



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

**Aktuální otázky stanovení specifické DNA : možnosti efektivního využití při kontrole v zemědělství a potravinářství**

Ovesná, Jaroslava; Pouchová, Vladimíra  
2009

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-387413>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 02.12.2020

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://nusl.cz) .

**Aktuální otázky stanovení  
specifické DNA :  
možnosti efektivního využití  
při kontrole  
v zemědělství a potravinářství**



**11.12.2009,**

**VÚRV, v.v.i, Drnovská 507, Praha 6**

**Ed.: Ovesná J., Pouchová V.**  
**ISBN: 978-80-7427-014-7**

## Obsah:

|  |        |
|--|--------|
| <b>Úvod</b>  | str.3  |
| <b>Vzorkování pro potřeby stanovení GMO (Kučera L.)</b>  | str.4  |
| <b>DNA chipy pro stanovení GMO (Hodek J.)</b>  | str.7  |
| <b>Možnosti stanovení fusárií pomocí DNA chipu (Pavlátová L.)</b>  | str.11 |
| <b>Mydlice lékařská (<i>Saponaria officinalis</i> L.) jako možný genetický zdroj pro fytofarmaceutika (Pavlátová L., Kučera L., Ovesná J. )</b>      | str.14 |
| <b>Hodnocení genové exprese u <i>Allium</i> sp. pomocí Real-time PCR (Ovesná J. a kol.)</b>  | str.21 |
| <b>Hodnocení genové exprese pro zlepšení vlastností rostlinných druhů (Ovesná J., Janská A.)</b>   | str.24 |
| <b>Stanovení změny genové exprese <i>Arabidopsis thaliana</i> působením 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) (Štrýmplová Šťastná K., Ovesná J., Honys D.)</b> | str.27 |
| <b>Aktuální otázky stanovení GMO (Ovesná J., Pouchová V.)</b>  | str.33 |

# Úvod

Výzkum genetické variability hospodářsky významných plodin přináší nové možnosti ve zlepšování jejich biologického potenciálu.

Pro tvorbu skutečně kvalitních genotypů adaptovaných na prostředí určených pro tradiční výrobu potravin i alternativní využití je třeba znát genetické založení vybraných znaků, polymorfismus kódujících sekvencí i znalosti o transkripci genů, reagujících na podmínky prostředí. Využívá se řada technik jakými jsou analýza délkového polymorfismu mikrosatelitů nebo AFLP jako základního nástroje pro určení míry diversity genetických zdrojů určité plodiny, klonování a sekvenování genů významných metabolických drah rostlin. Využívá se Real-Time PCR jak pro hodnocení alelomorfismu, tak pro kvantifikaci genů a transkriptů. Transkripce je hodnocena i pomocí DNA čipů. Tyto informace vedou k přípravě markerů, které umožňují snadnou selekci genotypů s požadovanou sadou genů a tím urychlují šlechtění nových odrůd.

Tento seminář byl věnován možnostem některých postupů, jejich využitím pro charakterizaci genů a genové exprese u významných plodin jakými jsou pšenice a ječmen, ale také minoritních plodin typu česneku a konopí, kde není dostatek dostupných dat o sekvenci genů, jako je tomu u jiných zejména modelových organismů.

Rovněž byly ukázány praktické aplikace získaných výsledků a postupy vzorkování.

# Vzorkování pro potřeby stanovení GMO

Kučera L.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

e-mail: [kuceral@vurv.cz](mailto:kuceral@vurv.cz)

## Abstrakt

V současné době neexistují na mezinárodní úrovni jednotné postupy vzorkování pro stanovení přítomnosti GMO. Kompletní sestavy postupů vzorkování zajišťující možnost kontrol v jednotlivých klíčových bodech potravního řetězce nejsou zavedeny v řadě zemí ani na národní úrovni. Částečně jsou pokryty jen vybrané oblasti (například osiva), nebo produkty (zrniny, potraviny), zcela chybí například mezinárodní normy na vzorkování rostlin v produkčních porostech zemědělských plodin, aby bylo plně zajištěno naplňování směrnic a nařízení Evropské unie. Významné dopady na možnost kontroly dodržování legislativních norem má doposud nepřijetí limitů pro nezáměrnou přítomnost GMO v osivech, nebo nezavedení tzv. "technické nuly", pro rozhodování správních orgánů. Pro návrh postupů vzorkování při kvantitativním stanovení GMO je vhodné použít aplikaci SeedCalc8, která umožňuje exaktní posouzení dosažených limitů spolehlivosti pro zvolené hladiny GMO.

## Úvod

Jedním z klíčových míst pro věrohodné provádění úředních kontrol je fáze odběru vzorků. Správná aplikace metodologie vzorkování pro účely stanovení přítomnosti GMO, nebo jejich částí v produktech je nezbytná pro zajištění požadavků kontroly dodržování legislativních opatření vztahujících se k nakládání s GMO a zabezpečujících dohledatelnost GMO v potravním řetězci a sledování výskytu GMO v životním prostředí. Základní pravidla k právním předpisům týkajícím se krmiv a potravin jsou stanovena v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002. Obecná a základní pravidla pro odběr vzorků lze pak nalézt v kapitole III. Odběr vzorků a analýza, článku 11 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat. Základem pro vzorkování jsou postupy, které pro tyto účely zpracovala mezinárodní organizace ISTA (podle doporučení 2004/787/ES). Pro potřeby sestavování vzorkovacích plánů je možnost využít i vytvořenou a na stránkách ISTA dostupnou softwarovou aplikaci, která nabízí řadu alternativních přístupů. Problematickým bodem je výskyt nepovolených genetických modifikací v partiích osiv, kdy jsou v různých státech nastaveny rozdílné přístupy pro jejich tolerování

Metodologie vzorkování je většinou postavena na předpokladech o distribuci kontaminantů. Většina postupů vzorkování je neefektivních v případě nenáhodné distribuce. V případě hromadných komodit (například zrnin) je rozložení GM ovlivněno segregací částic během dopravy a nakládání. Vhodnost řady postupů zůstává problematickou, protože neuvažují specifika detekce nízkých úrovní kontaminace. Některé z postupů jsou explicitně sestaveny na základě statistického posouzení vzorkování. Většina postupů poukazuje na skutečnost, že nejsou účinné pro vzorkování při nenáhodné distribuci.

Pro všechny postupy platí: Hledané identifikovatelné části (např. GM zrna) jsou náhodně rozptýleny v dodávce, což předpokládá, že například každé individuální zrno v dodávce má

stejnou pravděpodobnost, že bude vybráno v procesu vzorkování. Tento předpoklad například umožňuje operovat s modelem binomického nebo Poissonova rozdělení.

## Materiál a metody

a) Výpočet potřebné velikosti vzorku semen při jednorázovém vzorkování:

$$n = \frac{\log(1-(G/100))}{\log(1-(P/100))}$$

- n velikost vzorku (počet zrn)
- G pravděpodobnost (%) pozitivního vzorku
- P % GMO

b) Výpočet potřebné velikosti vzorku semen při jednorázovém vzorkování pomocí postupu na základě předpokladu Poissonovy distribuce četností výskytu GMO ve vzorcích:

Východiska: četnost výskytu GMO, nebo transgenu lze charakterizovat Poissonovou distribucí četností (v případě, že se jedná o malé podíly GMO ve vzorcích)

průměr:  $m = 25$

aby bylo zajištěno, že v souboru bude min 25 částic (GMO, zrn, sekvencí transgenu) při 95% jistotě, je třeba odebrat vzorek u něhož je průměrný výskyt 35 částic

$$P(x > 25 | \mu = 35) = 0.95$$

Pro detekci 1% je ve vzorku o 3500 semenech

35  $\pm$  12 GMO pozitivních (tj.  $\pm$ 34 %), (95% interval spolehlivosti)

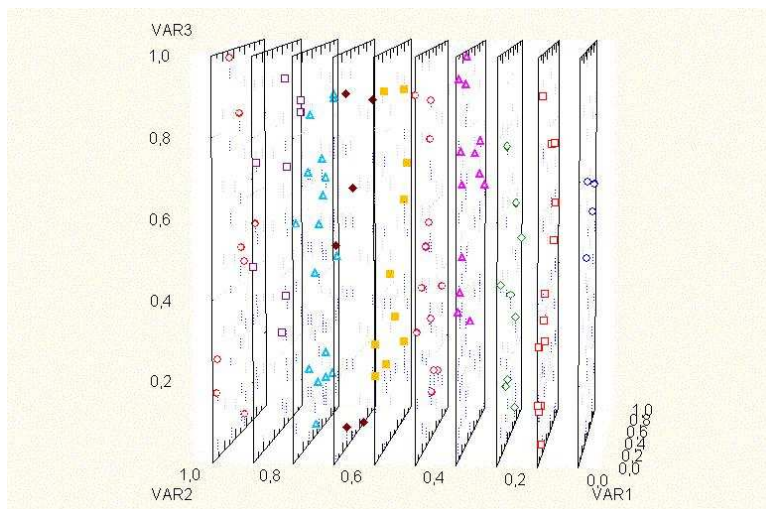
Poznámka: Tyto předpoklady však jsou platné jen v případě zcela homogenních vzorků (Hubner P., 2000).

c) simulace distribuce GMO ve vzorcích (EXCEL, Statistica)

d) návrh a porovnání alternativních vzorkovacích postupů pomocí aplikace SeedCalc8

## Výsledky a diskuse:

Výsledky simulace rozdělení GMO dokumentují, že k velkým rozdílům v obsahu GMO dochází i za předpokladu rovnoměrné distribuce v čase i prostoru a nezávislosti výskytů (viz obr. 1).



**Přístup aplikovaný v rámci 2004/787/ES**

Protokol o odběru vzorků je založen na dvoustupňovém postupu, který v nezbytných případech umožňuje získat odhady úrovně výskytu GMO spolu s tím spojenou nejistotou vyjádřenou jako směrodatná odchylka, aniž by vyvozoval jakékoli domněnky týkající se možné heterogenity GMO.

Aby byly možné odhady SO, měl by být v první řadě získán souhrnný vzorek a odvozený analytický vzorek by měl být analyzován na výskyt geneticky modifikovaných materiálů.

Pokud je získaný analytický výsledek blízko stanovené prahové hodnotě ( $\pm 50\%$  jeho hodnoty), doporučuje se analýza jednotlivých vzorků k archivaci, čímž by se získala míra spojené nejistoty.

## Porovnání tolerančních mezí

Příklady výsledků simulací ukázaly význam velikosti vzorku a intenzity vzorkování pro dosažení odpovídajících limitů spolehlivosti, zvláště pro oblast tolerančního limitu 0,1%.

| Impurity Estimation & Confidence Intervals (Assay measures impurity)<br>(Number of seed sampled should not exceed 10% of total number in population) |  | Impurity Estimation & Confidence Intervals (Assay measures impurity)<br>(Number of seed sampled should not exceed 10% of total number in population) |  |
|--|--|--|--|
| # of Seed Pools  | 3  | # of Seed Pools  | 3  |
| # of Seeds per Pool  | 1000   | # of Seeds per Pool  | 1000   |
| Total Seeds Tested   | 3000   | Total Seeds Tested   | 3000   |
| # Deviants Pools   | 0  | # Deviants Pools   | 1  |
| Computed % in sample   | 0,00 %   | Computed % in sample   | 0,04 %   |
| Desired Confidence Level   | 95 %   | Desired Confidence Level   | 95 %   |
| Upper Bound of True % Impurity   | 0,10<br><small>(95% confident that the lot impurity is below 0.1%)</small> | Upper Bound of True % Impurity   | 0,20<br><small>(95% confident that the lot impurity is below 0.2%)</small> |
| 2-sided CI for True % Impurity   | 0,00 to 0,12   | 2-sided CI for True % Impurity   | 0,00 to 0,24   |
| Lower Bound of True % Purity   | 99,90<br><small>(95% confident that the lot purity is above 99.9%)</small> | Lower Bound of True % Purity   | 99,80<br><small>(95% confident that the lot purity is above 99.8%)</small> |
| 2-sided CI for True % Purity   | 99,88 to 100,00  | 2-sided CI for True % Purity   | 99,76 to 100,00  |

## Závěr

Volba strategie vzorkování a metodologie vzorkování pro stanovení přítomnosti genetických modifikací u oblasti kontroly agrárních produktů je základním klíčem k získání reprezentativních dat. Pro výběr vzorkovacích postupů při zachování potřebné míry dosahovaných limitů spolehlivosti stanovení přítomnosti GMO pomocí kvalitativních zkoušek je aplikace programu SeedCalc8 plně využitelná. Výsledky simulací a modelové studie dokumentují, že výzkum a vyhodnocování vhodnosti jednotlivých přístupů je nezbytným předpokladem pro omezení chybných interpretací výsledků kontrolní činnosti pověřených dozorových orgánů v členských zemích EU. Na republikové úrovni je nezbytné harmonizovat přípravu vzorkovacích plánů v rámci dozorových orgánů a kontrolních laboratoří pro stanovení GMO. Akceptovat jednotné úrovně hodnot statistické tolerance, především pro hodnoty nižší než 0,1%.

