

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: B4131 Zemědělství  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie  
Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Analýza metabolických efektů transkripčních  
faktorů chmelu (*H. lupulus*) u heterologního  
systému *Petunia hybrida***

Autor: Vendula Moravcová  
Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.  
Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, duben 2013

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské – diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum 1. 4. 2013

Podpis studenta .....

## **Poděkování**

Děkuji oběma svým školitelům RNDr. Jaroslavu Matouškovi, CSc. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za vstřícný přístup a cenné připomínky při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře za přátelský přístup, trpělivost při mém zaučování a velikou ochotu, kterou projevili ve chvílích, kdy jsem potřebovala pomoc nebo radu. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za potřebnou podporu.

## Abstrakt

Transformace rostlin je dnes klíčovou metodou v oblasti biologie rostlin a rovněž se jedná o jedinečný praktický nástroj v zlepšování odrůd kulturních rostlin. Při této práci byla snaha získat transgenní rostliny *Petunia x hybrida* obsahující transgen nptII (gen pro kanamycinovou rezistenci) pomocí nepřímé transformace s využitím bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. V podmínkách *in vivo* byl ze semen vypěstován pokusný materiál v podobě rostlin *Petunia x hybrida* cv. *Andrea*. Pro pokusy byly použity tři různé konstrukty, a to *HLWD40 3278-80* a *HLbHLH 3577* a *HLbHLH 3677 GFP*. Z listů petúnií byly připraveny listové disky a byla provedena kokultivace na 1/2MS s bakteriemi nesoucími příslušné konstrukty. Kokultivace probíhala přes noc a následně byly přepasážovány na pevné regenerační medium. Z listových disků postupně vznikly kalusy (shluky buněk), na kterých regenerovaly nové rostliny. Na explantátech začaly během prvních 2-4 týdnů po transformaci vznikat kalusy a během dalšího týdne bylo možné odebrat první regeneranty. Na jeden explantát připadlo průměrně okolo 7 regenerantů, přičemž explantáty regenerované konstruktem *HLbHLH 3577* regenerovaly lépe než regeneranty transformované konstruktem *HLWD 40 3278-80*. Během transformace byly získány regeneranty. Pomocí „tissue“ PCR bylo zjištěno, že 15 rostlin nese gen pro kanamycinovou rezistenci. Účinnost transformace byla 3,75%. Úspěšná transformace by měla splňovat i podmínku, že transformované rostliny budou fertillní. Z tohoto důvodu byl udělán pokus křížení, kdy byly kříženy rostliny transformované *Pap1 1527/2* a *Pap1 1572/4* s rostlinami kříženými *HLWD 40 3278-80*. Na vyrostlých rostlinách byla provedena reakce PCR.

### Klíčová slova:

Transformace, *Petunia x hybrida*, *Agrobacterium tumefaciens*, PCR

## **Abstract**

Plant transformation is now a key research in plant biology, and also is a unique practical tool in the improvement of varieties of cultivated plants. The aim of this work was to obtain transgenic plants *Petunia x hybrida* containing transgene *nptII* (kanamycin resistance gene) using the indirect transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. In terms of *in-vivo* was grown from seeds experimental material in the form of plant *Petunia x hybrida* cv. *Andrea*. For the experiments three different constructs *HLWD40 3278-80* and *HLbHLH 3577* and *HLbHLH 3677 GFP* were used. The leaf explants from *Petunia* plants were prepared. Explants were transferred using tweezers into the crucible containing liquid ½ MS and prepared bacteria were added. Thus prepared explants remained in bacteria the next day, when they were transferred to the regenerating solid ground. The explants formed callus gradually (clusters of cells) which regenerate a new plant. Transformation should satisfy the condition that the transformed plants should be fertile. For this reason, an attempt was made crossing the transformed plants were crossed *Pap1 1527/2* and *Pap1 1572/4* with plants crossed *HLWD 40 3278-80*. The grown plants were analysed by a PCR reaction. The explants began during the first 2-4 weeks after transformation to form callus and during the next week to remove the first regenerants. At one exulant fell averaged around 7 regenerants and the explants regenerated by construct *HLbHLH 3577* regenerate better than regenerants transformed with construct *HLWD 40 3278-80*. During the transformation we obtained regenerants. With "tissue" PCR, it was found that 15 plants carried the gene for kanamycin resistance. Transformation efficiency was 3.75%.

### **Key words:**

Transformation, *Petunia x hybrida*, *Agrobacterium tumefaciens*, PCR

## OBSAH

1. Úvod .....	8
2. Literární rešerše .....	9
2.1. Bakterie indukující morfogenetické změny rostlin .....	9
2.1.1. Historie transformace rostlinných buněk pomocí bakterií rodu <i>Agrobacterium</i> .....	9
2.1.2. Rody bakterií využívaných pro morfogenetické změny rostlin.....	9
2.2. Přenos DNA z <i>Agrobacterium</i> do rostlinné buňky .....	10
2.3. Mechanismy a metody transformace .....	13
2.3.1. Tranzientní exprese .....	14
2.3.2. Transformace prostřednictvím bakterií <i>Agrobacterium</i> .....	14
2.3.2.1. Princip vektorů .....	15
2.3.2.2. Selektovatelné a reportérové transgeny .....	17
2.3.2.2.1. Selektovatelné transgeny.....	17
2.3.2.2.2. Reportérové transgeny .....	18
2.3.2.3. Transformace rostlinných pletiv .....	19
2.3.3. Přímá transformace .....	20
2.3.3.1. Transformace protoplastů.....	20
2.3.3.2. Transformace buněk a pletiv .....	20
2.3.4. Porovnání transformace přímé a nepřímé .....	21
2.4. Možnosti využití transformací rostlin .....	21
2.5. Zhodnocení současného stavu výzkumu <i>Humulus lupulus</i> L. z hlediska molekulární genetiky kodeterminace Lupulinu .....	23
3. Cíl bakalářské práce .....	26
4. Metodika.....	26
4.1. Materiál .....	26
4.1.1. Charakteristika rostliny <i>Petunia x hybrida</i> .....	26

4.1.2.	Použitý rostlinný materiál .....	27
4.1.3.	Charakteristika bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
4.1.4.	Plazmidový konstrukt .....	27
4.2.	Metody .....	28
4.2.1.	Příprava medií .....	28
4.2.2.	Použitá media .....	28
4.2.3.	Příprava bakterií .....	30
4.2.4.	Příprava explantátů .....	30
4.2.5.	Transformace rostlinného materiálu .....	31
4.2.6.	Křížení transformovaných rostlin .....	31
4.2.7.	Vyhodnocení výsledků .....	32
4.2.8.	Infiltrace rostlin .....	33
5.	Výsledky a diskuse .....	34
5.1.	Výsledky transformací .....	34
5.1.1.	Výsledky PCR analýzy .....	36
5.2.	Výsledky infiltrace .....	39
6.	Závěr .....	46
7.	Literatura .....	47
8.	Seznam grafů .....	59
9.	Seznam obrázků .....	59
10.	Seznam tabulek .....	60
11.	Seznam zkratk .....	61
12.	Obrazové přílohy .....	62

# 1. ÚVOD

Transformace rostlin je dnes klíčovým výzkumem v oblasti biologie rostlin a rovněž se jedná o jedinečný praktický nástroj v zlepšování genetického potenciálu a tvorby nových odrůd kulturních rostlin. Rostlinné transformace pomocí nejrůznějších metod začlenění nových genů do rostlinného genomu jsou již popsány přibližně u sto dvaceti různých rostlinných druhů přibližně z 35 čeledí.

Transformace je zavádění DNA, představující klonovaný gen do buňky tak, aby se projevil protein kódovaný genem. Přestože fyzické vložení DNA do buněčného jádra je jednoduchý proces, exprese proteinů kódovaných touto DNA, která není součástí chromozomu, je často jen přechodná. Naproti tomu DNA začleněná do chromosomu, bude předána během mitózy do všech dalších dceřiných buněk. Jedná se pak o "stabilní" transformace, která umožňuje po vnesení DNA do jedné buňky kompletní regeneraci kompletního organismu z této jedné transformované buňky, kdy každá buňka obsahuje kopii nově vnesené DNA.

Schopnost zabudovat a exprimovat různé cizí geny v rostlinách byla první popsána u rostlin tabáku *Nicotiana*, a to již v roce 1984. Dnes úspěšné transformace rostlin jsou používány u ekonomicky významné rostlinné druhy, jako jsou významné polní plodiny, zeleninu, okrasné a léčivé rostliny, ovocniny i lesní dřeviny.

Cílem této práce bylo otestovat vliv transkripčních faktorů typu bHLH a WD 40 pocházejících z českého chmelu *Humulus lupulus* Oswaldova klonu 72 na rostlinném druhu *Petunia x hybrida* a získat transgenní linie této rostliny. Rod *Petunia* byl vybrán, protože je, společně s rodem *Nicotiana* v praxi využíván jako modelový organismus pro práci s *Humulus lupulus*.



## 2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 2.1. Bakterie indukující morfogenetické změny rostlin

#### 2.1.1. Historie transformace rostlinných buněk pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*

U bakterie rodu *Agrobacterium tumefaciens* se dlouhodobě předpokládaly schopnosti geneticky měnit rostlinné buňky. Pouze díky malým znalostem nebo neexistenci adekvátních metod nebylo možné tuto schopnost dlouho prokázat.

Bylo zjištěno, že v rostlinných tumorech vznikajících jako důsledek infekce *Agrobacterium tumefaciens* jsou přítomny charakteristické nádorově specifické látky. Tyto látky, které jsou ve své podstatě většinou estery některých bazických aminokyselin s jinými nízkomolekulárními látkami, se nazývají opiny. Nediferencovaná pletiva jsou dále schopny růst v in vitro podmínkách bez přidání rostlinných hormonů auxinů a cytokininů do agarového média. Tyto hormony jsou jinak nezbytným předpokladem pro dediferenciaci buněk během kalogeneze a růst kalusu v in vitro podmínkách. Tato vlastnost, tj. schopnost růstů a dělení původně diferencovaných pletiv bez dodání fytohormonů, lze považovat za důkaz genetické modifikace rostlinných buněk pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 2.1.2. Rody bakterií využívaných pro morfogenetické změny rostlin

Bakterií, které mají schopnost způsobovat morfogenetické změny v rostlinách je několik rodů. Mezi nejdůležitější patří bakterie z čeledi *Rhizobiaceae*, konkrétně rody *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas* a *Corynebacterium* (Chilton, et al., 1977). Někteří zástupci ze zmíněných rodů ovlivňují rostlinu jen dočasně a nedochází k přenosu genetické informace z bakterie do rostliny (např. bakterie *Pseudomonas*), u jiných dochází k trvalému zabudování bakterií do pletiv rostliny (např. bakterie *Rhizobium* – tvorba hlízek na kořenech). Pouze bakterie rodu *Agrobacterium* jsou ale schopny vnést své specifické geny, které se nachází v části velkého plazmidu Ti, případně Ri, do genomu rostliny. Plazmidy Ti jsou schopny vyvolat rostlinné nádory pouze v případě buněk bakterií *Agrobacterium* a *Rhizobium* (Gelvin, 2003).

Samotný rod *Agrobacterium* obsahuje čtyři druhy, a to: *Agrobacterium tumefaciens*, o kterém bude následně pojednáno, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi* a nově také *Agrobacterium vitis*. K těmto druhům bývá přiřazen ještě druh *Agrobacterium radiobacter*, který má ale identickou sestavu s *Agrobacterium tumefaciens* (El Sayed, Olama, Allam, 1983). Jednotlivé druhy se od sebe odlišují pomocí kritérií DNA-DNA-hybridizace a numerické taxonomie.

## 2.2. Přenos DNA z *Agrobacterium* do rostlinné buňky

Po více než dvě desetiletí, vědci používali genetickou transformaci zprostředkovanou bakteriemi rodu *Agrobacterium* k vytváření transgenních rostlin. Vědci zjistili, že přenos T-DNA může být proveden, i pokud nezbytný Ti-plazmid byl rozdělen do dvou oddílů, a to T-DNA a geny virulence (*vir*) potřebné pro zpracovávání a přenos T-DNA. Tento binární systém umožnil snadnou manipulaci s bakteriemi rodu *Agrobacterium* a otevřel možnosti rostlinného genetického inženýrství pro mnoho odvětví (Zaenen, et al., 1974).

Nejvýznamnější úseky na Ti plazmidu jsou:

a) T-DNA (transferred DNA), která sice do buněk rostliny vstoupí, ale sama o sobě nemá potřebné geny pro vlastní integraci. Tato samotná T-DNA plazmidů Ti a Ri obsahuje pouze hraniční sekvenci 25 párů bází (Koukolikova-Nicola, Hohn, 1993). Sekvence bází je silně konzervativní, i přes mírné odchylky v pořadí bází mezi různými typy T-DNA a mezi levou a pravou stranou. Zobecněním byla odvozena konsenzus sekvence (tj. sekvence nejlepší shody): *TGGCAGGATATATTCXGTTGTAATTC*, kde *A/T* a *T/C* popisují, že na daném místě mohou výt obě báze, přičemž první uvedená je vždy častější (Rommens, et al., 2005).

b) Úsek virulence, část, která obsahuje potřebné geny pro funkce, které podmiňují přenos T-DNA do rostlinných buněk a jejich začlenění do rostlinného genomu. Úsek virulence má délku 35 kb. Na mapě plazmidů Ti a Ri se nachází v různých vzdálenostech vlevo od T-DNA. Úsek virulence se skládá ze šesti operonů: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* a *virG*. Geny úseku virulence zprostředkují oddělení T-DNA a Ti plazmidu a následný přenos do buňky rostliny (Hoekema, et al., 1984).

Přenos T-DNA do buněk rostlin indukují fenolické látky typu acetosyringonu jako je kyselina lysergová, vanilin, kyselina galová, pyrogalol, kyselina ferulová a další

látky. Fenolické látky jsou produkovány buňkami, u kterých bylo zaznamenáno poranění, u většiny dvouděložných rostlin ale ne u buněk většiny rostlin jednoděložných. Úsek *vir* je pak indukován kyselinou skořicovou a flavonoidy. Geny úseku virulence jsou aktivovány i opiny (Bolca, et al., 2009).

Vnesením T-DNA do genomu rostliny dojde k rozšíření genomu rostliny o:

a) geny pro nové možnosti biosyntézy rostlinných hormonů, auxinů a cytokininů. Rostlinná pletiva následně rostou jako nediferencované nádory. Při *in vitro* kultivaci dochází k růstu na živné půdě bez přidavku růstových regulátorů a růst je přibližně stejně rychlý jako při růstu kalusu na půdě s optimální koncentrací růstových látek. Transformovaná pletiva pak rostou jako kořeny (Eklof, et al., 2000).

b) geny pro syntézu nádorově specifických látek tzv. opinů. Tyto látky slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie pro bakterie, které transformaci vyvolaly (Grotewold, 2008).

Prvním krokem zachycení buněk *Agrobacterium tumefaciens* na rostlinných buňkách je navázání bakterií na rostlinné buňky. Receptory, které za navázání zodpovídají, jsou pravděpodobně speciální proteiny. Tyto proteiny jsou kódovány geny, které jsou umístěné na bakteriálním chromozomu. Jde o lokusy *chvA*, *chvB* a *pscA*. Tyto lokusy se účastní syntézy a vylučování  $\beta$ -1,2-glukanu a také *exoC* a *att* (Castro, et al., 1996).

Výše zmíněné opiny, které aktivují úseky virulence, jsou rozeznávány receptory na buněčných stěnách bakterií *Agrobacterium*. Díky tomu se bakterie přiblíží k rostlinným pletivům chemotaxí a nasedají na buněčnou stěnu rostlinných buněk. Následně dojde k aktivaci genů úseku virulence. Bakterie *Agrobacterium* při chemotaxi reaguje na různé cukry sloučeniny, ale také na fenolické produkty. Výsadní postavení má acetosyringon, který zesiluje interakci mezi buňkami rostliny a bakterie. Poté co dojde k rozpoznání příjmové buňky, dojde k navázání bakterie *Agrobacterium* na buňky rostliny (Vergunst, et al., 2000). Tento proces je umožněn a zprostředkován bílkovinami, které jsou zakódovány geny bakteriálního chromozomu *chvA*, *chvB* a *pscA*, kdy podle Castro, et al. (1996):

- gen *chvA* kóduje protein podmiňující vylučování  $\beta$ -1,2-glukanu z bakterie

- lokus *chvB* kóduje protein, který spolupůsobí při syntéze  $\beta$ -1,2-glukanu
- gen *pscA* kóduje enzym, který se podílí na syntéze bakteriálních extracelulárních polysacharidů.

