto bývají obvykle vyhledávány transformanti s jednou začleněnou kopií T-DNA, u kterých je nejvíce pravděpodobné, že budou transgen stabilně exprimovat po několik generací.

Ve studiích transientní exprese genu pro  $\beta$ -glukuronidázu byla aktivita příslušného enzymu detekována nejčastěji pouze po několik málo dní po bakteriální infekci. Např. Abel a Theologis (1994) obdrželi nejvyšší hodnoty stupně transientní exprese v protoplastové kultuře rostliny *A. thaliana* transformovaných bakteriemi *A. tumefaciens* po 18–48 hodinách. Na druhé straně Mathur et al. (1995) publikovali zjištění, že maximální hladinu  $\beta$ -glukuronidázové aktivity naměřili u kultury protoplastů *A. thaliana* po 72 hodinách. Yoshioka et al. (1996) kokultivovali rostlinné buňky s bakteriemi *A. tumefaciens* a po 36-48 hodinách od začátku kokultivace zaznamenali expresi genu pro  $\beta$ -glukuronidázu. Ačkoliv by měl 35S promotor zajišťovat vysokou úroveň exprese ve většině rostlinných pletiv, k expresi docházelo pouze v některých pletivech a úroveň exprese nebyla příliš vysoká oproti modelovým rostlinám. Detekcí přítomnosti transgenů *gus* a *bar* v geneticky modifikovaných rostlinách ječmene T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub> generace na základě vizualizace PCR produktů DNA byla ve všech vzorcích geneticky modifikovaných rostlin zjištěna přítomnost těchto transgenů. Detekcí mRNA specifických pro gen *gus* pomocí PCR



u rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace byla opět u všech transgenních rostlin potvrzena přítomnost reportérového genu *gus*. GUS umožňuje analyzovat expresi na úrovni pletiv, buněk i na subcelulární úrovni. Na subcelulární úrovni se používá hlavně pro sledování jaderné lokalizace proteinu (Ono et al., 2003). Přítomnost  $\beta$ -glukuronidázy se stanovovala histochemicky. Pro studium lokalizace exprese se používal jako substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glukuronid (X-gluc), který vede ke vzniku modrého zbarvení. Reakce probíhá ve dvou krocích. Nejdříve je substrát hydrolyzován na bezbarvý rozpustný primární produkt. Ten je dále oxidován a dimerizován na modrý nerozpustný produkt 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Aby bylo dosaženo viditelného zbarvení bylo nutné provádět barvení minimálně přes noc.  $\beta$ -glukuronidázovou aktivitu jsem v GM rostlinách ječmene poprvé detekovala 2. den po vakuové infiltraci, avšak významné je na mé práci to, že jsem detekovala hladinu GUS aktivity po mnohem delší časový úsek (minimálně dva týdny). Výsledky mých stanovení aktivity  $\beta$ -glukuronidázy v transformovaných rostlinách ječmene se tedy tímto zjištěním částečně liší od výsledků prováděných na jiných objektech. Potvrzení přítomnosti transgenů *gus* a *bar* ve všech transgenních rostlinách se shoduje s výsledky ing. Ohnoutkové z UP Olomouc (nepublikované výsledky). U rostlin, kde byla molekulárně prokázána přítomnost genu *uidA*, byl i výsledek histologického testu pozitivní. Výsledky histologických analýz prováděných na UP v Olomouci nasvědčují tomu, že aktivita enzymu, soudě dle intenzity zbarvení produktu, je v ječmeni obecně nižší než u modelových rostlin tabáku a huseníčku. Mnou hodnocené geneticky modifikované rostliny též vykazovaly nižší aktivitu enzymu než modelová rostlina rajčete. Při histochemické detekci v částech listů geneticky modifikovaných rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace byla shodně zjištěna nejnižší aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u vzorku č. 3. U T<sub>3</sub> generace vykazoval druhou nejnižší aktivitu vzorek č. 1 a u T<sub>4</sub> generace vzorek č. 12. U T<sub>3</sub> generace byla nejvyšší aktivita enzymu ve vzorcích č. 9, 10 a 11. Vzorky listů T<sub>4</sub> generace kromě č. 3 a 12 vykazovaly téměř stejnou aktivitu enzymu. Při histochemické detekci u různých částí listů (listy ze spodní, střední a horní části rostliny) geneticky modifikovaných rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace se u geneticky modifikovaných rostlin projevilo zbarvení na řezných plochách, špičkách listů (pokud je ještě bylo možné z rostliny odebrat), zároveň pokud došlo při vakuové infiltraci k poškození listů, tak byly arteficiálně zbarveny všechny poškozené části. U všech vzorků T<sub>3</sub> generace došlo k zbarvení