**Poděkování** Práce je podporována Ministerstvem zemědělství ČR VZ : MZe 0002700604.

## Literatura

- Paoletti C, Donatelli M, Kay S, Van den Eede G (2003) Simulating kernel lot sampling: the effect of heterogeneity on the detection of GMO contaminations. *Seed Sci Technol* 31:629–638
- Paoletti C, Heissenberger A, Mazzara M, Larcher S, Grazioli E, Corbisier P, Hess N, Berben G, Lubeck PS, De Loose M, Moran G, Henry C, Brera C, Folch I, Ovesna J, Van den Eede G (2006) Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *Eur Food Res Technol* 224:129–139
- Remund K. M., Dixon D. A., Wright Deanne L. and Holden L. R. (2001) Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research* 11, 101–119
- 2004/787/ES: Doporučení Komise ze dne 4. října 2004 o technických pokynech pro odběr vzorků a detekci geneticky modifikovaných organismů a materiálu vyrobeného z geneticky modifikovaných organismů nebo produktů s jejich obsahem podle nařízení (ES) č. 1830/2003



# DNA čipy pro stanovení GMO

Hodek J.<sup>1</sup>, Ovesná J.<sup>1</sup>, Demnerová K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

<sup>2</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

e-mail: [hodek@vurv.cz](mailto:hodek@vurv.cz)

## Abstrakt

Nakládání s Geneticky modifikovanými organismy (GMO) je v rámci EU legislativně upravováno na národní i evropské úrovni. Po kontrolních laboratořích je požadována schopnost v testovaných vzorcích GMO detekovat, kvalitativně určit a případně kvantifikovat. Nejvíce rozšířenou metodou pro analýzu GMO je PCR. Vzhledem k celosvětovému nárůstu počtu GMO a vzniku komplexnějších transgenních konstruktů může být PCR analýza některých složitějších případů zdlouhavá.

Z těchto důvodů jsme se zaměřili na vývoj vysokokapacitních DNA čipů pro GMO skrínig.

## Úvod

Čipové (angl. Arrays) techniky jsou rychle se rozšiřující oblastí, používanou k analytickým účelům v různých oborech molekulární biologie či medicíny.

Podstatou technologie čipů pro molekulární biologii je pevný nosič, jehož povrch je osazen velkým množstvím molekul, úseků molekul, funkčních domén apod., které nazýváme sondami a které slouží jako pátrače po částech vyšetřovaného vzorku, se kterými jsou za daných podmínek vytvořit vazbu. Tyto sondy za vhodných reakčních podmínek interagují s vyšetřovaným vzorkem tak, že s ním vytvoří vazebný komplex. Výsledek analýzy, tzn. vazebný komplex vzorku se specifickou sondou, je pak po odstranění nenavázaných částí vzorku detekován v závislosti na použitém značení vyšetřovaného vzorku.

V některých aplikacích se využívá reverzního formátu analýzy, kdy je pevný nosič osazen vyšetřovaným vzorkem, který interaguje se souborem značených sond. Společným jmenovatelem technologie je vysoce kapacitní přístup k analýze vzorků.

Příkladem komerčně využívaných čipových technologií jsou tkáňové čipy (Tissue Arrays), čipy osazené protilátkami (Antibody Arrays), bílkovinné čipy (Protein Arrays), buněčné čipy (Cell Arrays) nebo DNA čipy (DNA arrays). Jednotlivé typy čipů se liší jak svým zaměřením jak z hlediska analyzované části organismu, tak z hlediska rozdílného typu molekul, které jsou cílem analýzy (Kononen a kol. 1998; Uetz a kol. 2000; Stoevesandt a kol. 2009).

## **DNA čipy**

DNA čipy, nebo také DNA microarrays, jsou tedy vysoce kapacitní technologií, která je využívána pro analýzu DNA nebo RNA. To znamená, že pevný nosič (nejčastěji sklíčko, často s chemicky upraveným povrchem) je osazen různě dlouhými úseky DNA (od oligonukleotidů o délce cca 25-60 bp po PCR produkty o délce až stovek bp), které slouží k vyšetření DNA sekvence analyzovaného vzorku.

Po nanesení vyšetřované DNA na podložní sklo osazené DNA sondami (DNA čip), během optimalizovaných reakčních podmínek, dojde v případě komplementarity k reasociaci denaturovaných vláken DNA sondy a vyšetřovaného vzorku. Po odmytí nenavázaných vláken DNA lze výsledek hybridizace (tzn. reasociace DNA sondy a vyšetřovaného vzorku) vizualizovat v případě, že byla DNA vyšetřovaného vzorku před vlastním nanesením na čip vhodným způsobem označena. V praxi se v současné době nejčastěji využívá fluorescenční značení DNA nebo značení biotinem. Při fluorescenčním značení DNA se detekce provádí ozářením DNA čipu laserem v konfokálním fluorescenčním skeneru. Při značení biotinem je výsledkem, po proběhnutí dalších dílčích reakcí, precipitace stříbrných solí. Detekce pak probíhá ve skeneru pro kolorimetrickou detekci stříbrných částic.

Hlavní výhodou čipových technik je, jak už bylo zmíněno, jejich vysokokapacitní přístup k analýze. U DNA čipů to znamená, že je možno během jedné analýzy vyšetřit neznámý vzorek DNA nebo cDNA z hlediska přítomnosti až stovek tisíců specifických DNA sekvencí. Nejčastěji jsou v praxi DNA čipy využívány v humánní medicíně, kde slouží např. jak pro výzkum genetického základu vybraných nemocí, tak i pro jejich diagnostiku a predikci vývoje stavu pacienta.

Ve spojení s výzkumem v zemědělství jsou DNA čipy nejčastěji využívány při analýzách genové exprese, a to především pro porovnávání exprese genů při vystavení organismu různým stresovým podmínkám. Tyto experimenty slouží hlavně k poznání genů, které jsou zahrnuty v alternativních metabolických drahách, aktivovaných daným stresovým podnětem.

## **DNA čipy pro analýzu GMO**

Geneticky modifikované organismy (Genetically Modified Organisms) jsou sledovanou složkou v zemědělských produktech a potravinách z nich odvozených.

Produkce GMO ve světovém měřítku neustále roste (GMO Compass; Clive 2009). Mezi nejvíce využívané a rozšířené GM plodiny patří sója odolná k herbicidu RoundUp, kukuřice odolné k herbicidům a hmyzím škůdcům (Bt kukuřice), dále pak obdobně geneticky

modifikované bavlníky a řepky. V členských zemích Evropského společenství je povoleno pěstovat pouze Bt kukuřici MON810, další plodiny jsou uvolněny do prostředí pouze pro experimentální účely na národních úrovních. Další GMO jsou do EU importovány v souladu s nařízením Evropské komise 1829/2003. Nakládání s GMO je v rámci EU tedy řízeno zákony na národní i Evropské úrovni. GMO a z nich odvozené produkty musí být v EU značeny. Výjimkou jsou náhodné příměsi schválených GMO až do výše 0,9%. Příměsi GMO v EU neschválených jsou nepovolené. Přesto již došlo k záchytu některých nepovolených kontaminací.

Na kontrolních laboratořích, které jsou zřízeny pro analýzy GMO, je požadována schopnost GMO v testovaných vzorcích detekovat, kvalitativně určit a případně kvantifikovat. Asi nejrozšířenější metodou pro analýzu GMO je PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce) (Michelini a kol. 2008).

Obecnou kvalitu kontrolních laboratoří pomáhá harmonizovat referenční laboratoř EU při JRC (Joint Research Centre) Ispra, která validuje metody pro kontrolu jednotlivých GM událostí ve spolupráci s mezinárodní sítí laboratoří zabývajících se analýzami GMO (ENGL-European Network of GMO Laboratories).

Při hledání přítomnosti GMO ve vzorku nebo pro potvrzení přítomnosti určitých genů z transgenní kazety (regulační úseky, pomocné geny, vlastní geny zodpovědné za novou vlastnost) při určování GMO může hledání daných specifických sekvencí DNA po jednotlivých PCR zkouškách složité a zdlouhavé.

V naší práci jsme se zaměřili na možnost využití DNA z hlediska přítomnosti transgenní sekvence kapacitnější metodou DNA čipů.

DNA čipy pro analýzu GMO v rostlinách a odvozených produktech je již validována a distribuována fy. Eppendorf. Jejich produkt DualChips je založen na spojení DNA čipů s PCR preamplifikačním krokem, který zajistí dostatečné množství cílového analytu pro DNA microarrays (Leimanis a kol. 2006). V literatuře byly uvedeny i další práce na téma DNA čipů pro analýzu GMO ve spojení s preamplifikačním krokem multiplexové PCR (Xu a kol. 2007). Hlavním cílem naší práce je vývoj DNA čipů pro analýzu GMO v rostlinách a odvozených produktech bez použití PCR amplifikačního kroku. Chen a kol. (2006) uvádí metodu pro detekci transgenních rajčat, brambor a dalších plodin, založenou na hybridizaci celogenomové DNA na DNA čipu osazeném cDNA sondami. Pro zajištění dostatečné citlivosti systému je však nutné disponovat dostatečným množstvím templátové DNA.

V předchozích experimentech jsme testovali relativní citlivost DNA čipu, kde sondy byly naspotované PCR produkty. Citlivost čipu byla testována metodou hybridizace ředící řady

značeného PCR produktu. Minimální navážka cílové templátové DNA, kterou byl schopen DNA čip spolehlivě detekovat, byla 50 ng DNA. S takovouto citlivostí DNA čipu by bylo potřeba například pro zachycení kontaminace GM kukuřice na hladině 0,1% nanést na čip minimálně 50 µg templátové DNA, což při hmotnosti haploidního kukuřičného genomu 2,725 pg (Arumuganathan & Earle 1991) odpovídá 18.348.624 kopiím DNA.

Práce bude následovat testováním zmnožení templátové DNA pomocí random primerů během izotermické reakce s Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I. Tento postup je jednodušší na provedení než PCR a nevyžaduje použití termálního cykléru pro PCR. Navíc dojde ke zmnožení celé genomové DNA a ne jen určitých vybraných úseků, jak je tomu u PCR při použití specifických primerů.

**Poděkování :** Práce je podporována Ministerstvem zemědělství ČR jako projekt č. 1B44068 a MZe 0002700604.

## Literatura

- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Mol Biol Reporter* 9: 208-218.
- Chen TL, Sanjaya, Prasad V a kol. (2006) Validation of cDNA microarray as a prototype for throughput detection of GMOs. *Botanical Studies* 47: 1-11.
- Clive J (2009): <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/pptsides/default.asp>
- [http://www.gmo-compass.org/eng/grocery\\_shopping/crops/](http://www.gmo-compass.org/eng/grocery_shopping/crops/)
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A a kol. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4:844-847.
- Leimanis S, Hernandez M, Fernandez S a kol. (2006) A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Molecular Biology* 61: 123-139.
- Michelini E, Simoni P, Cevenini L a kol. (2008) New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Anal Bioanal Chem* 392: 355-367.
- Stoevesandt O, Taussig MJ, He M (2009) Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics. *Expert Rev Proteomics* 6, 2:145-157.
- Uetz P, Giot L, Cagney G a kol. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* more options. *Nature* 403, 6770: 623-627.
- Xu J, Miao H, Wu H a kol. (2006) Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosens Bioelectron* 22 (1): 71-77.

# Možnosti stanovení Fusárií pomocí DNA čipu

Pavlátová L., Ovesná J., Hodek J., Novotný D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

e-mail: [pavlatova@vurv.cz](mailto:pavlatova@vurv.cz)

## Abstrakt

Určování druhů Fusárií klasickými metodami je založeno například na rychlosti růstu kolonií, použitém kultivačním médiu, pigmentaci kolonie a na výskytu charakteristických morfologických znaků určitého kmene. Tento přístup je zdlouhavý, neboť trvá týdny než jsou Fusaria nakultivovány a také nejistý, protože se občas charakteristické morfologické znaky nevytvoří, jsou nejednoznačné atp. Proto jsme se zaměřili na identifikaci kmenů Fusárií molekulárně-biologickými metodami tedy pomocí DNA čipu, neboť tento přístup je rychlejší a podle našich zkušeností i přesnější.

## Úvod

Fusaria patří mezi Ascomycota (houby vřeckovýtrusé), jsou to rostlinné patogeny, které napadají například kukuřici, rýži, čirok, proso, oves, luštěniny, pšenici, ječmen, banány.....Celosvětově snižují kvalitu i kvantitu úrody a jsou tak ve středu zájmu mnohých vědeckých skupin. Největší nebezpečí Fusárií spočívá v produkci širokého spektra vysoce toxických mykotoxinů, jejich tolerovaný denní příjem stanovený Evropskou Unií kolísá od 0,06 µg/kg tělesné hmotnosti (T-2 a HT-2 toxin) do 1 µg/kg tělesné hmotnosti (zearalenon). Určení druhu Fusaria dovolí odhadnout jaké druhy mykotoxinů se budou vyskytovat ve vzorku pšenice.

Cílem naší práce bylo připravit DNA čip pro detekci Fusárií produkující trichothecen a moniliformin, testovat DNA čip na ověřených sbírkových kmenech (*F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. poae*). Tyto kmeny byly vybrány, protože se v české republice vyskytují nejvíce. Dalším krokem bylo vyzkoušení DNA čipu na vzorcích zrn pšenice napadené Fusariem.

## Materiál a metody

Materiál

Patnáct sbírkových kmenů třech druhů Fusárií : *F. graminearum*- 5 kmenů, *F. culmorum*-5 kmenů a *F. poae*-5 kmenů. Dále byly použity vzorky zrn pšenice kontaminované Fusariem.

#### Izolace DNA

Izolace DNA z houbových mycelií byla provedena modifikovanou CTAB metodou (*Leisova et al 2005*), DNA z infikované pšenice byla izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo)

#### Příprava DNA čipu

Pro přípravu DNA čipu jsme použili aldehydovaná skla a oligonukleotidové sondy modifikované na 5'konci primární aminoskupinou. Sekvence sond byly převzaty z literatury (*Kristensen et al 2007*).