Přenos T-DNA potom začíná od pravé hraniční sekvence 25 bp, kde se vytvoří zlom v dolním vlákně T-DNA. Podle (Vergunst, et al., 2000) je T-DNA do rostlinných buněk vnesena za pomoci komplexu proteinů, které jsou produktem operonu *virB* a genu *virD4*. Tento transportní systém *virB/D4* potom podmiňuje přenos nukleoproteinového T-komplexu do rostlinných buněk. Ve skutečnosti ale dochází pouze k přenosu proteinů, které jsou výsledkem genů virulence *virE2* a *virF* a T-DNA je pouze pasivně nesena. Protein *virE2* je hustě navázán po celé délce T-DNA .

Následně je potřeba umístit T-DNA do jádra buňky. Aby proteiny mohly vstupovat do jádra, je potřeba aktivovat jaderné póry, a to za pomoci signálu pro jadernou lokalizaci. Tento signál je přenášen buď samotným proteinem anebo připojeným pomocným proteinem. Je tedy jasné, že i pro nasměrování T-DNA z cytoplazmy do jádra musí existovat nějaký proteinový mechanismus. Herrera-Estrella, Van Montagu a Wang (1990) popsali kovalentní vazbu mezi pravým koncem T-DNA a proteinem, který je produktem genu virulence *virD2*. Zároveň dokázali, že protein D2 působí jako signál pro lokalizaci do jádra (Koukolikova-Nicola, Hohn, 1993).

Nezbytnou podmínkou přenosu T-DNA do rostlinných buněk je aktivita chromozomálních genů virulence. Produkty těchto genů se podílí na prvních fázích interakce mezi rostlinnými buňkami a buňkami bakterie *Agrobacterium* a na regulaci genů úseku *vir*. Operony *chvA* a *chvB* se podílí na přisednutí buněk bakterií na buňky rostliny (Hoekema, Hooykaas, Schilperoort, 1984).

Celý proces integrace T-DNA do buněk rostliny lze podle (Koukolikova-Nicola, Hohn, 1993) shrnout od následujících kroků:

- a) Jsou rozpoznány citlivé buňky rostlin bakteriemi rodu *Agrobacterium*.
- b) Po poranění začnou rostlinná pletiva vylučovat fenolické a další látky typu acetosyringonu. Tyto látky následně zaktivují geny *vir*-oblasti plazmidů Ti a Ri.
- c) Dochází k pozitivní chemotaxi k poraněným buňkám rostliny.
- d) Bakterie se připojí k rostlinným buňkám pomocí genů *chvA*, *chvB* a *pscA* chromozomální DNA bakterií *Agrobacterium*. Signální molekuly se naváží na

receptorové proteiny buněčných stěn. Tyto proteiny jsou produkovány genem *virA*. Dojde k aktivaci proteinu *virG* proteinem *virA* (Hichri, et al., 2011).

e) Signály se přenáší přes bakteriální buněčnou stěnu a aktivují transkripci genů *virB*, *virC*, *virD* a *virE*.

f) Dochází k uvolnění jednovláknových kopií T-DNA, které se mohou následně přenést do buněk rostliny.

g) Za pomoci endonukleázy kódované geny *virD1* a *virD2* dochází ke vzniku jednovláknových zlomů na specifických místech. Dojde k vystřížení jednovláknové T-DNA z plazmidu Ti.

h) Odkroucení jednovláknové T-DNA zprostředkované proteiny, které jsou kódované geny *virD1*, *virD2* a *virE2*.

ch) Vytvoří se přenosové komplexy T-DNA a polypeptidů. Ty jsou kódované geny *virD1*, *virD2*, *virE2* a možná také *virB*. *VirE2* je připojen po celé délce T-DNA.

i) Komplex je přenesen přes bakteriální i rostlinnou buněčnou stěnu za pomoci proteinů *virD2* a *virE2*.

j) Přes jaderné póry je T-DNA vnesena do buněčného jádra.

k) V buněčném jádru je T-DNA integrována do rostlinného genomu.

### **2.3.Mechanismy a metody transformace**

Pod pojmem transformace dnes rozumíme přenos cizího genetického materiálu (DNA, RNA) do buňky bakterií, rostlin či hub (Snustad, Simmons, 2009).

Původně však byl termín transformace vyhrazen pouze pro proces vnášení cizorodé DNA do bakterií a pro mechanismy, které tento proces kontrolují. Pro zapojení cizorodé DNA do genomu eukaryontních buněk se původně zavedl pojem transgenóze (Doy, Gresshoff, Rolfe, 1973). Původně i tento termín ale znamenal něco jiného. Pojem vyplynul z pokusů (Merril, Geier, Petricciani, 1971), který výraz transgenóze zavedl pro dočasnou expresi bakteriofága  $\gamma$  v eukaryontních buňkách tkáňových kultur. V současné době ale pojem transgenóze a transformace splývají velmi často v jeden a popisují stejné procesy.

### 2.3.1. Tranzientní exprese

Tranzientní exprese, jinak také označovaná jako dočasná exprese, je exprese signálního transgenu, která je vyvolaná tím, že je do jader buněk pronikne větší množství úseků T-DNA. Dříve než dojde k jejich začlenění do genomu nebo dojde k jejich degradaci nukleázami, proběhne jejich exprese. Tento proces je možný provádět jak bakteriemi *Agrobacterium*, tak přímým vnesením plazmidové DNA do protoplastů elektroporací, nebo vnesením cizorodých genů do rostlinných buněk pomocí virových vektorů (Goff, Cone, Chandler, 1992).

Výhodou tranzientní exprese je fakt, že:

- a) výsledek, kterým posoudíme účinnost použitých regulačních sekvencí v daném genomu, získáme ve velmi krátkém časovém horizontu,
- b) může být aplikovaná na celá pletiva a rostliny,
- c) může být provedena exprese několika genů najednou,
- d) může zároveň ovlivňovat mnoho různých tkání rostlin
- e) lze aplikovat u různých druhů rostlin a genotypů, a to i u takových, kde nedochází k integraci T-DNA (Boivin, et al., 2010).

Při použití bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* se jako indikační systém exprese používá nejčastěji transgen pro  $\beta$ -glukuronidázu GUS a obvyklá doba od počátku inokulace bakteriemi *Agrobacterium* do nástupu exprese je přibližně 48 hodin. Podle (Sparkes, et al., 2006) je transientní exprese výrazně intenzivnější než exprese běžně dosažená po integraci transgenů. Stupeň exprese je závislý na místě integrace transgenu do genomu (Simmons, Van Der Gheynst, 2007).

### 2.3.2. Transformace prostřednictvím bakterií *Agrobacterium*

Snahy o transformaci rostlin pomocí bakterií *Agrobacterium* probíhaly v několika krocích. V prvním kroku byly inaktivovány jednotlivé geny T-DNA vnášením transpozonů, v druhém kroku byla nahrazena celá T-DNA novými geny. Následně byla tato metoda zdokonalena rozdělením funkcí původního plazmidu Ti a rozdělení na dva plazmidy, z nichž jeden nese samotnou T-DNA a druhý úsek virulence jak bylo již výše detailně popsáno (Zaenen, et al., 1974).

### 2.3.2.1. Princip vektorů

Pokud chceme bakterie *Agrobacterium* využít jako vektory transgenů, je nutné z T-DNA odstranit původní geny a nahradit je jinými. Z původní T-DNA pak zůstane zachována jen hraniční sekvence. Pro tento proces by byla potřeba vhodná restriční endonukleáza, která způsobí zlomy pouze uvnitř T-DNA co nejbližší k hraničním sekvencím. Takový restriční enzym ale neexistuje. Základem pro úpravu T-DNA plazmidu Ti je rozštěpení celého Ti plazmidu restriční endonukleázou na velké množství fragmentů. Plazmid Ti ale obsahuje velké množství restričních míst pro všechny restriční endonukleázy (Chilton, et al., 1977).

Velký význam mají fragmenty T-DNA. Jednotlivé fragmenty T-DNA lze klonovat do malých plazmidových vektorů a jednotlivé úseky T-DNA různě pospojovat. Tímto způsobem lze získat plazmid s krátkým úsekem s levou hraniční sekvencí, krátký úsek s pravou hraniční sekvencí a mezilehlý úsek jiné T-DNA. Tento útvar se nazývá intermediární plazmid, tj. prostředník při modifikaci T-DNA plazmidu Ti. Gen, který potřebujeme do T-DNA Ti plazmidu vnést se vsune do intermediárního plazmidu T-DNA restričním štěpením a ligací (Tinland, 1996).

Pokud vsuneme intermediární plazmidy do velkého množství buněk *Agrobacterium*, udrží se trvale jen v buňkách, kde došlo k rekombinaci mezi homologními úseky plazmidů Ti a intermediárního plazmidu. Jednoduchá rekombinace má za následek vznik kointegrátu, dvojitá rekombinace pak vyústí v substituci úseku plazmidu Ti za úsek vektorového plazmidu (Rommens, et al., 2005).

Kointegrativní vektor, je takový vektor, který je tvořen plazmidem Ti, u kterého je T-DNA modifikovaná včleněním kointegrativního vektoru. Sekvence T-DNA, která se integruje do genomu rostliny společně s žádaným genem, nesmí vyvolat žádné diferenciační změny rostlin, tj. musí být zbavena genů pro syntézu auxinů a cytokininů. Navíc musí T-DNA obsahovat kromě vnášeného genomu selektovatelný gen, který umožní detekování a selekci transformovaných pletiv (Walden, Wingender, 1995). První kointegrativní vektor založený na intermediárním plazmidu se je nazván *pGV3850* a jedná se o modifikovaný Ti-plazmid *C58* s genem pro nopalinsyntázu. Další geny, které se mají přenést do genomu rostlin s vlastním promotorem, jsou nejprve integrovány do intermediárního plazmidu *pBR322*. Tento plazmid je obohacen o gen pro rezistenci k jiným antibiotikům, než je ampicilin. Tento gen se projevuje

v bakteriích. Takto upravené buňky bakterie *Agrobacterium* se následně selektují. Rezistence vzniká díky kointegrátu mezi sekvencí *pBR322* plazmidu *pGV3850* a odpovídající sekvenci intermediárního plazmidu (Zambryski, et al., 1983). Takto vytvořený kmen bakterie *Agrobacterium tumefaciens* je možný použít pro naočkování rostlin nebo protoplastů. Tím jsou zajištěny podmínky pro diferenciaci rostlinných pletiv a následně se u kalusů nebo regenerovaných pletiv zjišťuje syntéza nopalínu, což dokazuje transformaci. Tímto způsobem lze zhodnotit expresi dalších genů, které jsou do rostlinného genomu vneseny (Walden, Wingender, 1995).

Jiná (pro tuto práci důležitá) varianta plazmidu *pGV3850* je plazmid *pGV3850neo*, který v úseku *pBR322* obsahuje gen *nptII* pro rezistenci ke kanamycinu. Tento gen se projevuje v rostlinném genomu a lze tedy provádět selekci transformovaných pletiv na základě kanamycinové rezistence (Dolgov, Mitiouchkina, Skryabin, 1997).

Kmeny *Agrobacterium tumefaciens*, u kterých byl plazmid Ti rozdělen na dva plazmidy, se nazývá binární vektor. Jeden úsek plazmidu neobsahuje T-DNA ale úsek virulence. Druhý úsek plazmidu obsahuje T-DNA, která je nesena typem plazmidu, který se replikuje v *Agrobacteriu* a má selektovatelný gen pro rezistenci k některému z antibiotik a nemá vir (Bevan, 1984). Výhodou rozdělení plazmidu Ti na dvě části, kdy menší vektorový plazmid je dostatečně malý s vhodnými restrikčními místy pro zabudování cizorodé sekvence DNA do T-DNA, je snadná genová manipulace pro úpravu *Agrobacterium* (Lee, Gelvin, 2008). Úpravy plazmidů *in vitro* se provádí v bakteriích *E. coli*. Do t-DNA výchozího vektorového plazmidu se začlení gen, který je potřeba vnést do rostlin. Plazmid má zpravidla v T-DNA syntetickou sekvenci, která se stává z cílových míst pro mnoho restrikčních endonukleáz. Tato místa jsou naprosto unikátní. Tato syntetická sekvence v T-DNA se nazývá polylinkerová sekvence (Khanna, Daggard, 2003). Následně dochází k vyštěpení genu, který chceme přenést do rostliny, z DNA některým z restrikčních enzymů a stejným je následně rozštěpen vektorový plazmid v polylinkerovém úseku. Žádoucí gen je poté začleněn do plazmidu ligací a transformován do buněk *E. coli* (Bevan, 1984). Buňky s plazmidem se izolují, rozmnoží se a následně znova izolují. Takto izolované buňky se rozštěpí restrikčními endonukleázami a ověří se, zda mají požadovanou strukturu. Pokud ano je možné je pomocí bakteriální konjugace nebo transformace přenést z buněk *E. coli* do buněk *Agrobacterium tumefaciens* (Lee, Gelvin, 2008).



Kvůli velmi nízké schopnosti transformace u většiny dvouděložných kulturních rostlinných druhů je snaha o zvýšení schopnosti virulence u bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. O stupni virulence rozhoduje především *virG*, který je schopen aktivovat další geny virulence. Zvláště virulentní je agropinový typ *Agrobacteria A281* s Ti plazmidem *Bo542*. Účinnost transienční exprese se při použití tohoto kmene zvyšuje až na pětinasobek (Hood, Fraley, Chilton, 1987).

### 2.3.2.2. Selektovatelné a reportérové transgeny

Jako chimérické transgeny označujeme takové transgeny, které jsou složeny z úseků DNA, které pochází z různých genomů. Rozeznáváme dva různé typy genů:

a) selektovatelné geny, které přenáší rezistenci k látce, která může být přidávána do agarového média nebo jinak aplikovaná na rostliny a která se využívá k selekci transgenních buněk a pletiv (Ramessar, et al., 2007).

b) reportérové neboli signální geny, jejichž biochemický produkt se dá jednoduše zjistit a kvantifikovat (Bhatnagar, et al., 2010).

#### 2.3.2.2.1. Selektovatelné transgeny

Pro selektovatelné transgeny se využívá několik selekčních systémů:

a) Transgen pro rezistenci ke kanamycinu *nptII* kódující neomycinofosfotransferázu II. Původně byl gen součástí transpozonů *Tn5*, kdy kódující sekvence je lokalizovaná na fragmentu ohraničeném restrikčními místy enzymů *BglIII*-*BamHI*. Kanamycinová rezistence se projevuje velmi intenzivně v rostlinných pletivech, která jsou schopna normálního růstu při běžném použití kanamycinu (Carrer, et al., 1993).

K důkazu projevu genu *nptII* se používá metody, kde jsou z rostlin extrahovány proteiny a rozděleny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. K tomuto gelu se přidává roztok s obsahem ATP značené radioaktivním fosforem a s kanamycinem. Kanamycin a ATP se dočasně naváží na enzym a vytvořený fosforylovaný kanamycinu se na místě lokalizace enzymu *NPTII* naváže na fosfocelulózový filtr. Po autoradiografii zanechá na těchto místech charakteristické stopy (De Vries, Wackernagel, 1998).

