

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V
ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra: rostlinné výroby



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Porovnání účinnosti přímé a nepřímé metody genetické transformace u bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Daniela Pavingerová, CSc.

Autor:

Bc. Marie Příbylová

2008

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Porovnání účinnosti přímé a nepřímé metody genetické transformace u bramboru (*Solanum tuberosum* L.)“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury, kterou uvádím v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích
12. dubna 2008

Marie Příbylová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svým školitelům Mgr. Daniele Pavingerové, CSc. a Prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky, které mi při vypracování této práce poskytli.

Rovněž děkuji laborantce Jitce Maškové z Ústavu Molekulární biologie rostlin za velkou trpělivost při zaučování v laboratoři a za pomoc při přípravě pokusů.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1 Nepřímé metody transformace	8
2.1.1 Charakteristika bakterií rodu <i>Agrobacterium</i>	8
2.1.2 Ti-plazmid bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.1.3 Přenos a integrace T-DNA	10
2.1.4 Vektory pro transformace	10
2.1.5 Disková metoda transformace	11
2.2 Přímé metody transformace	12
2.2.1 Transformace protoplastů	12
2.2.2 Transformace mikroprojektily	13
2.2.3 Transformace chloroplastů	15
2.3 Selekční systémy	16
2.3.1 Negativní selekce	16
2.3.2 Pozitivní selekce	16
2.4 Reportérové geny	17
2.4.1 Gen <i>gus</i>	17
2.4.2 Tranzientní exprese	18
2.5 Solanum tuberosum	19
2.5.1 Původ brambor	19
2.5.2 Šlechtění brambor	19
2.5.3 Výsledky šlechtění brambor	21
2.5.4 Situace v České republice	22
3. MATERIÁL A METODY	23
3.1 Rostlinný materiál	23
3.1.1 Kultivace rostlin	23
3.1.2 Příprava kultivačních médií	23
3.1.3 Složení kultivačních médií	23

3.2 Plazmidový konstrukt	25
3.3 Transformace bakteriemi <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3.3.1 Zaočkování bakterií a jejich příprava na transformaci	25
3.3.2 Transformace internodií bramboru a regenerace rostlin	25
3.4 Transformace mikroprojektily	26
3.4.1 Příprava rostlinného materiálu	26
3.4.2 Příprava částic zlata	26
3.4.3 Příprava mikroprojektilů	27
3.4.4 Transformace internodií bramboru	27
3.4.5 Detekce tranzientní exprese genu <i>gus</i> a regenerace rostlin	28
3.5 Detekce přítomnosti transgenů v rostlinách pomocí „tissue“ PCR	29
3.5.1 Příprava vzorků na „tissue“ PCR	29
3.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	30
3.5.3 Elektroforéza	30
3.6 Stanovení aktivity enzymu β-glukuronidázy	31
3.6.1 Fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy	31
3.6.2 Měření proteinů	32
3.6.3 Histochemické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy	33
4. VÝSLEDKY	34
4.1 Transformace bakteriemi <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
4.2 Analýza rostlin transformovaných bakteriemi <i>A. tumefaciens</i>	36
4.2.1 Histochemické a fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy...	36
4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	39
4.2.3 Porovnání jednotlivých analýz transformovaných rostlin	41
4.3 Transformace mikroprojektily	43
4.3.1 Průběh transformace	43
4.3.2 Tranzientní exprese	44
4.3.3 Regenerace a zakořeňování prýtů	46
4.4 Porovnání účinnosti transformací	48

5. DISKUZE	49
5.1 Transformace bakteriemi rodu <i>Agrobacterium</i>	49
5.1 Transformace mikroprojektily	52
6. ZÁVĚR	55
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

1. ÚVOD

Brambory jsou po pšenici, kukuřici a rýži čtvrtou nejvýznamnější plodinou na světě. Pěstují se ke konzumním, krmným a zpracovatelským účelům, ale v současné době dochází k poklesu využití brambor jako potravin a naopak vzrůstá význam zejména geneticky modifikovaných (GM) odrůd určených pro zpracovatelský průmysl.

Rostliny bramboru jsou pro genetické modifikace vybírány z několika důvodů. Jsou množeny převážně vegetativně, což zajišťuje, že se vložená vlastnost udrží v genotypu rostliny několik generací, dále na rozdíl od většiny vyšších rostlin vytvářejí hlízy, které mohou sloužit jako zásobárna určitých látek a nelze ani opomenout, že brambor náleží do čeledi lilkovitých, kam patří i tabák, který se používá jako modelová rostlina většiny transformací vyšších rostlin.

K přenosu genů do genomu rostlin se využívají jednak nepřímé transformace pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*, jednak transformace přímé, nejčastěji chemické působení polyetylglykolu na izolované protoplasty, případně elektroporace nebo mikroprojektily. Každá transformační metoda má své výhody, nevýhody a omezení.

Dnes se v principu rozlišují tři základní skupiny GM rostlin (Navrátil, 2004). První generace GM rostlin zahrnuje odrůdy, které jsou výhodné z hlediska zemědělské produkce (odolnost k herbicidům, odolnost ke škůdcům, ale i odolnost vůči virovým chorobám). Druhá generace je typická změnou složení koncového produktu (např. lepší složení proteinů, změněné složení olejů, vyšší obsah vitaminů). Příkladem je tzv. „zlatá rýže“ s vyšším obsahem vitamínu A. Třetí generace by měla nalézt uplatnění ve farmaceutickém průmyslu a zdravotnictví (např. tzv. jedlé vakcíny, výroba některých kofaktorů, enzymů apod.).

Celosvětové plochy GM plodin rok od roku vzrůstají, v roce 2007 dosáhly výměry téměř 115 milionů hektarů. Oficiálně se GM plodiny pěstují ve 23 zemích, mezi něž se řadí i Česká republika, kde se v roce 2007 pěstovalo asi 5 000 hektarů transgenní kukuřice.

Mezi největší pěstitele náleží tradičně USA, které v roce 2007 pěstovaly GM plodiny na 57,7 milionech ha, následované Argentinou (19,1 mil. ha), Brazílií (15 mil. ha), Kanadou (7 mil. ha), Indií (6,2 mil. ha) a Čínou (3,8 mil. ha). Na většině ploch se pěstují čtyři plodiny: sója, kukuřice, bavlník a řepka olejná (Clive, 2007).

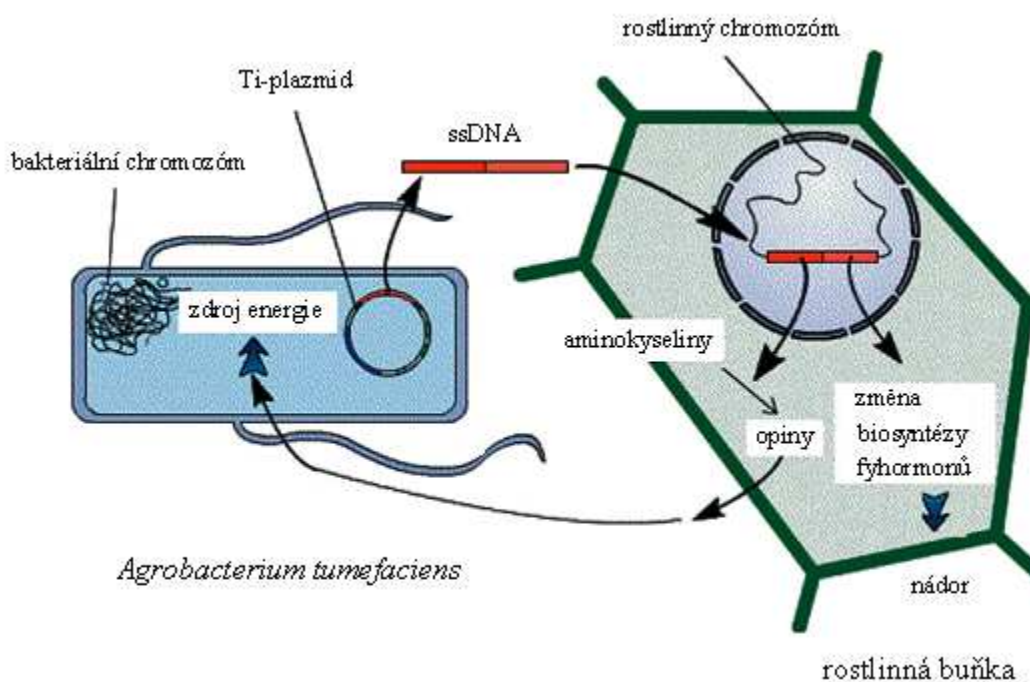
Cílem mé diplomové práce bylo porovnání účinnosti transformace internodií bramboru (*Solanum tuberosum* L.), odrůdy Bintje, při použití dvou odlišných metod. Nepřímé metody transformace prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a přímé metody transformace mikroprojektily. Pro srovnání účinnosti byl při transformacích použit shodný plazmid p35SGUSint. Důkazem přítomnosti transgenu v rostlinách byla jednak polymerázová řetězová reakce (PCR) a jednak stanovení exprese genu *gus* fluorimetrickým a histochemickým způsobem.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Nepřímé metody transformace

Nepřímé metody transformace jsou založeny na využití přenašečů (viry nebo bakterie), které jsou schopné vnést část své genetické informace do hostitelské buňky. Obecně používaným přenašečem jsou bakterie rodu *Agrobacterium* z čeledi *Rhizobiaceae* (Obr. 1), které umožňují včleňovat do rostlinného genomu až 150 kb velké úseky DNA (Hamilton *et al.*, 1996).

Obr. 1: Princip transformace pletiv bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* (Vejl, 2007).



2.1.1 Charakteristika bakterií rodu *Agrobacterium*

Bakterie rodu *Agrobacterium* jsou gram-negativní půdní bakterie zahrnující čtyři druhy: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* a *A. rubi*. V buňkách bakterií je přítomný velký plazmid, který kóduje výhodné znaky (např. rezistence, syntézy specifických látek aj.) a také u některých druhů podmiňuje virulenci. V případě bakterií *A. tumefaciens* je tento virulentní plazmid nazýván Ti-plazmid a v případě bakterií *A. rhizogenes* pak Ri-plazmid (Mlynářová a Nap, 1997).

Bakterie *A. tumefaciens* způsobují u infikovaných rostlin tvorbu neorganizovaných nádorů, zatímco bakterie *A. rhizogenes* vyvolávají intenzivní tvorbu kořenů. Nádory a tvorba kořenů jsou výsledkem přenosu relativně malého a přesně definovaného úseku Ti- nebo Ri-plazmidu, který se nazývá T-DNA (transferred DNA), z bakteriálních buněk do infikované rostlinné buňky (Weising a Kahl, 1996).

2.1.2 Ti-plazmid bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Ti-plazmid má délku v rozmezí 150 - 200 kb, což odpovídá asi 3 % délky chromozomu bakterie *A. tumefaciens*. Plazmid v sobě nese několik úseků nepostradatelných k indukci tumorů.

Prvním je T-DNA o velikosti 15 - 45 kb, která se skládá z 25 bp dlouhých hraničních sekvencí, mezi nimiž jsou vloženy dva typy genů (Mlynářová a Nap, 1997):

1) Geny pro syntézu nádorově specifických látek (opinů)

Opiny slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie pro bakterie, které infekci způsobily. Podle typu opinů se bakterie *Agrobacterium tumefaciens* dělí na jednotlivé kmeny např. nopalínové, oktopínové, kmeny produkující manopin, agropin aj.

2) Geny pro nové cesty syntézy fytohormonů

Auxiny a cytokininy, produkované vnesenými geny T-DNA, působí na diferenciaci rostlinných buněk tak, že pozměněná pletiva rostou jako nádory.

Druhou nezbytnou část Ti-plazmidu tvoří asi 35 kb dlouhý úsek virulence (*vir*), který nese geny umožňující přenos T-DNA do rostlinných buněk a její integraci v rostlinném genomu. *Vir* oblast je lokalizována v různých vzdálenostech vlevo od T-DNA. Do přenosu T-DNA se prokazatelně zapojuje šest operonů této oblasti - *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* (Ondřej, 1992).

Ti-plazmid nese ještě další úseky nutné pro funkci plazmidu v bakteriálních buňkách a pro interakci bakterií s rostlinnými buňkami. Jsou to například geny, které kódují enzymy podmiňující degradaci opinů (Ondřej a Drobník, 2002).

2.1.3 Přenos a integrace T-DNA

Bakterie rodu *Agrobacterium* dokáží rozpoznat poraněné rostlinné buňky. Tato vlastnost je řízena proteiny kódovanými geny bakteriálního chromozomu *chvA*, *chvB* a *pscA*. Chemotaxí se bakterie přiblíží k poraněné buňce, přichytí se na buněčnou stěnu a zároveň se aktivuje *vir* oblast (Weising a Kahl, 1996). Jednovláknové kopie T-DNA jsou uvolněny zlomem mezi 3. a 4. bází pravého hraničního úseku. Zlomy jsou indukovány endonukleázou, kterou kódují geny *virD1* a *virD2*. Vytvoří se komplex T-DNA a polypeptidů *virD1*, *virD2* a *virE2* a možná některých *virB*. Proteiny *virD2* a *virE2* chrání T-DNA před 5'-3' exonukleázami. Takto je T-DNA přenesena přes buněčnou stěnu a integruje se do buněčného jádra (Gelvin, 2003).

2.1.4 Vektory pro transformace

Pro využití bakterií rodu *Agrobacterium* jako přenašečů transgenů je třeba vyměnit původní geny T-DNA (Ondřej *et al.*, 1999). Konstrukty genů se vždy skládají z transkripčních regulačních sekvencí (promotor, terminátor) a oblastí kódujících proteiny. Nejčastěji používané promotory jsou 35S CaMV a *nos* (Christou, 1996).

Pro úpravu T-DNA v plazmidu byly vyvinuty dvě základní strategie:

1) Intermediární vektor

Vektorem je malý plazmid (např. z bakterie *E. coli*), který nese klonovaný úsek T-DNA. Do tohoto úseku je restričním štěpením a ligací včleněn žádaný gen. Plazmid je konjugací vložen do buněk bakterií rodu *Agrobacterium*, kde dojde k homologní rekombinaci mezi úseky Ti-plazmidu a malého intermediárního plazmidu (Zambryski *et al.*, 1983).

2) Binární vektory

Tyto vektory jsou založeny na principu rozdělení Ti-plazmidu na dvě části. Větší z obou plazmidů obsahuje úsek virulence. Menší plazmid nese T-DNA, má vhodná restriční místa a je dostatečně malý, aby bylo možné vnášet požadované geny přímo do T-DNA (Van den Elzen *et al.*, 1985).

Binární vektory se staly základem zejména přímé transformace, protože se s nimi snadno manipuluje a k vytvoření požadované T-DNA nevyžadují homologní rekombinace (Mlynářová a Nap, 1997).

