

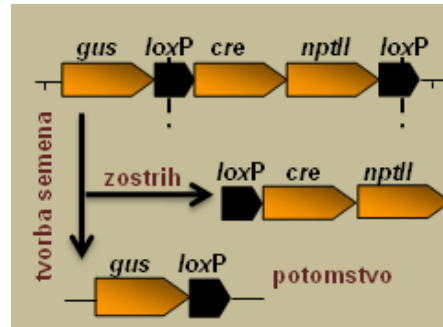
PROJEKT: SAV-FM-EHP-2008-02-01

Názov projektu / Project title: Bio-bezpečná transgénna repka prostredníctvom inováčných biotechnológií. Biosafe transgenic oilseed rape through innovative biotechnology

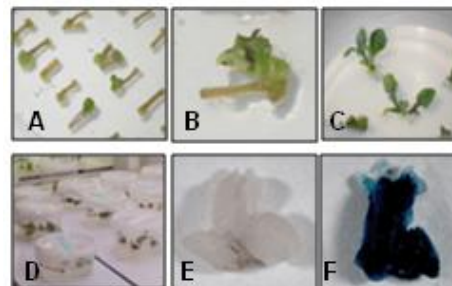
Konečný prijímateľ / Project promoter: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV / Institute of Plant Genetics and Biotechnology SAS

Jednou z priorit EÚ je produkcia nutrične kvalitných poľnohospodárskych plodín, odolných voči rôznym typom environmentálneho stresu. Toto je možné dosiahnuť cestou produkcie geneticky modifikovaných rastlín s vylepšenými vlastnosťami, ale len v prípade vyriešenia sporných otázok týkajúcich sa ich bio-bezpečnosti. Hlavné prítomnosť génov rezistencie voči antibiotikám v genóme transgénnych rastlín predstavuje určité riziko týkajúce sa ich nekontrolovaného šírenia v prírode. Na druhej strane, gény rezistencie voči antibiotikám zohrávajú nevyhnutnú úlohu počas procesu regenerácie transformovaných rastlín, následne sa však stávajú nadbytočné a je žiadúce ich z genómu transgénnych rastlín odstrániť. Jednou z možností ako to dosiahnuť je využiť technológiu zahrňujúcu Cre/loxP systém.

Predkladaný projekt je zameraný na aplikáciu tohto systému na repku olejku, ktorá má v súčasnosti stúpajúci trend využitia ako potravina aj ako biopalivo. Zostrih nežiaducich sekvencií bude riadený silným, pletivovo špecifickým kruciferinovým promótorom *cruC* a prebehne vo vyvíjajúcich sa semenách transgénnych rastlín. Výsledkom tohto procesu bude transgénna repka olejka, ktorá by mala byť



Scheme of selectable marker *nptII* gene excision in progeny of transgenic plants



A – D: The *in vitro* regeneration of oilseed rape, E – F: histochemical activity detection (blue staining) of β -glucuronidase gene in control-non-transformed (E) and in transformed (F) tissues of oilseed rape.

One of the priorities of EU is the production of nutritionally valuable crops that are more resistant to various types of environmental stress. Genetically modified plants represent a potential tool to achieve this goal under condition of solved questions concerning their bio-safety. Especially the presence of genes for resistance to antibiotics in the genome of transgenic plants represents a risk due to their potential to spread into environment. On the other hand, these genes play inevitable role during processes of regeneration of transgenic plant from transformed tissue. After obtaining transgenic plants, these selectable marker genes become superfluous. In recent few years, a strategy of transgene removal from genome of transgenic plants has been suggested, that exploits Cre/loxP self excision system.

The proposed project is focused on implementation of this excision system on oilseed rape that has increasing importance both food, as well as bio-fuel. In our system the excision of undesired gene is triggered by the strong, specific cruciferin (*cruC*) promoter that is solely active in developing seeds of transgenic plants. The result of this process is expected to be a transgenic oilseed rape with eliminated risk of undesired gene flow into environment.

bezpečnejšia z hľadiska voľného toku nežiaducich génov do životného prostredia.

Prvá časť projektu je zameraná na prípravu transgénnych rastlín repky olejky s odstráneným selekčným markerovým génom. Súčasťou tejto časti je vypracovanie transformačného a regeneračného protokolu pre vybrané odrody repky olejky. Na základe predbežných výsledkov regeneračných testov sme na transformačné experimenty vybrali 6 odrôd repky olejky, pričom ako východiskový materiál používame kotyledonárne petioly, segmenty hypokotylu z rastlínok klíacich v tme a za svetla. Zároveň sme uskutočnili test citlivosti voči antibiotikám hygromycínu, alebo kanamycínu/geneticínu (G-418), ktoré využívame ako selekčné látky počas regenerácie transformovaných buniek v intaktné rastliny.

Druhá časť projektu je zameraná na izoláciu DNA sekvencií pletivovo špecifických promótorov využiteľných v Cre/loxP stratégii prípravy marker-free transgénnych rastlín. Na základe dostupných dát sekvenovaného genómu *Arabidopsis thaliana* L. a údajov o expresii väčšiny jeho génov sme z databázy Arabidopsis eFP Browser vybrali 5 génov s vysokou expresiou v peli a/alebo v embryu a minimálnou expresiou v ostatných pletivách alebo orgánoch. Následne sme prostredníctvom nástroja Sequence Viewer databázy TAIR zistili sekvenciu jednotlivých promótorov, izolovali ich za pomoci špecifických primerov metódou PCR, klonovali do pGEM-T easy klonovacieho vektora a restriktívnu analýzou preverili pravosť získaných sekvencií.

Tissue specificity	Denomination of respective promoters genes (TAIR)	The length of PCR amplicons v bp
Embryo	At2g02515	2335
Embryo	At5g38170	2528
Pel'	At5g43340	2026
Pel'	At4g16160	2046
Pel'	At5g20390	680

Table shows the list of isolated promoters and their characterisation.



V rámci **popularizačných aktivít** sme sa prezentáciou v podobe posteru zúčastnili medzinárodného veľtrhu "Veda - vzdelávanie – Inovácie", ktorý sa konal v dňoch 16. - 19. apríla 2009 na výstavisku Agrokomplex v Nitre. Poster presentation in the frame of International exhibition "Science – Education – Innovation".

First part of the project is focused on generation of transgenic oilseed rape plants with removed selectable marker gene. This includes the elaboration of the transformation and regeneration protocol for selected species. Based on preliminary results of regeneration test, six oilseed rape species have been selected for transformation experiments in which as a starting material cotyledonary petioles, hypocotyl segments germinating in dark and in light conditions, have been used. At the same time, the test of sensitivity to antibiotics hygromycin and kanamycin/geneticin (G-418) was carried out since these agents we apply for selection of transformed cells during regeneration into intact transgenic plants.

Second part of the project is focused on isolation of DNA sequences of tissue-specific promoters applicable in Cre/loxP strategy intended to marker-free transgenic plants production. Based on available data of sequenced genome of *Arabidopsis thaliana* L. and expression pattern of individual genes stated in database Arabidopsis eFP Browser we have selected five genes with high expression in pollen and/or embryo and low expression in other tissue and organs. Subsequently via Sequence Viewer tool of TAIR database the sequence of individual promoters was obtained, using PCR method and specific primers were isolated, into pGEM-T easy vector cloned and using restriction analyses verified.