Před vlastním použitím byl čip prehybridizován, aby došlo k zablokování volných aldehydových skupin a k odmytí nenavázaných oligonukleotidových sond.

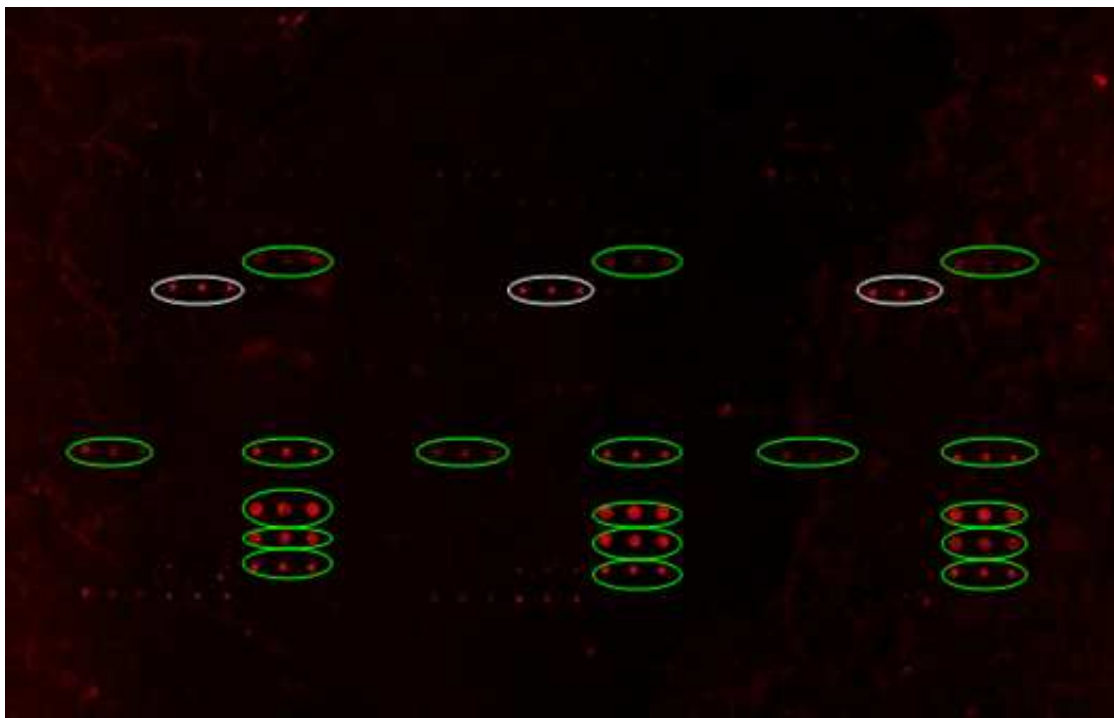
#### Hybridizace značené PCR s DNA čipem

Pro hybridizaci s DNA čipem jsme použili značený PCR produkt. Amplifikace variabilní části Translačního elongačního faktoru 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) byla zajištěna s pomocí degenerovaných univerzálních primerů (*O'Donnell et al 1998*). Velikost amplifikovaného úseku byla 700 bp. PCR byla značena fluorescenční barvou Cy5 (Alexa5) nebo Cy3 (Alexa3) s pomocí značící PCR nebo dodatečným naznačením obyčejné PCR s použitím kitu BioPrime Total Genomic Labeling System (Invitrogen, USA).

Hybridizace probíhala při 55 °C 2 hodiny. Nenavázaná DNA byla následně odmyta a sklo naskenováno v laserovém skeneru GenePi 400a Microarray scanner (MDS, Inc., USA).

#### Výsledky

Získané výsledky ukazují, že DNA čip je vhodný pro detekci *F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. poae*. V jednom případě ověřeného sbírkového kmenu *F. graminearum* nedošlo k získání pozitivního hybridizačního signálu sond specifických pro *F. graminearum*. Sekvenací bylo potvrzeno, že v sekvenci skutečně nejsou a jedná se o *F. culmorum*.



Obrázek 1. Hybridizační signál DNA čipu se značeným PCR produktem *F. poae*. Bíle zakroužkované signály odpovídají sondě specifické pro *F. poae*. Zeleně zakroužkované signály jsou pozitivní kontroly hybridizace.

**Poděkování:** Tento výzkum byl realizován za finanční podpory MZe, projekt NAZV 1G 46068 a CZ002700604.

### Literatura:

- Kristensen R., Gauthier G., Berdal K.G., Hamels S., Remacle J., Host Jensen A. (2007): DNA microarray to detect and identify trichothecene- and moniliformin-producing *Fusarium* species. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1060-1070
- Leisova L, Kucera L, Minarikova V, Ovesna J. (2005). AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net form of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathol.* 54:66-74.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2044-2049

# Mydlice lékařská (*Saponaria officinalis* L.) jako možný genetický zdroj pro fytoremediace

Pavlátová L., Kučera L., Tomšíková I., Ovesná J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

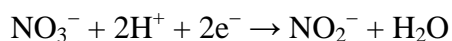
e-mail: [pavlatova@vurv.cz](mailto:pavlatova@vurv.cz)

## Abstrakt

Mydlice lékařská (*Saponaria officinalis* L.), vyznačující se schopností přežít na území značně kontaminovaném nitrosloučeninami, byla vybrána jako zdroj pro izolaci a charakterizaci genu nitrátreduktázy. Sekvenační analýza parciální genomické sekvence enzymu nitrátreduktázy o délce 2771 pb, prokázala přítomnost 4 exonů a 3 intronů. Sekvence nezahrnuje části exonu 1 (na 5' konci) a 4 (na 3' konci). Překladem kódující nukleotidové sekvence byla získána parciální aminokyselinová sekvence proteinu (837 aa), která zahrnuje všechny domény přítomné v eukaryontních nitrátreduktázách. Bioinformační analýza dokumentovala nejvyšší míru podobnosti nitrátreduktázy mydlice lékařské s nitrátreduktázou lípy velkolisté.

## Úvod

Enzym nitrátreduktáza (EC 1.7.1.1 - Nitrate reductase (NADH), dříve EC 1.6.6.1) katalyzuje redukci dusičnanových iontů na dusitanové ionty podle reakce:



Tato reakce je prvním limitujícím krokem asimilace nitrátu (Campbell 1999). Studium genu nitrátreduktázy je proto důležité nejen pro prohloubení znalostí koloběhu dusíku v přírodě, ale je i klíčové pro výnos kulturních plodin, má tedy i značné ekonomické dopady. V dnešní době se v rozvojových zemích a části Asie používají stále větší množství dusíkatých hnojiv za účelem zvyšování výnosu, toto neuvážené přehnojování má však za následek až toxické koncentrace nitrosloučenin v půdě, které vedou k eutrofizaci povrchových i spodních vod (Miller & Cramer 2004). Cílem této práce je studium genu nitrátreduktázy mydlice lékařské (*Saponaria officinalis* L.) u níž bylo pozorováno přežívání na půdách zamořených nitrosloučeninami (Podlipná *et al.* 2007). V dostupných databázích, například NCBI (National Center for Biotechnology Information), je registrováno celkem 43 nukleotidových sekvencí enzymu nitrátreduktázy, ale pro rod *Saponaria* L. (řád hvozdíkovité) nebyla tato sekvence doposud popsána. U ostatních zástupců řádu *Caryophyllales* Juss. (hvozdíkovité) byla popsána parciální sekvence CDS nitrátreduktázy u koukolu polního (*Agrostemma githago* L.)



a kompletní CDS u špenátu (*Spinacia oleracea* L.) z příbuzné čeledi *Amaranthaceae*. Srovnání funkčních domén nitrátreduktázy mydlice lékařské s odpovídajícími doménami proteinové sekvence tohoto enzymu u jiných vyšších rostlin přístupných v NCBI přinese údaje o fylogenetické příbuznosti mezi doménami různých taxonů a umožní tak dále studovat souvislost mezi schopností některých rostlinných druhů přežít v prostředí s nadlimitním obsahem nitrosloúčenin v půdě a formou či aktivitou jejich nitrátreduktáz.

## **Materiál a metody**

### *Materiál*

Pro izolaci a charakterizaci genu nitrátreduktázy mydlice lékařské (*Saponaria officinalis* L.), byly použity kalusové kultury odvozené z rostliny která rostla na pozemku silně kontaminovaném nitrosloúčeninami.

### *Izolace DNA*

DNA byla extrahována z kalusových kultur pomocí modifikované CTAB izolační metody (Murray & Thompson 1980). Kvalita izolované DNA byla zkontrolována na 0,8% agarozovém gelu a její koncentrace a čistota byla stanovena spektrofotometricky.

### *Klonování a sekvenování produktu PCR*

V první etapě byly použity degenerované primery navržené pro funkční domény enzymu nitrátreduktázy špenátu (D86226) a byly získány parciální sekvence genomické DNA. Získané fragmenty byly vloženy do klonovacího vektoru pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, California) a následně transformovány do *E. coli*. Izolované plazmidy (High Pure Plasmid Isolation kit, Roche, Německo) byly sekvenovány pomocí ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer a jako sekvenační primery byly použity M13 primery. Sekvenační data byla vyhodnocena programem ABI DNA Sequencing Analysis Software Version 5.2. Amplifikace nových částí genu pak probíhaly s využitím inverzní PCR. Klonování a sekvenování takto získaných ampliconů probíhalo podle výše uvedených postupů.

### *Charakterizace nukleotidové a proteinové sekvence*

Pro analýzy nukleotidové genomické sekvence a proteinové sekvence získané překladem potenciální CDS byly využity především bioinformační nástroje dostupné na NCBI. V nukleotidové sekvenci byly identifikovány introny a exony, vyhodnoceny alignmenty a

vyhledány charakteristické domény pro eukaryontní nitrátreduktázy. Taxonomické zařazení odpovídá systému APG III.

## Výsledky a diskuse

Celkem bylo získáno 8 parciálních sekvencí genomické DNA. Byly vždy klonovány 3 nezávislé PCR produkty a sekvenovány nejméně 3 nezávislé klony, aby byly postihnuty možné chyby Taq polymerázy při PCR (Li *et al.* 1999) nebo chyby klonování. Tyto sekvence byly zkompletovány a byla tak získána parciální sekvence genomické DNA pro nitrátreduktázu mydlice lékařské o celkové délce 2771 pb.

Porovnáním se sekvencí mRNA špenátu (M32600.1) byla sekvence charakterizována vzhledem k počtu a umístění jednotlivých exonů a intronů. Byly identifikovány 4 exony a 3 introny, přičemž část 1. a 4. exonu schází, pro 5' konec prvního exonu se jedná přibližně o 100 pb a část sekvence exonu 4 je na 3' konci kratší přibližně o 54 pb, bez stop kodonu.

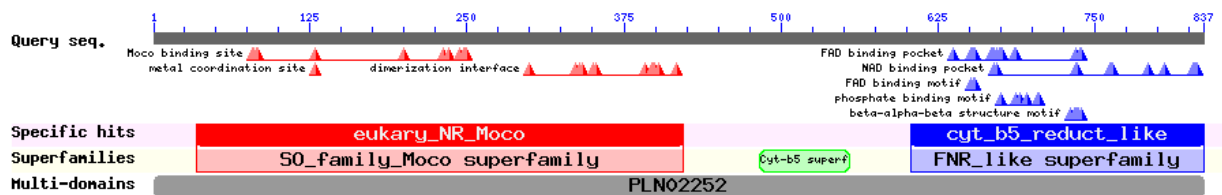
Výsledky prohledávání databázi (BLASTn, BLASTx) dokládají, že nukleotidová sekvence izolovaná z mydlice lékařské je blízká nukleotidové sekvenci pro mRNA nitrátreduktázy lípy velkolisté (*Tilia platyphyllos*) (AY138811.1, Guescini *et al.* 2003), viz tabulka č.1.

**Tabulka č. 1:** Vybrané DNA sekvence a skóre jejich alignment s DNA pro nitrátreduktázu mydlice (alignment kódující oblasti DNA).

| Accession  | Description   | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|------------|---|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| AY138811.1 | <i>Tilia platyphyllos</i> nitrate reductase (nr1) mRNA, complete cds  | 2800      | 2800        | 99%            | 0.0     | 84%       |
| EU163265.1 | <i>Beta vulgaris</i> nitrate reductase (NR) mRNA, complete cds        | 1279      | 1279        | 91%            | 0.0     | 72%       |
| M32600.1   | Spinach NADH nitrate reductase mRNA, complete cds                     | 1256      | 1256        | 90%            | 0.0     | 72%       |
| U64308.1   | <i>Agrostemma githago</i> nitrate reductase (agnr1) mRNA, partial cds | 843       | 843         | 64%            | 0.0     | 72%       |
| U64309.1   | <i>Agrostemma githago</i> nitrate reductase (agnr2) mRNA, partial cds | 672       | 672         | 50%            | 0.0     | 71%       |
| D86226.1   | <i>Spinacia oleracea</i> DNA for nitrate reductase, complete cds      | 489       | 1263        | 90%            | 3e-135  | 77%       |

Sekvence o délce 837 aminokyselin, získaná překladem kódující oblasti, byla vyhodnocena z hlediska přítomnosti domén charakteristických pro eukaryotní nitrátreduktázy (Marchler-Bauer A *et al.* 2009). Výsledky potvrdily přítomnost všech domén, PLNO2252 (multidoména pro eukaryotní nitrátreduktázy), NR-Mono, Cyt-b5 a Cyt-b5 reductase like a byla zaznamenána vysoká míra shody sekvence v oblastech vazebných míst (Obr. 1, 2).