2.1.5 Disková metoda transformace

V roce 1985 Horsch se spolupracovníky zavedli metodu transformace listových disků (Horsch *et al.*, 1985).

Principem metody je společná kokultivace listových disků s bakteriemi rodu *Agrobacterium*. K tomu, aby se bakterie přichytily na povrch buňky, postačuje krátká doba kokultivace. Avšak pro přenos a integraci bakteriální T-DNA do rostlinné buňky je třeba prodloužit dobu působení bakterií a oddálit aplikaci antibiotik používaných k jejich likvidaci tím, že se po transformaci explantáty kultivují nejprve 24 - 48 hodin na médiu bez antibiotik.

Následná kultivace probíhá na agarové půdě, která kromě anorganických látek a sacharózy obsahuje antibiotikum nutné pro eliminaci bakterií rodu *Agrobacterium* (např. timentin), dále selekční činidlo, nejčastěji antibiotikum, zajišťující přežití rostlinným buňkám, u nichž došlo k přenosu T-DNA (např. kanamycin, hygromycin) a růstové látky, které navozují kalogenezi a následnou regeneraci pupenů a stonků.

Metoda transformace listových disků reprezentuje ideální kombinaci vysoké frekvence transformace s jednoduchou a rychlou selekcí a regenerací transformovaných rostlin (Weising *et al.*, 1988).

Zpočátku se bakterie rodu *Agrobacterium* používaly převážně k transformacím dvouděložných rostlin, neboť tyto rostliny patří mezi přirozené hostitele této bakterie. V současnosti se však bakteriemi rodu *Agrobacterium* transformují i některé jednoděložné rostliny, což bylo umožněno jednak použitím supervirulentních kmenů bakterií a jednak vývojem nových konstruktů (Veluthambi *et al.*, 2003). Transformují se například cukrová třtina (Arencibia *et al.*, 1998), kukuřice (Graves a Goldman, 1987), rýže (Hiei *et al.*, 1994), pšenice (Marks *et al.*, 1989) aj. Gelvin (2003) uvádí, že se bakterie rodu *Agrobacterium* využívají také k transformaci vřeckovýtrusých a stopkovýtrusých hub, kvasinek a byl proveden i přenos genetické informace do lidských buněk.

Transformace metodou listových disků byla modifikována prakticky na jakoukoli část rostliny např. segmenty hypokotylů (Khan *et al.*, 1994), kořenů a hlíz (Ishida *et al.*, 1989), stonkové segmenty (Pavingerová a Šedivá, 1999; Pavingerová *et al.*, 1997) nebo tenké řezy obsahující pouze epidermis a několik dalších vrstev buněk (Charest *et al.*, 1988).

2.2 Přímé metody transformace

Většinu jednoděložných rostlin se dlouho nedařilo transformovat pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*, a proto byly vyvíjeny přímé metody transformace (Paszkowski *et al.*, 1984). Do rostlinného genomu se bez využití přenašeče vkládá přímo DNA, nejčastěji plazmidy s požadovanými geny (Daniell, 1997).

2.2.1 Transformace protoplastů

Často se při přímých transformacích využívají protoplasty, neboť buněčná stěna představuje významnou bariéru průniku cizorodé DNA do buněčných jader. Výhodou metody je možnost transformace velkého množství rostlinných buněk (řádově $10^6 - 10^7$) a nevýhodou je často problematická regenerace rostlin z protoplastů a problém somaklonální variability (Potrykus, 1991).

K průniku DNA do protoplastů může docházet pouze endocytózou např. v přítomnosti polyetylglykolu a iontů vápníku při zvýšeném pH, nebo elektroporací, kdy působením pulzů stejnosměrného elektrického proudu vznikají dočasné póry v plazmalemě, které umožňují průnik DNA do buněk (Mlynářová a Nap, 1997).

K přenosu DNA do jader buněk lze použít metodu mikroinjekcí, kdy injektované buňky mohou přežít a proliferovat (Neuhaus a Spangenberg, 1990).

Další metodou transformace je aplikace lipozómů, což jsou lipidové kapénky s vloženou genetickou informací. Enkapsidace DNA v membráně zajišťuje ochranu před nukleázami a není třeba žádný nosič (Weising *et al.*, 1988). Lipozómy se aplikovaly na pletiva, buněčné kultury (Gad *et al.*, 1990) nebo pylové láčky (Ahokas, 1987).

Jiná metoda přímé transformace je založena na smíchání ostrých vláken karbidu křemíku (délka 10 – 80 μm , průměr 0,6 μm) s buněčnou suspenzí a roztokem DNA (Kaepler *et al.*, 1992).

Úspěšná transformace a regenerace protoplastů byla dosažena u řady rostlin např. bramboru (Fehér *et al.*, 1991), rýže (Fujimura *et al.*, 1985), kukuřice (Rhodes *et al.*, 1988) aj.

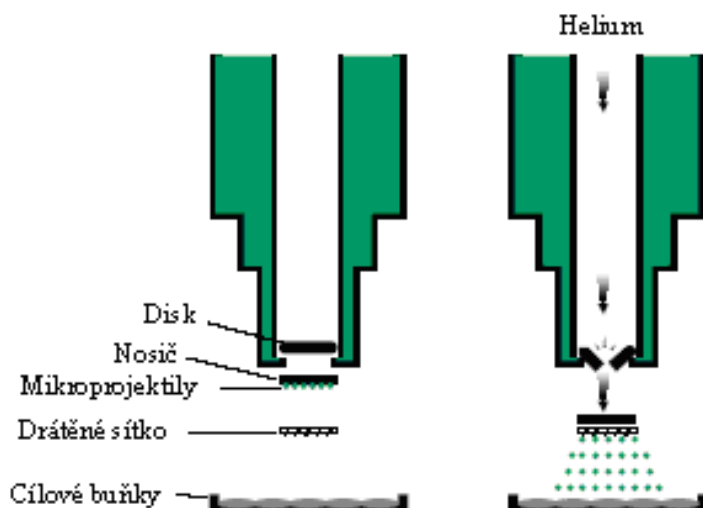
2.2.2 Transformace mikroprojektily

První zařízení pro přenos částic do pletiv vyvinul Sanford se spolupracovníky v roce 1987 (Sanford *et al.*, 1987). V průběhu několika let byla vytvořena celá řada přístrojů, z nichž nejpoužívanějším se stal PDS-1000/He (BioRad). Jako pohon pro dopravení částic do pletiva využívá helia (Obr. 2), přičemž celý proces probíhá ve vakuu (Sanford *et al.*, 1991).

Mikroprojektily jsou zlaté nebo wolframové kuličky o velikosti 0,3 - 6 μm , na které se naváže DNA. Russell *et al.* (1992) uvádějí, že velmi rozšířené wolframové kuličky jsou sice levné, ale na některé buňky působí toxicky. Mají nepravidelný povrch a podléhají oxidaci, což ovlivňuje jednak proces navazování DNA a jednak způsobuje degradaci navázaného plazmidu. Zlato je naopak biologicky inertní materiál téměř kulovitěho tvaru. Při transformaci pronikají zlaté částice díky vyšší hustotě do hlubších vrstev pletiva, zatímco většina wolframových částic zůstává v epidermis (Southgate *et al.*, 1995).

Jeden výstřel může způsobit mnoho zásahů a tím přenést geny do většího množství buněk (Potrykus, 1991).

Obr. 2: Princip transformace mikroprojektily.



Směs částic zlata s navázanou DNA se rovnoměrně nanese na tenký syntetický nosič a umístí se do komory přístroje. Plyn je zadržován tenkým průtřzným diskem určujícím tlak (450 - 2200 psi). Do komory přístroje se po vytvoření dostatečného vakua začne přivádět He, které při požadovaném tlaku protrhne disk. Po jeho protržení je uvolněna tlaková vlna, která způsobí pohyb nosiče směrem k drátěnému sítku. Zde je nosič

zachycen, mikroprojektily jsou uvolněny a letí směrem k rostlinnému pletivu umístěnému ve spodní části přístroje, kde dopadnou v kruhu o průměru 1 až několik cm v závislosti na vzdálenosti mezi rostlinným pletivem a drátěným sítkem (Sanford, 1990). Pletivo se po transformaci umístí na médium vhodné pro regeneraci a selekci transgenních pletiv (Christou, 1992).

Obecným problémem metody je nízká účinnost transformace. Jen 7 - 10 % mikroprojektilů pronikne alespoň do epidermis. Je však nutné, aby pronikly do mezofylu, protože buňky epidermis nejsou schopny tvořit kalus a pak diferencovanou rostlinu (Taylor a Fauquet, 2002). Pokud jsou buňky mezofylu zasaženy, ve většině případů (95 %) se mikroprojektily dostanou jen do cytoplazmy, kde nedochází k transkripci a nemůže tedy dojít ani k expresi vneseného genu. U zbývajících 5 % buněk zasažených do buněčného jádra většina (98 – 99 %) do 48 hod odumírá. Integrace transgenu do genomu je možná pouze v případě, že mikroprojektil pronikne do jádra a buňka zásah přežije (Ondřej a Drobník, 2002).

Účinnost transformace u různých rostlinných materiálů lze výrazně ovlivnit optimalizací podmínek např. stupněm vakua v komoře přístroje, tlakem helia, velikostí částic zlata nebo wolframu apod. (Birch a Franks, 1991). Klein *et al.* (1988) uvádějí, že opakováním transformace lze zvýšit její účinnost, ale dochází přitom ke snižování životaschopnosti rostlinného materiálu. Před samotnou transformací se na pletiva běžně působí osmotickými činidly, která snižují poškození buněk po zásahu mikroprojektily (Taylor a Fauquet, 2002).

Pokud je vnášený plazmid větší než 10 kb, může během transformace docházet k jeho rozpadu a tím k ovlivnění účinnosti transformace (Southgate *et al.*, 1995). Dalším problémem transformace mikroprojektily při použití celého plazmidu je integrace všech genů T-DNA. Jedním z řešení je využití tzv. kotransformace, kdy jsou jednotlivé geny vloženy zvlášť na různé plazmidy a smíchány před nanesením na částice kovu. Transformační frekvence dvou plazmidů se pohybuje kolem 85 % (Hilliou *et al.*, 1999; Wakita *et al.*, 1998; Bower *et al.*, 1996). Bylo dokázáno, že do rostlinného genomu může být kotransformací přeneseno až 12 různých plazmidů (Hadi *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998).

K transformaci pomocí mikroprojektilů lze použít různé biologické materiály např. meristémy (McCabe a Martinell, 1993), nezralá embrya (Kartha *et al.*, 1989), pylová zrna (Twell *et al.*, 1989), kalusy (Christou *et al.*, 1988), buněčné suspenze (Klein *et al.*, 1989) aj.

První rostliny transformované mikroprojektily byly sója (McCabe *et al.*, 1988) a kukuřice (Fromm *et al.*, 1990). Metoda byla upravena i pro přenos cizorodé DNA do bakterií (Klein *et al.*, 1992), hub (Armaleo *et al.*, 1990), řas (Mayfield a Kindle, 1990), hmyzu, savců (Klein *et al.*, 1992) a to za účelem studia exprese genů, genové terapie a produkce sekundárních metabolitů (Furth, 1997).

V současnosti metoda transformace mikroprojektily v důsledku nízké účinnosti poněkud ustupuje do pozadí, ale určitý význam si stále ponechává. Jednak umožňuje přenos více genů do rostliny a tím i přeměnu celých biosyntetických drah a jednak je u některých rostlin stále jedinou účinnou metodou transformace (Sharma *et al.*, 2005).

2.2.3 Transformace chloroplastů

Chloroplasty jsou semi-autonomní organely nesoucí malý vysoce polyploidní genom s vlastním transkripčním a translačním aparátem. Typická rostlinná buňka obsahuje asi 100 chloroplastů, a proto je po úspěšné transformaci očekávaná vysoká exprese transgenů. Nový protein může tvořit až několik procent všech buněčných bílkovin, zatímco při transformaci buněčných jader jsou to obvykle maximálně desetiny procenta (Maliga, 2004). Nezanedbatelnou výhodou je skutečnost, že dědičnost znaků kódovaných chloroplastovou DNA je matrilineární, nedochází tedy k přenosu transgenů pylem (Grevich a Daniell, 2005).

K přenosu genů do chloroplastů se zkoušelo několik metod např. bakterie rodu *Agrobacterium* (DeBlock *et al.*, 1985) nebo PEG (Sporlein *et al.*, 1991). Za nejúčinnější metodu je považována transformace mikroprojektily (Ye *et al.*, 1990).

První transformovanou rostlinou byl tabák (Svab *et al.*, 1990), ale transformace chloroplastů se podařila také např. u bramboru (Sidorov *et al.*, 1999) a rajčete (Ruf *et al.*, 2001).

2.3 Selekční systémy

Důležitým přínosem k úspěšné kombinaci transformace a následné regenerace transgenních rostlin bylo vyvinutí účinných selekčních systémů. Z tohoto důvodu bývají součástí vektorů vnášených do rostlin i geny pro selekci (Mlynářová a Nap, 1997).

2.3.1 Negativní selekce

Negativní selekce využívá takových genů, jejichž exprese umožňuje růst pouze transformovaným rostlinným buňkám na médiu s příslušnou látkou, přičemž netransformované buňky odumírají. Nejrozšířenější selekční gen *nptII* kóduje neomycinfosfotransferázu II a navozuje tak rezistenci ke kanamycinu, geneticinu a paromomycinu (Bevan *et al.*, 1983). Dalšími běžně používanými selekčními činidly jsou např. hygromycin (gen *hpt*) nebo herbicid fosfinotricin (gen *bar*).

2.3.2 Pozitivní selekce

Při pozitivní selekci poskytují specifické selekční geny transformované rostlině metabolickou výhodu. Netransformované buňky na selekčním médiu neodumírají, pouze trpí nedostatkem určité živiny a tím je inhibován jejich růst (Joersbo a Okkels, 1996). Do média nejsou uvolňovány toxické látky z odumřelých buněk, nedochází k inhibici růstu transformantů, a proto může být dosaženo lepší regenerace rostlin a vyšší transformační účinnosti (Penna *et al.*, 2002).

Jednou z rozšířených strategií pozitivní selekce je využití přídavku manózy do média. Samotná manóza není pro rostliny toxická, ale v rostlinném těle je tento monosacharid fosforylován na manózo-6-fosfát. Tuto látku rostliny nedokáží metabolizovat, hromadí se v buňkách, inhibuje růst a indukuje endonukleázy k degradaci DNA. Je-li však v transformované rostlině přítomen gen *manA* kódující manózo-6-fosfát izomerázu, dochází k přeměně manózo-6-fosfátu na fruktózo-6-fosfát, který je použit jako prekurzor glykolýzy (Joersbo *et al.*, 1998)

Jednou z dalších možností je selekce s využitím genu *xylA*, který kóduje enzym xylózoizomerázu. Tento enzym katalyzuje přeměnu pro rostliny nemetabolizovatelného cukru D-xylózy na D-xylulózu. Selekční látkou je xylóza, kterou transformované rostliny využívají jako zdroj energie (Haldrup *et al.*, 1998).