celých listů a u vzorků T<sub>4</sub> generace nedošlo k zabarvení pouze u vzorků 1<sub>D</sub> a 6<sub>D</sub>, tedy u listů ze spodních částí rostlin. Při detekci enzymu ve stoncích ječmene T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace byla opět prokázána aktivita enzymu ve všech studovaných GM rostlinách. Ve stoncích rostlin č. 1 a 6 T<sub>4</sub> generace byla zjištěna nejvyšší aktivita enzymu β-glukuronidázy, zatímco ve stoncích rostliny č. 10 T<sub>3</sub> generace byla zjištěna nejnižší aktivita enzymu β-glukuronidázy. To, že v rostlině č. 10 byla zjištěna nejnižší aktivita enzymu může být způsobeno tím, že rostliny T<sub>3</sub> generace byly při odběru vzorků výrazně starší, než T<sub>4</sub> generace a v listech již nejspíše docházelo k rozpadu enzymu, proto klesla i jeho aktivita. Přítomnost enzymu u mladých odnoží byla zkoumána pouze u vzorků č. 2, 6 a 10 T<sub>4</sub> generace. U vzorku č. 10 došlo k zabarvení celé odnože. U vzorku č. 6 také došlo u jedné části odnože k celkovému zabarvení. Řezné plochy vzorků 2 a 6 byly intenzivněji zabarvené, než u vzorku 10, což by nasvědčovalo o vyšší aktivitě enzymu v odnožích rostlin č. 2 a 6. Při histochemické detekci enzymu u semen geneticky modifikovaných rostlin T<sub>4</sub> generace byla nejnižší aktivita enzymu prokázána u vzorků č. 5, 8, 9 a 10 a nejvyšší u vzorků 1, 2 a 3. U naklíčených semen byla prokázána aktivita již mladých kořenech. U semen ale bylo obtížné dosáhnout projasnění, přestože právě pro ně a také pro další hůře projasnitelné části rostlin byla publikována metoda, která se skládá z extrakce v ethanolu a kyselině octové a projasnění v Hoyerově médiu (Stageland a Salehian, 2002). V mých pokusech prováděných na GM rostlinách ječmene T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generací byla při histochemické detekci GUS aktivita prokázána již druhý den po vakuové infiltraci, obvykle se v následujícím období 1–2 dní zintenzívnila a následně zůstala výrazná minimálně 2 týdny po vakuové infiltraci. Zhruba po dvou týdnech po vakuové infiltraci docházelo k postupnému snižování intenzity zabarvení produktu reakce.

Odell et al. (1985) prokázali vysokou aktivitu enzymu β-glukuronidázy v kořenech stoncích a listech transformovaných rostlin tabáku. Tyto poznatky se shodují s mými výsledky, protože na mnou sledovaných GM rostlinách ječmene byla také prokázána aktivita enzymu β-glukuronidázy v kořenech, stoncích i listech. Preťová et al. (2001) uvádí, že nejmladší listy tabáku vykazují až 5-krát vyšší aktivitu enzymu β-glukuronidázy, než starší listy, avšak β-glukuronidáza je velmi stabilní protein, který je schopen se hromadit v průběhu času (Gallagher, 1992). Co

se týče mých výsledků, tak u částí rostlin, které viditelně vykazovaly vyšší obsah chlorofylu a byly tedy mladší, vykazovaly také vyšší aktivitu enzymu. Histochemické detekce byly prováděny v několika opakováních a při detekci u T<sub>4</sub> generace došlo zprvu k zabarvení pouze řezných ploch a při následném opakování detekce zhruba po dvou měsících došlo k zabarvení nejen řezných ploch, ale i celých částí listů, což by mohlo odpovídat tvrzení autora Gallagher (1992), že dochází k hromadění proteinu GUS v průběhu času. Ve studii Preťové et al. (2001) zjistili, že silná GUS exprese v mladších listech souvisí s přítomností silného promotoru (CaMV 35S), který je aktivní ve větším počtu buněk. Bekkaoui et al. (1990) ve své studii uvádí, že s intenzitou exprese GUS genu souvisí typ promotoru i buněk.