**Obrázek č. 1:** Výskyt domén charakteristických pro eukaryotní nitrátreduktázy v kódovaném proteinu mydlice lékařské.



**Obrázek č. 2:** Alignment domény Moco (Kisker *et al.* 1997) nitrátreduktázy mydlice (query) s odpovídajícími zástupci eukaryotní domény NR-Moco v databázi konzervativních domén (CDD NCBI).

```

Feature 1
gi 730139 73 DDGTSQDWI . [1] . RNASMI RLTGKHPFNAEPP . [6] . HGFITPSPHIVRSHGP . [2] . HARWEDWTEVETGLV 141
query 35 DEATADNWI . [1] . RNPSMVR L TGKHP LNSEPP . [6] . HGFITPVPPLHFVRNHGA . [2] . KASWDDWTEVETGLV 103
gi 30526321 64 DVGTPDQWI . [1] . RHPDLIR L TG RHP LNV EPP . [6] . RGFITPSSLHYVRNHGP . [2] . KMTWADHKVTICGLV 132
gi 730148 88 DVGTPDEWV . [1] . RHPDLIR L TG RHP FNSEPP . [4] . STFITPMPALHYVRNHGP . [2] . RLEWDTHTFSIDGLV 154
gi 1352498 40 DLKTKDNFV . [1] . RDPDL L RL TG SHPFNSEPP . [6] . SGFLT PVS L HFVRNHGP . [5] . DENILDWEVSI EGMV 111
gi 548360 18 DANTPDHWI . [1] . RDERMIR L TGKHPFNSEAP . [6] . KGFLT P QNL FYVRSQGD . [5] . REQAENWKLKVHGLV 89
gi 548358 131 DLKTPDHLI RDPRLIR L TG SHPFNV EPP . [6] . HGFLT P QNL HYVRNHGP . [16] . DDSLLNWEFTVEGLV 212
gi 1352497 89 DEGTVDAWV . [1] . SSQSLIR L TGKHS L NGELP . [4] . HGFITPVRPHYVRNHGP . [2] . RGDWATWTEVETGLV 155
gi 128186 98 NEGTA DAWT . [1] . RNPSLIR L TGKHP L NCEPP . [6] . HGFITPAALHYVANHGA . [2] . RGDWSTWTV DVTGLV 166
gi 1113863 71 DKGTKDEWI . [1] . RHPDLVRL TG RHPFNV EPT . [5] . ESYIT PPS LHYVRNHGA . [2] . QIKWEEHRLAVNGLV 138
gi 548361 46 DQDTPDNWV . [1] . RDPRLIR L TG RHP L NCEPP . [6] . YGFITPPAVHFVRNHGA . [2] . RIPWAEHRIEINGLV 114
gi 6224515 73 DLATPDAWI . [1] . RDP R MVR L TGKHPFNAEAN . [6] . QGFITP SNL FFVRNHGA . [5] . QDKADEWTLKLHGLC 144

Feature 1
gi 730139 142 . [1] . RPTCF TMEQLV . [4] . SHEFPATLV CAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTSVWRGVSLRSL LKRCG . [9] . H 219
query 104 . [1] . EPTKLTMDQLV . [4] . SREFPVS L VCAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTSVWRGVPLCDV LKRCG . [9] . N 181
gi 30526321 133 . [1] . KPLVLSMDEIA . [3] . QVTMLAT L TCAGNRRKEENMVKKTIGFSWGPAGT GCSYWTGVRMSHLLKLAG . [8] . H 208
gi 730148 155 . [1] . KPRTFGMNELV . [6] . TVTFPVL L VCAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTSVWRGVPLCDV LKRCG . [9] . W 232
gi 1352498 112 . [1] . TPKYIKLSDIM . [4] . YSTPVT M VCAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTSLWTCMGLGDV LKRCG . [6] . F 186
gi 548360 90 . [1] . QEVELS TKDLK . [5] . SHPQTIT L VCAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTGLFTGVY LADILDYCK . [21] . H 180
gi 548358 213 . [1] . HPLKISVRELM . [6] . NVTYPVT L VCAGNRRKEQNVLRKSKGFSW GAGGLSTALWTVGLSEILARAK . [10] . Y 293
gi 1352497 156 . [1] . RPRALTMDELA . [4] . ALELPVT L VCAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTSVWRGARLSDV LKRCG . [9] . F 233
gi 128186 167 . [1] . RPMRLTMDELV . [4] . AVEIPVT L VCAGNRRKEQNMVQSIGFNW GAGGVSTSVWRGARLSDV LKRCG . [9] . N 244
gi 1113863 139 . [1] . APTFTMDDIL . [3] . SVDVTCT L VCAGNRRKEENMVKKTIGFNW GAGGVSTGCTWTVGVRVSDLLQRCG . [9] . H 215
gi 548361 115 . [1] . KPLFLTMDELV . [3] . SITFPCT L VCAGNRRKEENMLKKSIGFNW GPCATSTTYWTGVRLRDLL LLAG . [9] . F 191
gi 6224515 145 . [1] . NPTTSLADLR . [4] . VVTVPVT L VCAGNRRKEQNVQKSLGFSW GPGGISTALFTGVY LADVLDVQV . [6] . H 219

Feature 1
gi 730139 220 VCFEGA . [9] . NYGTS L MREVAL . [4] . DIILAYM QNGELLSPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIVVSNQQSQSHY 301
query 182 VCFEGA . [11] . KYGTSITKELAM . [4] . DIILAYM QNGERLSPDHGFPVIRL IIPGFIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 265
gi 30526321 209 VRF RGP . [10] . SYATSLPLWKCM . [4] . DVIVAWK QNGRILDPDHGFPVRMIIPGHIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 291
gi 730148 233 VWFEGE . [6] . KYGT CIRASTEL . [4] . DVLVAVK ANGELLGPDHGFPVRL IVPGHIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 311
gi 1352498 187 VVMEGA . [6] . AYRT CIRLSWCM . [4] . CIMIAYQ QNGEGLHPDHGKPLRVV IIPGFIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 265
gi 548360 181 VVFEGA . [6] . KYGTSQR LNWAL . [4] . GMLIAWGLNGE LSPDHGFPVRL IVPGHIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 259
gi 548358 294 VCFEGA . [6] . TYGTSV LKAWAM . [4] . GIMVAHK MNGENLHPDHGFPVRL IVPGHIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 372
gi 1352497 234 VCFEGA . [9] . KYGTSITREVAL . [4] . DVM LAYQNGG P L LDPDHGFPVRL IVPGCTAGR MVKWLKRIVVSDNESDNY 315
gi 128186 245 VCFEGA . [9] . KYGTSITRQWAL . [4] . DIM LAYM QNGEPL LDPDHGFPVRA IIPGFIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 326
gi 1113863 216 VCF RGP . [10] . SYGTSV LTVWKAM . [4] . DVL IAYK QNGR L LTPDHGFPVRL IIPGFIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 298
gi 548361 192 VCF RGP . [10] . SYGTS LTYAKAM . [4] . DVIIAYK QNHRW L LTPDHGFPVRL IIPGFIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 274
gi 6224515 220 VVFEGS . [6] . PYGTSQLTSWAR . [4] . GMMLAWAMNGLPLEPDHGFPVRL IVPGFIGGRMVKWLKRIVVSDNESDNY 298

Feature 1
gi 730139 302 HYKDNK LFP . [9] . EDW WYKPEYIINEV NINSVITTP . [15] . PYSMRGYAYS GG . [1] . RKVTRVEV L DGGETWQV 389
query 266 HYKDNRLV LPS . [9] . EAWWYRPEYIINELNINSVITTP . [15] . PYTLRGYAYS GG . [1] . KKVTRVEV L DGGETWQV 353
gi 30526321 292 HFMDNRV LPS . [9] . EGW WFKPDFIINELNINSAITTP . [10] . NTVVKGYAYS GG . [1] . QKVIRCEV L DDDAKSWK 373
gi 730148 312 HFMDNRV LPS . [9] . EGW WSKSPYAIMELN VNAVILP . [18] . TYTKGYAYS GG . [1] . RRVTRVEV L DDDGASWL 402
gi 1352498 266 HFVFDNRV LPT . [10] . DRW WDKDERYAIYDLNLQITICPK . [11] . EYEIAGFGYNGG . [1] . VRIGRIEV L DDKGSKWL 350
gi 548360 260 HFHNDQV LPT . [10] . MHW WYDPKYIINDLN VNSAICSP . [16] . MLPLEGYAYTGG . [1] . RVSTRVEV L DDDGRSWK 349
gi 548358 373 HFVFDNRV LPT . [14] . ERVWRDERYAIYDLNLVNSVJCEP . [15] . TYRLRGYAYS GG . [1] . RRVTRLEV L DQKGSWRL 465
gi 1352497 316 HYRDNRLV LPS . [9] . EGW WYKPEYIINEV NINSVITTP . [15] . IYTMKGYAYS GG . [1] . KKVTRVEV L DDDGGENWLL 403
gi 128186 327 HYKDNRLV LPS . [9] . DAW WYKPEYIINELN VNSVITTP . [15] . GYTMKGYAYS GG . [1] . KRITRVEV L DGGETWLV 414
gi 1113863 299 HFHNDNRV LPS . [9] . EGW WYKPDFIINDLN VNSAIGYP . [11] . TYAVRGYAYS GG . [1] . NKIIRCEV L DDDGSKWL 382
gi 548361 275 HFMDNRV LPS . [9] . EGW WYKPEYIINDLN VNSAVARP . [12] . PYTMRGYAYS GG . [1] . RRIIRCEV L DDDGKTWRL 359
gi 6224515 299 HFHNDKVLPM . [10] . KQW WYDPRYIIRDLN VNSAITASP . [15] . TYTVKGYAYS GG . [1] . RRVTRVEV L DDDGSDSWK 387

Feature 1
gi 730139 390 CSVE . [8] . GKYWCWCFWSLEV . [8] . KEIAVRAWDEA QNTQPEKLIWNTMGMINNCWFRVKT 458
query 354 CTTD . [8] . GIFWCWCFWSLEV . [8] . KEIAVRAWDET LNTQPQNL IWNVMGMNNC WFRVKT 422
gi 30526321 374 AKIN . [9] . GKFVAWVHWEISV . [8] . KEICRAWSDMNTQ PNSFTWNLGMNNC VYRVKV 443
gi 730148 403 ARII . [8] . GKMWCVVHYELAA . [8] . REVCVRAWDSMNLMPAFTWNVGMNNC PWRVVKI 471
gi 1352498 351 ADID . [24] . MSCLCWCWFKLKV . [8] . KDILIRGMDERMVQPR TMYVNVV TSM LNNWYRVAI 435
gi 548360 350 ASIH . [25] . EMSFSWCWFLD V . [11] . KVISVRALDEVLATQPRDMYWNATSMNNC WFRVCI 438
gi 548358 466 AGIE . [25] . ESCFCWCWFDLEI . [8] . KDVCIRAMDES LALQPKEMYVSLGMMNNC PWRVVI 551
gi 1352497 404 CELD . [8] . GRYWCWCFWSIDV . [8] . KEIAVRAWDSQ LNTQPEFLTWNLGMNNC WFRVVKV 472
gi 128186 415 CVLD . [8] . GKHWCFWFPVEV . [8] . KEIAARAWDSQ LNTQPEKLIWNTMGMINNC WFRVVKV 483
gi 1113863 383 GSVT . [8] . GKHWGWWVWSLEV . [8] . PEICRAWDSMNTQ PNTFTWNVGMNNC SYRVKI 451
gi 548361 360 GDIQ . [8] . GKYWCWVHWSLDV . [8] . KEVLLRAWDET MNTQPAITITWNVGMNNC YVRIKI 428
gi 6224515 388 ANIS . [24] . DACFCWCWFSFDI . [8] . RAIMVRCMDES LALQPRDMYWNATGMNNC WFRVCI 472

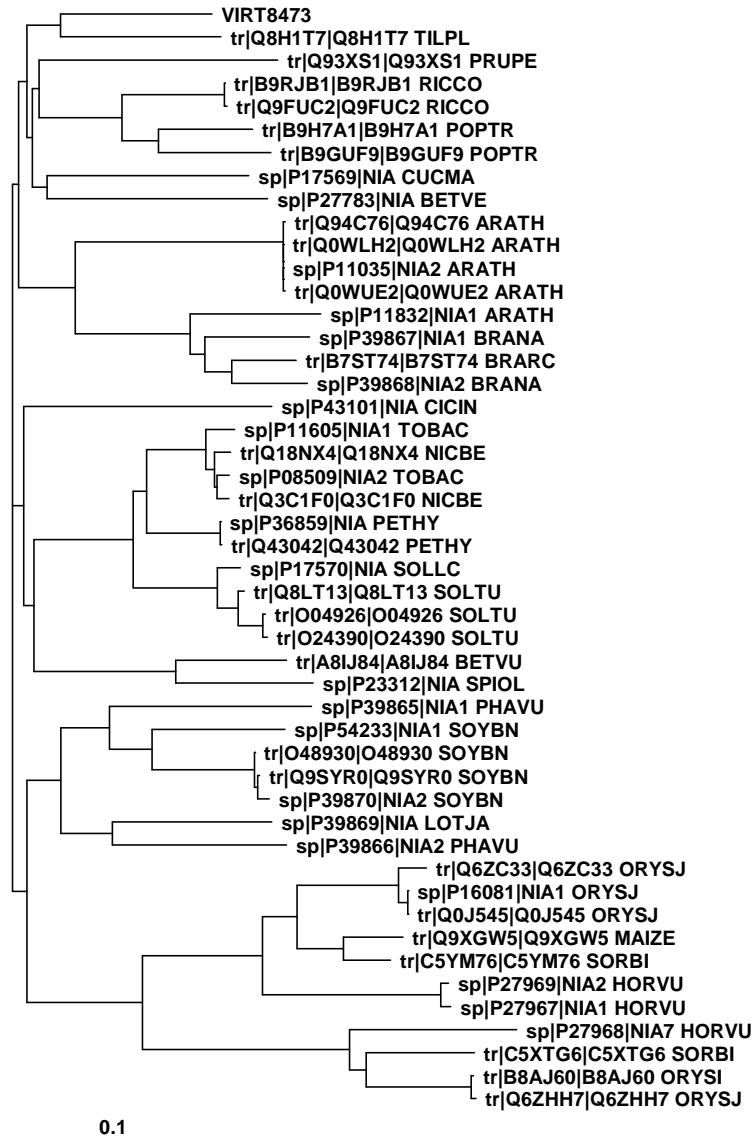
```

Aminokyselinová sekvence potenciální nitrátreduktázy *Saponaria officinalis* L. byla porovnána s 43 sekvencemi rostlinných nitrátreduktáz v databázi proteinů NCBI. Nejvyšší stupeň podobnosti vykazovala nitrátreduktáza mydlice s nitrátreduktázou lípy velkolisté, *Tilia platyphyllos* Scop., (Q8H1T7, 894 AA), která je zástupcem řádu slézotvarých (*Malvales*). Jejich shoda na úrovni proteinové sekvence byla následující: Score = 1491 bits (3859), Expect = 0.0 Identities = 717/836 (85%), Positives = 759/836 (90%), Gaps = 8/836 (0%).