Nepřímá metoda detekce je umístění výhonů rostlin na médium s kanamycinem. Výhony rostlin nejsou schopny zakořenit a rostlina postupně odumře. Pokud jsou ale na

agarové médium s růstovými látkami a kanamycinem umístěny fragmenty listů, dojde k regeneraci kalusů vzniklých z buněk transformovaných bakteriemi *Agrobacterium* (Bevan, 1984; Paszkowski, et al., 1984).

b) Chimérický transgen pro rezistenci k hygromycinu, tedy antibiotiku, které blokuje proteosyntézu u prokaryont i eukaryont. Selekční systém je ale využíván jen ojedinele, protože hygromycin je vysoce toxický pro rostlinné i živočišné buňky (Elzen, et al., 1985; Waldron, et al., 1985).

c) Chimérické transgeny pro rezistenci k antibiotikům streptomycinu (Honore, Cole, 1994; Lederberg, 1951), gentamycinu (Elsinghorst, 1994) a neomycinu (Hille, et al., 1986)

d) Transgen pro rezistenci k herbicidu glufosinátu (Rohrer, et al.)

e) Transgen pro rezistenci k sacharidu manóze (Joersbo, et al., 1998)

#### **2.3.2.2. Reportérové transgeny**

Reportérové transgeny slouží jako měřítko stupně exprese transgenů s různými promotory, strukturou, v různých genotypch, pletivech a a za různých podmínek. Obsahují vždy sekvence pro projev v genomu rostlin, ale kódující sekvence bývá buď bakteriální, nebo živočišného původu (Bhatnagar, et al., 2010).

Jsou popsány různé chimérické geny, z nichž nejdůležitější jsou:

a) Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu. Tento enzym působí acetylaci chloramfenikolu na dvou místech molekul (Laban, Wirth, 1989).

b) Transgen pro  $\beta$ -glukuronidázu. Jedná se o zatím nejúspěšnější signální gen, který mění dostupné substráty na modře zbarvené nebo fluoreskující látky. Aktivita genu se detekuje buď fluorescenční metodou nebo histochemickou metodou (Pavlikova, et al., 2004).

c) Transgen pro luciferázu, kdy dochází k emisi viditelného záření po dodání substrátu k rostlinnému proteinovému extraktu transgenních rostlin (Millar, et al., 1992).

d) Transgen pro zeleně fluoreskující protein, který byl klonován z medúzy *Aequorea victoria* (Chiu, et al., 1996).

### 2.3.2.3. Transformace rostlinných pletiv

Pro využití vektorů, které do rostlinného genomu vnášejí pouze rezistenci ke kanamycinu nebo jinému antibiotiku se vyvinula metoda nazvaná disková metoda transformace, kde se odeberou z asepticky kultivovaných rostlin terčíky a ty se kultivují společně s bakteriemi *Agrobacterium* a následně se přenesou zpět na agarové médium s vhodným selekčním agens umožňujícím přežití jen transformovaných buněk. Agarové médium obsahuje také růstové látky a antibiotika, které dohromady pomáhají ke kalogenezi a následnému vzniku pupenů. Ve vhodném stádiu jsou přeneseny výhony k zakořenění. Pro zvýšení rychlosti exprese genů virulence se přidává do agarového média acetosyringon (McCormick, et al., 1986).

Pokud je tato metoda obtížně proveditelná je možné použít metodu transformace ustrižených růstových vrcholů, kdy se v kultivaci pokračuje bez kalogeneze a růstový vrchol dá vzniknout celé rostlině (Dutt, et al., 2007).

Výjimečné postavení při transformaci pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* má rostlina *Arabidopsis thaliana*, u které existují metody umožňující obcházení využití tkáňových kultur, a to pomocí transformace čerstvě namočených semen do suspenze *Agrobacterium tumefaciens*. Předpoklad je že bakterie přežívá v rostlinách až do stádia kvetení rostliny a k transformaci dochází právě až při vývoji květů (Bechtold, Pelletier, 1998).

Původně se předpokládalo, že integrovat T-DNA do genomu jednoděložných rostlin je nemožné. Tento předpoklad však byl vyvrácen v různých experimentech, kdy byla potvrzena i trvalá integrace bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Obecně dochází v těchto případech k použití embryonálních rostlinných pletiv (Shrawat, Lorz, 2006). Podstatou řešení je překonání problémů s aktivací genů virulence v Ti plazmidu, pro nichž jsou potřeba látky fenolické povahy. Tyto látky se v jednoděložných rostlinách vyskytují právě jen v embryonálních pletivech. Metoda byla úspěšně ověřena na různých hospodářských jednoděložných rostlinách, jako je *Oryza* (Chan, et al., 1993), *Hordeum* nebo *Triticum* (Hensel, et al., 2009).

### **2.3.3. Přímá transformace**

Jak již bylo zmíněno, není možné nebo zcela vhodné použití transformaci pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* u všech rostlin, konkrétně u rostlin jednoděložných. Dnes již sice tato transformace byla aplikována u pletiv různých obilovin jako např. *Zea mays*, *Oryza* a dalších, ale také u dalších rostlin jako je např. *Asparagus*, ale přesto byla vyvinuta metoda přímé transformace. Tato transformace nepoužívá bakterie *Agrobacterium* (Takenaka, et al., 2000).

Nejstarší metodou byla aplikace bakteriální DNA na klíčící semena. Změny ve fyzikálních a chemických vlastnostech u hydratovaných semen jsou pro přijetí cizorodé DNA příznivé (Senaratna, et al., 1991).

#### **2.3.3.1. Transformace protoplastů**

Obvyklým výchozím bodem pro transformaci byly rostlinné protoplasty. Dnes je však obvyklejší transformace celých pletiv, a to z důvodu špatných regeneračních vlastností rostlin z protoplastů.

Postup pro transformaci čerstvě izolovaných protoplastů spočívá v inkubaci protoplastů v tlumivém roztoku s cizorodou DNA, která je přijata prostřednictvím endocytózy. Stimulace endocytózy je možné prostřednictvím polyetylglykolu, iontu vápníků a zvýšeného pH, elektroporací, nebo mikroinjekcemi do jádra (Lörz, Baker, Schell, 1985).

#### **2.3.3.2. Transformace buněk a pletiv**

Metody transformace buněk a pletiv jsou velmi univerzální, a z toho důvodu v poslední době velmi rozšířené. Výhodou je, že výsledek je nezávislý na genotypu akceptoru.

Možnosti transformace buněk a pletiv jsou různé, kdy nejrozšířenější jsou využití přímých mikroinjekcí do buněčných jader, společná kultivace mikrospor nebo pylových láček s vnášenou DNA nebo mikroprojektily, tedy mikrobombardování zlatými nebo wolframovými mikrokuličkami o velikosti 2  $\mu\text{m}$ , na něž je nasorbovaná plazmidová DNA (Chen, Beversdorf, 1994).

### **2.3.4. Porovnání transformace přímé a nepřímé**

Základním rozdílem je velikost včleňovaných částí do rostlinného genomu. V případě transformace bakterií *Agrobacterium* je možné do genomu rostlin včlenit poměrně velké úseky DNA oproti včleňovaným fragmentům DNA v případě přímé transformace. Tyto včleňované úseky jsou fragmenty dlouhé jen jeden maximálně několik genů (Snustad, Simmons, 2009).

Při transformaci jsou potřebné do jednoho místa genomu rostliny začlenit současně nejméně dva geny, kdy jeden z nich je selektovatelný a druhý je ten, který má být sledován. Jak již bylo výše popsáno u přímé transformace, je obvyklé přenášet jen jeden gen. Z tohoto důvodu při přímé transformaci spolupůsobí na vnášenou DNA endonukleázy, exonukleázy, ale také ligázy, které spojují dohromady jednotlivé fragmenty DNA (Paszkowski, et al., 1984).

Pokud je to u konkrétního rostlinného druhu možné a využitelné, je mnohem účinnější transformace prostřednictvím bakterie *Agrobacterium* než metoda přímá. Tento případ nastává u většiny dvouděložných rostlin a některých jednoděložných rostlin a také u nahosemenných rostlin (Snustad, Simmons, 2009).

Přímá transformace je vždy účinná, ale obecně účinnost bývá nízká. Tato metoda se proto využívá především u jednoděložných rostlin a je popsána zejména u obilovin, ale také okrasných rostlin jako *Lilium* (Iyer, et al., 2000).

## **2.4. Možnosti využití transformací rostlin**

Transformace se využívají pro zlepšení vlastností především kulturních rostlin pro snazší překonávání problémů s problematickými místními podmínkami, překonávání problémů se škůdci a chorobami, ale rovněž pro rezistenci k různým látkám. Pomocí transformací je rovněž možné ovlivnit růst a zrání rostlin a změnit jejich fyziologické procesy. Transformace se také využívá pro zlepšení estetických vlastností okrasných rostlin nebo například plodů rostlin. V současné době je transformací využíváno i pro zvýšení produkce farmakologicky významných látek (Birch, 1997).

Jedna z nejvýznamnějších skupin pokusů s transformací rostlin se zabývá tolerancí k herbicidům (Gasser, Fraley, 1989). Díky takto upraveným rostlinám je možné snížit dávky používaných herbicidů, nebo alespoň používat herbicidy

tolerantnější k životnímu prostředí, které se rychleji odbourávají. Nejčastěji řešenou problematikou je řešení tolerance k herbicidu glyfozátu (N-(fosfonometyl)glycin), který je znám pod obchodním názvem Roundup (Hu, et al., 2003).

Z hlediska zemědělské produkce je velmi zajímavá transformace kvůli rezistenci k virovým infekcím. Z tohoto pohledu je velmi důležitá odolnost vůči virům způsobujícím tabákovou mozaiku u *Nicotiana*, žilkovou mozaiku *Brassica oleracea* *convar. botrytis*, zlatou mozaiku u *Solanum lycopersicum*, páskovitost u *Zea mays* nebo zakrslost u *Triticum* (Gasser, Fraley, 1989).

Neméně významné jsou rovněž transformace rostlin prodlužující životnost řezaných květín, prodlužující zrání některých plodů a také zlepšení estetických vlastností (Tanaka, Tsuda, Kusumi, 1998) jako je změna barevnosti květů (Aida, et al., 2000), nebo lepší vybarvení tržních plodů např. u jablek (Espley, et al., 2007).

V současnosti nabývá na významu rovněž rezistence vůči nepříznivým podmínkám způsobeným extrémní v abiotických faktorech, jako je extrémní sucho, nízké nebo naopak velmi vysoké teploty. Rovněž se v některých částech světa osvědčila transformace pro rezistenci vůči zasolení půd nebo přítomnosti některých škodlivých látek v ovzduší jako jsou např. oxidy síry. Zajímavostí je rovněž genetická ochrana proti zaplevelení pozemků pro zemědělství (Kasuga, et al., 1999).

Z pohledu lidské výživy především mají velký význam transgeny, které ovlivňují biochemické dráhy, metabolismus a fyziologii rostliny. Nejvýznamnějším příkladem je projekt Rockefellerova biotechnologického programu tzv. Zlaté rýže (Al Babili, Beyer, 2005) pro produkci  $\beta$ -karotenu v endospermu obilky *Oryza sativa* (Datta, et al., 2003). Tento gen pro produkci  $\beta$ -karotenu byl pokusně vnesen i do rostlin řepky olejky (Beyer, et al., 2002). Z pohledu fyziologie rostlin se šlechtitelé snaží u rostlin zvýšit rovněž produkci ligninu, škrobu nebo feritinu, který je potřebný pro dostatek železa u lidské populace. Tento gen je rovněž začleněn do tzv. Zlaté rýže (Paine, et al., 2005).

Stále více však v dnešní době nabývá na významu transformace rostlin z důvodu farmakologie. Příkladem takové úpravy jsou transgenní rostliny pro proteiny podporující srážlivost krve, tedy hirudin. Dále se uvažuje o úpravě rostlin pro produkci proteinů lidské krevní plazmy nebo látek pro léčbu hemofilie (Gruber, Theisen, 2000). Z pohledu farmakologie je vysoce zajímavou rostlinou rovněž *Humulus lupulus L.*, ze

kterého se některé látky využívají v léčbě rakovinových onemocnění (Miranda, et al., 1999). Více bude o této rostlině a o látkách, které produkuje, pojednáno v následující kapitole.

## **2.5. Zhodnocení současného stavu výzkumu *Humulus lupulus* L. z hlediska molekulární genetiky kodeterminace Lupulinu**

Chmel (*Humulus lupulus* L.) je popínavá dvoudomá trvalka pěstovaná pro komerční využití zejména v pivovarnickém průmyslu a je znám jako tradiční léčivá rostlina již od středověku (Burnie, et al., 2007). Pro tyto účely se využívají samičí květenství, označované jako šišťice, na kterých se vyskytují žláznaté trichomy (tzv. lupulinové žlázky). Tato část tvoří specifickou část metabolomů *Humulus lupulus*, který je charakteristický relativně stabilním biochemickým složením, typickým pro každý jednotlivý genotyp *Humulus lupulus* (Okada, Ito, 2001).

Látky obsažené v lupulinových žlázkách, které jsou z pohledu využití *Humulus lupulus* nejdůležitější, jsou humuliny ( $\alpha$  – kyseliny) a lupuliny ( $\beta$  – kyseliny). Tyto látky jsou využívány jako ochucovadla v pivovarnictví (De Keukeleire, et al., 2003). V současné době nabývají velkého významu látky označené jako prenylované flavonoidy (Bolca, et al., 2010), které mají prokazatelné medicínální účinky (Gerhauser, et al., 2002). Hlavními zástupci této skupiny látek je xantohumulol, desmetylxantohumulol, 8-prenylnaringenin a 6-prenylnaringenin. Tyto látky jsou důležité jako chemopreventivní sloučeniny v případě karcinogeneze a jako fytoestrogeny (Miranda, et al., 1999).

Obsah jednotlivých účinných využitelných látek závisí nejen na obsahu a složení lupulinových metabolomů, které se průběžně mění v závislosti na průběhu zrání, ale také na genetických složkách, které určují velikost a počet chmelových šišťic a hustotu trichomů (De Keukeleire, et al., 2003).

V současné době je výzkum v oblasti molekulární genetiky zaměřen na geneticky modifikovaný *Humulus lupulus* uzpůsobený pro produkci transgenního metabolomu (Novák, Krofta, Matoušek, 2006). Tento výzkum je umožněn jen díky odhalení nejrůznějších genů *Humulus lupulus* v souvislosti se studiem genetické determinace lupulinu (Matoušek, 2012). Jako příklad lze uvést skupinu tzv. pravých chalkonsyntáz *chs\_H1* (Matoušek, et al., 2002), valerophenosyntáz (Okada, Ito, 2001),

O-metyktransferázu 1 (Nagel, et al., 2008), nebo prenyltransferázu (Tsurumaru, et al., 2012).

V dnešní době je dostupných šest rostlinných transformačních vektorů pro homologické chmelové transkripční faktory z rodiny *Myb*, tři z rodiny *bZip*, dva z rodin *bHLH*, jeden z rodiny *WD40* a další vektory jsou v přípravě (Matoušek, et al., 2012). Vedle těchto možností jsou k dispozici heterologní geny zejména z druhu *Arabidopsis thaliana*, u nichž je s vysokou pravděpodobností možné, že po vnesení do genomu *Humulus lupulus L.* mění metabolom.

Nové poznatky v oblasti molekulární biologie, zejména zjištění závislosti aktivace některých genů kodeterminujících metabolom lupulinových žlázek jako *chs\_H1* na působení ternárních komplexů, mění tento koncept jednoduché transformace směrem k použití polycistronických vektorů, kde bude uspořádáno několik transgenů pod společnou regulační jednotkou s cílem dosáhnout jejich synchronizované a kombinované exprese (Matoušek, 2012). Výsledkem cílené kombinační regulace by pak mohla být mnohem efektivnější produkce transgenního metabolomu (Matoušek, et al., 2012).

Výzkum, při kterém je využíváno transienční exprese chmelových genů probíhá rovněž u druhů *Nicotiana benthamiana* a *Petunia x hybrida*. Výsledkem je například zjištění, že chalkonsyntáza *chs\_H1*, je regulována nejen nezávislým způsobem (např. pomocí heterologního faktoru *Pap1*), ale i pomocí tzv. binárních a ternárních komplexů regulačních faktorů sestávajících z komponent skupiny *Myb*, *bHLH* a *WDR*. Existence těchto komplexů při regulacích biosyntézy rostlinných pigmentů, trichomů a prùduchů byla prokázána např. u rostlin *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Petunia x hybrida* nebo *Zea mays* jak popisuje (Ramsay, Glover, 2005) nebo *Perilla frutescens* nebo *Vitis vinifera* (Hichri, et al., 2011).