2.4 Reportérové geny

Reportérové geny bývají často vnášeny do rostlin společně s geny pro selekci. Jejich expresi je možné stanovit jednoduchou a spolehlivou metodou na základě barevné reakce nebo fluorescence.

Nejčastěji se používají luciferázové geny ze světlušky *Photinus pyralis* nebo z bakterie *Vibrio harveyi* (O'Kane *et al.*, 1988), gen *gus* pro enzym β -glukuronidázu (Jefferson *et al.*, 1987) a gen *gfp* z medúzy *Aequorea victoria*, který jediný fluoreskuje bez dodání substrátů či kofaktorů (Chalfie *et al.*, 1994). V roce 2006 byl poprvé do protoplastů tabáku úspěšně vnesen vektor exprimující fluoreskující HaloTag protein, původně vyvinutý pro buňky savců (Lang *et al.*, 2006).

2.4.1 Gen *gus*

V současné době je velmi rozšířený systém, který k průkazu exprese transgenu využívá enzym β -glukuronidázu (Jefferson *et al.*, 1987). β -glukuronidáza je kódována genem *gus* (dříve *uidA*), který byl izolován z bakterie *Escherichia coli* K12. Enzym štěpí β -glykozidické vazby mezi kyselinou D-glukuronovou a necukernou složkou, je termostabilní, odolný proteázám a aktivní v širokém rozsahu pH (Jefferson *et al.*, 1986).

Stanovení je založeno na principu, kdy z bezbarvého substrátu resp. nefluoreskující sloučeniny barviva s kyselinou glukuronovou, je působením enzymu odštěpeno barvivo resp. fluoreskující látka.

Při histochemickém stanovení se jako substrát používá 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid (X-Gluc) uvolňující působením enzymu β -glukuronidázy přítomné v transgenních pletivech derivát indolu, který přechází oxidací na intenzivně modrý, velmi nerozpustný derivát indiga (Vitha *et al.*, 1995; Jefferson *et al.*, 1987).

Při fluorimetrickém stanovení vzniká působením enzymu β -glukuronidázy na substrát 4-metylbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG) kyselina D-glukuronová a fluoreskující 4-metylbelliferon (4-MU). Reakce se zastaví přidáním alkalického roztoku sody, který zvýšením pH umožní ionizaci hydroxyly 4-MU nutnou pro fluorescenci. Fluorescence se měří při excitaci 365 nm a emisi 455 nm (Gartland *et al.*, 1995).

Předností metody založené na enzymu β -glukuronidáze je jednoduchost, rychlost a spolehlivost (Jefferson *et al.*, 1987). Enzym dává při stanovení příznivě nízké pozadí, protože se glukuronidázy nevyskytují v rostlinách, houbách, ani ve velké většině bakterií a glukuronidázy obratlovců mají velmi slabou aktivitu k běžně používaným syntetickým substrátům. Nevýhodou může být určitá nespecifická aktivita některých rostlinných pletiv například pylových zrn (Plegt a Bino, 1989).

2.4.2 Tranzientní exprese

K expresi transgenů může dojít ještě před jeho integrací do rostlinného genomu. Tento jev se označuje jako tranzientní neboli dočasná exprese. Doba od transformace do nástupu exprese činí asi 48 hodin a během několika dalších dnů zaniká (Janssen a Gardner, 1989).

Jako reportérový transgen se většinou využívá gen *gus*, neboť při histochemickém stanovení je snadné určit, kde dochází k expresi genů použitých k transformaci. Výhodné je i použití genu *gfp*, kdy rostlinné buňky při stanovení exprese neodumírají.

Prakticky se tranzientní exprese využívá k orientačnímu porovnání účinnosti různých promotorů, ke zjišťování funkčnosti vektorů a k porovnávání účinnosti téhož konstruktů v různých materiálech (Daniell, 1997).

2.5 *Solanum tuberosum*

2.5.1 Původ brambor

Pravlastí brambor je západní část Jižní Ameriky, kde se brambory pěstovaly již ve 2. stol. n. l. *Solanum tuberosum* spp. *andigenum*, vytvářející hlízy za krátkého dne, vznikl ve vysoko položených údolích And v Peru a Bolívii. Do Evropy byl dovezen v roce 1565 a sloužil jako zahradní okrasná a léčivá barevně kvetoucí rostlina. V roce 1585 byl do Anglie dovezen z Chile bíle kvetoucí druh *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*, který vytváří hlízy za dlouhého dne. Tento druh se stal základem evropských odrůd brambor (Diviš *et al.*, 2000).

Druh *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* náleží do rodu lilek (*Solanum*) a čeledě lilkovitých (*Solanaceae*). Brambor hlíznatý je vysoce heterozygotní, tetraploidní ($2n = 48$), dvouděložná rostlina a jednoletá bylina, která může být rozmnožována generativně i vegetativně.

2.5.2 Šlechtění brambor

Konvenční způsob šlechtění brambor je velmi pomalý (trvá 10 až 15 let) a někdy obtížný. Zahrnuje křížení rostlin buď se stejnou nebo s různou ploidní úrovní ($2n$ až $6n$), odvození klonů, hodnocení a selekci rostlin na základě fenotypu a často i opakovaná zpětná křížení (Bradshaw a Mackay, 1994).

Plané andské druhy poskytují širokou zásobárnu genů, které nesou velmi zajímavé a žádoucí vlastnosti (např. rezistence k patogenům, tolerance k biotickým a abiotickým stresům aj.). Jako donory vlastností se v současných šlechtitelských programech používají zejména druhy *S. demissum*, *S. acaule*, *S. chacoense*, *S. spegazzinii*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*. Většina planých druhů jsou diploidní rostliny. Problémem je častá sexuální inkompatibilita planých a kulturních druhů, kterou lze někdy obejít propojením technik somatické hybridizace, pylové embryogeneze a transformace (Heřmanová *et al.*, 2007). Somatická hybridizace protoplastů brambor byla provedena prostřednictvím elektrofúze (např. DeVries a Tempellar, 1987) a polyetylglykolu (např. Fehér *et al.*, 1991).

Brambory byly jednou z prvních transformovaných plodin, u nichž se podařilo regenerovat transgenní rostliny. Disková metoda transformace bramboru byla poprvé použita v roce 1988 a jako vhodný explantát byly vybrány disky hlíz (Sheerman a Bevan, 1988; Stiekema *et al.*, 1988) a listů (Tavazza *et al.*, 1989; DeBlock, 1988). Později byla metoda aplikována na stonkové segmenty bramboru (Visser *et al.*, 1989).

Autoři se shodují, že účinnost transformace bakteriemi rodu *Agrobacterium* i následná regenerace transgenních rostlin bramboru je závislá na genotypu, fyziologickém stavu a stáří použitého materiálu, složení kultivačních médií, kmeni bakterie *A. tumefaciens* aj. (Snyder a Belknap, 1993; DeBlock, 1988). Např. transformační účinnost disků hlíz odrůdy Désirée kolísala od 1 % (Stiekema *et al.*, 1988) do 20 % (Sheerman a Bevan, 1988). Kumar (1995) uvádí účinnost transformace explantátů hlíz v rozmezí 5 % - 50 %.

Častým problémem je nízká účinnost transformace a vysoký stupeň somaklonální variability (Higgins *et al.*, 1992; Tencate a Ramulu, 1987). Např. Visser *et al.* (1989) uvádějí účinnost transformace internodií bramboru 6 % - 8 %, přičemž téměř 13 % získaných transgenních rostlin mělo výrazně pozměněný fenotyp a cytologická analýza prokázala i změny v genotypu.

S efektivností *in vitro* kultur a účinností transformačních postupů se úměrně zlepšují i výsledky transformace. Např. Beaujean *et al.* (1998) provedli transformaci pomocí bakterií *A. tumefaciens* u internodií tří odrůd brambor Bintje, Kaptah Vendel a Désirée. Dosáhli účinnosti transformace přes 90 % spojené s nízkou frekvencí somaklonální variability. Získali v průměru 7 až 9 výhonů na 1 explantát.

Transformace prostřednictvím bakterií rodu *Agrobacterium* je u brambor nejběžněji používaná metoda, avšak i v případě tohoto druhu plodiny lze najít odrůdy, u nichž je transformace bakteriemi rodu *Agrobacterium* problematická (Figueira-Filho *et al.*, 1994), a proto se zkoušely další způsoby transformace. Při transformaci mikroprojektily se transformační účinnost brambor pohybovala v rozmezí 2 % až 31 % v závislosti na použitém explantátu (Romano *et al.*, 2001). Craig *et al.* (2005) využili při transformaci listových explantátů brambor selekci na hygromycin. Dosáhli průměrné transformační účinnosti 30 %. Romano *et al.* (2003), kteří ve své práci kotransformovali dva plazmidy, získali transformační účinnost internodií bramboru v rozmezí 5 % - 35 %.

2.5.3 Výsledky šlechtění brambor

Hlavním problémem zemědělců v mnoha částech světa zůstává kontrola patogenů. Plíseň bramborová (*Phytophthora infestans*), mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*), Potato Leaf Roll Virus (PLRV) a Potato Virus Y (PVY) způsobují až 90 % ztráty na výnosu.

V současnosti existují rostliny bramboru odolné k několika druhům virů (Harrison, 1992; Huisman *et al.*, 1992; Van den Elzen *et al.*, 1993; 1989), viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (Sano *et al.*, 1997), odrůdy produkující Bt-toxiny navozující rezistenci k hmyzím škůdcům (Kuvshinov *et al.*, 2001), brambory produkující peptidy (Jouanin *et al.*, 1998) aj.

U brambor je také kladen důraz na odolnost k abiotickým stresům. Nejvíce je rozvinut výzkum mrazuvzdornosti, kde byly provedeny pokusy s expresí syntetického nemrznoucího proteinu (Wallis *et al.*, 1997). Testuje se také zvýšení odolnosti vůči chladu a suchu prostřednictvím modifikovaných forem genu C17 pocházejícího z rostliny *Arabidopsis thaliana* (Kirch *et al.*, 1997). Nedávno byly získány brambory tolerantní vůči zasolení půdy (Hmida-Sayari *et al.*, 2005).

Důležité jsou i modifikace technologických vlastností bramborového škrobu. Expresí genu glykogen syntázy pocházejícího z bakterie *Escherichia coli* způsobuje zvyšování podílu amylopektinu v hlízách brambor (Shewmaker *et al.*, 1994). Byly vytvořeny odrůdy brambor obsahující pouze amylopektin. Tyto odrůdy jsou založeny na antisense inhibici enzymu GBSS a jsou vhodné např. pro papírenský a textilní průmysl, výrobu barev, lepidel aj. Brambory obsahující v hlízách pouze amylozu mají vnesen gen, který inhibuje enzym SBE. Tato odrůda je vhodná nejen k výrobě bioplastů, ale i v potravinářském průmyslu (Heeres *et al.*, 1997; Kuipers *et al.*, 1994).

Transgenní rostliny mohou produkovat proteiny, které jsou vlastní patogenům napadajícím epiteliální membrány. Tzv. jedlé vakcíny účinné vůči těmto infekcím stimulují mukózní imunitní systém k produkci imunoglobulinů IgA. Byly získány transgenní brambory syntetizující epitop viru nakažlivého prasečího průjmu (Kim *et al.*, 2005), povrchový antigen viru žloutenky B (Sunil-Kumar *et al.*, 2006), lidský alfa interferon (Sawahel, 2002) aj.

2.5.4 Situace v České republice

Ministerstvo životního prostředí vydalo povolení k uvádění těchto geneticky modifikovaných rostlin bramboru do životního prostředí (MŽP, 2007):

1) Brambory se zvýšeným podílem amylopektinu ve škrobu (schváleno 2005)

Snížení podílu amyulózy a nárůst množství amylopektinu ve škrobu hlíz brambor je způsobeno vložením fragmentu genu syntetázy (*gbss*) škrobu vázané na škrobové zrno (v antisense orientaci vzhledem k fragmentu *gbss* promotoru bramboru). Gen *gbss* je vlastní gen bramboru (*Solanum tuberosum*).

2) Brambory se změněným obsahem cukrů v hlízách (schváleno 2006)

Rostliny nesou gen kódující bakteriální enzym fosfofruktokinázu, který je aktivní v hlízách skladovaných při nízkých teplotách. V důsledku této aktivity mají hlízy snížený obsah rozpustných cukrů.

3) Brambory se zvýšeným podílem amyulózy ve škrobu (schváleno 2006)

Vyšší obsah amyulózy a v důsledku toho snížený obsah amylopektinu v hlízách brambor je způsoben vložením fragmentů genu *sbe1* a *sbe2* jako duplikovaného invertovaného opakování enzymu štěpícího bramborový škrob napojeného na fragment promotoru *gbss*, společně s genem kódujícím protein 1 (StGH1), který zesiluje biosyntézu škrobu, aniž by se tím snížilo množství škrobu v hlízách.

4) Brambory se zvýšenou odolností k *Phytophthora infestans* (schváleno 2007)

Rostliny nesou geny, které pocházejí z genomu bramboru *Solanum bulbocastanum* (R geny) *Rpi-blb1* a *Rpi-blb2*. R geny specificky rozlišují cílový patogen a vyvolají obrannou odpověď v rostlině, a tak ji před infekcí chrání.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

K transformacím jsem použila tetraploidní ($2n = 48$) rostlinu *Solanum tuberosum* L., odrůda Bintje. Tato odrůda pochází z Holandska, kde ji v roce 1904 vyšlechtil de Vries.

3.1.1 Kultivace rostlin

Rostliny bramboru jsem pěstovala v *in vitro* podmínkách na 0,8 % agarových MS půdách (Murashige a Skoog, 1962) při fotoperiodě 16 hod., teplotě 25°C a intenzitě osvětlení 90 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Pasážování rostlin probíhalo sterilně ve flow boxu v čtyřtýdenních intervalech. Každou rostlinu jsem nastříhala na stonkové řízky obsahující 1-2 nody a vložila na nové MS médium.

3.1.2 Příprava kultivačních médií

Do kádinky s destilovanou vodou jsem postupně za stálého míchání přidala všechny složky kromě agaru. Objem jsem doplnila destilovanou vodou a kyselost upravila 1N KOH na požadované pH. Médium jsem rozdělila do 500 ml Erlenmayerových baněk po 250 ml, přidala agar, baňky uzavřela hliníkovou fólií a vysterilizovala v autoklávu (121°C, 30 min.).

Po klávování jsem médium zchladila na 60°C a ve flow boxu jsem sterilně přidala další termolabilní složky (antibiotika, růstové látky). Nakonec jsem médium rozdělila do různých sterilních kultivačních nádob podle potřeb rostlinného materiálu a uchovávala v chladicím boxu.