Na obrázku 3 je fylogram 43 nitrátreduktáz, který odpovídá taxonomické příslušnosti jednotlivých zdrojů sekvencí. Zařazení sekvence pro nitrátreduktázu mydlice lékařské je zcela odlišné od nejbližších zástupců řádu *Caryophyllales* (clade core *Eudicots*), *Beta vulgaris* L. a

*Spinacia oleracea* L., a je spíše zařazeno mezi zástupce clade *Rosids* (řády *Fabales*, *Brassicales*).

Obrázek č. 3: Fylogram znázorňující příbuznost proteinové sekvence nitrátreduktázy mydlice lékařské se známými sekvencemi rostlinných nitrátreduktáz.



## Závěr

Byla získána zcela původní informace o genomické sekvenci DNA pro nitrátreduktázu mydlice lékařské o délce 2771 pb, zahrnující podstatnou část kódující oblasti od 1. do 4. exonu, včetně tří identifikovaných intronů. Výsledky dokládají, že nitrátreduktáza mydlice lékařské je poněkud odlišná od zástupců řádu *Caryophyllales*, kam taxonomicky náleží a je více podobná lípě velkolisté, která je taxonomicky zařazena do řádu *Malvales*. Toto zjištění dokumentuje určitou specifičnost nitrátreduktázy mydlice lékařské, což může být spojeno i

s určitými biochemickými vlastnostmi enzymu. Informace o nukleotidové a proteinové sekvenci nitrátreduktázy mydlice lékařské umožní další studium a funkční charakterizaci nitrátreduktázy ve vztahu ke schopnosti mydlice metabolizovat nitrosloučeniny.

### **Poděkování**

Tento výzkum byl realizován za finanční podpory projektu MŠMT NPV II: 2B06187.

### **Literatura:**

- APG (2009). "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III.". *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 399–436
- Campbell W.H. (1999): Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:277 – 303
- Guescini M., Pierleoni R., Palma F., Zeppa S., Vallorani L., Potenza L., Sacconi C., Giomaro G., Stocchi V. (2003): Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. *Mol. Gen. Genomics* 269: 807 – 816
- Kisker C., Schindelin H., Pacheco A., Wehbi W.A., Garrett R.M., Rajagopalan K.V., Enemark J.H., Rees D.C. (1997) Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91 (7):973-83.
- Li Y., Mitaxov V., Waksman G. (1999): Structure-based design of Taq DNA polymerases with improved properties of dideoxynucleotide incorporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9491 – 9496.
- Marchler-Bauer A. et al. (2009), "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database.", *Nucleic Acids Res.* 37 (D):205-10
- Miller A.J., Cramer M.D. (2004): Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274: 1 -36
- Murray H.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic. Acids. Res.*, 8: 4321 – 4325.
- Podlipná R., Nepovím A., Soudek P., Vágner M., Vaněk T. (2007) : Soapwort oxidoreductase is involved in trinitrotoluene detoxification. *Biologia Plantarum* 51 (2): 367 – 371

# Hodnocení genové exprese u *Allium* sp. pomocí Real-time PCR

Ovesna J., Němcová P., Kučera L.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

e-mail: [ovesna@vurv.cz](mailto:ovesna@vurv.cz)

## Abstrakt

Česnek patří k významným zeleninám. Přesto jeho genom ani transkriptom není dobře prozkoumán. Navrhli jsme primery pro hodnocení genu se stabilní expresí a genu pro alliin. Ukázalo se, že gen pro aktiv má stabilní expresi a podařilo se optimalizovat systém pro hodnocení exprese alliinu.

## Úvod

Česnek je jednou z nejstarších kulturních rostlin. Patří mezi jednoděložné rostliny čeledi česnekovitých (*Alliaceae*), do rodu česnek (*Allium*). Během mnoha let pěstování a šlechtění bylo vyprodukováno velké množství různých odrůd česneku. Kolekce česneků je možné podle schopnosti vytvářet květní stvol a květenství rozdělit na 3 typy: typ paličák (vytváří květní stvol a květenství), nepaličák (nevytváří květní stvol) a typ se skrytým květním stvolem (vytváří květní stvol, ale nevyvíjí se květenství).

Česnek je oproti dalším hospodářsky významným plodinám málo prozkoumán. Genové exprese česneku nejsou vůbec známy. Zaměřili jsme se na tvorbu základních postupů pro hodnocení genové exprese u dané plodiny.

## Materiál a metody

Pro hodnocení genové exprese byly použity dva genotypy česneku - odrůda Japo a krajová odrůda Djambul.

Byla odebírána listová pletiva po vzejití rostliny. Pro sledování genové exprese byla z listů izolována RNA (optimalizovaný protokol viz box 1) po kontrole kvality na bioanalyzáru.

Genové exprese byla hodnocena pomocí real-time PCR.

**Box 1: Izolace RNA** (podle Kiefer et al., 2000, *Plant Molecular Biology Reporter*, 18: 33-39)

### Činidla :

Extrakční pufr ( předehřát na 65 °C ) : 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) ; 25 mM EDTA; 2 M NaCl;  
2% CTAB; 2 % PVP; 0,5 % spermidin; 2% mercaptoethanol

Chloroform/isoamylalkohol 24:1

Nucleon Phyto Pure DNA extraction resin (Biotech)

Isopropanol

70 % ethanol

TE: 10 mM Tris-HCl; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,5

### Protokol:

- ☐ 30-50 mg materiálu rozdrtit v tekutém dusíku
  - ☐ Vzorek přemístit do 2ml zkumavky, přidat 500 ul přehřátého extrakčního pufru
  - ☐ Přidat 250 ul chloroform/isoamylalkoholu a 100 ul Nucleon PhytoPure extraction resin a vortexovat (1 800 rpm) při laboratorní teplotě
  - ☐ Centrifugace 13 000 rpm 5 min při 4 °C
  - ☐ Přemístit supernatant do nové 2ml zkumavky, přidat 125 ul chloroform/isoamylalkoholu, vortex a centrifugace 13 000 rpm min při 4 °C
  - ☐ Přemístit supernatant do nové 2ml zkumavky a přidat 2obj. vychlazeného isopropanolu(4°C)
  - ☐ Inkubovat 5 min na ledu a centrifugace 13 000 rpm 5 min při 4°C
  - ☐ Rozpustit pelet v 13 ul H<sub>2</sub>O a 2 ul Dnase pufru a 5 ul DNaseI. Inkubace 15 min při 37 °C
  - ☐ Přidat 2obj. vychlazeného isopropanolu (4°C), promíchat a centrifugace 13 000 rpm 2 min 4°C
  - ☐ Promýt pelet 1 ml 70 % ethanolem. Centrifugace 13 000 rpm 5 min při 4 °C
  - ☐ Odstranit supernatant, pelet sušit 20 min a rozpustit v 50 ul H<sub>2</sub>O nebo TE pufru
- Purifikace RNA** kitem RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Na základě bioinformatických analýz byly navrženy primery pro hodnocení genů se stabilní expresí

**Aktin:**

FW primer: TCACTGAGGCACCTCTCAAC

REV primer: GAAAGCACAGCCTGGATAGC

**Beta-tubulin:**

FW primer: CCTGCTCATCTCGAAGATCC

REV primer: CATTGTAGGGCTCAACCACA

Reakce byly uskutečněny na přístroji ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR system. Reakce byly provedeny v konečném objemu 20 µl, reakce obsahovala 200 nM forward primer a 200 nM reverse primer, 1x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) a 1 µl templátu (cDNA, RNA, gDNA). Reakce byly provedeny v triplicátech.

Program pro real time PCR: 95 °C – 10 min  
95°C – 15 sec - 40 cyklů

Byly navrženy primery pro hodnocení exprese genu cystein-syntáza.

Pro hodnocení genové exprese byla využita genomická DNA (pozitivní kontrola reakce), celková RNA (negativní kontrola reakce a ověření kvality RNA, resp. přítomnosti stop DNA) a cDNA získaná přepisem RNA pomocí reverzní transkripce. Délka produktů po PCR reakci odpovídala očekávání. Reakce byla vyhodnocena i na real-time PCR.

**Výsledky a diskuse:**

Byla vyhodnocena efektivita reakce a stabilita genové exprese

→ při použití primerů amplifikujících část genu tubulinu: tvorba nespecifických produktů. proto nebyl dál tento použit.

→ v případě použití primerů amplifikujících část genu aktinu došlo k tvorbě jednoho produktu. Hodnoty Ct byly hraniční (25-28). Přesto bylo možné považovat expresi v hodnocených rozsazích za stabilní.

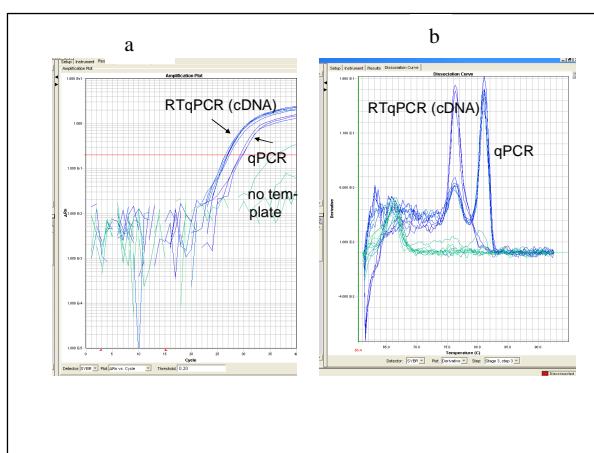


Byly získány optimalizované protokoly, specifické pro danou reakci s účinností v rozmezí 1,85 – 1,91. V testovaném rozsahu koncentrací byl průběh reakce lineární, a nedocházelo tedy k inhibici reakce.

Bylo zjištěno, že na analyzovaných materiálech se aktin chová jako gen s relativně stabilní expresí a odlišnosti v hodnotách Ct nepřesahují hodnotu 2. Expres cystein syntázy vykazovala za sledovaných podmínek u sledovaného genotypu obdobné hodnoty. Genová exprese alliinázy vykazovala u jednotlivých listů větší odlišnosti a bude třeba ji sledovat i u dalších genotypů a za odlišných environmentálních podmínek.

### Obr.1

*Profil real-time PCR z cDNA a genomické DNA rozdíly mezi expresí v odlišných vývojových stádiích rostliny (2. list a 5. list) nebyly na základě rozdílu v Ct identifikovány. (a) Normalizovaná exprese nebyla přepočítávána (b) Disociační křivka reakce*



### Závěr

Při omezeném počtu dostupných sekvencí je vhodný systém Real-Time PCR, který je v tomto případě výhodný i z finančního hlediska. Je rovněž známo, že pro kvantifikaci je přesnější než systém DNA arrays. Systém byl ověřen a byl nalezen alespoň jeden gen se stabilní expresí v daném pletivu, který je využitelný jako komparátor. Pro *A. sativum* a *A. cepa* zatím žádné vhodné komparátory nebyly nalezeny a jedná se o zcela první výsledek v této oblasti.

**Poděkování** Tento výzkum byl realizován za finanční podpory MZe, projektu 1G58084

### Literatura:

Rivlin RS . 2001. Historical perspective on the use of garlic. J Natur 131: 951S-954S

Ipek, M., A. Ipek, S.G. Almquist, and P.W. Simon. 2005. Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 110:228-236.

Etoh T, Simon PW (2002) Diversity, fertility and seed production of garlic. In: Rabinovitch HD, Currah L (eds) Allium crop science: recent advances. CAB International, New York, pp 101-117.