Výsledky poté naznačují, že některé *bHLH* proteiny jsou zapojeny do různých fyziologických akcí, jako je regulace flavonoidů biosyntézy a stanovení osudu epidermálních buněk. Základní mechanismy těchto různých specializací zůstávají stále neznámé. Řada rostlinných transkripčních *bHLH* faktorů schopných regulovat anthokyaninovu biosyntézu se neustále zvyšuje. Patří mezi ně skupiny *Zea mays B, R, Lc*, a *Sn* (Goff, Cone, Chandler, 1992), (Consonni, et al., 1993), *Antirrhinum majus* (Gong, et al., 1999), *Perilla frutescens MYC-RP* (Gong, et al., 1999), *Petunia x hybrida*



*PhANI* a *PhJAF13* (Spelt, et al., 2002), *Malus MdbHLH3* a *MdbHLH33* (Espley, et al., 2007), nebo *Gentiana GtbHLH1* (Nakatsuka, et al., 2008).

U *Humulus lupulus* byly identifikovány dva chmelové ternární komplexy, které aktivují gen *chs\_H1*, a to sestava faktorů *HIMYB2/HIWDR1/HlbHLH2* a sestava *s-HIMYB3/HIWDR1/HlbHLH2*. Různé formy faktoru *HIMYB3* mohou měnit i morfogenezi, celkový vzhled a vzrůst rostlin (Matoušek, 2012).

Zvláštností zůstává fakt, že metabolom lupulinových žlázek je omezen v produkci anthokyanů. Přestože podle Matouška (2012) dochází k aktivaci lupulinových genů ternárními komplexy, k biosyntéze anthokyanů v tomto pletivu prakticky nedochází a chmelové komplexy nejsou ani schopny indukovat biosyntézu těchto pigmentů v listech *Petunia x hybrida* na rozdíl od regulačního faktoru *Pap1* z *Arabidopsis thaliana*. Z tohoto faktu vyplývá, že s použitím specifických chmelových transgenů by bylo možné v lupulinových žlázkách dosáhnout zvýšené produkce prenylflavonoidů, aniž by docházelo ke konverzi chalkonů do pigmentů, anthokyanů a květních barviv (Matoušek, et al., 2012).

Schwekendiek, et al. (2007) popsal transgenní klony *Humulus lupulus* exprimující konstitutivně stilben syntázu z révy vinné. U transgenního *Humulus lupulus* při dosažení fáze maturace dochází k červenému zbarvení hlávek a k akumulaci různých metabolitů, zejména antokyanu, rutinu a isoquercetinu. Podle Gatica-Arias, et al. (2012) jsou některé metabolity zajímavé pro farmacii. Díky transformaci byly získány nové možnosti pro produkci zajímavých látek. Transgenní pletiva *Humulus lupulus* lze získat buď klasickým způsobem při použití transformace bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* a regenerací na selekčním médiu (Horlemann, et al., 2003), nebo pomocí biolistické metody (Batista, Sousa, Pais, 1996).

Matoušek, et al. (2012) popisují úspěšné využití klasických monocistronických transformačních vektorů, tedy zpravidla vektorů obsahujících v rámci vnášené T-DNA nezávisle uspořádaný transgen a jeden nebo více genů pro selekci regenerátů transgenních rostlin. Jako selekční gen je nejvhodnější použití genu pro kanamycinovou rezistenci, případně gen pro zeleně fosforeskující protein.

### 3. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této práce je otestovat vliv transkripčních faktorů typu *bHLH* a *WD 40* pocházejících z českého chmelu *Humulus lupulus* Oswaldova klonu 72 na rostlinném druhu *Petunia x hybrida* a získat transgenní linie této rostliny.

### 4. METODIKA

#### 4.1. Materiál

##### 4.1.1. Charakteristika rostliny *Petunia x hybrida*

*Petunia x hybrida* vznikla zkřížením dvou druhů, a to *Petunia axillaris* a *Petunia integrifolia*. *Petunia* je rychle rostoucí jednoletá až vytrvalá bylina z čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Její tmavě zelené listy mají vejčitý až eliptický tvar, na větveném stonku jsou postaveny vstřícně a ke stonku jsou přisedlé nebo mají krátké řapíky. Celá rostlina je pokryta lepkavými žláznatými trichomy. Květy *Petunia* jsou pětičlenné, mají nálevkovitý tvar se širokými okraji, přičemž se vyskytují jednoduché i plnokvěté varianty. Typ a velikost květů a výška rostlin se liší v závislosti na kultivaru. Pěstují se kultivary ze čtyřech skupin: *Grandiflora*, *Multiflora*, *Nana compacta* a *Pendula*. Skupina *Grandiflora* a *Multiflora* dorůstají výšky okolo 30 cm. Skupina *Grandiflora* má menší množství mělkých širokých květů, *Multiflora* tvoří větší množství menších květů. Kultivary ze skupiny *Nana compacta* mají velké množství malých květů na rostlině o výšce pod 15 cm. Kultivary skupiny *Pendula* tvoří středně dlouhé poléhavé lodyhy. *Petunia* měla původně květ zabarvený do růžova, dnes se pěstují v mnoha barevných variantách s květy jednobarevnými, s různě barevnou žilnatinou nebo barevnými skvrnkami. Rozmnožují se pomocí semen (v gramu je 6-10 tisíc semen). *Petunia* pochází z Jižní a Střední Ameriky, poprvé byla objevena v roce 1823 v Brazílii. Rychle rostoucí zahradní kultivary rodu *Petunia* nejsou mrazuvzdorné, a proto se pěstují jako letničky všeobecně oblíbené na záhony, do okenních truhlíků, závěsných košů a keramických misek. Vyhovuje jim slunné místo chráněné před větrem s dobře propustnou živnou půdou; nejlépe prospívají v oblastech s horkými léty (Burnie, et al., 2007). Zálivku vyžaduje pravidelnou, ale je citlivá na přemokřování. Půdu potřebuje humózní s neutrální případně mírně kyselou reakcí.

#### 4.1.2. Použitý rostlinný materiál

V podmínkách *in-vivo* byl ze semen vypěstován pokusný materiál v podobě rostlin *Petunia x hybrida* cv. *Andrea*.

#### 4.1.3. Charakteristika bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je gramnegativní, nesporulující, obligátně aerobní bakterie. Tato bakterie má tyčinkovitý tvar s peritrichálně rozmístěnými bičíky a dorůstá rozměrů 1,5-3  $\mu\text{m}$ . *Agrobacterium tumefaciens* je celosvětově rozšířená půdní bakterie, vyskytující se zejména v okolí napadených rostlin. Tato bakterie způsobuje nádorovitost krčku dvouděložných rostlin, tzv. „crown gall“. Schopnost bakteriální buňky toto onemocnění indukovat je spojována s přítomností plazmidu Ti (tumor-inducting) (Brown, 2007). Nádorovitost krčku je vyvolána po vniknutí bakterie do stonku v místě poranění případně v místě roubu, reaguje s DNA a způsobí produkci opinů (specifické aminokyseliny) a vytvoření nádoru (zával), který se během růstu rostliny velmi rychle zvětšuje. Tento nádor je zpočátku měkký, kulovitý a na povrchu bělavý, a později zdřevnatí. Druhotným příznakem infekce je zakrslost rostlin doprovázená chlorózou listů a sníženým výnosem (u stromů není tak patrné). Během infekce se mohou vytvořit i sekundární nádory na místech vzdálených od primárního nádoru, způsobené přenosem patogenů cévním systémem. Indukce tvorby tumoru netrvá po poranění při teplotě okolo 25°C déle než 20 hodin. Poté již není pro vývoj nádoru přítomnost samotných bakteriálních buněk potřebná. Inkubační doba, tj. čas od inokulace po vznik symptomů, se během vegetace pohybuje okolo 8-15 dní (Kůdela, Novacky, Fucikovský, 2002). *Agrobacterium* napadá většinu dvouděložných rostlin (infekce byla zaznamenána u cca 643 druhů). Velký význam má hlavně pro zemědělské plodiny jako peckoviny, olejninu (*Brassica napus*, *Helianthus*) nebo *Humulus lupulus*. Dále má význam při napadení okrasných rostlin jako *Rhododendron*, *Chrysanthemum* nebo *Dianthus*. V lesnictví znamená větší riziko pro listnaté stromy než pro jehličnany (Hood, Fraley, Chilton, 1987).

#### 4.1.4. Plazmidový konstrukt

Pro pokusy byly použity tři různé konstrukty a to *HLWD40 3278-80* a *HLbHLH 3577* nebo *HLbHLH 3677 GFP*.

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Příprava medií

Půdy byly připraveny tak, že na množství 1l media byla použita kádinka s přibližně 1l dH<sub>2</sub>O, do ní bylo umístěno míchátko a kádinka umístěna na magnetickou míchačku. Na předvážkách byly jednotlivě naváženy potřebné složky kromě agaru a přidány do kádinky, kde byly ponechány k rozpuštění. Pokud byly pro půdu potřebné hormony, byly přidány pipetou ještě před měřením pH. Po přidání všech složek bylo změřeno pH pomocí pH-metru a upraveno na správnou hodnotu pomocí 1N HCl a 1N KOH. Po získání správné hodnoty pH bylo medium přelito do odměrného válce, doplněno dH<sub>2</sub>O na 1l a promícháno. Po připravení tekutého media byly připraveny dvě litrové Ehrlenmeyrové baňky, do každé byl navážen agar pro ½ litru media (pro získání tuhého media) a přidáno 0,5l připraveného tekutého media. Poté byly baňky uzavřeny alobalem a přelepeny páskou pro kontrolu sterilizace. Baňky s mediem byly umístěny šikmo do Papinova hrnce s cca 4 cm vody a byly vařeny, dokud se hrnec nenatlakoval. Po natlakování hrnce bylo odměřeno 20 minut a pak bylo vaření ukončeno a baňky vyjmuty. Baňky s uvařeným mediem byly vychlazeny pod proudem chladné vody na teplotu asi 50°C a poté do nich byla ve flow-boxu připipetována příslušná antibiotika, medium opatrně zamícháno, aby v něm nevznikly vzduchové bublinky, a rozlito do umělohmotných laboratorních kelímků (výška media v kelímku asi 1 cm). Nevyužité kelímky s mediem byly skladovány ve chladicím boxu.

### 4.2.2. Použitá media

Pevná LK půda na 1l dH<sub>2</sub>O:

- Sacharóza 10g
- Kasein 8g
- Kvasnice 4g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g
- MgSO<sub>4</sub> 300mg
- Agar 15g

Tekutá LK půda:

- Sacharóza 10g
- Kasein 8g
- Kvasnice 4g
- $K_2HPO_4$  2g
- $MgSO_4$  300mg

Promývací MES na 100 ml  $H_2O$ :

- MES 2,13g
- Acetosyringon 0,01 mg
- $MgCl_2$  2,03 g

Tekutá  $\frac{1}{2}$  Ms na 1l  $dH_2O$ :

- MS 2,2 g
- Sacharóza 15 g
- pH 5,6 – 5,8

Tuhá  $\frac{1}{2}$  Ms půda na 1l  $dH_2O$ :

- MS 2,2 g
- Sacharóza 15 g
- Agar 9 g
- pH 5,6 – 5,8

Tuhá regenerační půda na 1l  $dH_2O$ :

- MS 4,4g
- Sacharóza 30 g
- Agar 9 g
- Hormony:
  - Naa 200  $\mu$ l/1l
  - Bap 2-5 ml/1l

- pH 5,6 – 5,8
- Antibiotika:
  - Ticarcilin 500 µl
  - Kanamycin 250 µl

Zakořeňovací MS TK na 1l dH<sub>2</sub>O:

- MS 4,4 g
- Sacharóza 30 g
- Agar 9 g
- pH 5,6 – 5,8
- Antibiotika:
  - Ticarcilin 500 µl
  - Kanamycin 250 µl

#### 4.2.3. Příprava bakterií

Pro transformaci bylo připraveno *Agrobacterium tumefaciens* tak, že byly přes noc na pevné LK půdě vypěstovány bakterie s požadovaným transformačním konstruktem.

Pro transformaci byla použita metoda organogeneze, kdy byly bakterie zaočkovány do tekutého LK media (bez použití agaru) a ponechány při 28°C třepat do následujícího dne. V této fázi byly dvě možnosti, jak pokračovat dále. Buď mohly být bakterie stočeny na centrifuze při pokojové teplotě na 4000 otáček/min., tekutina odstraněna a sediment byl rozpuštěn v promývacím MESu (případně v MgSO<sub>4</sub>) o stejném objemu jako byl původní (přibližně 20 ml) nebo ponechány v tekutém mediu (v takovém případě bylo nutné dále používat větší objemy použitých bakterií). Použity byly obě možnosti, ale častěji byla využívána druhá možnost bez stáčení.

#### 4.2.4. Příprava explantátů

Z listů petúnií byly připraveny explantáty, tak že byly pomocí ostrých nůžek ostříhány okraje listů, odstraněny nejsilnější části listové žilnatiny a zbytek byl nastříhán na čtverce o rozměrech cca 1x1 cm. Takto rozstříhané listy byly umístěny do

kádinky s destilovanou vodou, aby bylo zabráněno vadnutí, než bylo připraveno dostatečné množství explantátů. Připravené explantáty byly vysterilizovány pomocí roztoku vody a sava v poměru 9:1, tak že byly v roztoku máčeny přibližně 10-15 minut. Kádinka se sterilizujícími se explantáty byla přesunuta do vyfoukaného flow-boxu a od této chvíle práce pokračovaly jen uvnitř. Po uplynutí doby sterilizace byl roztok opatrně vylit a explantáty několikrát propláchnuty pomocí sterilní H<sub>2</sub>O tak, že byly promíchány ve vodě a následovně scezeny přes sterilní víčko.

#### **4.2.5. Transformace rostlinného materiálu**

Opláchnuté explantáty byly pomocí vyžíhané pinzety přesunuty do kelímku obsahujícího tekutou ½ Ms a k nim byly přidány připravené bakterie. Takto připravené explantáty zůstaly v bakteriích do druhého dne, kdy byly přepasážovány na tuhou regenerační půdu. V případě použití druhé varianty se stočenými bakteriemi, byly explantáty ponechány v bakteriích 20-30 minut a následně umístěny na tuhou ½ Ms půdu, na které byly ponechány do druhého dne, kdy byly přepasážovány na regenerační půdu.

Explantáty byly na regenerační půdě ponechány po dobu 3-4 týdnů a po uplynutí této doby byly přepasážovány na novou regenerační půdu. Tento postup byl opakován přibližně každé čtyři týdny. Z explantátů postupně vznikly kalusy (shluky buněk), na kterých regenerovaly nové rostliny. Regenerované prýty byly pomocí nůžek odstraněny z kalusů a umístěny na půdu MS TK, kde byly ponechány, aby zakořenily.

Pro přípravu negativní kontroly byly explantáty po sterilizaci rovnou umístěny na regenerační půdu. Regeneranty byly umístěny na tuhou MS půdu, ve které nebyla použita antibiotika.

#### **4.2.6. Křížení transformovaných rostlin**

Transformace by měly splňovat podmínku, že transformované rostliny by měly být fertily. Z tohoto důvodu byl udělán pokus křížení, kdy byly kříženy rostliny transformované *Pap1 1527/2* a *Pap1 1572/4* s rostlinami kříženými *HLWD 40 3278-80*. Křížení proběhlo tak, že u obou typů rostlin byla část květů ponechána, aby rozkvetla a prašníky praskly. Z druhé části květů byly ještě před rozvinutím prašníky odstraněny, aby nedošlo k samooplození. Po rozkvetení byl pyl přenesen na blizny. Po vytvoření tobolek byly ponechány k dozrání a prasknutí. Zralé tobolek byly sebrány a uloženy do

mikrozkumavky. Zralá semena byla vyseta a na vyrostlých rostlinách byla provedena reakce PCR.