3.1.3 Složení kultivačních médií

1) Základní MS médium

MS s vitamíny (DUCHEFA)	4,4 g.l ⁻¹
sacharóza	20 g.l ⁻¹
inositol	100 mg.l ⁻¹
agar	8 g.l ⁻¹

pH = 5,7

2) Zakořeňovací médium MSTim300Km100

Do základního MS média jsem přidala 300 mg.l⁻¹ timentinu a 100 mg.l⁻¹ kanamycinu.

3) Regenerační médium MSBR1

MS s vitamíny (DUCHEFA)	4,4 g.l ⁻¹
sacharóza	20 g.l ⁻¹
inositol	100 mg.l ⁻¹
zeatin	1 mg.l ⁻¹
kyselina naftyloctová (NAA)	0,02 mg.l ⁻¹
kyselina gibberelová (GA ₃)	0,02 mg.l ⁻¹
agar	8 g.l ⁻¹

pH = 5,7

4) Selekční médium MSBR1Km100

Do regeneračního média MSBR1 jsem přidala 100 mg.l⁻¹ kanamycinu.

5) Selekční médium MSBR1Tim400Km100

Do regeneračního média MSBR1 jsem přidala 400 mg.l⁻¹ timentinu a 100 mg.l⁻¹ kanamycinu.

6) LK médium pro kultivaci *A. tumefaciens* (Langley a Kado, 1972)

sacharóza	10 g.l ⁻¹
kasein	8 g.l ⁻¹
kvasnicový extrakt	4 g.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2 g.l ⁻¹
MgSO ₄ · 7H ₂ O	300 mg.l ⁻¹
tetracyklin	5 mg.l ⁻¹

pH = 5,7

3.2 Plazmidový konstrukt

Při obou způsobech transformace jsem použila shodný plazmidový konstrukt p35SGUSint (Vancanneyt *et al.*, 1990), který pochází od prof. Willmitzera z Ústavu Maxe Plancka v Kolíně nad Rýnem. Obsahuje 35S CaMV promotor, gen *gus* s vloženým intronem, který zabraňuje expresi genu v bakteriích *Agrobacterium tumefaciens*, a gen *nptII* pro neomycinfosfottransferázu II.

3.3 Transformace bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*

3.3.1 Zaočkování bakterií a jejich příprava pro transformaci

Bakterie *A. tumefaciens*, kmen LBA 4404, s plazmidem p35SGUSint jsem zaočkovala sterilní kličkou do 10 ml tekutého LK média s kanamycinem o koncentraci 50 mg.l⁻¹ a nechala přes noc kultivovat na třepačce při teplotě 28°C. Narostlé bakterie jsem centrifugovala 2 minuty při 10 000 ot.min⁻¹. Po odstranění supernatantu jsem bakterie resuspendovala ve stejném objemu (10 ml) 10mM MgSO₄ a použila pro transformaci. Kokultivace probíhala ve sterilní Petriho misce o průměru 12 cm.

3.3.2 Transformace internodií bramboru a regenerace rostlin

Ve flow boxu jsem sterilně odstříhávala internodia rostliny bramboru přímo do Petriho misky s bakteriální suspenzí. Kokultivace trvala 20 minut za občasného promíchání krouživými pohyby. Poté jsem internodia přenesla na základní MS médium, kde zůstala 24 hodin. Druhý den jsem explantáty sterilně přemístila na selekční médium s obsahem timentinu (odstranění bakterií) a kanamycinu.

Jako kontrola sloužila netransformovaná internodia, jejichž jednu část jsem kultivovala na regeneračním médiu MSBR1 a druhou část na selekčním médiu MSBR1Tim400Km100.

Internodia jsem kultivovala při fotoperiodě 16 hod., teplotě 25°C a intenzitě osvětlení 90 μM.m⁻².s⁻¹ asi tři měsíce. Narostlé kalusy jsem vždy po čtyřech týdnech přepasážovala na čerstvé médium, regenerující prýty odstříhla a přenesla na zakořeňovací médium MSTim300Km100.

3.4 Transformace mikroprojektily

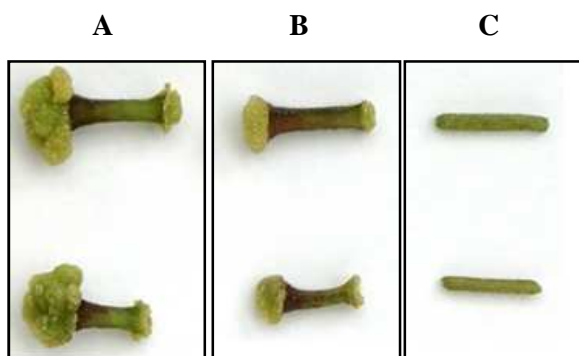
3.4.1 Příprava rostlinného materiálu

Sterilně nastříhaná internodia bramboru určená pro transformaci jsem kultivovala na miskách s regeneračním médiem MSBR1 za podmínek popsanych v 3.1.1. Z důvodu hodnocení účinnosti transformace během různých stádií růstu kalusu byla internodia předkultivovaná na regeneračním médiu po dobu 14 dní, 7 dní a 1 den (Obr. 3).

Počty internodií na miskách (20 internodií předkultivovaných 14 dní; 25 internodií předkultivovaných 7 dní; 30 internodií předkultivovaných 1 den) jsem určila experimentálně tak, aby se internodia při transformaci vešla do kruhu o průměru 2 cm.

Obr. 3: Ukázka internodií bramboru použitých k transformaci mikroprojektily.

A – předkultivace 14 dní; B – předkultivace 7 dní; C - předkultivace 1 den.



3.4.2 Příprava částic zlata

Na analytických vahách jsem do 1,5 ml mikrozkuřavky odvářila 30 mg zlata o příslušné velikosti. Při transformačních pokusech jsem používala tři velikosti zlata 1,6 μm ; 1,0 μm ; 0,6 μm .

Další práce pokračovala za sterilních podmínek ve flow boxu. Do mikrozkuřavky jsem přidala 1 ml 70 % ultračistého etanolu, směs jsem 2 - 3 minuty intenzivně vortexovala a po 15 minutách stání centrifugovala 5 sekund při 5 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.

Odstranila jsem supernatant a ke zlatu připipetovala 1 ml sterilní destilované vody. Mikrozkuřavku jsem 1 minutu vortexovala, 1 minutu ponechala sedimentovat, krátce centrifugovala (5 sekund, 5 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$) a poté jsem supernatant odstranila. Tento promývací postup jsem opakovala pětkrát. Nakonec jsem k částicím zlata připipetovala

500 μl sterilního 50 % glycerolu. Takto připravené částice zlata mohou být skladovány až dva týdny při 4°C nebo 25°C.

3.4.3 Příprava mikroprojektilů

Předem připravené částice zlata v glycerolu jsem vortexovala po dobu 5 minut. Následně jsem za neustálého vortexování sterilně odebrala 1 alikvotu (tj. 100 μl resp. 6 mg) částic do nové 1,5 ml mikrozkušavky a k ní jsem postupně přidala 10 μl DNA (koncentrace $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 100 μl 2,5 M CaCl_2 a 40 μl 0,1 M spermidinu. Ve vortexování jsem pokračovala ještě 2 - 3 minuty a po 1 minutové sedimentaci a krátké centrifugaci (3 sekundy, 5 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$) jsem odstranila supernatant.

Následovaly sterilizační kroky, kdy jsem ke směsi přidala a po krátké centrifugaci (3 sekundy, 5 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$) odstranila nejprve 280 μl 70 % ultračistého etanolu a následně 280 μl 100 % ultračistého etanolu. Závěrem jsem směs resuspendovala v 76 μl 100 % etanolu poklepáním a pomalým vortexováním. Mikrozkušavku se směsí jsem uložila do ledu.

Připravené množství mikroprojektilů jsem použila na jeden pokus tj. na transformaci 12 misek. Na 1 nosič jsem aplikovala 6 μl směsi, což odpovídá 0,5 mg zlata a 0,8 μg DNA.

3.4.4 Transformace internodií bramboru

Transformace probíhala prostřednictvím přístroje PDS-1000/He (BioRad) za sterilních podmínek ve flow boxu.

V autoklávu (121°C, 30 min.) jsem vysterilizovala kovové držáky na nosiče mikroprojektilů, potřebný počet nosičů a drátěných sítěk. Vnitřní rozebíratelné součásti přístroje jsem vysterilizovala ponořením do 70 % etanolu na dobu 20 minut a pak ponechala volně rozložené na otevřených Petriho miskách ve flow boxu, aby dokonale vyschly. Přístroj jsem pečlivě vytřela bunou namočenou v 70 % etanolu.

Do kovových držáků jsem pinzetou vložila nosiče mikroprojektilů a utěsnila sterilním válečkem. Na každý nosič jsem napipetovala 6 μl připravené směsi mikroprojektilů v etanolu a ponechala nejméně 10 minut zaschnout. Před každým odběrem jsem směs opatrně protřepala. Mezitím jsem v izopropanolu vysterilizovala vybrané průřezné disky. Při pokusech byly použity tři různé typy disků umožňující dosáhnout tlaku helia 1350 psi, 1100 psi a 900 psi.

Internodia jsem sterilně pomocí pinzet seskládala do kruhu o průměru 2 cm doprostřed misky. Postup při každé transformaci byl totožný - do komory přístroje jsem našroubovala kovové kolečko s vybraným průřezným diskem, vložila destičku s drátěným sítkem a s držákem nosiče mikroprojektilů. Jako poslední jsem vložila misku s internodií do požadované vzdálenosti od drátěného sítka (při pokusu byly používány vzdálenosti 6 a 9 cm). Po zavření komory jsem pomocí vývěvy dosáhla požadovaného vakua (28" Hg) a DNA jsem pomocí tlaku helia vstříkla do rostlinných pletiv. Po transformaci jsem všechny misky uzavřela parafilmem a kultivovala 48 hodin ve tmě.

Vzdálenost mezi průřezným diskem a nosičem mikroprojektilů byla 6 mm, vzdálenost mezi nosičem mikroprojektilů a drátěným sítkem 11 mm. Tyto parametry byly v průběhu pokusu neměnné.

3.4.5 Detekce tranzientní exprese genu *gus* a regenerace rostlin

Tranzientní expresi jsem hodnotila pomocí histochemického stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy (viz 3.6.3) 48 hodin po transformaci u poloviny internodií z každé misky.

Zbylou polovinu internodií jsem přenesla na selekční médium MSBR1Km100, kde jsem je kultivovala za účelem regenerace transgenických rostlin asi tři měsíce.

Jako kontrolu jsem použila netransformovaná internodia, jejichž jednu část jsem kultivovala na regeneračním médiu MSBR1 a druhou část na selekčním médiu MSBR1Km100.

Vždy po čtyřech týdnech jsem zelená internodia přepasážovala na čerstvé médium, regenerující prýty odstříhla a přenesla na zakořeňovací médium MSTim300Km100.

3.5 Detekce přítomnosti transgenů v rostlinách pomocí „tissue“ PCR

Pro stanovení přítomnosti genu *nptII* v pletivech regenerovaných rostlin bramboru jsem použila primery NPT1 (5′ - ACG CAG GTT CTC CGG CCG CTT G - 3′) a NPT2 (5′ - GAA GCG GTC AGC CCA TTC GCC G - 3′). Při reakci se amplifikoval fragment dlouhý 699 bp.

Přítomnost vneseného genu *gus* pro enzym β -glukuronidázu jsem zjišťovala pomocí primerů GUS1 (5′ - TCG ATG CGG TCA CTC ATT AC - 3′) a GUS2 (5′ - CCA CGG TGA TAT CGT CCA C - 3′). Při reakci se amplifikoval 495 bp dlouhý fragment, který se skládal z částí genu *gus* (pozice 263 - 385 a 575 - 757 nukleotidů) a intronu (pozice 386 - 574 nukleotidů).

Pro ověření, zda signály pro geny *gus* a *nptII* nepocházejí z bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, jsem použila primery pro *vir* oblast bakterie VIRA1 (5′ - ATT TCA CCG ACG CGG CAG GAT TTT AAG ACA - 3′) a VIRA2 (5′ - AGC TTT GGT ACG AGA GAC TAT TTC GCC TAG - 3′). Při reakci se amplifikoval fragment o velikosti 1093 bp.

3.5.1 Příprava vzorků na „tissue“ PCR

K identifikaci rostlin nesoucích T-DNA jsem použila metodu „tissue“ PCR, při níž není templátem izolovaná DNA, ale přímo rostlinná tkáň.

Do 1,5 ml mikrozkuvek umístěných na ledu jsem z každé rostliny kořenící na kanamycinu odebrala malý kousek listu. Ke každému vzorku jsem přidala 40 μ l 0,25 M NaOH, poté jsem mikrozkuvku povařila ve vodní lázni po dobu 30 sekund a zchladila na ledu.

Ke každému zchlazenému vzorku jsem připipetovala 40 μ l 0,25 M HCl a 20 μ l 0,5 M Tris (pH = 8), promíchala špičkou a mikrozkuvku povařila 2 minuty ve vodní lázni a opět zchladila na ledu. Vzorky jsem buď hned použila pro PCR, nebo uložila při -20°C.

3.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vybrané vzorky na PCR jsem 2 minuty povařila ve vodní lázni a zchladila na ledu. Malou část rostlinné pletiva jsem přidala do 0,5 ml mikrozkušavky s reakční směsí o objemu 25 μ l.

PCR probíhala na přístroji typu T3 Termocykler. Počet reakčních cyklů byl 35, přičemž každý cyklus se skládal z fáze denaturace (94°C, 45 s), nasednutí primerů (55°C, 30 s) a syntézy DNA (72°C, 2 min.).

Složení reakční směsi: 77 % sterilní destilované vody

10 % PCR pufr (500 mM KCl; 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl,

pH = 8,3; 25 mM MgCl₂; 0,5 mM Nonidet-40®)

10 % dNTPs (každý nukleotid 2,5 mmol.l⁻¹)

1 % primer 1 (20 μ mol.l⁻¹)

1 % primer 2 (20 μ mol.l⁻¹)

1 % TaqDNA polymeráza (Takara)

3.5.3 Elektroforéza

Amplifikované úseky DNA jsem pomocí elektroforézy rozdělila v 1 % agarózovém gelu. Gel obsahující 20 ml 10 x koncentrovaného TBE pufru (Duchefa), 180 ml destilované vody a 2 g agarózy (Serva) jsem rozvařila v mikrovlnné troubě po dobu 3 - 4 minut a po částečném zchlazení přidala 20 μ l ethidium bromidu (1 mg.ml⁻¹). Příprava 10 x TBE pufru probíhala smícháním 108 g Tris base, 55 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA (etylendamintetraoctová kys.) a doplněním destilovanou vodou do objemu 1l.

Elektroforéza probíhala v pufru obsahujícím 50 ml 10 x TBE pufru a 450 ml destilované vody. Do jednotlivých jamek na gelu jsem nanášela 20 μ l amplifikovaného vzorku smíchaného s 3 μ l vkladacího pufru (TopBio).