Vzhledem k tomu, že transgeny *bar* i *gus* byly pozitivně detekovány v T<sub>3</sub> i v následné T<sub>4</sub> generaci lze soudit, že u mnou zkoumaných GM rostlin ječmene je velká stabilita přenosu transgenů do dalších generací. Následně by se naskýkala možnost ověřování přenosů transgenů i do dalších generací (T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub>) pro potvrzení stability přenosu. V této studii je zajímavé zjištění, že v rostlinách docházelo k rozdílnému projevu aktivity enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v různých částech rostlin s ohledem na stáří rostliny. Této skutečnosti nasvědčují výsledky histochemické detekce přítomnosti enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u rostlin T<sub>4</sub> generace ve stáří přibližně dvou měsíců, kdy v přítomnosti substrátu X-Gluc došlo k zabarvení pouze řezných ploch částí listů a při následném opakování této detekce zhruba o dva měsíce později došlo k zabarvení celých ploch listů, což by znamenalo, že v listovém pletivu dochází k hromadění enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v průběhu času. Hromaděním enzymu v průběhu času by se vysvětlovalo i zjištění, že u vzorků odpovídajících si linií T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace nedošlo ke shodě projevu s ohledem na jejich nejvyšší a nejnižší aktivita enzymu. Úroveň aktivity enzymu se u jednotlivých rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace neudrží a to z toho důvodu, že u rostlin T<sub>3</sub> generace byl projev nejvyšší aktivity u rostlin č. 9, 10 a 11 a nejnižší u č. 1 a 3. Zatímco u T<sub>4</sub> generace byla nejvyšší aktivita enzymu u vzorků č. 1, 2 a 3 a nejnižší u č. 5, 8, 9 a 10. To, že u vzorků č. 1 a 3 došlo v následné generaci k výraznějšímu projevu aktivity enzymu by mohlo být způsobeno tím, že stabilita exprese *gus* je hodně ovlivněna vnějšími podmínkami nebo je u ječmene relativně tak nízká, že její i mírné kolísání může způsobit to, že nemusí být histochemicky vždy detekovatelná. Obě varianty vysvětlení by mohly

podporovat i publikované výsledky Lazarowa a Lüttickeho (2009). Lazarow a Lütticke (2009) se zabývali expresí genu *gus* v různých částech rostlin GM rostlin ječmene a podařilo se jim detekovat enzym  $\beta$ -glukuronidázu v mladých listech, nodech, semenech, nezralých zrnech, ve zralých a opylených květech. Detekce prováděli u 141 rostlin a u 72 (51 %) se jim podařilo prokázat přítomnost enzymu. Celkově jejich *gus* exprese u ječmene byla nižší, než u modelových rostlin *A. thaliana* a rýže. Dědičnost nebyla určena. Nejvyšší frekvence *gus* exprese byla v zrnech (26 %) a v sazenicích (24 %). Amoah et al. (2000) se zabývali ověřením správného začlenění genetické transformace genu *gus* do genomu pšenice pomocí bakterie rodu *A. tumefaciens*. Úspěšnou transformaci se jim podařilo potvrdit histochemickou detekcí podle Jeffersona 1987, a tím potvrdili, že bakterie *A. tumefaciens* je vhodná i pro přenos genů do obilovin.

## 7. Závěr

Tato diplomová práce se zabývá stanovením přítomnosti selektovatelných a<sup>o</sup>reportérových transgenů *bar* a *uidA* (*GUS*) v rostlinách jarního ječmene odrůdy Golden Promise a kontrolní (near-izo) linie výchozí odrůdy Golden Promise.

Byly optimalizovány podmínky PCR pro skrínink transformantů na základě detekce přítomnosti genu *bar* pro rezistenci proti Bialaphos, který se velmi často používá v transgenozí rostlin k selekci geneticky modifikovaných buněčných linií a<sup>o</sup>rostlin, které obsahují tento gen tolerance k herbicidu. Gen *bar* zajišťuje odolnost proti širokému spektru herbicidů, jako např. glufosinátu. Optimalizace byla zároveň provedena pro detekci přítomnosti reportérového genu *gus*, který slouží pro ověření zda došlo k přenosu inzertu do hostitelských buněk. Danou metodou molekulární biologie byla prokázána u všech geneticky modifikovaných rostlin T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> generace přítomnost obou transgenů, což potvrzuje pravidelnost jejich přenosu do vyšších generací.