Lancaster J.E., Dommissie E.M., and Shaw M.L. (1988). Production of flavour precursors (S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides) in photo callus of garlic. Phytochemistry 27(7), 2123-212

# Hodnocení genové exprese pro zlepšení vlastností rostlinných druhů

Ovesna J., Janská A.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

e-mail: [janska@vurv.cz](mailto:janska@vurv.cz)

## Souhrn

Rostlinné druhy pěstované v oblasti mírného pásma jako užitkové plodiny jsou často vystavovány nepříznivým faktorům vnějšího prostředí, které mohou mít značný vliv na výnosy. Mezi takové stresové faktory patří zejména nedostatek vody a nízká teplota. Pro zlepšení odolnosti plodin vůči těmto podmínkám prostředí je nutné znát její základní mechanismy, které jsou kvantitativní povahy a proto lze vyšší odolnosti dosáhnout běžnými šlechtitelskými postupy jen obtížně. Metoda DNA čipů umožňuje sledovat míru indukce a represe až tisíců genů za zvolených podmínek a umožňuje tak lépe odhadnout cílové skupiny genů pro potenciální využití v biotechnologickém průmyslu.

## Úvod

Geneticky modifikované rostliny nacházejí své uplatnění i v oblasti stresové problematiky, zejména v souvislosti s nedostatkem vody a nízkou teplotou. Tyto dva stresové faktory jsou také nejčastější abiotickou příčinou nízkých výnosů v oblasti mírného pásu. Nezbytnou podmínkou pro úspěšnou konstrukci rostlin s vyšší odolností vůči abiotickým faktorům je podrobná znalost signálních drah a regulačních mechanismů, které směřují k syntéze či degradaci produktů umožňujících rostlině přizpůsobit se nepříznivým podmínkám. Důkladná teoretická znalost těchto procesů je tím potřebnější, že odolnost k nepříznivým podmínkám prostředí, ať už se jedná o odolnost vůči nedostatku vody, vůči nízkým teplotám či salinitě, je vždy vlastností kvantitativní – podílí se na ní mnoho různých složek a je tedy žádoucí postihnout tu, která bude mít největší vliv ve prospěch získání odolnosti a zároveň nebude představovat riziko vedlejších účinků, např. sníženého výnosu v případě užitkových plodin.

Mírou exprese či stabilizací produktů signálních či ochranných látek je možné měnit odolnost konkrétních plodin k danému stresoru či kombinaci několika faktorů najednou. V případě nízkých teplot se rostliny mírného pásu aklimatizují na podzim a přeměrovávají metabolismus ve prospěch syntézy různých osmo- a kryo- protektivních látek jako jsou rozpustné cukry (sacharóza, trehalóza, rafinóza, stachyóza), cukerné alkoholy (sorbitol,

inositol) a nízkomolekulární dusíkaté látky jako jsou aminokyseliny (hlavně prolin) a různé betainy (glycinbetain apod.). Kromě těchto metabolitů se začínají ve větší míře a/nebo v jiných poměrech syntetizovat proteiny stabilizující buď jiné, pro buňku nezbytné, proteiny nebo bránit jejich shlukování a zároveň proteiny, které stabilizují buněčné struktury, zejména plazmatickou membránu. Typickými zástupci ochranných proteinů jsou proteiny tepelného šoku (heat shock proteins, HSPs) a jiné chaperony, dehydriny a chladem regulované proteiny (cold regulated proteins, CORs). Některé z nich se podílejí i na vylučování a zneškodnění reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) (Hare *a kol.* 1998; Iba 2002; Wang *a kol.* 2003; Gusta *a kol.* 2004; Chen & Murata 2008).

Cílem našich experimentů bylo analyzovat rozdílnou míru transkripce genů kódujících ochranné proteiny a enzymy metabolismu osmolytů a to jak v čase během chladové aklimatizace, tak i v rozdílných orgánech ozimého ječmene.

### **Materiál a metodika**

Pro experimenty byl napěstován ozimý ječmen (*Hordeum vulgare*) v kontrolních podmínkách připomínajících podmínky počínajícího podzimu, kdy je za normálních okolností vyséván na pole (18 °C den/13 °C noc, 12h fotoperioda). Po třech týdnech byly rostliny ve stádiu plně vyvinutého druhého listu přendány do podmínek simulované chladové aklimatizace (3 °C) na dobu 21 dní a vzorky druhých listů a odnožovacích uzlů byly odebírány po 1, 3, 7 a 21 dnech do tekutého dusíku. Rostliny byly dále vystaveny ještě teplotám pod bodem mrazu na 1 den (-3 °C) a opět odebrány. Rostlinné vzorky byly uchovány v mrazovém boxu při -130 °C. Z materiálu byla izolována RNA pomocí TRIZOL Reagent (Invitrogen), která byla dále ještě purifikována kitem RNeasy mini kit s přidávkou DNasy pro odstranění zbytkové genomické DNA (Qiagen). Pomocí metody real-time PCR s reverzní transkripcí byla eliminována možnost přítomnosti genomické DNA a vzorky byly předány servisní laboratoři Ústavu molekulární genetiky AVČR pro hybridizaci na ječmenný DNA čip firmy Affymetrix. Hrubá data byla zpracována statistickými programy pro normalizaci dat (RMA) a hodnocení změněné exprese (program GeneSpring) ve spolupráci s laboratoří prof. Luigiho Cattivelliho (Fiorenzuola d' Arda, Itálie).

Pro lepší porozumnění transkriptomických dat jsme hodnotili i fyziologické parametry kontrolních a stresovaných rostlin a to zejména dosaženou hladinu mrazové tolerance v bodech jednotlivých odběrů, kterou jsme hodnotili pomocí dvou různých postupů. Prvním z nich byl přístup založený na metodě výtoku elektrolytů (Prášil a Zámečník 1998), druhým pak hodnocení přežití celých rostlin po postupném chlazení v kryomatu rychlostí 9 °C/h. Stupeň mrazové odolnosti byl hodnocen programem Statistica.

## Výsledky a diskuse

Podle předpokladů se měnilo spektrum významně indukovaných a reprimovaných genů v průběhu celé aklimatizace i mezi listy a odnožovacím uzlem. Indukce signálních molekul a transkripčních faktorů prudce stoupala těsně po přechodu z kontrolních podmínek do chladu (po 1 dnu), následně byla exprese genů pro transkripční faktory opět snížena, naopak vzrostla exprese genů pro proteiny účastníci se přímo ochrany buňky před chladem (chladem regulované bílkoviny) a pro enzymy biosyntézy osmolytů (prolinu a rozpustných sacharidů). Výrazné indukce dosáhl zejména klíčový enzym pro biosyntézu prolinu, P5CS (pyrroline-5-carboxylate synthase) a enzymy biosyntézy cukrů raffinóзовé řady. Listy a odnožovací uzle se lišily zejména mírou exprese a načasováním indukce jednotlivých genů, jejich spektrum bylo podobné. Výsledky naznačují, že jakkoli je aklimační odpověď listů a odnožovacích uzlů rozdílná, alespoň část je velmi podobná. To naznačuje zejména skupina společně regulovaných genů v průběhu aklimatizace (cca 1400 genů). Hodnoty mrazové tolerance dosáhly vrcholu po 3 dnech v chladu a 1 dni v -3 °C, kde dosáhla obě pletiva i nejvyšší absolutní hodnoty mrazové odolnosti, což naznačuje, že rostliny potřebují k vyvinutí maximální tolerance nejen dostatečně dlouhou dobu, ale i vystavení teplotám těsně nad bodem mrazu. Detailní analýzou skupin genů vytipovaných pomocí DNA čipů lze navrhnout geny, jejichž indukce je potenciálně nezbytná pro vyvinutí vysoké míry odolnosti vůči nízkým teplotám a lze je tedy využít k biotechnologickým účelům – ať už jako markéry mrazové odolnosti nebo potenciální cíle genetických manipulací.

## Poděkování

Autoři děkují laboratoři prof. L. Cattivelliho za pomoc při hodnocení genové exprese, zvláště A. Aprilemu, Ph.D. a dále Ing. J. Zámečnickovi, CSc. za pomoc s hodnocením mrazové tolerance. Práce probíhá za podpory Projektu MZe NAZV QH 81287 a MŠMT OC 09032

## Literatura:

- Chen, T.H. and Murata, N. (2008) Glycinbetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 13, 499 – 505.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T., Gusta, M.L. (2004) The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology*, 135, 1642-1653.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21, 535-553.
- Iba, K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 225-245.
- Prášil, I., Zámečník, J. (1998) The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, 40: 1-10.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1 – 14.

# Stanovení změny genové exprese *Arabidopsis thaliana* působením 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT)

Štrymplová Šťastná K.<sup>(1)</sup>, Ovesná J.<sup>(1)</sup>, Honys D.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

<sup>(2)</sup>Ústav experimentální botaniky AVČR, Rozvojová 135, Praha 6

e-mail: [stastna@vurv.cz](mailto:stastna@vurv.cz)

## Abstrakt

Pro efektivnost využití fytoředičnických metod je nutné získat přesné informace nejen o způsobu a schopnosti akumulace látek rostlinou, jejich toleranci ke kontaminujícím látkám, ale jsou také nutné informace o procesech na buněčné úrovni. Důležitým aspektem je znalost genetických základů a mechanismů akumulace či metabolizace. Pro analýzu genové exprese byly použity čipy firmy Affimetrix – *Arabidopsis* genome ATH1 Array. Získaná data byla normalizována a exprese genů (tři opakování) byla statisticky ověřena na hladině významnosti  $p\text{-value} = 0,05$ . Pro anotace genů byla použita databáze TIGR. Z 22 810 genů, které je možné analyzovat na čípech - *Arabidopsis* genome ATH1 Array, bylo exprimováno 17 307 genů. Celkem 3004 genů vykazovalo alespoň 1,5x změněnou expresi v jednom měření. Z tohoto počtu vykazovalo 345 genů zvýšenou expresi, 353 genů sníženou expresi a 2304 genů se stabilní expresí. Byly detekovány geny aktivní při metabolismu xenobiotik. Změna genové exprese se týkala zejména genů odpovídající obecně na abiotické stresy.

**Klíčová slova:** fytoředičnické, 2,4,6-trinitrotoluen, genová exprese

## Úvod

Více než 400 druhů rostlin je schopno akumulovat toxické kovy a ukládat je do různých orgánů (Brooks 1998) nebo je schopna metabolizace (degradace, transformace) mnohých perzistentních organických látek, čímž se ukazuje možnost využití těchto rostlin pro detoxikaci celé řady látek znečišťujících životní prostředí.

2,4,6-trinitrotoluen (TNT) byl používán jako výbušnina od začátku 20. století a jeho produkce se zrychlila během druhé světové války. TNT je zařazen mezi velmi stálé organické polutanty. Toxicita TNT u člověka způsobuje anémii a záněty jater (Rosenblatt, 1980), u

rostlin jejich zakrslost a chlorózu listů (Pavlostathis et al. 1998). Metabolismus TNT je charakterizován třemi fázemi. U první fáze byly definovány dva možné kroky iniciace katabolismu TNT: (i) redukce nitro- skupin za vzniku 2- nebo 4-hydroxylaminodinitrotoluenu (HADNT) a 2- nebo 4 aminodinitrotoluenu (ADNT) (Subramanian et al., 2006); (ii) oxidace methylových skupin nebo přímo hydroxylace aromatických jader. Ve druhé fázi dochází k redukci produktů HADNT a ADNT, které mohou být UDP-glykosyltransferázami (UGTs) konjugovány s cukry. Vzniklé konjugáty vykazují nižší toxicitu a vyšší rozpustnost než původní látka (Coleman et al. 1997). Ve třetí fázi se konjugáty mohou uvolnit z cytosolu do vakuol nebo apoplastu (Sandermann 1992) nebo inkorporovat do buněčné stěny (Sens et al., 1998).

V hydroponickém prostředí byly účinky TNT sledovány např. na: vojtěšce seté (Gorge et al., 1994), pšenici seté (Scheidemann et al., 1998), brukvi zelné (Schneider et al., 1996), topolu DN37 – hybrid (Thomposon et al., 1998), sveřepu bezbranného (Sun et al., 2000), lilku a revení (Nepovím et al. 2004), kukuřici, rýži, sóje (Vila et al. 2006) a v neposlední řadě na modelové rostlině huseníčku rolního – *Arabidopsis thaliana* (Ekman et al. 2003; Mentewab et al. 2005). Právě huseníček rolní zaujímá významný prvek ve studiích fytoremediace. Krátký životní cyklus, malá velikost genomu, dobrá schopnost růstu za kontrolních podmínek, velký počet semen, snadná transformace, známé sekvence a také ekonomická nenáročnost pěstování řadí právě *Arabidopsis thaliana* k často využívaným modelovým rostlinám v rámci genetických výzkumů (Page and Grossniklaus, 2002). Modelová rostlina byla použita např. při výzkumu akumulace rtuti (Heidenreich et al., 2001), caesia (Tobias et al. 2005), kadmia (Weber et al., 2006), selenu (Zhang et al., 2006).

Pro efektivnost využití fytoremediální metody je nutné získat přesné informace nejen o způsobu a schopnosti akumulace látek rostlinnou, jejich toleranci ke kontaminujícím látkám, ale jsou také nutné informace o procesech na buněčné úrovni. Důležitým aspektem je znalost genetických základů a mechanismů akumulace či metabolizace (Salt et al., 1998; Cobbett 2000). V buňce se vyskytuje nepřehledné množství molekul mRNA, proto je nutné pro jejich identifikaci použít vysokokapacitní analytický systém, který umožní detekci v jednom experimentu. DNA čipy takovouto analýzu umožňují a v dnešní době jsou nejvíce využívaným prostředkem pro měření hladin mRNA v transkriptomu sledovaného organismu.