Pro odečtení velikosti fragmentů jsem použila 7 μ l 100 bp DNA standard molekulové hmotnosti (ladder). Elektroforéza probíhala 45 min při 120 V. Výsledky jsem odečetla pomocí UV-transluminátoru (Image Store 5 000 od firmy UVP) a vyfotografovala.

3.6. Stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy

3.6.1 Fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy

1) Chemikálie

a) Extrakčně-inkubační pufr (GUS pufr):

50 mM NaPO₄, pH=7

10 mM merkaptoetanol

1 mM Na₂EDTA

0,1 % Triton X-100

b) Stop pufr: 0,2 M Na₂CO₃

c) Substrát MUG (4-metylbelliferyl- β -D-glukuronid):

2 mg MUG v 5 ml GUS pufru (vždy připravován čerstvý)

2) Pracovní postup

Malé množství listových pletiv (2 - 5 mg) odebraných do 1,5 ml mikrozkušavek jsem homogenizovala se 75 μ l GUS pufru. Vzniklý homogenát jsem uchovávala na ledu. Poté jsem 4,5 μ l homogenátu přidala k 75 μ l substrátu MUG vytemperovaného na 37°C. Vzorky jsem odebírala v čase 2 a 6 minut tak, že jsem 20 μ l směsi MUG + vzorek přidala do 1,5 ml stop pufru a důkladně promíchala.

Hodnotu fluorescence jsem změřila na fluorimetru značky Hoefler TKO 110 (Scientific Instrument, USA).

Aktivitu enzymu β -glukuronidázy jsem vypočetla v pmol MU.min⁻¹.mg⁻¹ čerstvé hmoty listu podle následujícího vztahu:

$$\underline{\text{Aktivita} = (10 \times h) / (t \times hm)}$$

h – hodnota fluorescence změřená v čase 6 minut

t – délka inkubace v minutách (6 minut)

hm – čerstvá hmotnost vzorku listu (v mg)

Aktivitu enzymu β -glukuronidázy jsem po změření proteinů přepočítala na $\text{pmol MU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ proteinu podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita} = (10 \times h) / (t \times p)$$

h – hodnota fluorescence změřená v čase 6 minut

t – délka inkubace v minutách (6 minut)

p – množství proteinu ve vzorku (v μg)

3.6.2 Měření proteinů

Zjištění koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové je rychlým kolorimetrickým stanovením proteinů (Bradford, 1976). Podstata metody spočívá v reakci barviva (roztok činidla Bradfordové) a proteinů v prostředí kyseliny fosforečné za současné změny zbarvení roztoku. Měření absorbance se provádí při 595 nm proti „blanku“ tj. srovnávacímu vzorku. Zbarvení roztoku je přímo úměrné koncentraci bílkoviny, proto je možné koncentraci vypočítat podle absorbance zařazených standardních vzorků. Jako standard se obvykle používá hovězí sérumalbumin (BSA) nebo vaječný albumin (OVA).

Pro stanovení proteinů jsem použila zbylý homogenát vzorku s GUS puforem připravený pro fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy. V mikrotitrační destičce jsem smíchala 1 μl homogenátu vzorku s 50 μl destilované vody a 200 μl Bradford činidla (Protein Assay Bio-Rad).

Koncentrační řadu (pro odečtení množství proteinu ve vzorku) jsem vytvořila smícháním 50 μl destilované vody, 200 μl Bradford činidla (Protein Assay Bio-Rad) a 5 μl standardního vzorku BSA o příslušné koncentraci (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

Množství proteinu ve vzorku (v μg) jsem vypočítala podle následujícího vztahu:

$$\text{celkové množství proteinu} = (\text{OD} / k) \times (v1 / v2)$$

OD – optická denzita

k – směrnice získaná po lineární regresi mezi daným množstvím proteinu (v μg) a naměřenou OD standardních vzorků

v1 – objem GUS pufru, ve kterém byl vzorek homogenizován (75 μl)

v2 – objem vzorku (1 μl)

3.6.3 Histochemické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy

1) Chemikálie

a) 50 mM NaPO₄, pH=7

39 ml 0,05 M NaH₂PO₄ smíchat s 61 ml 0,05 M Na₂HPO₄

b) Substrát X-Gluc:

1,5 mg X-Gluc rozpustit v 50 μ l dimethylformamidu a přidat 14 ml

50 mM NaPO₄

2) Pracovní postup

Do jednotlivých částí mikrotitrační destičky jsem napipetovala 1 - 5 ml substrátu X-Gluc tak, aby byly čerstvě odštížené části pletiva testované rostliny potopeny. Poté jsem mikrotitrační destičku umístila do exsikátoru, kde se substrát pomocí podtlaku infiltroval do rostlinných pletiv po dobu 15 minut.

Po infiltraci jsem rostlinná pletiva nechala v substrátu inkubovat ještě 24 hodin při 37°C. Po uplynutí inkubační doby následovalo odstranění roztoku a odbarvení zelených částí rostlin 96 % etanolem.

4. VÝSLEDKY

4.1 Transformace bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* (kmen LBA 4404) nesoucími plazmid p35SGUSint jsem ve třech samostatných pokusech transformovala celkem 194 internodií rostliny *Solanum tuberosum* L., odrůdy Bintje. Během pokusu docházelo k opakovaným problémům s přerůstáním bakterií rodu *Agrobacterium*. Z tohoto důvodu klesl počet internodií na 41, což odpovídá asi 21 % původního počtu. Průběh transformace jsem uvedla v Tab. 1.

Tab. 1: Průběh transformace internodií prostřednictvím bakterií *A. tumefaciens*.

Pořadí pokusu	Počet transformovaných internodií	Délka transformace	Optická denzita transformační směsi	Počet internodií* (MSBR1Tim400Km100)
I	60	20 min.	1,8	2
II	64	20 min.	1,96	12
III	70	20 min.	1,27	27
Celkem	194	průměr 20 min.	průměr 1,67	41

* počet internodií zbylých po přerůstání bakterií rodu *Agrobacterium* na selekčním médiu s kanamycinem (100 mg.l⁻¹) a timentinem (400 mg.l⁻¹)

Internodia jsem kultivovala na selekčním médiu s koncentrací 100 mg.l⁻¹ kanamycinu a 400 mg.l⁻¹ timentinu (MSBR1Tim400Km100). Čtyři až šest týdnů po začátku kultivace se na koncích internodií začal vytvářet kalus, který byl tmavě zelený, rozpadavý a na povrchu hladký. Za další dva týdny začaly z kalusů regenerovat prýty, které jsem postupně oddělovala a přenášela na zakořeňovací médium s koncentrací 100 mg.l⁻¹ kanamycinu a 300 mg.l⁻¹ timentinu (MSTim300Km100) po dobu asi tří měsíců.

Na selekčním médiu (MSBR1Tim400Km100) vytvořilo zelený kalus 7 internodií, z nichž regenerovalo 75 prýtů. Po přenesení na zakořeňovací médium (MSTim300Km100) zakořenilo 44 prýtů (Tab. 2).

Tab. 2: Výsledek regenerace transformovaných internodií na selekčním médiu (MSBR1Tim400Km100) a zakořeňovacím médiu (MSTim300Km100).

Pořadí pokusu	Počet regenerujících internodií	Počet regenerantů	Počet kořenících prýtů na Km100	% kořenících prýtů
I	1	1	1	100
II	2	65	37	56,9
III	4	9	6	66,7
Celkem	7	75	44	průměr 58,7

Netransformovaná internodia (kontrola 1), které jsem kultivovala na selekčním médiu (MSBR1Tim400Km100), během několika týdnů odumřela (Tab. 3).

Netransformovaná internodia (kontrola 2) na regeneračním médiu bez antibiotik (MSBR1) vyprodukovala 408 prýtů, z nichž na zakořeňovacím médiu (MSTim300Km100) nezakořenil žádný (Tab. 4).

Tvorba kalusu a regenerace kontrolních internodií probíhala v porovnání s transformovanými internodiemi rychleji. Tvorba kalusů byla patrná už po 2 týdnech a začátek regenerace po 6 týdnech kultivace. Lišil se i charakter kalusu, který byl světle zelený, na povrchu zvrásněný, tvrdý a kompaktní.

Tab. 3: Výsledek regenerace netransformovaných internodií (kontrola 1) na selekčním médiu (MSBR1Tim400Km100).

	Počet internodií	Počet regenerujících internodií	Počet regenerantů	Počet kořenících prýtů
Celkem	30	0	0	0

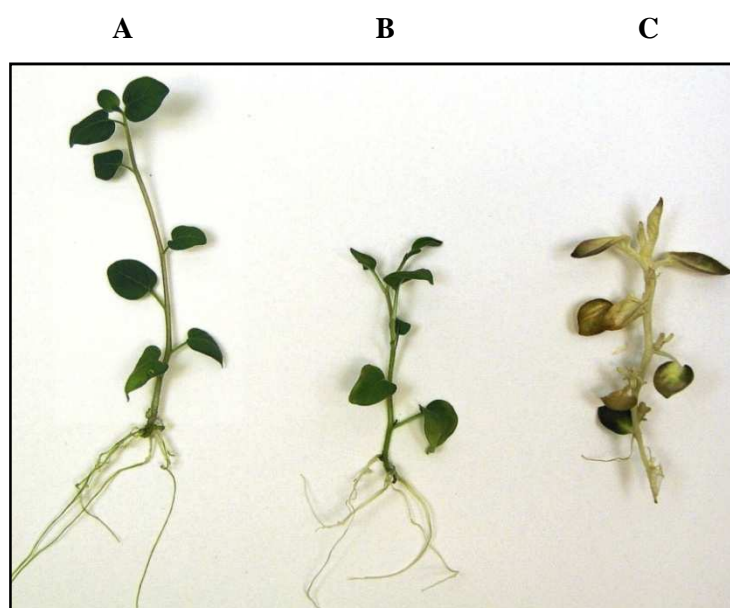
Tab. 4: Výsledek regenerace netransformovaných internodií (kontrola 2) na regeneračním médiu (MSBR1) a zakořeňovacím médiu (MSTim300Km100).

	Počet internodií	Počet regenerujících internodií	Počet regenerantů	Počet kořenících prýtů
Celkem	41	31	408	0

4.2 Analýza rostlin transformovaných bakteriemi *A. tumefaciens*

U všech prýtů kořenicích na zakořeňovacím médiu (MSTim300Km100) jsem pomocí „tissue“ PCR detekovala přítomnost transgenů *nptII* a *gus* a stanovovala aktivitu enzymu β -glukuronidázy fluorimetrickým a histochemickým způsobem. Ukázka regenerovaných rostlin je na Obr. 4.

Obr. 4: Makrofotografie regenerovaných rostlin bramboru. A - kontrolní rostlina na médiu bez Km; B – transgenní rostlina na Km 100; C - netransformovaná rostlina na Km 100.



4.2.1 Histochemické a fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy

Z celkového počtu 44 testovaných rostlin vykazovalo histochemickou a zároveň fluorimetrickou aktivitu 16 rostlin. Šest testovaných rostlin prokázalo aktivitu genu *gus* při histochemickém stanovení (Obr. 5), ale ne při fluorimetrickém. Nenalezla jsem žádnou rostlinu, u které by se při fluorimetrickém stanovení projevila aktivita enzymu β -glukuronidázy a zároveň se neprojevila při histochemickém stanovení. Polovina rostlin kořenicích na MSTim300Km100 nevykazovala aktivitu enzymu β -glukuronidázy při žádném z měření (Tab. 5).

Tab. 5: Souhrnné výsledky měření aktivity enzymu β -glukuronidázy histochemickým a fluorimetrickým způsobem u rostlin kořenicích na médiu s Km100.

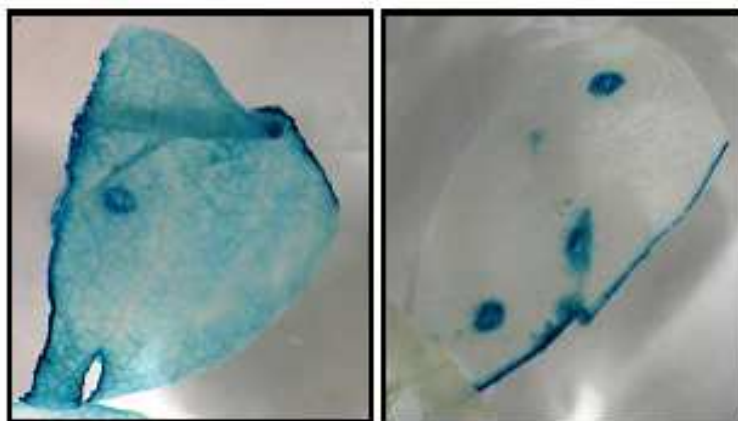
Pořadí pokusu	Počet kořenicích rostlin na Km100	Počet rostlin s aktivitou genu <i>gus</i>			
		H+ F+	H- F-	H+ F-	H- F+
I	1	0	1	0	0
II	37	16	16	5	0
III	6	0	5	1	0
Celkem	44	16 (36,4 %)	22 (50 %)	6 (13,6 %)	0

H = histochemické stanovení

F = fluorimetrické stanovení

Při fluorimetrickém stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy jsem za pozitivní rostliny považovala ty, jež při měření dosáhly alespoň 10 x vyšší hodnoty než kontrolní rostliny. Konkrétní hodnoty aktivity enzymu získané při fluorimetrickém stanovení se u jednotlivých testovaných rostlin pohybovaly v rozmezí 2 až 1279 pmol MU.min⁻¹.mg⁻¹ čerstvé hmotnosti listu (tj. 0,06 až 34,48 pmol MU. min⁻¹. μ g⁻¹ proteinu) a společně s histochemickým stanovením jsem je uvedla v Tab. 6.

Obr. 5: Ukázka exprese genu *gus* při histochemickém stanovení na listech regenerovaných transgenních rostlin bramboru.



Tab. 6: Výsledky měření aktivity enzymu β -glukuronidázy u rostlin kořenících na Km100.