#### 4.2.7. Vyhodnocení výsledků

Na regenerovaných rostlinách byla provedena analýza na přítomnost transgenů. Pro účel práce proběhla pouze kontrola na přítomnost genu *nptII*. (kanamycinové rezistence), který je základní součástí transformovaných rostlin. K této analýze byla použita „tissued“ PCR a následná elektroforéza. Vzorek pro PCR byl připraven na základě metody popsané v (Klimyuk, et al., 2011). Z testované rostliny byl odebrán cca 5 mm velký kus listu, který byl povařen 45 sekund ve 40  $\mu$ l 0,25N NaOH, poté bylo přidáno 40  $\mu$ l 0,25N HCl a 20  $\mu$ l 0,5 M Tris HCl (pH 8,0) a povařeno 2 minuty. Po uvaření byly zkumavky umístěny na led.

Pro PCR byly použity dva způsoby využití vzorku, kdy byl využit pouze extrakt nebo místo extraktu byl použit cca 2 mm velký kus listu, který byl v extraktu. Pro kontrolu průběhu PCR byl použit plazmid obsahující požadovaný transgen. Jako rostlinná pozitivní kontrola bylo nejdříve použito transgenní *Solanum lycopersicum* a po nalezení transgenní *Petunia* byla použita tato rostlina. Jako negativní kontrola byla použita *Petunia*, která prošla pouze organogenezí bez procesu transformace. Pro detekci transgenů *nptII* byly použity primery *NPT 1* a *NPT 2*.

Směs pro PCR se skládala (na 25  $\mu$ l/vzorek) z 10% Takara pufru (2,5  $\mu$ l), 8% směsi nukleotidů (2  $\mu$ l), 2% 20  $\mu$ M primeru 1 (*NPT 1*) (0,5  $\mu$ l), 2% 20  $\mu$ M primeru 2 (*NPT 2*) (0,5  $\mu$ l), 10% 10xPVP (2,5  $\mu$ l), 1% 100xBSA (0,25  $\mu$ l), 1% rTaq polymerázy (0,25  $\mu$ l) a 66% sterilní dH<sub>2</sub>O (16,5  $\mu$ l).

Nastavení PCR:	94°C – 3minuty	}	opakovat 35x
	94°C – 45 sekund		
	55°C – 30 sekund		
	72°C – 2 minuty		
	4°C – $\infty$		

Po proběhlé PCR byl vzorek vyhodnocen pomocí gelové elektroforézy, na kterou byl použit 1% agarosový gel. Elektroforéza byla nastavena na 80V a probíhala asi 1,5 hodiny. Po uplynulém čase byl gel vyjmut a zkontrolován pomocí UV lampy.



#### **4.2.8. Infiltrace rostlin**

Do tekuté LK půdy byly pomocí sterilního očka naočkovány potřebné bakterie a přes noc byly napěstovány v třepačce a aktivovány pomocí promývací půdy MES. Druhý den byly namíchány požadované kombinace bakterií a pomocí inzulinových stříkaček bez jehly vpraveny ze spodní strany do pletiv listů rostlin a místo vpichu označeno. Po barevné změně byla tato místa odebrána, natrhána a uložena do scintilačních nádobek ty byly překryty gázou a upevněny lahvičky pomocí gumičky. Po uzavření byl do lahviček nalit tekutý dusík a vzorky uvnitř zmrazeny. Ze zmražených vzorků byl vylit dusík a nádobky byly umístěny do lyofilizátoru a zlyofilizovány. Po ukončení lyofilizace byly vysušené listy rozemlety v třecích miskách. Pro analýzu pigmentů bylo odebráno 10mg materiálu a rozpuštěno v roztoku metanolu a dH<sub>2</sub>O (v poměru 1:1). Rozpuštěný materiál byl dále zvortexován a stočen na stolní centrifuze. Důležitým krokem přípravy vzorku pro analýzu pigmentů bylo rozbití buněk v sonikátoru na 0,5 cyklu. Připravené vzorky byly odeslány do specializovaných laboratoří k vyhodnocení.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1. Výsledky transformací

Cílem transformačních experimentů bylo ověřit funkčnost vektorů a kmenů *A. tumefaciens*, které budou používány pro transformace chmelu. *P. hybrida* byla zvolena jako modelový rostlinný druh, který byl úspěšně transformován chmelovými regulačními faktory již v minulých experimentech např. Matoušek et al. (2006).

Do výsledků transformací a regenerace byly započítány pouze prýty odebrané z kalusů a umístěné na půdu MS TK, kde byly ponechány, aby zakořenily. Na vytvořených kalusech regenerovalo značné množství listů, které nebylo možné vhodně odebrat a následně použít. Tento charakter regenerace je rovněž popsán u rostliny rajčete *Lycopersicum esculentum* v práci McCormick, et al. (1986).

Během prvních týdnů po transformaci došlo průměrně k 20-25% ztrátám v počtu explantátů z příčiny macerace zejména u menších explantátů, u kterých došlo k výraznějšímu poškození během sterilizace. K dalším ztrátám došlo během regenerace z důvodů přerůstání explantátů *Agrobacteriem* a macerace kalusů. Obdobných výsledků i podobného stupně mortality explantátů dosáhli rovněž Schmidt a Willmitzer (1988), kdy u rostlin *Arabidopsis thaliana* došlo k přežití přibližně 20 – 30 % explantátů.

U pokusu, kdy byly bakterie odstraněny centrifugací a promývací MES byl nahrazen  $MgSO_4$ , bylo použito cca 100 explantátů transformovaných *HLWD 40 3278-80* a cca 100 explantátů transformovaných *HLbHLH 3577*. Během tří měsíců bylo pozorováno mírné vytvoření kalusů, avšak na kalusech se nevytvořily regeneranty. Během této doby všechny explantáty postupně zmacerovaly. Během experimentů v laboratoři bylo pozorováno, že u příbuzného druhu *Nicotiana* docházelo k opačnému efektu a proces regenerace byl použitím  $MgSO_4$  naopak urychlen. Použití  $MgSO_4$  je dokladováno v mnoha studiích jako například u již výše zmíněných rostlin *Arabidopsis thaliana* popsaných (Schmidt, Willmitzer, 1988) nebo u transformace stejného druhu rostlin ve studii (Feldmann, David Marks, 1987). Obě studie prokazují lepší vývoj regenerátů a zvýšení přežití jednotlivých explantátů.

Během pokusů začaly na explantátech během prvních 2-4 týdnů po transformaci vznikat kalusy a během dalšího týdne bylo možné odebrat první regeneranty. Na jeden explantát připadlo průměrně okolo 7 regenerantů, přičemž explantáty regenerované

konstruktem *HLbHLH 3577* regenerovaly lépe než regeneranty transformované konstruktem *HLWD 40 3278-80*. U prvních regenerovalo zhruba 8 regenerantů na explantát, u druhých regenerovalo zhruba 6 regenerantů na explantát. Nejlépe regenerovaly explantáty transformované konstruktem *HLbHLH 3677* s *GFP*. U tohoto konstruktu připadlo na jeden explantát průměrně 11 regenerantů. Explantáty byly schopné regenerovat nové rostliny přibližně sedm měsíců, u některých probíhala regenerace až deset měsíců. (McCormick, et al., 1986) popsala celkovou dobu, po kterou probíhala regenerace rostlin rajčete *Lycopersicon esculentum*, v délce tři měsíce, ale u odrůdy Roma až v délce šesti měsíců.

U některých regenerátů se během doby, kdy byly ponechány k zakořenění, objevilo fialové zbarvení listů a stonků (Obr. 1. a Obr. 3.). Fialové zbarvení listů svědčí o aktivaci biosyntetické dráhy antokyany, pro kterou jsou geny z genové rodiny *bHLH* známými aktivátory (Matoušek et al., 2012), proto zjištěný fenotyp svědčí o transformaci analyzovaného pletiva.



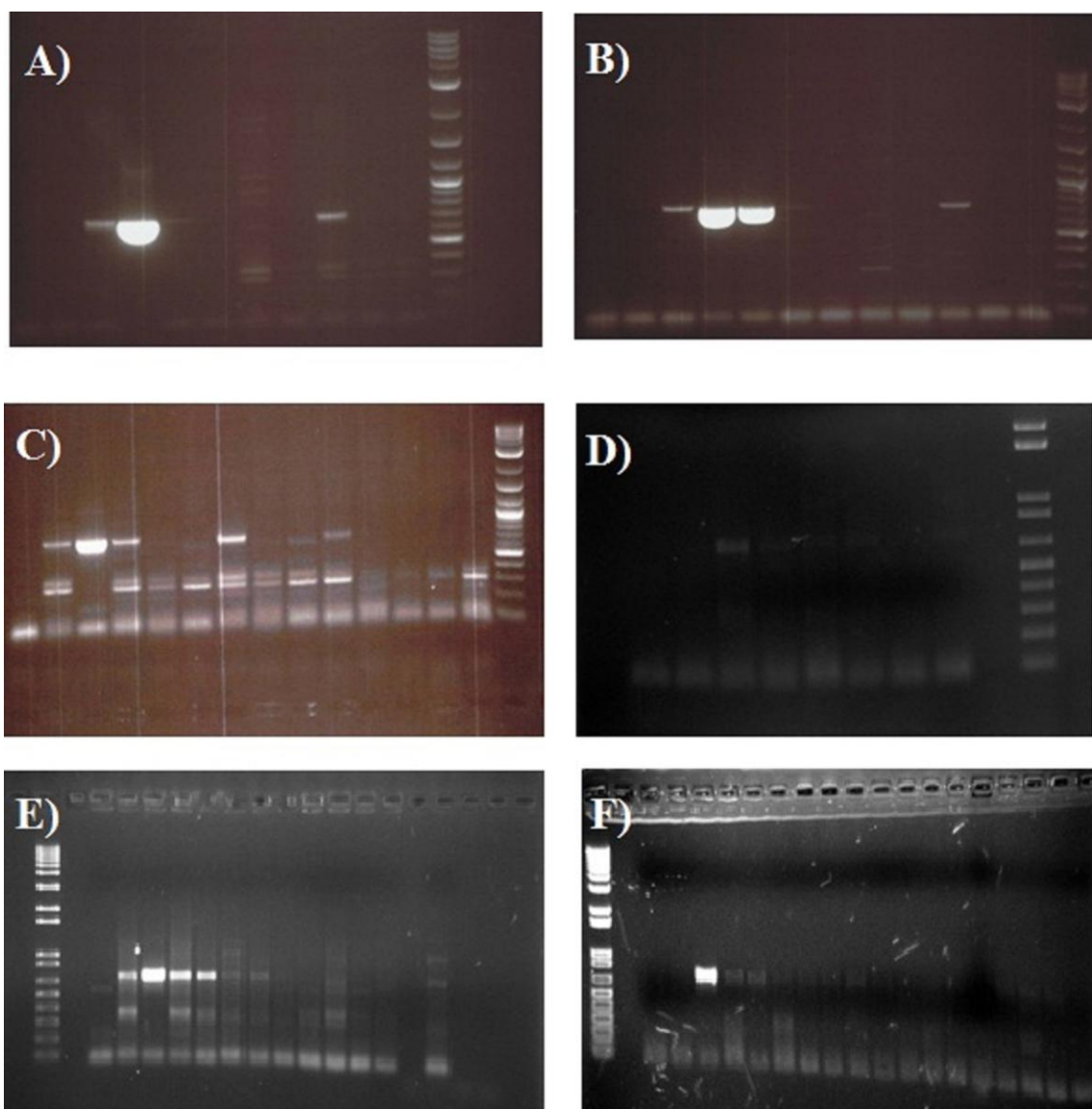
Obr. 1. Příklad rostliny pozitivní pro kanamycinovou rezistenci, u které se objevilo fialové zbarvení

Tento jev rovněž popsal v práci s rostlinami *Arabidopsis thaliana* i Yi, Mysore a Gelvin (2002) a přímo u rostlin *Petunia hybrida* Albert, et al. (2009). Stejných výsledků u rostlin *Petunia hybrida* dosáhl rovněž Matoušek et al. (2012).

### 5.1.1. Výsledky PCR analýzy

Pro rychlé ověření transformantů byla v naší práci zvolena metoda tissue PCR. Tato metoda umožňuje rychlou primární selekci transformantů pro případnou další analýzu (Maloukh, et al., 2009), která však nebyla předmětem bakalářské práce.

Pro analýzy metodou PCR byly použity rostliny, které nejlépe splňovaly podmínky, podle kterých by měly být transformované, jako dobré zakořenění, růst a popřípadě i fialové zabarvení listů.



Obr. 2. Výsledky analýzy Tissue PCR na gen *nptII*: A) Pořadí použitých vzorků (zleva doprava): Master Mix, negativní kontrola *Petunia*, pozitivní kontrola transgenní *Solanum lycopersicum* obsahující gen *nptII*, pozitivní kontrola plazmid (ředění 10), vzorky 1-7 a Marker; B) Pořadí použitých vzorků (zleva doprava): Master Mix,

negativní kontrola *Petunia*, pozitivní kontrola transgenní *Solanum lycopersicum* obsahující gen *nptII*, pozitivní kontrola plazmid (ředění postupně 104, 105), vzorky 1-7 a Marker; C) Pořadí vzorků (zleva doprava): Master Mix, negativní kontrola, pozitivní kontrola plazmid (ředění 105), pozitivní kontrola transgenní *Solanum lycopersicum*, vzorky 1-3, 5, 7, 6, 8-12, Marker; D) Pořadí vzorků (zleva doprava): Master Mix, negativní kontrola *Petunia*, pozitivní kontrola *Petunia* (vzorek 5), kříženec, 13, 14, 15, 21, Marker; E) Pořadí vzorků (zleva doprava): Marker, negativní kontrola, pozitivní kontrola *Petunia* (vzorek 5), pozitivní kontrola plazmid (105), 2x kříženec, vzorky 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23; F) Pořadí vzorků (zleva doprava): Marker, 1 volná kolonka, Master Mix, negativní kontrola, pozitivní kontrola plazmid (105), pozitivní kontrola *Petunia* (vzorek 5), kříženec, vzorky 24-36.

Na obrázku 2A a 2B byly použity vzorky 1, 2, 3, 5 transformované konstruktem *HLbHLH 3577*, vzorky 4, 6, 7 transformované konstruktem *HLWD 40 3278-80*. Pozitivně vyšly vzorky 1 a 5, které byly transformovány konstruktem *HLbHLH 3577*. Pro analýzu na obrázku 2A byl použit pouze extrakt z rostlin, zatímco pro analýzu na obrázku 2B byla použita i část pletiva. Pro další analýzy byl použit pouze extrakt.

Na obrázku 2C byly použity vzorky 1, 2, 3, 5, 10, 12 transformované konstruktem *HLbHLH 3577* a vzorky 6, 7, 8, 9, 11 transformované konstruktem *HLWD 40 3278-80*. Pozitivně vyšly vzorky 1 a 5, které byly transformovány konstruktem *HLbHLH 3577*. Slabá pozitivní reakce byla zaznamenána u vzorků 6 a 8, které byly transformovány konstruktem *HLWD 40 3278-80*.

Na obrázku 2D byly použity vzorky 14, 15 transformované konstruktem *HLbHLH 3577* a vzorky 13, 21 transformované konstruktem *HLWD 40 3278-80*. Slabá pozitivní reakce byla zaznamenána u vzorku 14, který byl transformován konstruktem *HLbHLH 3577*, 13, 21, které byly transformovány konstruktem *HLWD 40 3278-80*.

Na obrázku 2E byly použity vzorky 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 transformované konstruktem *HLbHLH 3577* a vzorky 13, 21, 23 transformované konstruktem *HLWD 40 3278-80*. Pozitivní reakce byla zaznamenána u vzorků 13 (*HLWD 40 3278-80*) a 14 (*HLbHLH 3577*), slabá pozitivní reakce byla patrná u vzorků 17 (*HLbHLH 3577*), 21 (*HLWD 40 3278-80*).