Dalším cílem bylo histochemickou detekcí ověřit přítomnost reportérového genu pro enzym  $\beta$ -glukuronidázu v různých částech transgenních rostlin. Ve všech testovaných částech byla prokázána přítomnost enzymu. Testovanými částmi rostlin byli naklíčená semena, mladé odnože, stonky a části listů z různých částí rostlin.

## 8. Seznam použité literatury

Abel, S., Theologis, A. (1994): Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. - *Plant J.* 5: 421-427.

Amoah et al. (2000): Factors influencing Agrobacterium – mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue, *Journal of Experimental Botany*, s. 1135-1142.

Barakat, A., Carels, N., Bernardi, G. (1999): The distribution of genes in the genomes of Gramineae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6857-6861.

Bekkaoui et al. (1990): The effects of promoter on transient expression in conifer cell lines, *Theor. Appl. Genet.* 79: 353-359.

Bennett, M.D., Leitch, I.J. (2005): Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Ann. Bot.* 95: 45-90.

Bennett, M.D., Smith, L.B. (1976): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 274: 227-274.

Blažičková, J. (2010): Optimalizace systému pro studium proteinových komplexů. Diplomová práce, PřF MU. Brno, 52 s.

Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jørgensen, R. B., Linde-Laursen, I., (1991): An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. *Systematic and Ecogeographic Studies of Crop Genepools*. 7, IBPGR.

Brich-Petresen, H., Olesen, A., Rasmussen, S.K., Holm, P.B. (2000): Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Mol. Breed.* 6: 195-206.

Citovsky, V., Warnick, D., Zambryski, P. (1994): Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3210-321.

- Dai, F., Qiu, L., Ye, L., Wu, D., Zhou, M., Zhang, G. (2011): Identification of a Phytase Gene in Barley (*Hordeum vulgare* L.). PLoS ONE 6(4): e18829. doi:10.1371/journal.pone.0018829.
- De Buck, S., Podevin, N., Nolf, J., Jacobs, A., Depicker, A. (2009): The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. Plant. J. 60 :134 – 145.
- De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. 16: 839-842.
- Douglas, C.J., Halperin, W., Nester, E.W. (1982): *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. J. Bacteriol. 152: 1265-1275
- Falciatore, A.; Formiggini, F.; Bowler Ch. (2002): Reporter genes in vivo imaging. In: Bowler Ch.; Gilmartin P.M. (eds.): Molecular Plant Biology. New York : Oxford University Press.
- Farre, G. et al.(2011): Nutritionally enhanced crops and food security: scientific achievements versus political expediency. Science Direct. 11: 245-251.
- Filichkin, S.A., Gelvin, S.B. (1993): Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1,D2 endonuclease. Mol. Microbiol. 8: 915-926.
- Gallagher S. R. ed. (1992): GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. Academic Press, San Diego.
- Gartland, K. M. A.; Phillips, J. P.; Vitha, S.; Beneš K. (1995): Fluorometric GUS analysis for transformed plant material. Methods Mol Biol., 44, 195–199.
- Gelvin, S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiol Mol Biol Rev. 67: 16–37.
- Hansen G., Wright M.S. (1999): Recent advances in transformation of plants. Trends Plant Sci. 4: 226—231.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H. (1985): Genetic Manipulation of *Streptomyces*. The John Innes Foundation, Norwich.
- Harwood W.A., Bilham L.J., Travella S., Salvo-Garrido H., Snape J.W. (2004): Fluorescence in situ hybridization to localise transgenes in plant chromosomes. Methods in Molecular Biology: Transgenic Plants (Ed. L Pena) Vol. 286, 327-340.