Pořadí Pokusu	Označení rostliny	Histochemické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy	Aktivita enzymu β -glukuronidázy (pmol MU.min ⁻¹ .mg ⁻¹ č.hm.)	Aktivita enzymu β -glukuronidázy (pmol MU.min ⁻¹ . μ g ⁻¹ proteinu)
I	11/1	-	3	0,05
	II	12/1	-	22
	12/2	-	9	0,23
	12/6	-	3	0,07
	12/7	-	3	0,09
	12/8	-	5	0,08
	12/9	-	4	0,06
	12/10	+	847	15,94
	12/11	+	613	14,36
	12/12	+	678	14,43
	12/13	+	414	12,69
	12/14	+	615	12,23
	12/15	+	347	9,31
	12/16	-	5	0,12
	12/17	-	4	0,12
	12/18	+	449	11,91
	12/19	+	2	0,06
	12/20	+	388	9,12
	12/21	+	540	13,15
	12/22	-	7	0,17
	12/23	-	4	0,08
	12/24	-	2	0,06
	12/25	-	9	0,25
	12/26	+	439	13,36
	12/27	+	455	13,23
	13/1	+	11	0,31
	13/2	+	1279	34,48
	13/3	+	686	29,61
	13/4	+	726	19,92
	13/5	+	85	3,02
	13/6	+	261	16,75
	13/7	+	6	0,20
	13/8	+	29	0,98
	13/9	-	11	0,28
	13/10	-	13	0,44
	13/11	-	32	1,08
	13/12	-	4	0,14
	13/13	+	120	2,18
III	17/1	-	22	0,48
	17/2	-	16	0,35
	17/3	-	16	0,29
	18/1	-	17	0,29
	18/2	-	17	0,32
	18/3	+	17	0,32
Kontrola		-	10	0,18

č. hm. = čerstvá hmotnost listu

4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

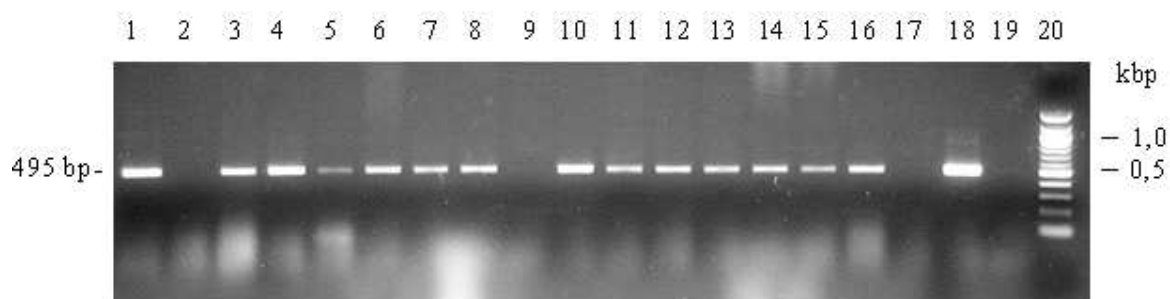
Všech 44 kořenících rostlin jsem analyzovala na přítomnost genů *nptII* a *gus* v genomu transformovaných rostlin. Ačkoli testované rostliny kořenily na médiu s kanamycinem, transgen pro rezistenci ke kanamycinu jsem prokázala u 41 rostlin. U 39 rostlin byly přítomny zároveň oba transgeny a u tří rostlin žádný transgen. U dvou rostlin jsem potvrdila přítomnost *nptII* genu, ale současně nenalezla gen *gus* (Tab. 7).

Tab. 7: Detekce nukleotidových sekvencí *gus* a *nptII* založená na PCR u rostlin kořenících na médiu s Km100.

Pořadí pokusu	Počet kořenících rostlin na Km100	Počet rostlin			
		<i>gus+</i> <i>nptII+</i>	<i>gus-</i> <i>nptII-</i>	<i>gus+</i> <i>nptII-</i>	<i>gus-</i> <i>nptII+</i>
I	1	1	0	0	0
II	37	32	3	0	2
III	6	6	0	0	0
Celkem	44	39 (88,6 %)	3 (6,8 %)	0	2 (4,6 %)

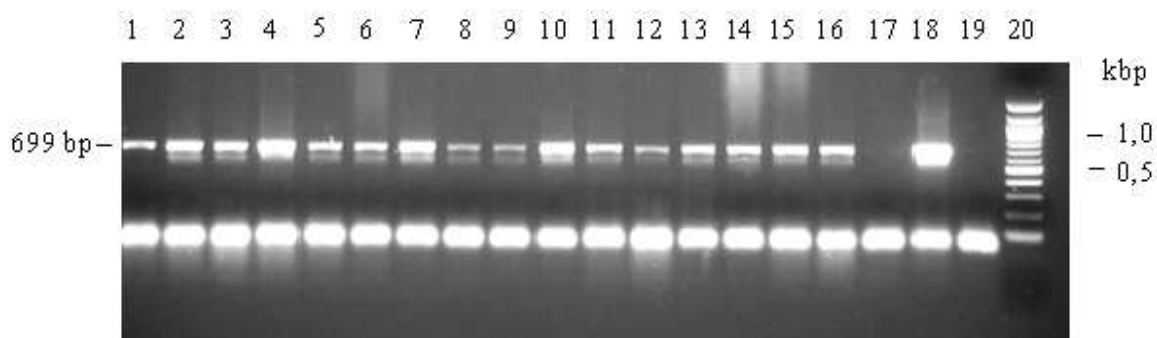
Ukázky reprezentativní PCR jsou na Obr. 6 a 7. Dráhy 2 a 9 představují rostliny pozitivní pouze na přítomnost genu *nptII*, ostatní rostliny jsou *gus/nptII* pozitivní.

Obr. 6: Ukázka „tissue“ PCR u šestnácti vybraných rostlin bramboru *Solanum tuberosum*, odrůdy Bintje, kořenících na médiu s Km100. Detekce genu *gus* pro enzym β -glukuronidázu, primery GUS1 a GUS2. Při reakci se amplifikoval fragment dlouhý 495 bp.



Dráhy 1-16 testované rostliny; dráha 17 – netransformovaná rostlina (negativní kontrola); dráha 18 – *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (pozitivní kontrola); dráha 19 – reakční směs bez DNA; dráha 20 – standard molekulové hmotnosti (100 bp ladder)

Obr. 7: Ukázka „tissue“ PCR u šestnácti vybraných rostlin bramboru *Solanum tuberosum*, odrůdy Bintje, kořenících na médiu s Km100. Detekce genu *nptII*, primery NPT1 a NPT2. Při reakci se amplifikoval fragment dlouhý 699 bp.



Dráhy 1-16 testované rostliny; dráha 17 – netransformovaná rostlina (negativní kontrola); dráha 18 – *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (pozitivní kontrola); dráha 19 – reakční směs bez DNA; dráha 20 – standard molekulové hmotnosti (100 bp ladder)

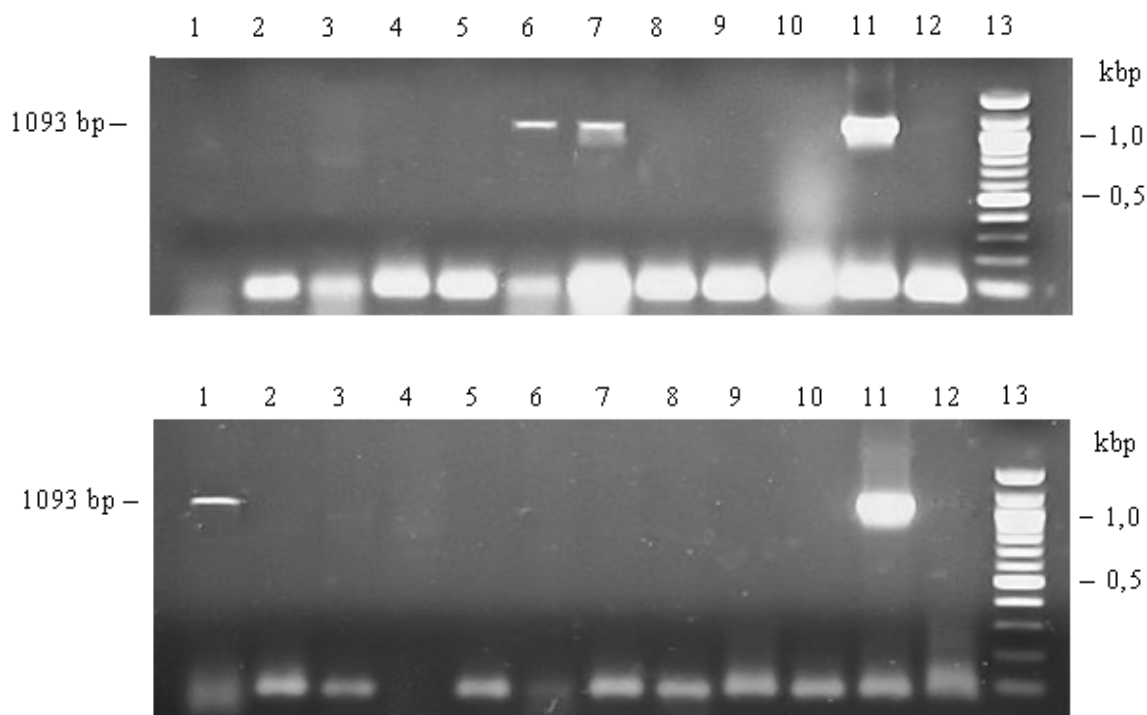
4.2.3 Porovnání jednotlivých analýz transformovaných rostlin

Výsledky jednotlivých provedených analýz (PCR, histochemické a fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy) u rostlin, které kořenily na médiu MSTim300Km100, jsem shrnula v Tab. 8.

Celkem 16 rostlin, u nichž jsem potvrdila přítomnost transgenu *gus* pomocí PCR, prokázalo aktivitu genu *gus* při histochemickém a fluorimetrickém stanovení.

U 17 kořenicích rostlin, s pozitivní PCR na přítomnost genu *gus*, jsem nenalezla aktivitu enzymu β -glukuronidázy ani při jednom způsobu stanovení. Na základě těchto výsledků jsem provedla PCR analýzu na přítomnost bakterií *A. tumefaciens* ve vzorku (Obr. 8). Při analýze jsem potvrdila přítomnost bakterií u 3 vzorků rostlin s označením 12/22, 12/24 a 13/10.

Obr. 8: „Tissue“ PCR u rostlin bramboru *Solanum tuberosum*, odrůdy Bintje, u nichž jsem potvrdila přítomnost genu *gus*, ale nedošlo k expresi. Detekce *vir* oblasti bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, primery VIRA1 a VIRA2. Při reakci se amplifikoval fragment dlouhý 1093 bp.



Dráhy 1-9 testované rostliny; dráha 10 – netransformovaná rostlina (negativní kontrola); dráha 11 – *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (pozitivní kontrola); dráha 12 – reakční směs bez DNA; dráha 13 – standard molekulové hmotnosti (100 bp ladder)

Tab. 8: Porovnání přítomnosti transgenů *gus* a *nptII* a projevu aktivity genu *gus* u rostlin kořenících na Km100.

Pořadí pokusu	Označení rostliny	PCR gen <i>nptII</i>	PCR gen <i>gus</i>	PCR gen <i>vir A</i>	Histochemické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy	Fluorimetrické stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy
I	11/1	+	+	-	-	-
II	12/1	+	+	-	-	-
	12/2	+	+	-	-	-
	12/6	-	-	n.p.	-	-
	12/7	+	+	-	-	-
	12/8	+	-	n.p.	-	-
	12/9	-	-	n.p.	-	-
	12/10	+	+	n.p.	+	+
	12/11	+	+	n.p.	+	+
	12/12	+	+	n.p.	+	+
	12/13	+	+	n.p.	+	+
	12/14	+	+	n.p.	+	+
	12/15	+	+	n.p.	+	+
	12/16	+	+	-	-	-
	12/17	-	-	n.p.	-	-
	12/18	+	+	n.p.	+	+
	12/19	+	+	n.p.	+	-
	12/20	+	+	n.p.	+	+
	12/21	+	+	n.p.	+	+
	12/22	+	+	+	-	-
	12/23	+	-	n.p.	-	-
12/24	+	+	+	-	-	
12/25	+	+	-	-	-	
12/26	+	+	n.p.	+	+	
12/27	+	+	n.p.	+	+	
III	13/1	+	+	n.p.	+	-
	13/2	+	+	n.p.	+	+
	13/3	+	+	n.p.	+	+
	13/4	+	+	n.p.	+	+
	13/5	+	+	n.p.	+	-
	13/6	+	+	n.p.	+	+
	13/7	+	+	n.p.	+	-
	13/8	+	+	n.p.	+	-
	13/9	+	+	-	-	-
	13/10	+	+	+	-	-
	13/11	+	+	-	-	-
	13/12	+	+	-	-	-
	13/13	+	+	n.p.	+	+
	17/1	+	+	-	-	-
	17/2	+	+	-	-	-
	17/3	+	+	-	-	-
	18/1	+	+	-	-	-
18/2	+	+	-	-	-	
18/3	+	+	n.p.	+	-	

n.p. = nebyla provedena analýza

4.3 Transformace mikroprojektily

4.3.1 Průběh transformace

Prostřednictvím přístroje PDS-1000/He jsem plazmidem p35SGUSint navázaným na částicích zlata transformovala internodia rostliny *Solanum tuberosum* L., odrůdy Bintje, v deseti samostatných pokusech. Jednotlivé pokusy se od sebe lišily ve velikosti použitých zlatých částic a v tlaku helia (Tab. 9).

Při každém pokusu jsem transformovala 12 misek s celkem 300 internodií bramboru. Vždy 4 misky obsahovaly jeden typ internodií předkultivovaných po stejnou dobu 1, 7 nebo 14 dní na regeneračním médiu MSBR1. Dalšími variantami pokusu byla vzdálenost internodií 6 a 9 cm od drátěného sítka v komoře přístroje, přičemž každá varianta zahrnovala 2 misky. Pokus VII byl opakováním pokusu I.

Tab. 9: Parametry jednotlivých variant transformací internodií bramboru mikroprojektily.

Varianta pokusu	Velikost částic zlata	Tlak helia	Počet misek s internodií	Celkový počet internodií	Vzdálenost pletiv od drátěného sítka
I	1,0 µm	1100 psi (75 842,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
II	1,0 µm	1350 psi (93 079,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
III	1,0 µm	900 psi (62 053,2 hPa)	12	300	6 a 9 cm
IV	0,6 µm	1350 psi (93 079,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
V	0,6 µm	1100 psi (75 842,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
VI	0,6 µm	900 psi (62 053,2 hPa)	12	300	6 a 9 cm
VII	1,0 µm	1100 psi (75 842,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
VIII	1,6 µm	1350 psi (93 079,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
IX	1,6 µm	1100 psi (75 842,8 hPa)	12	300	6 a 9 cm
X	1,6 µm	900 psi (62 053,2 hPa)	12	300	6 a 9 cm

4.3.2 Tranzientní exprese

Abych se přesvědčila, že plazmidová DNA pronikla do jader buněk internodia a došlo k expresi genu *gus*, stanovovala jsem vždy 48 hodin po transformaci histochemickou metodou aktivitu enzymu β -glukuronidázy.

Stanovení jsem prováděla vždy u poloviny transformovaných internodií z každé misky. Tranzientní exprese genu *gus* se projevovала jako modré tečky na povrchu internodia a našla jsem je pouze ve 4 variantách pokusu (I, VIII, IX a X). V tabulce 10 jsem uvedla množství míst, vykazujících tranzientní expresi genu *gus* („modrých teček“), nalezených po jednotlivých transformacích a v tabulce 11 podíly zasažených internodií.