Na obrázku 2F byly použity vzorky 24, 26, 27 a 28, které byly transformovány konstruktem *HLbHLH 3577*, 25, 29, 30, 31, které byly transformovány konstruktem

*HLWD 40 3278-80* a vzorky 32-36, které byly transformovány konstruktem *HLbHLH 3677 GFP*. Slabá pozitivní reakce byla zaznamenána u vzorků 25 (*HLWD 40 3278-80*), 24, 26, 27 (*HLbHLH 3577*), 33, 34 a 35 (*HLbHLH 3677 GFP*).

Získané výsledky ukazují, že k transformaci došlo u obou analyzovaných vektorů, avšak vyšší frekvence transformace byla pozorována u genu *bHLH2* oproti genu *WDR1*. Tuto okolnost lze částečně přisuzovat metabolické aktivitě konzervovaného faktoru *WDR1*, který by mohl zasahovat to řady procesů a nelze tak u něho v některých kombinacích nebo při zvýšené hladině jeho exprese vyloučit určitou toxicitu nebo vliv na regeneraci buněk (funkce a konzervativní sekvence *WDR1* viz Matoušek et al. (2012)).

Moje analýzy (viz Obr 2.) svědčí o pozitivních transformacích vzorků. Ostatní vzorky daných variant se jevily jako negativní, kde nedošlo k regeneraci ze stabilně transformovaných buněk. Negativní varianty by mohly být rovněž chimérické, s koncentrací transgenu pod úrovní detekčního limitu použité PCR. Chimérická pletiva jsou při transformačních experimentech možná (Nakatsuka, et al., 2010) v mé bakalářské práci však možný chimérismus nebyl zjišťován)

Během transformací se podařilo získat 15 rostlin s pozitivní reakcí při PCR, což dělá 3,75% účinnost transformace. Permyakova, Shumnyi a Deineko (2009) říkají, že transformační účinnost pro *Petunia x hybrida* je 19,3%.

## 5.2. Výsledky infiltrace

V další části práce byl analyzován vliv nově izolovaného faktoru *WRKY1* na metabolom *Petunia* indukovaný faktorem *Pap1* (Matoušek et al., 2006). Protože vliv působení *WRKY1* závisí na dalších faktorech, zejména *WDRI* a supresoru *p19*, byly hodnoceny kombinace, které jsou uvedené níže.

Po infiltraci listových sektorů a transientní expresi kombinovaných genů u dvou transgenních linií *Petunia* bylo hodnoceno složení pigmentů nezávisle ve dvou laboratořích, a to v Žatci a v Gentu.

Použitá kombinace bakterií pro provedenou infiltraci byla:

$$PK = 3 \times 4404$$

$$P1 = 2 \times 4404 + WRKY1$$

$$P2 = 1 \times 4404 + WRKY1 + WD40$$

$$P3 = P19 + WRKY1 + WD40$$

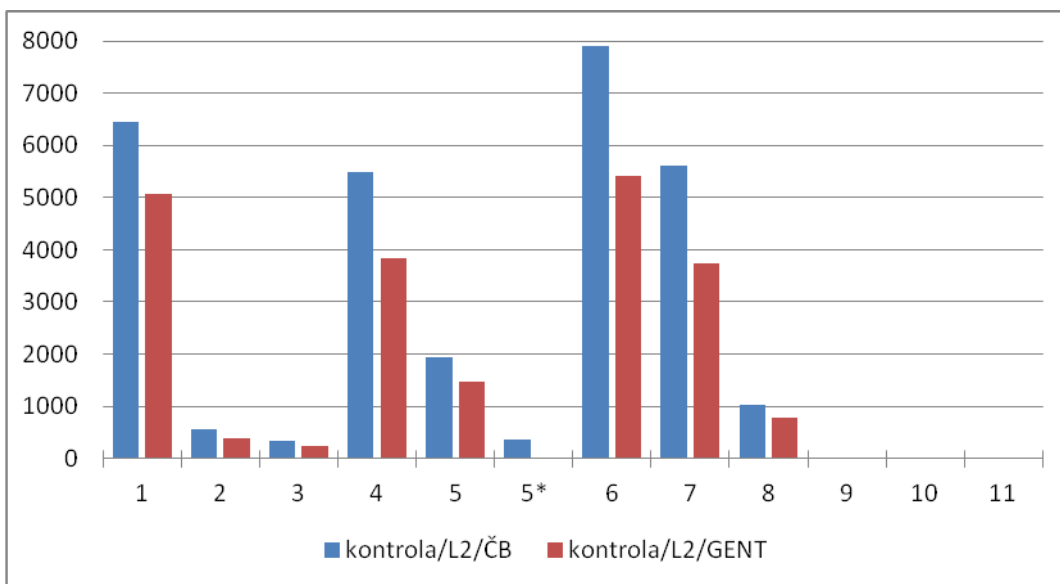
Tyto kombinace bakterií byly infiltrovány do rostlin již dříve transformovaných dvěma různými liniemi bakterií a to linií *Pap1* 1578/2 a *Pap1* 1578/4. Takto ošetřené rostliny byly rozděleny na varianty L2 (rostliny transformované *Pap1* 1578/2) a L4 (rostliny transformované *Pap1* 1578/4). Při odběru bylo u některých rostlin patrné modré zbarvení, zejména u linie L2.

Během detekce pigmentů bylo zjištěno celkem 12 piků, reprezentujících jednotlivé barevné metabolity zastoupené v transformovaných rostlinách. Rozdílné výsledky jsou způsobené rozdílnými pufrů použitými pro extrakci pigmentů. V laboratoři v Žatci byl použit pufr pro klasické chmelové polyfenoly, obdobně jako popisuje García-Villalba, et al. (2006), zatímco v laboratoři v Gentu byl použit pufr s kyselinou octovou pro antokyany. Tento postup odpovídá metodologii popsané v publikaci Knuthsen (1987). Pro detekci pigmentů byla použita kvantifikační vlnová délka 325 nm.

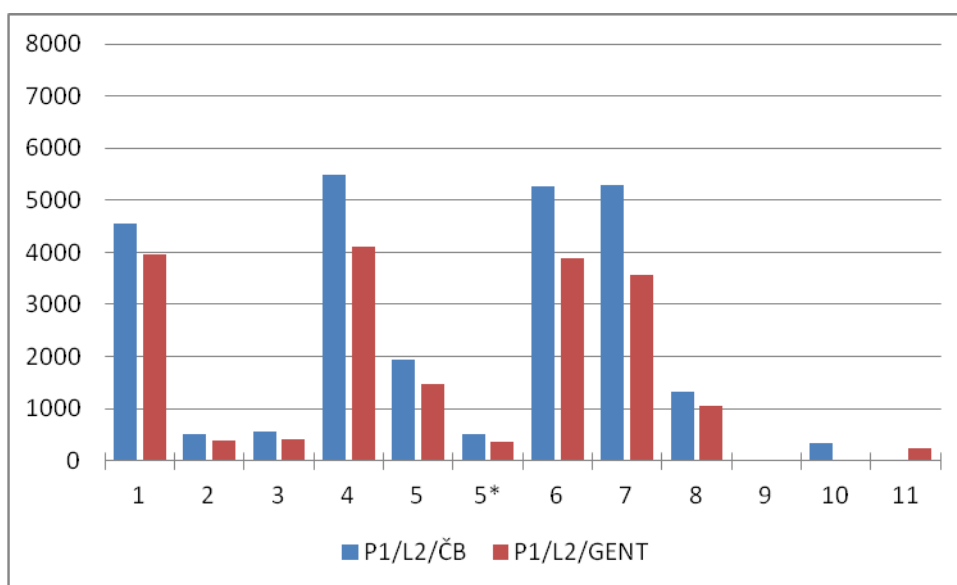
		Označení piku											
číslo vzorku	Označení vzorku	1	2	3	4	5	5*	6	7	8	9	10	11
1	kontrola/L2/ČB	6456	558	348	5494	1945	361	7906	5617	1036	-	-	-
2	P1/L2/ČB	4564	502	570	5499	1946	505	5264	5289	1326	-	339	-
3	P2/L2/ČB	2720	289	240	2525	817	251	5803	3921	1148	-	-	-
4	P3/L2/ČB	1117	248	359	2514	921	341	3408	4879	504	-	-	-
5	kontrola/L4/ČB	2019	-	316	6236	411	-	-	754	1047	1117	1615	-
6	P1/L4/ČB	-	36	142	576	293	222	385	1827	95	114	129	-
7	P2/L4/ČB	89	34	156	264	113	106	1297	1839	659	89	216	146
8	P3/L4/ČB	142	72	164	1505	448	372	265	1455	134	215	329	153
9	kontrola/L2/GENT	5081	393	239	3849	1470	-	5411	3745	785	-	-	-
10	P1/L2/GENT	3948	386	404	4114	1461	354	3891	3566	1044	-	-	231
11	P2/L2/GENT	2734	279	218	2404	786	225	5288	3238	1051	-	-	-
12	P3/L2/GENT	1105	228	295	2073	770	260	2744	3503	410	-	-	-
13	kontrola/L4/GENT	13524	561	-	6036	999	-	1344	903	6852	1001	1476	557
14	P1/L4/GENT	424	195	146	498	278	174	1112	1318	99	45	91	-
15	P2/L4/GENT	362	184	136	223	121	-	3348	1533	812	-	160	-
16	P3/L4/GENT	751	266	154	1225	483	282	912	1183	187	162	232	85

Tab. 1. Číselné hodnoty naměřené u jednotlivých barevných metabolitů u listů *Petunia*

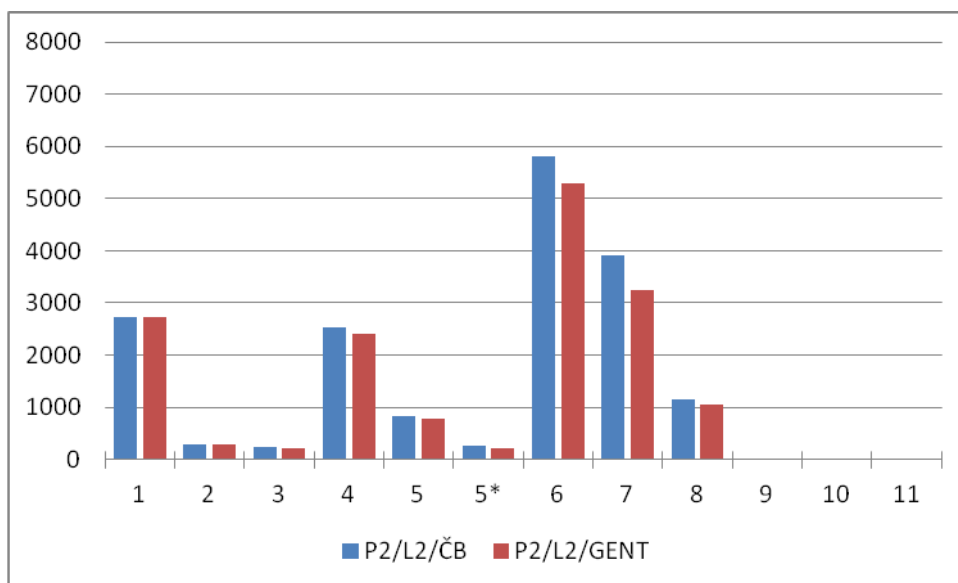




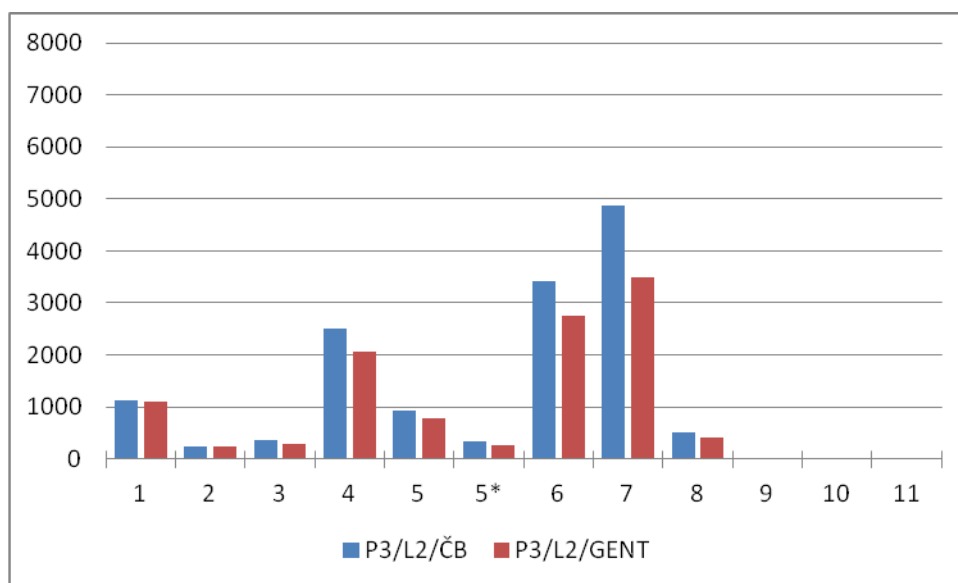
Graf 1. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404



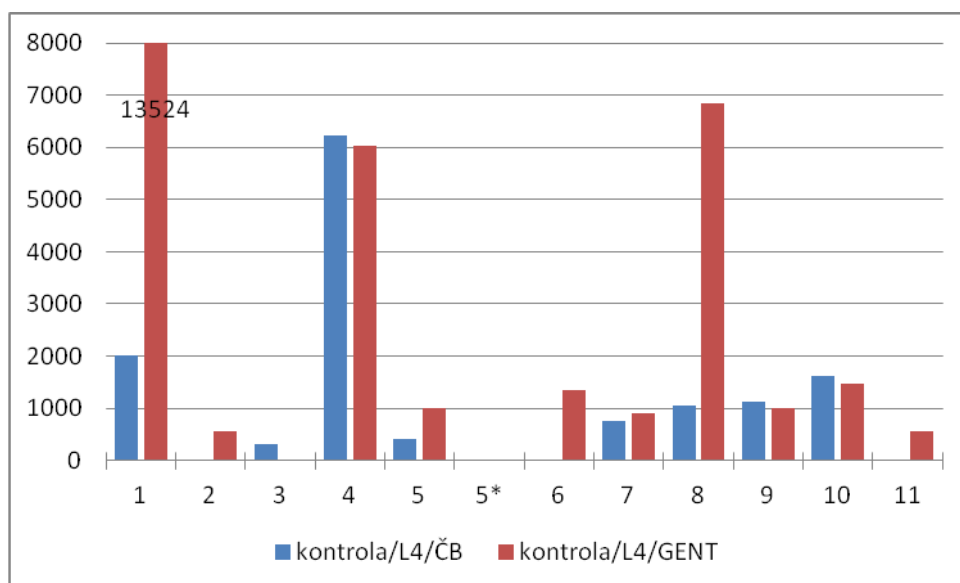
Graf 2. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + *WRKY* 1



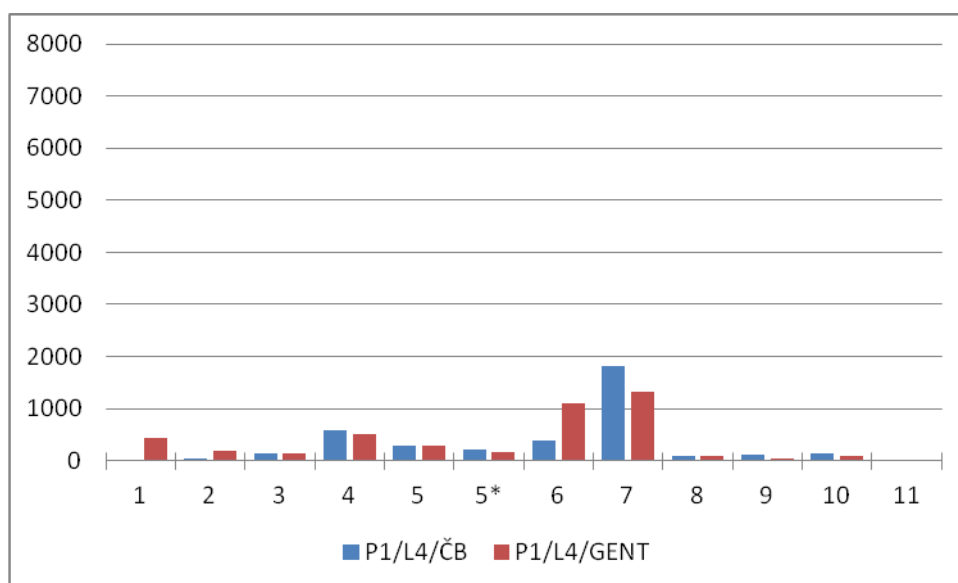
Graf 3. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + *WRKY1*+*WD40*