- Chilton, M.D., Drummond, M. J., 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* 77: 263-271.
- Christie P.J. (2004): Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694: 219–23.
- Christensen A.H a Quail P.H. (1996): Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 213-218.
- Iglesias, V.A., Moscone, E.A., Papp, I., Neuhuber, F., Michalowski, S., Phelan, T., Spiker, S., Matzke, M., Matzke, A.J. (1997). Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* 9:1251-1264.
- Jefferson, R. A.; Burgess, S. M.; Hirsh D. (1986):  $\beta$ -glukuronidase from *Escherichia coli* as a gene - fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 8447–8451.
- Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A.; Bevan, M. W. (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 3901-3907.
- Jones H. D., Shewry P. R. (2009): *Methods in Biotechnology. Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterisation.* Series Ed. J Walker. Humana Press, Totowa NJ.
- Kim, S., Veena, Gelvin, S.B. (2007): Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *Plant. J.* 51: 779–791.
- Kleinhofs, A., Graner, A. (2001): An integrated map of the barley genome. *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants* 6: 187-200.
- Konietzny, U., Greiner, R. (2002): Molecular and catalytic properties of phytase-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 791-812.
- Lazarow K., Lütticke S. (2009): An Ac/Ds-mediated gene trap system for functional genomics in barley, *BMC Genomics* 1-13.
- Ledoux, L., Huart, R. (1968): Fate of exogenous bacterial deoxyribonucleic acids in barley seedlings. 243-262.
- Ledoux, L., R. Huart, and M. Jacobs. (1974): DNA-mediated correction of thiaminless *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 249:17–21
- Liu, C.N., Li, X.-Q., Gelvin, S. B. (1992): Multiple copies of virG enhance the transient transformation of celery, carrot, and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 20: 1071-1087.

- Manninen, O. (2000): Genetic mapping of traits important in barley breeding. Academic Disertation University of Helsinki, Department of Biosciences.
- Mathur, J., Koncz, C., Szabados, L. (1995). A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. Plant Cell Rep. 14: 221-226.
- Mayer, J., Sharples, J., Nottenburg, C. (2004): Resistance to Phosphinothricin., s. 1-44.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G.P., Schell, J., Hohn, B., Koncz, C. (1991): T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. EMBO J. 10: 697-704
- Mollier, P., Montoro, P., Delarue, M., Bechtold, N., Bellini, C., Pelletier, G. (1995): Promotorless gusA expression in large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by the in planta infiltration method. - C. R. Acad. Sci. Paris 318: 465-474.
- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K. and Thompson, C.J. (1986): Mol. Gen. Genet., 205, 42-50.
- Mysore, K.S., Nam, J., Gelvin, S.B. (2000): An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:948-953.
- Norrander, J., Kempe, T., Messing, J. (1983): Gene 26: 101-106.
- Ogras, T. T., Gözükmizi, N. (1999): Expression and inheritance of GUS gene in transgenic tobacco plants. Tr. J. Bot., 23, 297-302.
- Ondřej, M.; Drobník J. (2002): Transgenoze rostlin: Academia, Praha.
- Ono, A., Kim, S.H., Walbot, V. (2003): Subcellular localization of MURA and MURB proteins encoded by the maize MuDR transposon. Plant Mol. Biol. 50:599-611.
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.-H. (1985): Nature 313: 810-812.
- Ovesná, J. (2005): Geneticky modifikované organismy a jejich možné uplatnění v rostlinné výrobě. s. 3-14.
- Pazour, G.J., Ta, C.N., Das, A. (1992): Constitutive mutations of *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional activator virG. J. Bacteriol. 174: 4169-4174.
- Pospíšilová, H. a I. Frébort. (2010): Genetické modifikace ječmene.
- Preťová et al. (2001): Biotechnology Letters 23: 555-558.



Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanissevich, S.D., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K.J., Tuvešson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmioli, N., Sjakste, T., Ganal, Powell M., Waugh, R. (2000): A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997-2005.

Snustad, D.P. a Simmons M.J. (2009): *Genetika*.

Stageland, B., Salehian, Z. (2002): An Improved Clearing Method for GUS Assay in Arabidopsis Endosperm and Seeds. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20:107–114.

Tan, S., Evans, R., Singh, B. (2006): Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicidetolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204.

Thompson, Ch. J. et al. (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 2519-2523.

Thompson, C.J., Gray, G.S. (1983): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5190-5194.

Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V. (2004): *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* 20: 375-383.

Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'Connor-Sanchez, A.; Willmitzer, L.; Rocha-Sosa, M. (1990): Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220: 245-250.

Vitha, S. (1995): Některé problémy studia exprese reportérového genu pro  $\beta$ -glukuronidázu (GUS) v transgenních rostlinách. Dizertační práce, BF JU, České Budějovice, s. 23.

Ward, E.R., Barnes, W. M. (1988): VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science* 242: 927-930.

Yoshioka, Y., Takahashi, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K., Koizumi, J., Kojima, M., Machida, Y. (1996): Transient gene expression in plant cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Application for the analysis of virulence loci. *Plant Cell Physiol.* 37: 782-789.

[www.fermentas.cz](http://www.fermentas.cz).