## **Materiál a metodika**

Semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia byla sterilizována 70 % etanolem a v 10 % Savu. Ošetřená semena byla vložena na kultivační medium (Murashige and Skoog,

1962) připravené v Magenta boxu a umístěna do klimatizované místnosti s režimem: 16h světla a 8h tmy při stálé teplotě 20 °C. Po třech týdnech byly klíčící rostliny přendány na pevný nosič – perlit a dále pěstovány hydroponicky. Složení tekutého média bylo připraveno dle Norén a kol. (2004). Po týdnu bylo tekuté médium vyměněno a aplikován 24 hodinový stres TNT o koncentraci 0; 0,5; 5; 10 a 15 mg/l. Jako rozpouštědlo bylo použito DMSO (dimethylsulfoxid).

Izolace RNA byla provedena dle protokolu Invitrogen™ TRIzol®. Následně přečištěna setem RNeasy Mini Kit (Qiagen) včetně ošetření One-Column DNase Digestion s RNase-Free DNase Setem. Čistota a koncentrace izolované RNA byla detekována na spektrofotometru GeneQuant Pro (AP-Czech). Integrita RNA byla kontrolována metodou kapilární gelové elektroforézy přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Analyzovaný materiál byl vypěstován v roce 2007, ve stejném roce byla izolována RNA z listové tkáně (viz zpráva za rok 2007). Pro analýzu genové exprese byly použity čipy firmy Affimetrix – Arabidopsis genome ATH1 Array. Získaná data byla normalizována a exprese genů (tři opakování) byla statisticky ověřena na hladině významnosti  $p\text{-value} = 0,05$ . Pro anotace genů byla použita databáze TIGR (The Institute for Genomic Research). Geny byly roztrženy do funkčních kategorií dle databáze TAIR09 (The Arabidopsis Information Resources).

## Výsledky

Z 22 810 genů, které je možné analyzovat na čípech - Arabidopsis genome ATH1 Array, bylo exprimováno 17 307 genů. Celkem 3004 genů vykazovalo alespoň 1,5x změněnou expresi v jednom měření. Z tohoto počtu vykazovalo 345 genů zvýšenou expresi, 353 genů sníženou expresi a 2304 genů stabilní expresi. Na obrázku 1 je znázorněno procentické zastoupení genů zařazených do funkčních kategorií dle exprese genů (a) zvýšená exprese, (b) snížená exprese, (c) stabilní exprese. Z celkového počtu genů se zvýšenou genovou expresí připadá 14% genů, které byly zařazeny do funkční skupiny stresu. Byly detekovány geny aktivní při metabolismu xenobiotik.

V závislosti na koncentrační řadě TNT byla u genů aktivních při metabolismu xenobiotik detekována jejich zvýšená exprese: geny pro cytochrom P450 a karboxylesterázu byly zařazeny do metabolické funkční skupiny, geny pro peroxidázu do funkční skupiny stresu, geny pro glutathion S-transferázu byly zařazeny do funkční skupiny stresu a jeden gen do metabolické funkční skupiny. U genů aktivních při procesech změn vakuol byla detekována konstantní exprese. Tyto geny byly zařazeny do funkční skupiny týkající se

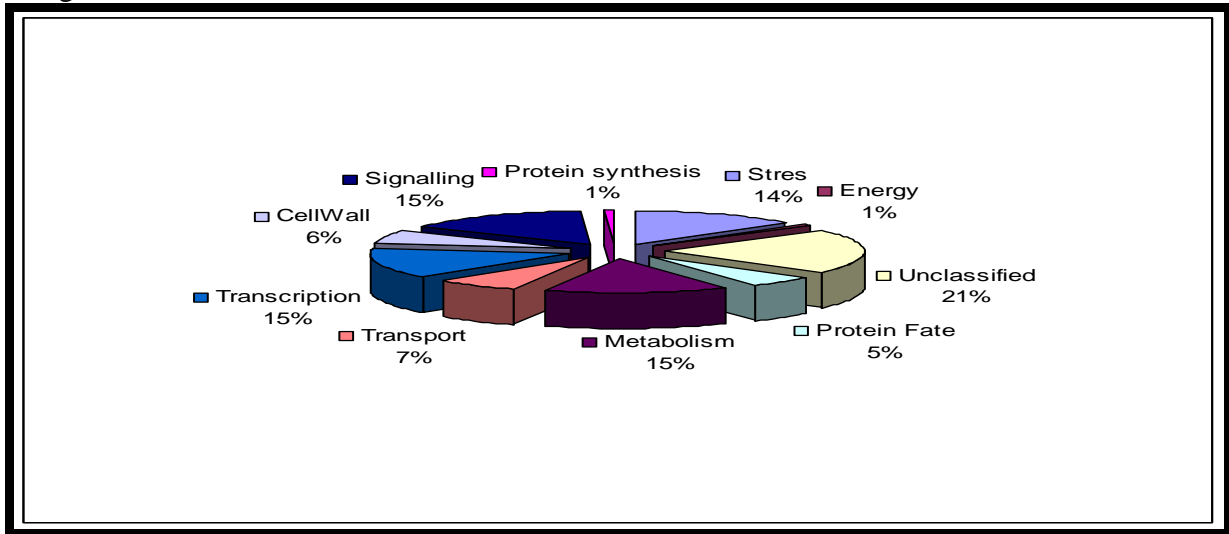
buněčné stěny. Dále došlo k detekci zvýšené exprese genů, které jsou obecně exprimovány na základě působení abiotického stresu, např.: geny protein - rezistentní k chorobám, dehydriny (ERD10, ERD14), COR314, ABC transportní proteiny, gen pro pozdější embryogenezi, transkripční faktor – WRKY54, chlad regulující gen 47. U genů účastnících se na procesu fotosyntézy byla detekována snížená exprese, vykazující závislost na koncentrační řadě TNT.

## **Diskuze**

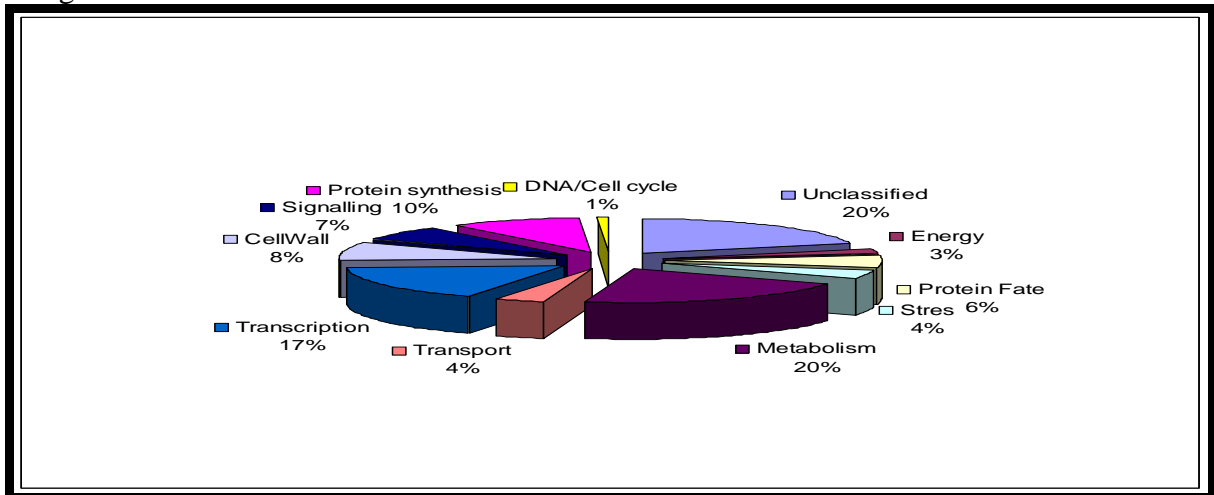
Enzymatická transformace xenobiotik byla u rostlin specifikována do třech etap. V první etapě jsou xenobiotika přijímána rostlinou a transformována enzymy cytochromem P450, karboxylesterázou a peroxidázou (Sandermann, 1994). V této práci byly detekovány geny pro výše uvedené enzymy a byla prokázána zvýšená exprese v závislosti na zvyšující se koncentraci TNT v jednotlivých měření. V druhé etapě dochází ke konjugaci transformovaných xenobiotik s D-glukózou, glutationem nebo aminokyselinami (Komoba et al., 1995) za působení enzymů glutation S-transferáza, glukosyltransferáza a malonyltransferáza. V naší práci jsme detekovali 4 geny pro glukosyltransferázu, které vykazovaly zvýšenou expresi v závislosti na zvýšené koncentraci TNT. Celkem 7 genů pro glukosyltransferázu detekovali Herrero et al. (2008). Ve třetím kroku dochází k ukládání a kompartmentaci; rozpustné látky jsou uloženy ve vakuolách, u nerozpustných látek je předpokládáno jejich uložení do buněčných stěn (Schroder and Collins, 2002). U genů, které se exprimují v procesech vakuol byly detekovány konstantní exprese. Ve studii Herrero et al. (2008) při působení stresu TNT po dobu 6-ti hodin nebyly detekovány žádné geny související s transportem látek do vakuol. S ohledem na úspěšnou detekci genů uváděných v první a druhé etapě enzymatické transformace xenobiotik, lze důvod konstantní exprese genů zařazených do třetí etapy přisuzovat krátkému působení vlivu stresu TNT, neboť Ekman et al. (2003) detekovali v rámci 5ti-denního stresu TNT geny uváděné v první a druhé etapě a také gen pro enzymatické procesy vakuol.



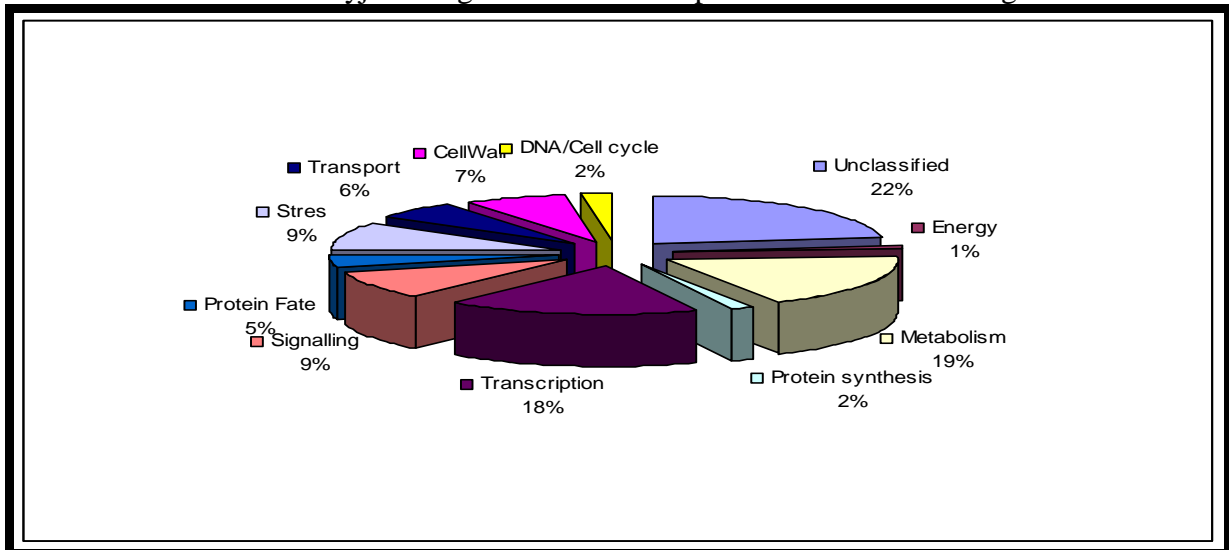
Obrázek 1a: Procentické vyjádření genů se zvýšenou expresí genů dle funkčních kategorií.



Obrázek 1b: Procentické vyjádření genů se sníženou expresí dle funkčních kategorií.



Obrázek 1c: Procentické vyjádření genů se stabilní expresí dle funkčních kategorií.