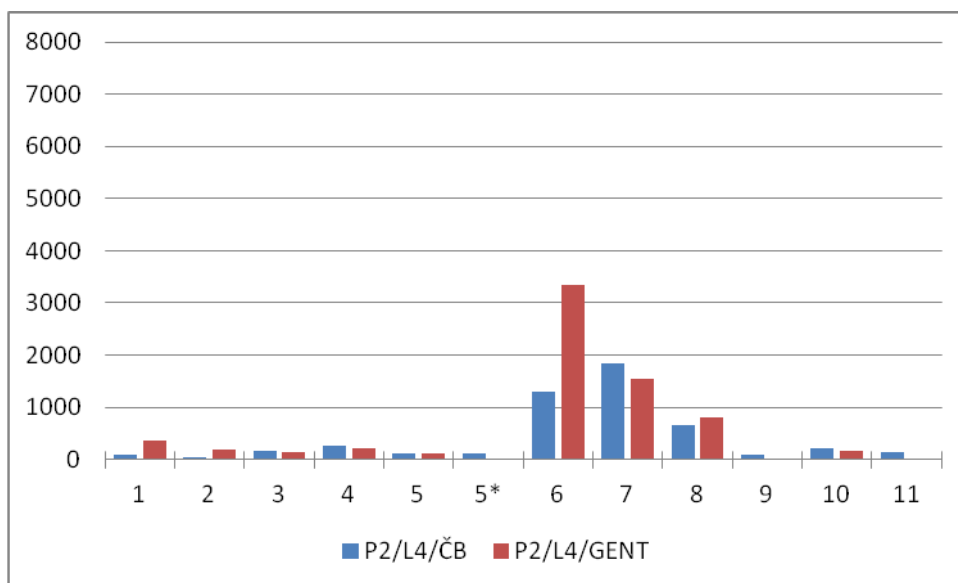
Graf 4. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů *P19* + *WRKY1*+*WD40*



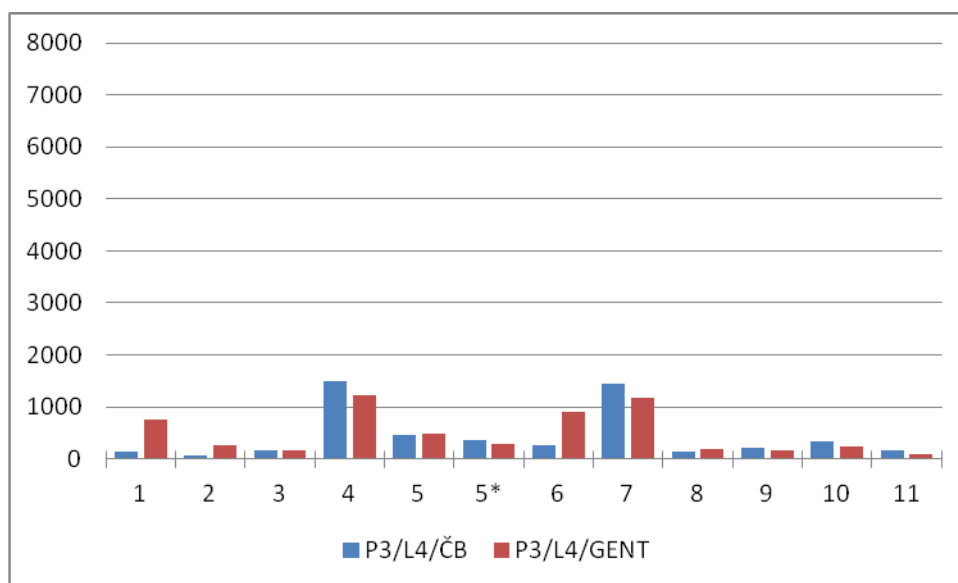
Graf 5. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404



Graf 6. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + *WRKY* 1



Graf 7. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + *WRKY1*+*WD40*



Graf 8. Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny *Pap1* 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů *P19* + *WRKY1*+*WD40*

Na výsledcích je patrný rozdíl mezi pufry použitými pro analýzu barevných pigmentů, a to anthokyanů a příbuzných metabolitů. Dále je na výsledcích patrné, že hodnoty naměřené u vzorků získaných z rostlin transformovaných konstruktem *Pap1* 1578/4 jsou ve většině případů výrazně nižší než hodnoty získané z rostlin transformovaných konstruktem *Pap1* 1578/2.

Dále z našich výsledků vyplývá nový a dosud nepopsaný fakt, že faktor *WRKY1*, který se specificky projevuje v lupulinových žlázkách chmelu (nepublikované výsledky laboratoře molekulární genetiky a Matoušek et al. (2012)) vede k supresi metabolomu indukovaného faktorem *Pap1*, tento fakt se projevuje při srovnání hladin metabolitu u obou transgenních linií (L2 a L4). Protože *Pap1* indukuje zejména produkci antokyanů a příbuzných metabolitů (Matousek, et al., 2006), je tento fakt konzistentní se zjištěním že u chmele transformovaného *Pap1* (Gatica-Arias, et al., 2012) nedošlo k produkci antokyanů v lupulinových žlázkách. Lze předpokládat, že k blokování antokyanů přispívá lupulin-specifický faktor *WRKY1*.

## 6. ZÁVĚR

Při této práci byla snaha získat transgenní rostliny *Petunia x hybrida* obsahující transgen *nptII* (gen pro kanamycinovou rezistenci) pomocí nepřímé transformace s využitím bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Pro tento účel byly použity konstrukty *HLWD40 3278-80*, *HLbHLH 3577* a *HLbHLH 3677* s *GFP*. Pro zjištění, zda byla transformace úspěšná, byla použita „tissue“ PCR a následná elektroforéza na agarovém gelu. Pro PCR byly použity rostliny nejlépe splňující podmínky, podle kterých by měly být úspěšně transformované. Zároveň proběhl pokus, jestli jsou transformované rostliny fertillní a na rostlinách vypěstovaných ze semen sklizených po křížení byla rovněž provedena „tissue“ PCR. Během transformace byly úspěšně získány regeneranty, na kterých byla provedena PCR pro ověření úspěšnosti transformace. Pomocí PCR bylo zjištěno, že 15 rostlin nese gen pro kanamycinovou rezistenci. Účinnost transformace byla 3,75%. U některých rostlin nesoucích kanamycinovou rezistenci se objevilo fialové zbarvení listů.

U pokusu infiltrací a následné analýzy pigmentů bylo zjištěno, že u rostlin transformovaných konstruktem *Pap1 1578/2* dochází k vyšší produkci antokyanů a jim příbuzných pigmentů než u rostlin transformovaných konstruktem *Pap1 1578/4*. Dále bylo zjištěno, že použití faktoru *WRKY1* způsobuje omezení produkce antokyanů.

## 7. LITERATURA

AIDA, R., KISHIMOTO, S., TANAKA, Y., SHIBATA, M. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Science*, 2000, 153(1), 33-42.

AL BABILI, S., BEYER, P. Golden Rice – five years on the road – five years to go? *Trends in Plant Science*, 2005, 10(12), 565-573.

ALBERT, N. W., LEWIS, D. H., ZHANG, H., IRVING, L. J., JAMESON, P. E., DAVIES, K. M. Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(7), 2191-2202.

BATISTA, D., SOUSA, M., PAIS, M. Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Bragança and var. Brewer's Gold. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 1996, 32(1), 37-41.

BECHTOLD, N., PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in molecular biology*, 1998, 82, 259-266.

BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(22), 8711-8721.

BEYER, P., AL-BABILI, S., YE, X., LUCCA, P., SCHAUB, P., WELSCH, R., POTRYKUS, I. Golden rice: Introducing the  $\beta$ -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *The Journal of nutrition*, 2002, 132(3), 506S-510S.

BHATNAGAR, M., PRASAD, K., BHATNAGAR-MATHUR, P., LAKSHMI NARASU, M., WALIYAR, F., SHARMA, K. K. An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, 2010, 29(5), 495-502.

BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Biology*, 1997, 48(1), 297-326.

BOIVIN, E. B., LEPAGE, E., MATTON, D. P., DE CRESCENZO, G., JOLICOEUR, M. Transient expression of antibodies in suspension plant cell suspension

cultures is enhanced when co-transformed with the tomato bushy stunt virus p19 viral suppressor of gene silencing. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(6), 1534-1543.

BOLCA, S., LI, J., NIKOLIC, D., ROCHE, N., BLONDEEL, P., POSSEMIERS, S., DE KEUKELEIRE, D., BRACKE, M., HEYERICK, A., VAN BREEMEN, R., DEPYPERE, H. Disposition of hop prenylflavonoids in human breast tissue. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 52(2), 284 - 294.

BOLCA, S., WYNS, C., POSSEMIERS, S., DEPYPERE, H., DE KEUKELEIRE, D., BRACKE, M., VERSTRAETE, W., HEYERICK, A. Cosupplementation of Isoflavones, Prenylflavonoids, and Lignans Alters Human Exposure to Phytoestrogen-Derived 17 beta-Estradiol Equivalents. *Journal of Nutrition*, 2009, 139(12), 2293 - 2300.

BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA Úvod*. Translated by Fellner, M., Beranová, I., Calábková, L., Divoká, M., Husičková, V., Janíková, M., Knapová, K., Křížová, K., Kubáňová, I., Kubátková, B., Musilová, M., Pivnička, J., Štembírková, J. Edition ed. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 389 p. ISBN 978-80-244-1719-6.

BURNIE, G., FORRESTER, S., GREIG, D., GUEST, S., HARMONY, M., HOBLEY, S., JACKSON, G., LAVARCK, P., LEDGETT, M., MCDONALD, R., MACOBOY, S., MOLYNEUX, B., MOODIE, D., MOOR, J., NEWMAN, D., NORTH, T., PIENAAR, K., PURDY, G., SILK, J., RYAN, S., SCHIEN, G. *Botanika*. Translated by Čížková, D. Edition ed.: Slovart, s.r.o., 2007. 659 p. ISBN 978-80-7209-936-8.

CARRER, H., HOCKENBERRY, T. N., SVAB, Z., MALIGA, P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, 241(1), 49-56.

CASTRO, O. A., ZORREGUIETA, A., IELMINI, V., VEGA, G., IELPI, L. Cyclic beta-(1,2)-glucan synthesis in Rhizobiaceae: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(20), 6043-6048.

CONSONNI, G., GEUNA, F., GAVAZZI, G., TONELLI, C. Molecular homology among members of the R gene family in maize. *The Plant Journal*, 1993, 3(2), 335-346.



DATTA, K., BAISAKH, N., OLIVA, N., TORRIZO, L., ABRIGO, E., TAN, J., RAI, M., REHANA, S., AL BABILI, S., BEYER, P. Bioengineered 'golden' indica rice cultivars with  $\beta$ -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant biotechnology journal*, 2003, 1(2), 81-90.

DE KEUKELEIRE, J., OOMS, G., HEYERICK, A., ROLDÁN-RUIZ, I., VAN BOCKSTAELE, E., DE KEUKELEIRE, D. Formation and accumulation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus Lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(15), 4436 - 4441.

DE VRIES, D. J., WACKERNAGEL, W. Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 1998, 257(6), 606-613.

DOLGOV, S., MITIOUCHKINA, T. Y., SKRYABIN, K. Agrobacterial transformation of *Chrysanthemum*. *Acta Horticulturae*, 1997, 329-334.

DOY, C. H., GRESSHOFF, P. M., ROLFE, B. G. Biological and molecular evidence for the transgenesis of genes from bacteria to plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(3), 723-726.

DUTT, M., LI, Z., DHEKNEY, S., GRAY, D. Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. "Thompson Seedless" via Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(12), 2101-2110.

EKLOF, S., ASTOT, C., SITBON, F., MORITZ, T., OLSSON, O., SANDBERG, G. Transgenic tobacco plants co-expressing Agrobacterium *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. *The Plant Journal*, 2000, 23(2), 279-284.

EL SAYED, M. M., OLAMA, Z. A., ALLAM, M. E. Structural studies of the exocellular polysaccharides of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium radiobacter*. *Carbohydrate Research*, 1983, 118(0), 195-203.

ELSINGHORST, E. A. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods in enzymology*, 1994, 236, 405-420.

ELZEN, P. J., TOWNSEND, J., LEE, K. Y., BEDBROOK, J. R. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant molecular biology*, 1985, 5(5), 299-302.

ESPLEY, R. V., HELLENS, R. P., PUTTERILL, J., STEVENSON, D. E., KUTTY-AMMA, S., ALLAN, A. C. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal*, 2007, 49(3), 414-427.

FELDMANN, K. A., DAVID MARKS, M. Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics MGG*, 1987, 208(1), 1-9.

GASSER, C. S., FRALEY, R. T. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*, 1989, 244(4910), 1293-1299.

GARCÍA-VILLALBA, R., CORTACERO-RAMÍREZ, S., SEGURA-CARRETERO, A., CONTRERAS, J. A. M.-L., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of hop acids and their oxidized derivatives and iso- $\alpha$ -acids in beer by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(15), 5400-5409.

GATICA-ARIAS, A., STANKE, M., BORN, U., ALDINGER, C., HOHNLE, M., FARAG, M., MATOUSEK, J., WESSJOHANN, L., WEBER, G. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(1), 111 - 119.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(1), 16-37, table of contents.

GERHAUSER, C., ALT, A., HEISS, E., GAMAL-ELDEEN, A., KLIMO, K., KNAUFT, J., NEUMANN, I., SCHERF, H., FRANK, N., BARTSCH, H., BECKER, H. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002, 1(11), 959 - 969.

GOFF, S. A., CONE, K. C., CHANDLER, V. L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development*, 1992, 6(5), 864-875.

GONG, Z. Z., YAMAGISHI, E., YAMAZAKI, M., SAITO, K. A constitutively expressed Myc-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molecular characterization, heterologous expression in transgenic plants and transactivation in yeast cells. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41(1), 33-44.

GROTEWOLD, E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(2), 138-144.

GRUBER, V., THEISEN, M. . Genetically modified crops as a source for pharmaceuticals. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 2000, 35, 357-364.

HENSEL, G., KASTNER, C., OLESZCZUK, S., RIECHEN, J., KUMLEHN, J. Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 2009.

HERRERA-ESTRELLA, A., VAN MONTAGU, M., WANG, K. A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of Agrobacterium VirD2 protein directs a beta-galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(24), 9534-9537.

HICHRI, I., BARRIEU, F., BOGS, J., KAPPEL, C., DELROT, S., LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 2011.

HILLE, J., VERHEGGEN, F., ROELVINK, P., FRANSSSEN, H., KAMMEN, A., ZABEL, P. Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant molecular biology*, 1986, 7(3), 171-176.

HOEKEMA, A., HOOYKAAS, P. J., SCHILPEROORT, R. A. Transfer of the octopine T-DNA segment to plant cells mediated by different types of Agrobacterium tumor- or root-inducing plasmids: generality of virulence systems. *Journal of Bacteriology*, 1984, 158(1), 383-385.

HOEKEMA, A., ROELVINK, P. W., HOOYKAAS, P. J., SCHILPEROORT, R. A. Delivery of T-DNA from the Agrobacterium tumefaciens chromosome into plant cells. *The EMBO Journal*, 1984, 3(11), 2485-2490.

HONORE, N., COLE, S. T. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1994, 38(2), 238-242.

HOOD, E. E., FRALEY, R. T., CHILTON, M.-D. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiology*, 1987, 83(3), 529-534.