Tab. 10: Vliv velikosti částic zlata, tlaku helia, vzdálenosti a typu internodií na transformaci rostlinných pletiv mikroprojektily, vyjádřený jako tranzientní exprese genu *gus*.

Velikost částic zlata	Tlak helia	Vzdálenost pletív od drátěného sítká	Tranzientní exprese genu <i>gus</i> („modré tečky“) na jednotlivých miskách			
			Předkultivace internodií 1 den	Předkultivace internodií 7 dní	Předkultivace internodií 14 dní	
0,6 μm	900 psi	6 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1100 psi	6 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1350 psi	6 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	900 psi	9 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1100 psi	9 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1350 psi	9 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
1,0 μm	900 psi	6 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1100 psi	6 cm	3 / 3	5 / >40	0 / 1	
	1100 psi (opakování)	6 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1350 psi	6 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	900 psi	9 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1100 psi	9 cm	10 / 3	3 / 6	>40 / >40	
	1100 psi (opakování)	9 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	1350 psi	9 cm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
1,6 μm	900 psi	6 cm	2 / 0	2 / 2	0 / 0	
	1100 psi	6 cm	0 / 6	10 / 0	2 / 2	
	1350 psi	6 cm	1 / 5	1 / 6	1 / 0	
	900 psi	9 cm	0 / 1	1 / 0	0 / 0	
	1100 psi	9 cm	16 / 8	4 / 5	0 / 0	
	1350 psi	9 cm	1 / 2	0 / 2	0 / 0	

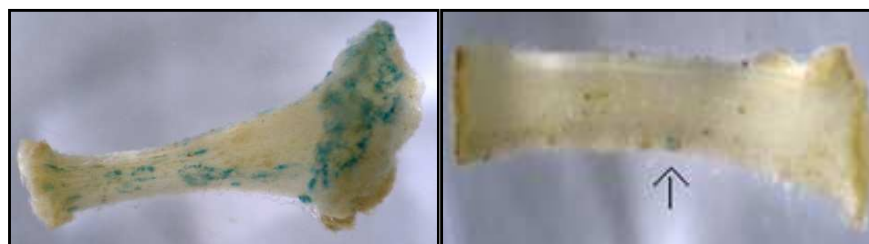
Tab. 11: Podíl internodií vykazujících tranzientní expresi genu *gus* u vybraných variant transformací.

Velikost částic zlata	Tlak helia	Vzdálenost pletiv od drátěného sítko	Podíl internodií vykazujících tranzientní expresi na jednotlivých miskách v %		
			Předkultivace internodií 1den	Předkultivace internodií 7 dní	Předkultivace internodií 14 dní
1,0 µm	1100 psi	6 cm	13,3 / 13,3	16 / 100	0 / 10
		9 cm	10 / 20	24 / 24	100 / 100
1,6 µm	900 psi	6 cm	13,3 / 6,7	16 / 16	0 / 0
	1100 psi	6 cm	0 / 26,7	32 / 0	20 / 20
	1350 psi	6 cm	6,7 / 33,3	8 / 32	10 / 0
	900 psi	9 cm	0 / 6,7	8 / 0	0 / 0
	1100 psi	9 cm	33,3 / 33,3	32 / 32	0 / 0
	1350 psi	9 cm	6,7 / 6,7	0 / 8	0 / 0

Po transformaci částicemi zlata o velikosti 0,6 µm jsem u žádného internodia nenalezla tranzientní expresi genu *gus*, ačkoli jsem měnila tlak helia a vzdálenost pletiv od drátěného sítko.

Po transformaci částicemi zlata o velikosti 1,0 µm jsem tranzientní expresi zjistila pouze u varianty I (tlak helia 1100 psi). Při porovnání jednotlivých transformačních pokusů jsem nejvyšší počet „modrých teček“ nalezla u internodií předkultivovaných po dobu 14 dní a umístěných ve vzdálenosti 9 cm od drátěného sítko a to i na misce při opakování. Zároveň jsem v této variantě nalezla tranzientní expresi u všech hodnocených internodií a tranzientní exprese se projevovala hlavně v kalusu (Obr. 9).

Obr. 9: Ukázka tranzientní exprese genu *gus* u internodií bramboru po transformaci mikroprojektily.



Druhý nejvyšší počet „modrých teček“ jsem našla také ve variantě I, přičemž internodia byla předkultivovaná po dobu 7 dnů a umístěná ve vzdálenosti 6 cm od drátěného sítka. Na druhé misce (opakování) jsem však zjistila mnohem nižší expresi. Tranzientní expresi vykazovalo v průměru 58 % internodií. Při opakování celého pokusu I se tranzientní exprese neprojevila vůbec.

Po transformaci částicemi zlata o velikosti 1,6 μm se tranzientní exprese projevila u většiny variant. U internodií předkultivovaných 14 dní jsem našla „modré tečky“ pouze v případě vzdálenosti pletiv 6 cm od drátěného sítka a tlaku 1100 psi nebo 1350 psi. Ve variantě IX (tlak helia 1100 psi) jsem našla „modré tečky“ asi u třetiny internodií předkultivovaných po dobu 1 i 7 dnů a umístěných ve vzdálenosti 9 cm od drátěného sítka.

V případě ostatních transformací se tranzientní exprese projevila převážně na internodiích.

4.3.3 Regenerace a zakořeňování prýtů

Ze zbylého počtu 1500 internodií, které jsem přenesla na selekční médium s koncentrací 100 mg.l^{-1} kanamycinu (MSBR1Km100) regenerovalo 12 prýtů. Po přenesení prýtů na zakořeňovací médium s koncentrací 100 mg.l^{-1} kanamycinu a 300 mg.l^{-1} timentinu (MSTim300Km100) nezakořenil žádný (Tab. 12).

Tab. 12: Výsledek regenerace transformovaných internodií na selekčním médiu (MSBR1Km100) a zakořeňovacím médiu (MSTim300Km100).

Pořadí pokusu	Počet internodií	Počet regenerujících internodií	Počet regenerantů	Počet kořenicích prýtů na Km100
I	150	3	3	0
II	150	2	2	0
III	150	0	0	0
IV	150	2	2	0
V	150	1	2	0
VI	150	1	1	0
VII	150	0	0	0
VIII	150	0	0	0
IX	150	1	1	0
X	150	1	1	0
Celkem	1500	11	12	0

Netransformovaná internodia (kontrola 1), které jsem umístila na selekční médium (MSBR1Km100) odumřela (Tab. 13). Netransformovaná internodia (kontrola 2) na regenerační médium (MSBR1) vyprodukovala 1175 prýtů, z nichž na zakořeňovacím médium (MSTim300Km100) nezakořenil žádný (Tab. 14).

Tab. 13: Výsledek regenerace kontrolních internodií (kontrola 1) na selekčním médium MSBR1Km100.

	Počet internodií	Počet regenerujících internodií	Počet regenerantů	Počet kořenících prýtů na Km100
Celkem	120	0	0	0

Tab. 14: Výsledek regenerace kontrolních internodií (kontrola 2) na regeneračním médium (MSBR1) a zakořeňovacím médium (MSTim300Km100).

	Počet internodií	Počet regenerujících internodií	Počet regenerantů	Počet kořenících prýtů na Km100
Celkem	120	101	1175	0

4.4 Porovnání účinnosti transformací

Transformační účinnost jsem vypočítala jako podíl transgenních rostlin z počtu transformovaných explantátů. Za transgenní jsem považovala rostliny kořenící na Km100, u nichž byla pomocí PCR potvrzena přítomnost genů *nptII* a *gus* a zároveň buď byla prokázána exprese genu *gus* nebo se exprese neprojevila, ale byla vyloučena přítomnost bakterií rodu *Agrobacterium* v pletivech vzorku.

Po transformaci internodií bramboru mikroprojektily jsem nezískala žádnou transgenní rostlinu. Po transformaci internodií bakteriemi rodu *Agrobacterium* jsem získala 36 transgenních rostlin, což odpovídá transformační účinnosti 87,8 % (Tab. 15).

Tab. 15: Účinnost transformace internodií bramboru mikroprojektily a bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*.

Metoda transformace	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Mikroprojektily
Konstrukt	p35SGUSint	p35SGUSint
Počet transformovaných internodií	41*	3000
Počet regenerujících internodií	7	11
Počet regenerantů	75	12
Počet transgenních rostlin	36	0
Účinnost transformace v %	87,8	0

*počet internodií zbylých po přerůstání bakterií rodu *Agrobacterium*

5. DISKUZE

V této práci jsem transformovala internodia rostliny bramboru *Solanum tuberosum* L., odrůdy Bintje, dvěma metodami a porovnávala transformační účinnost.

Internodia byla vybrána kvůli snadné manipulaci a ověřenému regeneračnímu systému v naší laboratoři. Použití stonkových segmentů k transformacím považují za výhodnější např. Beaujean *et al.* (1998) a Romano *et al.* (2001), kteří uvádějí, že v porovnání s listovými explantáty snášejí lépe kultivaci *in vitro* a zároveň jsou méně náchylné k poranění během manipulace. Případné poškození explantátu může mít za následek nízké procento transformace (DeBlock, 1988).

5.1 Transformace bakteriemi rodu *Agrobacterium*

Bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* (kmen LBA 4404) nesoucími plazmid p35SGUSint jsem ve třech pokusech transformovala 194 internodií bramboru.

Během všech pokusů jsem měla problémy s přerůstáním bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, kdy na médiu s koncentrací 300 mg.l⁻¹ timentinu odumřelo téměř 80 % transformovaných internodií. S podobnými problémy se při transformačních pokusech setkávali i jiní autoři. Gustafson *et al.* (2006) uvádějí, že při transformaci listových disků bramboru odrůdy Shepody poklesl kvůli přerůstání bakterií rodu *Agrobacterium* podíl explantátů na 65 %. Důvodem byla zřejmě zvýšená virulence těchto bakterií. Problém jsem řešila zvýšením koncentrace timentinu v médiu na 400 mg.l⁻¹ a mechanickým oddělováním vytvořených kalusů od internodia. Obdobný postup při transformaci bramboru použili i Rakosy-Tican *et al.* (2007).

Celkem ze všech tří pokusů regenerovalo 17,1 % transformovaných internodií. Podobně nízkou hodnotu regenerace transformovaných explantátů jsem našla v práci Tavazza *et al.* (1989), kde vytvářelo výhony 23 % transformovaných explantátů, v tomto případě ale listových disků. Další autoři však s těmito výsledky nesouhlasí a uvádějí výrazně vyšší schopnost regenerace. U internodií se podíly regenerujících explantátů pohybovaly v rozmezí 69 % (Ottaviani a Tencate, 1991) až 75 % (Visser *et al.*, 1989), u listů 59,5 % (Gustafson *et al.*, 2006) až 100 % a u hlíz 66 % až 100 %

(Nadolska-Orczyk *et al.*, 1995). Nízká hodnota regenerace mohla být ovlivněna vysokou koncentrací antibiotik, kdy sice došlo k odstranění bakterií z pletiv, vznikl silný selekční tlak na netransformované explantáty, ale zároveň mohla být negativně ovlivněna tvorba kalusu a regenerace prýtů. Vliv antibiotik na regeneraci netransformovaných internodií jsem netestovala.

Ačkoli regenerovala velmi malá část transformovaných internodií, nakonec jsem oddělila celkem 75 výhonů tj. 10,7 prýtů na explantát a u kontrolních netransformovaných rostlin 13,2 prýtů na explantát. Tato čísla jsou již srovnatelná s dalšími pracemi, kde autoři získali v průměru např. 9,3 (Beaujean *et al.*, 1998) a 11 prýtů na internodium (Sarker a Mustafa, 2002). V mém případě však mohl být výsledek ovlivněn skutečností, že některé regenerované rostliny byly klony tj. rostliny regenerované z kalusu tvořeného geneticky uniformními buňkami. Metodami používanými v této práci nelze klony spolehlivě rozlišit. Stanovení klonů by bylo možné pouze Southernovou hybridizací, kterou jsem neprovedla z časových důvodů.

Téměř polovina prýtů, která regenerovala z kalusů za působení kanamycinu nebyla následně schopna v jeho přítomnosti zakořenit. Toto zjištění nesouhlasí s dalšími pracemi, kde se uvádí, že na kanamycinu zakořenilo 80 % – 90 % oddělených prýtů (Nadolska-Orczyk *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2006, Gustafson *et al.*, 2006). S obdobným problémem se však setkal např. Horsch *et al.* (1985). Tento jev vysvětlovali tím, že tvořící se prýty jsou k antibiotiku všeobecně citlivější než kalusy. Jiným vysvětlením může být skutečnost, že tranzientní exprese genu *nptII* zajistí dočasnou ochranu před kanamycinem a umožní růst netransformovaným pletivům, nebo že je integrovaná kopie T-DNA zpočátku exprimována a po určité době umlčena.

Jako důkaz integrace T-DNA v regenerovaných rostlinách jsem použila „tissue“ PCR. Nalezla jsem ovšem tři případy, kdy rostliny kořenily, ale analýza pomocí PCR vyloučila přítomnost transgenů v genomu. Obdobných výsledků dosáhl Xu *et al.* (1995), kdy v několika případech získal netransgenní rostliny, které byly fenotypově shodné s transgenními. Mohlo dojít k inhibici PCR reakce v důsledku přítomnosti inhibičních látek, nebo se mohlo jednat o chimérickou rostlinu, kdy jsem k testování použila netransformovanou část rostliny.

U dvou kořenících rostlin jsem pomocí PCR potvrdila přítomnost genu *nptII*, ale nikoli genu *gus*. U těchto rostlin jsem zároveň nenalezla expresi genu *gus* při fluorimetrickém a histochemickém stanovení. Nešlo tedy zřejmě o chybu při PCR, ale

o ztrátu genu *gus*, ke které mohlo dojít během integrace T-DNA do genomu rostlin. Ostatní kořenící rostliny měly v genomu integrovány oba transgeny.

Jako další důkaz transformace jsem použila stanovení exprese genu *gus* jednak histochemickou a jednak fluorimetrickou metodou. Expresi genu *gus* při obou stanoveních jsem prokázala u 36,4 % kořenících rostlin. Při fluorimetrickém stanovení aktivita enzymu β -glukuronidázy kolísala v rozmezí 0,06 až 34,48 pmol MU.min⁻¹. μ g⁻¹ proteinu. Podobné rozmezí naměřených hodnot 0,1 až 50 pmol MU.min⁻¹. μ g⁻¹ proteinu zaznamenali ve své práci Ottaviani a Tencate (1991). Naopak nižší hodnoty 2,1 až 3,5 pmol MU.min⁻¹. μ g⁻¹ proteinu změřili Ottaviani *et al.* (1993), kteří uvádějí, že hodnota aktivity enzymu β -glukuronidázy se zvyšuje s věkem rostliny (subkultivační interval). Exprese se může lišit i v závislosti na testované části rostliny (Ottaviani a Tencate, 1991) a na použitém konstrukt (Ibrahim *et al.*, 2001).