## Poděkování: Tento výzkum byl realizován za finanční podpory MŠMT, projekt NPVII 2B06187

### Literatura

- Brooks R.R. (1998). Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. CAB International Publishing. Oxford University Press. ISBN-0851992366.
- Cobbett Ch. (2003). Heavy metals and plants - model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist*. 159:289-293
- Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Emyr Davies T.G. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2: 144–151.
- Ekman D.R., Lorenz W.W., Przybyla A.E., Wolfe N.L., Dean J.F.D. (2003). SAGE analysis of transcriptome responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to 2,4,6-Trinitrotoluene. *Plant Physiology*. 133:1397-1406.
- Gorge E., Brandt S., Wener D. (1994) Uptake and metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene in higher plants. *Environ. Sci. Pollut. R.* 4: 229-233.
- Heidenreich B., Mayer K., Sandermann H. Ernst D. (2001). Mercury-induced genes in *Arabidopsis thaliana*: identification of induced genes upon long-term mercuric ion exposure. *Plant, Cell and Environment*. 24: 1227–1234.
- Herrero F.G., Lorenz A., Larson T., Graham I.A., Bowles D.J., Rylott E.L., Bruce N.C. (2008). Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in *Arabidopsis*: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-97.
- Nepovím A., Hubálek M., Podlipná R., Zeman S., Vaněk T. (2004). In-vitro degradation of 2,4,6-trinitrotoluene using plant tissue cultures of *Solanum aviculare* and *Rheum palmatum*. *Eng. Life Sci.* 4: 46-49.
- Norén H., Svensson P., Andersson B. (2004). A convenient and versatile hydroponic cultivation system for *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 121: 343-348.
- Pavlostathis S.G., Comstock K.K., Jacobson M.E., Saunders F.M. (1998). Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2266–2273.
- Rosenblatt D.H., (1980). Toxicology of explosives and propellants. In: S.M. Kaye (Ed.). *Encyclopedia of Explosives and Related Items*. US Army Armament Research Development Command. Large Caliber Weapons System Laboratory. Dover. New Jersey. 322–336.
- Sahr T., Voigt G., Paretzke H.G., Schramel P., Ernst D. (2005). Caesium-affected gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 165: 747–754.
- Sandermann H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics – the green liver concept. Abstract of Paper Of The American Chemical Society. 4:62-AGRO.
- Sandermann H. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the green liver concept. *Pharmacogenetics*. 4: 225-241.
- Sens C., Scheidemann P., Klunk A., Werner D. (1998). Distribution of <sup>14</sup>C TNT and derivatives in different biochemical compartments of *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Sci Pollut Res.* 5: 202–208
- Scheidemann P., Klunk A., Sens C., Werner D. (1998). Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. *J. Plant physiol.* 152: 242-247.
- Schneider K., Oltmanns J., Radenberg T., Schneider T., PaulyMundegar D. (1996). Uptake of nitroaromatic compounds in plants – implications for risk assessment of ammunition sites. *Environ. Sci. Pollut. R.* 3: 138-138.
- Schroder P., Collins C. (2002). Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolisms of organic xenobios in plant. *International Journal of phytoremediation* 4:247-265.
- Subramanian M., Oliver D.J., Shanks J.V. (2006). TNT phytotransformation pathway characteristics in *Arabidopsis*: Role of aromatic hydroxylamines. *Biotechnol Prog.* 22: 208-216.
- Thompson P.L., Ramer L.A., Schnoor J.L. (1998). Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environmental Science and technology*. 32:975-980.
- Vila M., Lorber-Pascal S., Laurent F. (2006). Fate of RDX and TNT in agronomic plants. *Environmental Pollution*. 148: 148-154.
- Weber M., Trampczynska A., Clemens S. (2006). Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment*. 29: 950–963.
- Zhang L., Byrne P.F., Pilon-Smits E.A.H. (2005). Mapping quantitative trait loci associated with selenate tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 170: 33–42.

# Aktuální otázky stanovení GMO

Ovesná J., Pouchová V.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6

e-mail: [ovesna@vurv.cz](mailto:ovesna@vurv.cz)

## Abstrakt

Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou celosvětově uváděny do oběhu a v rámci EU je nakládání s nimi kontrolováno podle řady směrnic. Sledují se jak GMO uvolněné do oběhu, pro pěstování, tak GMO v EU nepovolená. Byly zaznamenány případy nízkých příměsí nepovolených GMO a tyto byly vedny v RASFF. GMO se stanovují podle validovaných postupů a to na úrovni ISO a dále pak validované v rámci EU referenční laboratoří evropského společenství. Principy metod a postupy jsou diskutovány v dále uvedeném příspěvku.

**Klíčová slova:** GMO, stanovení, PCR

## Úvod:

Geneticky modifikované organismy jsou výsledkem vnesení cizorodého genu do genetického základu příjemce. Proto i metody stanovení jsou založeny na detekci příslušného genu nebo odpovídajícího proteinu. Metody využívající stanovení přítomnosti metabolitů se zatím v širokém měřítku nevyužívají. V budoucnu však, pokud se budou na trhu uplatňovat fortifikované potraviny a rostliny pro alternativní využití produkce, kde otázka obsahu vitamínu, minerálních látek nebo látek určených pro speciální využití může být klíčová.

## Validované metody a akreditace

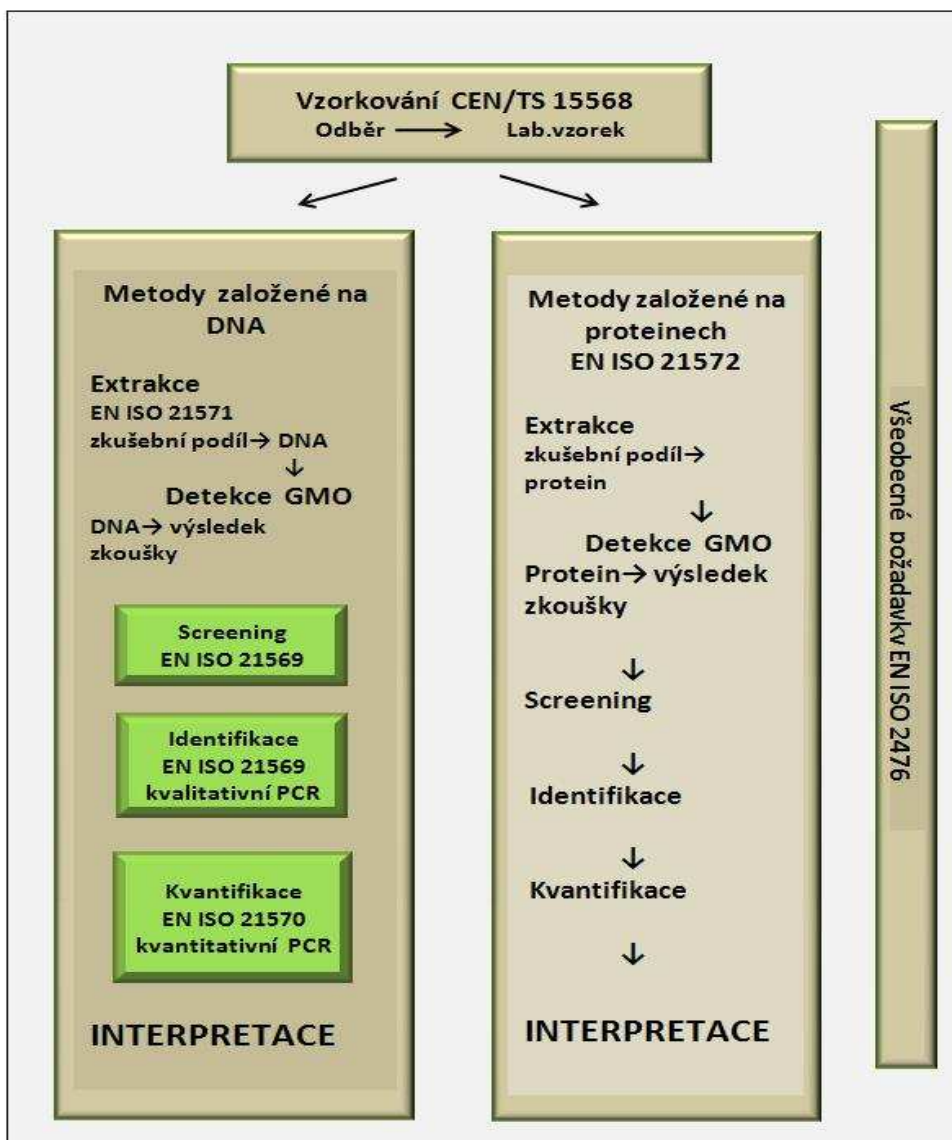
V současnosti se využívají metody založené na PCR (polymerázové řetězové reakci) v případě DNA a ELISA v případě proteinů. PCR analýza vyžaduje izolaci DNA. DNA je poměrně stabilní molekula, která je detekovatelná i ve výrobcích komplexních nebo zpracovaných. Vyžaduje extrakci a purifikaci DNA, provedení PCR, kvantifikaci zastoupení GM materiálu v případě pozitivního nálezu metodou real-time PCR. Metody extrakce

nukleové kyseliny, PCR a real-time PCR jsou popsány v příslušných ISO normách, stejně tak postupy pro analýzu proteinu. Schéma postupu viz Obr.1.

Základem správných výsledků je kvalitní vzorkování materiálu. Kromě EN/TS norem existují dokumenty národní - SRN, Francie, ČR i mezinárodní zjm. Výzkumného centra Evropské Unie (JRC, EC Ispra), které se zabývají vzorkováním.

Ve VÚRV, v.v.i. byl vypracován metodický pokyn pro vzorkování porostů pro potřeby Ministerstva životního prostředí i pro potřeby státní správy.

**Obr. 1: Schéma postupu při stanovení GMO**



Podle požadavků evropské legislativy musí být všechny laboratoře provádějící kontrolu GMO a validační studie pro CRL akreditovány podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2005. Akreditace znamená uznání způsobilosti zkušební laboratoře národním akreditačním orgánem k provádění zkoušek a nebo vzorkování uvedených v příloze k Osvědčení o akreditaci. V rámci ČR provádí akreditaci národní akreditační orgán, kterým je ČIA - Český institut pro akreditaci, člen EA, ILAC a IAF. ČIA jako Národní akreditační orgán založený vládou České republiky poskytuje své služby v souladu s platnými právními předpisy ve všech oblastech akreditace jak státním, tak privátním subjektům. Princip jednotného evropského akreditačního systému tvořeného národními akreditačními orgány, které fungují podle jednotných pravidel a akreditují podle definovaných mezinárodně uznávaných norem, vychází z postoje ES specifikované v Globální koncepci o přístupu ke zkoušení a certifikaci. V souladu s požadavky mezinárodních norem a dokumentů ČIA provádí nestranné, objektivní a nezávislé posouzení způsobilosti (akreditaci).

### **Legislativa:**

V České republice je nakládání s geneticky modifikovanými organismy právně upraveno od roku 2001.

Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2001/18/EC ze dne 21. března 2001 o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí a o zrušení směrnice Rady 90/220/EEC byla do národní legislativy transponována v únoru 2004 zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, který byl v souvislosti s naším vstupem do EU novelizován zákonem č. 346/2005 Sb. . Prováděcím předpisem je vyhláška č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Zákon stanoví povinnosti osob, působnost správních úřadů, administrativní postupy při povolování nakládání s GMO a genetickými produkty, včetně informování a zapojení veřejnosti. Ústředním správním úřadem vydávajícím oprávnění k nakládání s GMO podle tohoto zákona je Ministerstvo životního prostředí, jako odborný poradní orgán ministerstva k hodnocení rizik pro životní prostředí byla zřízena Česká komise pro nakládání s GMO. Vzhledem k širokému spektru aplikací GMO MŽP úzce spolupracuje s Ministerstvem zdravotnictví a Ministerstvem zemědělství, s odbornými pracovišti a kontrolními laboratořemi.

Národní síť GMO laboratoří byla ustanovena dne 31.05.2006 za účelem vyšší efektivity práce GMO laboratoří. Cílem NSGL je řešení aktuálních problémů detekce a kvantifikace GMO pro potřeby státní správy v návaznosti na výzkum v ČR. Současně síť zajišťuje efektivní kontakt s ENGL a CRL prostřednictvím národní referenční laboratoře (NRL) a zvoleného zástupce českých GMO laboratoří sdružených v ENGL do řídicího výboru ENGL. NSGL tvoří NRL s čtyřmi dalšími subjekty, které jsou členy ENGL a laboratoř ÚKZÚZ.

Národní síť reaguje na aktuální požadavky a potřeby kontroly trhu, vytváří podklady pro harmonizovanou činnost laboratoří a zabezpečení kontrolní činnosti na vysoké úrovni.

Národní referenční laboratoř pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting ve VÚRV, v.v.i. byla jmenována MZe s účinností od 1. července 2006 národní referenční laboratoř pro geneticky modifikované organizmy (GMO)

Toto špičkově vybavené pracoviště zajišťuje vývoj a validaci metod pro detekci a kvantifikaci GMO v rámci projektů podporovaných MZe, MŽP a MŠMT.

Referenční laboratoř zajišťuje pro orgány státní správy a jejich kontrolní orgány zázemí pro plnění direktiv EU a legislativy ČR harmonizované s legislativou EU. Konkrétně NRL spolupracuje se sítí laboratoří European Network of GMO Laboratories (ENGL) a CRL při JRC Ispra a je zapojena do projektů ENGL a validačních testů CRL. NRL je také metodickým zázemím pro potřebný rozvoj metod a pomoc laboratořím, které provádějí rutinní analýzy.

NRL každoročně poskytuje aktuální seznam kvalitativních PCR detekcí a kvantitativních RT-PCR analýz, které si rutinní laboratoře mohou u NRL objednat, v případě že nemají potřebnou detekční nebo kvantifikační metodu zavedenou.

NRL dále organizuje semináře a školení o aktuálních otázkách GMO pro pracovníky MZe ČR a státní správy. Pracoviště spolupracuje úzce s Evropskou kontrolní laboratoř a podílelo se již na řadě validačních studií. Je smluvním pracovištěm Institutu pro referenční materiály společného výzkumného centra EU v Geelu v Belgii, pro které provedlo několik testů.

NRL je členem European Network of GMO Laboratories (ENGL) podle nařízení EU 1829/2003 a 882/2004. Subjekt je akreditován pro provádění zkoušek GMO podle ČSN EN ISO 17025:2005, ve flexibilním rozsahu. Pracoviště je členem národní sítě laboratoří a smluvní laboratoř České inspekce životního prostředí. Pracoviště provádí rozborů vzorků pro kontrolu pravidel ko-existence v ČR. Pracoviště se podílí na řešení výzkumných projektů.

**Závěr:**

Geneticky modifikované organismy představují nový prvek v zemědělské a potravinářské výrobě, který doplňuje tradiční technologie. Nakládání s GMO a odvozenými produkty je upraveno legislativou, nad jejím dodržováním je dohlíženo dozorovými orgány a jsou k dispozici postupy a nástroje k zajištění efektivního využívání tohoto výsledku vývoje vědy.

**Poděkování:** Tento příspěvek vznikl za finanční podpory MŠMT, projekt OC 09031 a VZ MZE0002700604.