HORLEMANN, C., SCHWEKENDIEK, A., HOHNLE, M., WEBER, G. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 2003, 22(3), 210 - 217.

HU, T., METZ, S., CHAY, C., ZHOU, H., BIEST, N., CHEN, G., CHENG, M., FENG, X., RADIONENKO, M., LU, F. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(10), 1010-1019.

CHAN, M. T., CHANG, H. H., HO, S. L., TONG, W. F., YU, S. M. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(3), 491-506.

CHEN, J., BEVERSDORF, W. A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88(2), 187-192.

CHILTON, M.-D., DRUMMOND, M. H., MERLO, D. J., SCIACKY, D., MONTOYA, A. L., GORDON, M. P., NESTER, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 1977, 11(2), 263-271.

CHIU, W.-L., NIWA, Y., ZENG, W., HIRANO, T., KOBAYASHI, H., SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 1996, 6(3), 325-330.

IYER, L. M., KUMPATLA, S. P., CHANDRASEKHARAN, M. B., HALL, T. C. Transgene silencing in monocots. *Plant Molecular Biology*, 2000, 43(2), 323-346.

JOERSBO, M., DONALDSON, I., KREIBERG, J., PETERSEN, S. G., BRUNSTEDT, J., OKKELS, F. T. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding*, 1998, 4(2), 111-117.

KASUGA, M., LIU, Q., MIURA, S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer

of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(3), 287-291.

KHANNA, H., DAGGARD, G. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(5), 429-436.

KLIMYUK, V. I., CARROLL, B. J., THOMAS, C. M., JONES, J. D. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *The Plant Journal*, 2011, 3(3), 493-494.

KNUTHSEN, P. Investigations on grape skin colours for the purpose of legislative regulation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1987, 184(3), 204-209.

KOUKOLIKOVA-NICOLA, Z., HOHN, B. How does the T-DNA of Agrobacterium tumefaciens find its way into the plant cell nucleus? *Biochimie*, 1993, 75(8), 635-638.

KŮDELA, V., NOVACKY, A., FUCIKOVSKY, L. *Rostlinolékařská bakteriologie*. Edition ed. Praha: Academia, 2002. 347 p. ISBN 80-200-0899-3.

LABAN, A., WIRTH, D. F. Transfection of Leishmania enriettii and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(23), 9119-9123.

LEDERBERG, J. Streptomycin resistance: a genetically recessive mutation. *Journal of bacteriology*, 1951, 61(5), 549-550.

LEE, L.-Y., GELVIN, S. B. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 2008, 146(2), 325-332.

LÖRZ, H., BAKER, B., SCHELL, J. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Molecular and General Genetics*, 1985, 199(2), 178-182.

MALOUKH, L., MATOUŠEK, J., VAN BOCKSTAELE, E., ROLDÁN RUIZ, I. Housekeeping gene selection for real time-PCR normalization in female hop (*Humulus lupulus* L) tissues. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 18(1), 53 - 58.

MATOUŠEK, J. "Transgenní metabolom chmelu, některé aspekty jeho přípravy a perspektivy využití. *Kvasný průmysl*, 2012, 58(1), 13-19.

MATOUŠEK, J., KOCÁBEK, T., PATZAK, J., FÜSSY, Z., PROCHÁZKOVÁ, J., HEYERICK, A. Combinatorial analysis of lupulin gland transcription factors from R2R3Myb, bHLH and WDR families indicates a complex regulation of chs\_H1 genes essential for prenylflavonoid biosynthesis in hop (*Humulus Lupulus L.*). *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1), 27.

MATOUŠEK, J., NOVÁK, P., BŘÍZA, J., PATZAK, J., NIEDERMEIEROVÁ, H. Cloning and characterisation of chs-specific DNA and cDNA sequences from hop. (*Humulus lupulus L.*). *Plant Science*, 2002, 162(6), 1007 - 1018.

MATOUŠEK, J., VRBA, L., ŠKOPEK, J., ORCTOVÁ, L., PEŠINA, K., HEYERICK, A., BAULCOMBE, D., DE KEUKELEIRE, D. Sequence analysis of a true chalcone synthase (ch\_H1) oligofamily from hop (*Humulus lupulus L.*) and PAPI activation of ch\_H1 in heterologous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20), 7606 - 7615.

MCCORMICK, S., NIEDERMEYER, J., FRY, J., BARNASON, A., HORSCH, R., FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 1986, 5(2), 81-84.

MERRIL, C. R., GEIER, M. R., PETRICCIANI, J. C. Bacterial virus gene expression in human cells. *Nature*, 1971, 233(5319), 398-400.

MILLAR, A. J., SHORT, S. R., CHUA, N.-H., KAY, S. A. A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *The Plant Cell Online*, 1992, 4(9), 1075-1087.

MIRANDA, C. L., STEVENS, J. F., HELMRICH, A., HENDERSON, M. C., RODRIGUEZ, R. J., YANG, Y. H., DEINZER, M. L., BARNES, D. W., BUHLER, D. R. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 1999, 37(4), 271-285.

NAGEL, J., CULLEY, L., LU, Y., LIU, E., MATTHEWS, P., STEVENS, J., PAGE, J. EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell*, 2008, 20, 186 - 200.

NAKATSUKA, T., HARUTA, K. S., PITAKSUTHEEPONG, C., ABE, Y., KAKIZAKI, Y., YAMAMOTO, K., SHIMADA, N., YAMAMURA, S., NISHIHARA, M. Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(12), 1818-1829.

NAKATSUKA, T., MISHIBA, K.-I., KUBOTA, A., ABE, Y., YAMAMURA, S., NAKAMURA, N., TANAKA, Y., NISHIHARA, M. Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(3), 231-237.

NOVÁK, P., KROFTA, K., MATOUŠEK, J. Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(1), 48 - 54.

OKADA, Y., ITO, K. Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(1), 150 - 155.

PAINE, J. A., SHIPTON, C. A., CHAGGAR, S., HOWELLS, R. M., KENNEDY, M. J., VERNON, G., WRIGHT, S. Y., HINCHLIFFE, E., ADAMS, J. L., SILVERSTONE, A. L. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(4), 482-487.

PASZKOWSKI, J., SHILLITO, R. D., SAUL, M., MANDAK, V., HOHN, T., HOHN, B., POTRYKUS, I. Direct gene transfer to plants. *The EMBO journal*, 1984, 3(12), 2717.

PAVLIKOVA, D., MACEK, T., MACKOVA, M., SURA, M., SZAKOVA, J., TLUSTOS, P. The evaluation of cadmium, zinc and nickel accumulation ability of transgenic tobacco bearing different transgenes. *Plant Soil Environ*, 2004, 50(12), 513-517.

PERMYAKOVA, N. V., SHUMNYI, V. K., DEINEKO, E. V. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. *Russian Journal of Genetics*, 2009, 45(3), 266-275.

RAMESSAR, K., PEREMARTI, A., GÓMEZ-GALERA, S., NAQVI, S., MORALEJO, M., MUNOZ, P., CAPELL, T., CHRISTOU, P. Biosafety and risk

assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Research*, 2007, 16(3), 261-280.

RAMSAY, N., GLOVER, B. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2), 63 - 70.

ROHRER, M., BŘUSKOVÁ, H., HANÁČEK, P., REINÖHL, V., PROCHÁZKA, S. INDUCTION OF VIRAL AND INSECTS RESISTANCE IN PEA THROUGH TRANSGENESIS.

ROMMENS, C. M., BOUGRI, O., YAN, H., HUMARA, J. M., OWEN, J., SWORDS, K., YE, J. Plant-derived transfer DNAs. *Plant Physiology*, 2005, 139(3), 1338-1349.

SENARATNA, T., MCKERSIE, B. D., KASHA, K. J., DOUGLAS PROCUNIER, J. Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells. *Plant Science*, 1991, 79(2), 223-228.

SHRAWAT, A. K., LORZ, H. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant biotechnology journal*, 2006, 4(6), 575-603.

SCHMIDT, R., WILLMITZER, L. High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(7), 583-586.

SCHWEKENDIEK, A., SPRING, O., HEYERICK, A., PICKEL, B., PITSCH, N. T., PESCHKE, F., DE KEUKELEIRE, D., WEBER, G. Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(17), 7002-7009.

SIMMONS, C. W., VAN DER GHEYNST, J. S. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors and beta-glucuronidase in harvested lettuce leaf tissue does not improve recombinant protein accumulation in planta. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(4), 641-645.

SNUSTAD, P. D., SIMMONS, M. J. *Genetika*. Translated by Doškař, J., Fajkus, J., Hořín, P., Knoll, A., Kuglík, P., Relichová, J., Šmarda, J., Šmardová, J., Veselská,



R., Vyskot, B., Matalová, A. Edition ed. Brno: Masarykova univerzita, Nakladatelství, 2009. 871 p. ISBN 978-80-210-4852-2.

SPARKES, I., RUNIONS, J., KEARNS, A., HAWES, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 2006, 1, 2019 - 2025.

SPELT, C., QUATTROCCHIO, F., MOL, J., KOES, R. ANTHOCYANIN1 of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *The Plant Cell*, 2002, 14(9), 2121 - 2135.

TAKENAKA, M., YAMAOKA, S., HANAJIRI, T., SHIMIZU-UEDA, Y., YAMATO, K. T., FUKUZAWA, H., OHYAMA, K. Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Transgenic research*, 2000, 9(3), 179-185.

TANAKA, Y., TSUDA, S., KUSUMI, T. Metabolic engineering to modify flower color. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39(11), 1119-1126.

TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(6), 178-184.

TSURUMARU, Y., SASAKI, K., MIYAWAKI, T., UTO, Y., MOMMA, T., UMEMOTO, N., MOMOSE, M., YAZAKI, K. HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 417, 393 - 398.

VERGUNST, A. C., SCHRAMMEIJER, B., DEN DULK-RAS, A., DE VLAAM, C. M., REGENSBURG-TUINK, T. J., HOOYKAAS, P. J. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 2000, 290(5493), 979-982.

WALDEN, R., WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration (techniques). *Trends in Biotechnology*, 1995, 13(9), 324-331.

WALDRON, C., MURPHY, E., ROBERTS, J., GUSTAFSON, G., ARMOUR, S., MALCOLM, S. Resistance to hygromycin B. *Plant molecular biology*, 1985, 5(2), 103-108.

YI, H., MYSORE, K. S., GELVIN, S. B. Expression of the Arabidopsis histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to Agrobacterium transformation. *The Plant Journal*, 2002, 32(3), 285-298.

ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 86(1), 109-127.

ZAMBRYSKI, P., JOOS, H., GENETELLO, C., LEEMANS, J., MONTAGU, M. V., SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 1983, 2(12), 2143-2150.

## 8. SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 .....	41
<b>Graf 2.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + <i>WRKY</i> 1.....	41
<b>Graf 3.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + <i>WRKY</i> 1+ <i>WD</i> 40 .....	42
<b>Graf 4.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/2 (L2) infiltrovaných pomocí konstruktů <i>P19</i> + <i>WRKY</i> 1+ <i>WD</i> 40 .....	42
<b>Graf 5.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 .....	43
<b>Graf 6.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + <i>WRKY</i> 1.....	43
<b>Graf 7.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů 4404 + <i>WRKY</i> 1+ <i>WD</i> 40 .....	44
<b>Graf 8.</b> Grafické porovnání hodnot získaných metabolitů naměřených v Žatci a v Gentu pro rostliny <i>Pap1</i> 1578/4 (L4) infiltrovaných pomocí konstruktů <i>P19</i> + <i>WRKY</i> 1+ <i>WD</i> 40 .....	44

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1.</b> Příklad rostliny pozitivní pro kanamycinovou rezistenci, u které se objevilo fialové zbarvení.....	35
<b>Obr. 2.</b> Výsledky analýzy Tissue PCR na gen <i>nptII</i> : A) Pořadí použitých vzorků (zleva doprava): Master Mix, negativní kontrola <i>Petunia</i> , pozitivní kontrola transgenní <i>Solanum lycopersicum</i> obsahující gen <i>nptII</i> , pozitivní kontrola plazmid (ředění 10), vzorky 1-7 a Marker; B) Pořadí použitých vzorků (zleva doprava): Master Mix,	

negativní kontrola *Petunia*, pozitivní kontrola transgenní *Solanum lycopersicum* obsahující gen *nptII*, pozitivní kontrola plazmid (ředění postupně 104, 105), vzorky 1-7 a Marker; C) Pořadí vzorků (zleva doprava): Master Mix, negativní kontrola, pozitivní kontrola plazmid (ředění 105), pozitivní kontrola transgenní *Solanum lycopersicum*, vzorky 1-3, 5, 7, 6, 8-12, Marker; D) Pořadí vzorků (zleva doprava): Master Mix, negativní kontrola *Petunia*, pozitivní kontrola *Petunia* (vzorek 5), kříženec, 13, 14, 15, 21, Marker; E) Pořadí vzorků (zleva doprava): Marker, negativní kontrola, pozitivní kontrola *Petunia* (vzorek 5), pozitivní kontrola plazmid (105), 2x kříženec, vzorky 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23; F) Pořadí vzorků (zleva doprava): Marker, 1 volná kolonka, Master Mix, negativní kontrola, pozitivní kontrola plazmid (105), pozitivní kontrola *Petunia* (vzorek 5), kříženec, vzorky 24-36. .... 36

**Obr. 3.** Další příklad rostliny pozitivní pro kanamycinovou rezistenci, u které se objevilo fialové zbarvení ..... 62

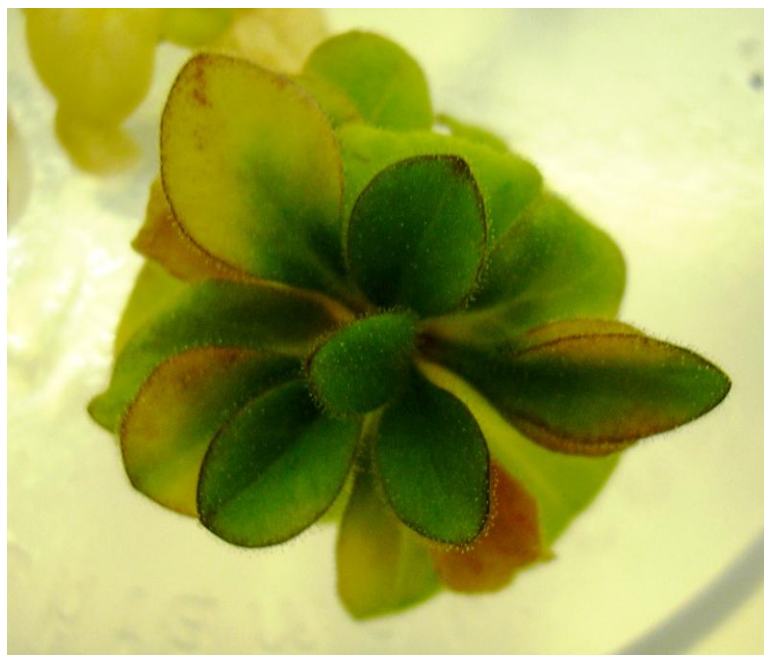
## 10. SEZNAM TABULEK

**Tab. 1.** Číselné hodnoty naměřené u jednotlivých barevných metabolitů u listů *Petunia* ..... 40

## 11. SEZNAM ZKRATEK

Bap	6-benzylaminopurin
BSA	albumin kravského séra (bovine serum albumine)
Cv	kultivar
GFP	green fluorescent protein
LK	Langley, Kado
MES	kyselina 2-(N-morpholino) ethansulfoniková
Ms	Murashige a Scoog
Naa	kyselina $\alpha$ – naftyloctová (naphthalenacetic acid)
<i>npt</i> II	gen kódující enzym neomycin-fosfotransferázu typ II.
PCR	polymerázová řetězová reakce
PVP	polyvinylpyrrolidon
Ri-plazmid	root inducing plazmid
T-DNA	transferová DNA
Ti-plazmid	tumor inducing plazmid

## 12.OBRAZOVÉ PŘÍLOHY



Obr. 3. Další příklad rostliny pozitivní pro kanamycinovou rezistenci, u které se objevilo fialové zbarvení