U 13,6 % kořenících rostlin jsem expresi transgeny *gus* zjistila pouze při histochemickém stanovení. K projevu aktivity při fluorimetrickém stanovení zřejmě nedošlo z důvodu chimérních pletiv, kdy ke stanovení byla použita netransformovaná část rostliny. Je také možné, že došlo k expresi genu *gus*, ale aktivita byla při porovnání s kontrolou příliš slabá, a proto jsem ji neuznala za pozitivní.

Všechny kořenící rostliny s pozitivní PCR na přítomnost obou transgenů *nptII* a *gus*, u nichž se neprojevila aktivita genu *gus* při fluorimetrickém a histochemickém způsobu stanovení, jsem z důvodu obavy před falešně pozitivními výsledky analyzovala pomocí PCR na přítomnost *virA* genu ve stejném vzorku pletiva. Kontaminaci jsem odhalila u tří vzorků. Problém s přežíváním bakterií rodu *Agrobacterium* v transformovaných pletivech pozorovali také Matzk *et al.* (1996), kteří potvrdili přítomnost těchto bakterií v pletivech tabáku ještě 12 měsíců po transformaci.

U 31,8 % kořenících rostlin nedošlo k expresi genu *gus*, ačkoli byl gen přítomen v genomu rostliny. Na podobný problém jsem narazila u několika autorů, kteří však uvádějí nižší podíly stejně se chovajících rostlin bramboru, například 17 % (Ottaviani a Tencate, 1991), 19,3 % (Gillisen *et al.*, 1991) a 29 % (Sarker a Mustafa, 2002). Vyšší podíl rostlin jsem zaznamenala v práci Ottaviani *et al.* (1993) a to 42,9 %. Tento jev vysvětlují metylací promotoru a kódující oblasti genu *gus*. O problému s umlčováním transgenů v rostlinách se zmiňují autoři již v minulém století (Depicker a Van Montagu, 1997; Park *et al.* 1996; Rotino *et al.*, 1992). Jiným vysvětlením může být skutečnost, že jsem jednotlivá stanovení prováděla s časovým

odstupem několika týdnů a vždy byla odebrána jiná část rostliny. K detekci tak mohla být použita zrovna ta část pletiva, která nebyla transformovaná.

Celkem jsem získala 36 transgenních rostlin ze 41 explantátů tj. transformační účinnost 87,8 %, což je srovnatelné s výsledky získanými od Beaujean *et al.* (1998), kteří uvádějí účinnost transformace stonkových segmentů 90 %. Tyto hodnoty však odporují tvrzení, že *in vitro* regenerace velkého množství transgenních rostlin je u odrůdy Bintje relativně obtížná (DeBlock, 1988; Ottaviani *et al.*, 1993). Řada autorů, kteří transformovali internodia a stonkové explantáty bramboru získala výrazně nižší hodnoty transformační účinnosti např. 10 % (Bajrovic *et al.*, 1995), 2 % – 35 % (Heeres *et al.*, 2002), 27 % - 31 % (Chang a Chan, 1991) a 30 % – 60 % (Rommens *et al.*, 2004).

Transformační účinnost závisí na mnoha faktorech např. na odrůdě, na genotypu rostliny, na kvalitě použitého rostlinného materiálu, na kmeni bakterie *A. tumefaciens* apod. Např. Trujillo *et al.* (2001) uvádějí, že transformační účinnost stonků a listů bramboru se pohybovala od 4,4 % do 14,3 %. S tímto souhlasí i Sarker a Mustafa (2002), kdy při transformaci rostlin bramboru se v závislosti na použitém explantátu pohybovala transformační účinnost v rozmezí 55 % – 80 %. Závislost účinnosti transformace na genotypu potvrzují ve svých pracích např. Moravcikova *et al.* (2003), Heeres *et al.* (2002), Gillisen *et al.* (1991) aj.

5.2 Transformace mikroprojektily

Plazmidem p35SGUSint navázaným na částicích zlata jsem pomocí přístroje PDS-1000/He transformovala internodia bramboru v deseti pokusech.

Pro úspěšnou transformaci každého rostlinného materiálu je nutná optimalizace parametrů přístroje. Autoři se shodují, že mezi nejdůležitější patří velikost částic zlata a tlak helia (např. Sanford *et al.*, 1993; Romano *et al.*, 2001), a proto jsem se ve svých pokusech zaměřila zejména na sledování transformační účinnosti při třech odlišných velikostech zlata (0,6 μm ; 1,0 μm ; 1,6 μm) a při třech tlacích helia (900 psi, 1100 psi, 1350 psi).

Tranzientní expresi jsem po transformaci částicemi zlata o velikosti 0,6 μm nenalezla ani na jednom testovaném internodiu. Na stejný problém narazil i Heiser (1998) při transformaci stonkových explantátů kvěťáku. Tyto částice jsou zřejmě příliš malé,

lehké, a proto nedosáhly potřebné rychlosti k průniku do jader buněk, kde se exprese projevuje. Craig *et al.* (2005) ve své práci uvádějí, že u bramboru našli tranzientní expresi genu *gus* při použití částic zlata o velikosti 0,6 μm . Transformovali však listové explantáty bramboru, které mají odlišné složení buněčné stěny a mikroprojektily tak mohly snáze proniknout do jader buněk.

Po transformaci internodií částicemi zlata o velikosti 1,0 μm jsem tranzientní expresi našla pouze při tlaku helia 1100 psi. U částic zlata o velikosti 1,6 μm jsem expresi našla při všech sledovaných tlacích helia. Podobné výsledky uvádí i Heiser (1998). Tyto částice zlata za příslušných tlaků helia dosahují pravděpodobně dostatečné rychlosti, aby pronikly do jader buněk internodia. Potvrdila jsem také poznatek Southgate *et al.* (1995), že je nutné používat čerstvě připravené zlaté částice a spermidin. U pokusu I, kde jsem našla největší tranzientní expresi, jsem použila čerstvě připravené částice zlata a spermidin. Při jeho opakování (pokus VII) jsem použila 3 měsíce starý zamražený spermidin i částice zlata a nenašla jsem žádnou expresi genu *gus*.

Hodnoty tranzientní exprese vyjádřené jako počty „modrých teček“ se podle použitého tlaku a velikosti zlata pohybovaly u internodií bramboru v rozmezí 0 až 16 na miskou. Pouze při dvou variantách pokusu jsem získala hodnoty exprese nad 40. V porovnání s prací Romano *et al.* (2001), kteří uvádějí počty „modrých teček“ pro internodia v rozmezí 0 až 150 na miskou a v případě listů v rozmezí 0 až 600 na miskou, jsem po transformaci dosáhla velmi nízké exprese. Craig *et al.* (2005) a Romano *et al.* (2001) popsali, že působení manitolu a sorbitolu na rostlinná pletiva vedlo k výraznému zvýšení tranzientní exprese a ovlivnilo i účinnost transformace brambor. Ve svých pokusech jsem upravovala pouze fyzikální podmínky transformace, a proto by bylo vhodné zaměřit se i na optimalizaci podmínek pro rostlinný materiál. Tito autoři však při transformacích používali odlišný typ genového děla, jiné plazmidy, regenerační a transformační protokoly.

Při všech transformacích jsem používala internodia s různou dobou předkultivace a tedy i velikostí kalusu. Exprese se projevila převážně na internodiu, pouze v případě varianty I, doby předkultivace 14 dní a vzdálenosti 9 cm se exprese výrazně projevila v kalusu. Největší počet „modrých teček“ jsem našla při transformaci internodií předkultivovaných 14 dní a 7 dní. Podobně Romano *et al.* (2001) získali lepší výsledky transformace u předkultivovaných internodií než u čerstvě odstřižených.

Transformace mikroprojektily je zřejmě velmi náhodný proces. Při histochemickém stanovení aktivity enzymu β -glukuronidázy jsem našla výraznou variabilitu, kdy

u většiny explantátů nebyla nalezena žádná místa tranzientní exprese, u některých v řádu jednotek a pouze při několika transformacích intenzivní modré zbarvení na větší ploše. Expres se velmi lišila, i když šlo o opakování pokusu. S podobnou variabilitou se setkali v případě transformace různých explantátů bramboru další autoři (Craig *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2001). Tento jev lze vysvětlit tím, že pro každý transformační pokus nelze připravit identickou směs mikroprojektilů, a také nelze zajistit, aby každá miska s explantáty, případně každý jednotlivý explantát byl transformován stejným množstvím zlatých částic a DNA (Southgate *et al.*, 1995; Sanford *et al.*, 1993).

Po transformaci internodií bramboru mikroprojektily se mi nepodařilo získat žádnou transgenní rostlinu. Na rozdíl např. od práce Romano *et al.* (2001), kteří získali transgenní rostliny bramboru s účinností 31 %. V pozdějším pokusu, kdy použili kotransformaci dvou plazmidů se transformační účinnost internodií pohybovala v rozmezí 5 % až 35 % (Romano *et al.*, 2003). Transgenní rostliny bramboru lze získat i z jiných explantátů. Romano *et al.* (2001) transformovali mikrohlízky s účinností 4 %. Po transformaci listů získali 3 kanamycin rezistentní rostliny z celkového počtu 157 listových explantátů (účinnost 2 %), zatímco Craig *et al.* (2005) uvádějí transformační účinnost listů 30 %.

Důvodem mého neúspěchu při získávání transgenních rostlin může být nedostatečná optimalizace podmínek transformace. Tranzientní exprese je důkazem, že mikroprojektily pronikly do jádra buňky, ale nedošlo zřejmě k integraci DNA do genomu rostliny, případně buňka zásah nepřežila. Southgate *et al.* (1995) uvádějí, že vysoký stupeň tranzientní exprese negativně koreluje s vysokým stupněm stabilní integrace a zisku transgenních rostlin. Také další autoři potvrzují, že pro účinnou transformaci je nezbytné nastavit parametry přístroje tak, aby nedošlo k nadměrnému stresu rostliny nebo poškození pletiv (Taylor a Fauquet, 2002; Romano *et al.*, 2001; Heiser, 1998).

6. ZÁVĚR

V této práci jsem porovnávala účinnost transformace internodií rostliny bramboru *Solanum tuberosum* L., odrůdy Bintje, dvěma metodami. Jednak nepřímou transformací pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, kmen LBA 4404, jednak přímou transformací mikroprojektily prostřednictvím přístroje PDS-1000/He. V obou případech jsem použila shodný plazmidový konstrukt p35SGUSint, který obsahoval geny *nptII* pro rezistenci ke kanamycinu a *gus* pro enzym β -glukuronidázu.

Po transformaci bakteriemi rodu *Agrobacterium* jsem získala 36 transgenních rostlin, u nichž jsem potvrdila přítomnost obou genů pomocí „tissue“ PCR a stanovila expresi genu *gus* histochemickou a fluorimetrickou metodou. Vzhledem k tomu, že jsem k testování použila rostliny kultivované několik měsíců na agarových médiích s kanamycinem, je možné předpokládat, že se jedná o geny stabilně integrované do rostlinného genomu. Transformační účinnost byla 87,8 %.

Po transformaci mikroprojektily se mi podařilo prokázat tranzientní expresi genu *gus* v případě použití částic zlata o velikosti 1,6 μm a zároveň tlaku helia 900 psi, 1100 psi nebo 1350 psi, a dále při velikosti částic zlata 1,0 μm a tlaku helia 1100 psi. Tím bylo potvrzeno, že došlo k přenosu plazmidu do jádra rostlinné buňky a že gen je schopen se v buňce exprimovat. Nenalezla jsem žádný významný vliv doby předkultivace ani vzdálenosti internodií od drátěného sítka na intenzitu tranzientní exprese. Nepodařilo se mi získat žádnou transgenní rostlinu.

Ze získaných výsledků je možné usuzovat, že transformace mikroprojektily je velmi náhodný proces, který při opakování poskytuje rozdílné výsledky a při němž je problematické dosáhnout vysoké transformační účinnosti.

Při porovnání obou metod transformace internodií rostliny bramboru *Solanum tuberosum* L., odrůdy Bintje, se jeví jako vhodnější nepřímá metoda transformace prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens*.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahokas H. (1987):** Transfection by DNA - associated liposomes evidenced at pea pollination. *Hereditas*, 106 (1): 129-138.
- Arencibia A. D., Carmona E. R., Tellez P., Chan M. T., Yu S. M., Trujillo L. E., Oramas P. (1998):** An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*, 7 (3): 213-222.
- Armaleo D., Ye G. N., Klein T. M., Shark K. B., Sanford J. C., Johnston S. A. (1990):** Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, 17 (2): 97-103.
- Banerjee A. K., Prat S., Hannapel D. J. (2006):** Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. spp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. *Plant Science*, 170 (4): 732-738.
- Bajrovic K., Sule A., Arican E., Karan K., Gozukirmizi N. (1995):** Transformation of potato (*Solanum-tuberosum* L.) using tuber discs and stem explants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 9 (1): 29-32.
- Beaujean A., Sangwan R. S., Lecardonnell A., Sangwan-Norreel B. S. (1998):** *Agrobacterium* - mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *Experimental Botany*, 49 (326): 1589-1595.
- Bevan M. W., Flavell R. B., Chilton M. D. (1983):** A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304: 184-187.
- Birch R. G., Franks T. (1991):** Development and optimisation microprojectile systems for plant genetic transformation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18 (5): 453-469.
- Bower R., Elliott A. R., Potier B. A. M., Birch R. G. (1996):** High-efficiency, microprojectile - mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding*, 2 (3): 239-249.
- Bradford M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities o protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.

- Bradshaw J. E., Mackay G. R. (1994):** Breeding strategies for clonally propagated potatoes. *Potato Genetics*, 467-497.
- Clive J. (2007):** Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. ISAAA Brief No. 37. <http://www.isaaa.org>
- Craig W., Gargano D., Scotti N., Nguyen T. T., Lao N. T., Kavanagh T. A., Dix P. J., Cardi T. (2005):** Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplast. *Plant Cell Reports*, 24: 603-611.
- Daniell H. (1997):** Transformation and foreign gene expression in plants mediated by microprojectile bombardment. *Methods in Molecular Biology*, 62: 463-489.
- DeBlock M. (1988):** Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 76 (5): 767-774.
- DeBlock M., Schell J., Van Montagu M. (1985):** Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO*, 4 (6): 1367-1372.
- Depicker A., Van Montagu M. (1997):** Post-transcriptional gene silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 9: 373-382.
- DeVries S. E., Tempellar M. J. (1987):** Electrofusion and analysis of potato somatic hybrids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3: 211-221.
- Diviš J., Jůza J., Moudrý J., Vondrys J. (2000):** Pěstování rostlin (skriptum). Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Fehér A., Felföldi K., Preiszner J., Dudits D. (1991):** PEG-mediated transformation of leaf protoplasts of *Solanum tuberosum* L. cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27 (1): 105-114.
- Figueira-Filho E. S., Figueiredo L. F. A., Monte - Neshich D. C. (1994):** Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, 13 (12): 666-670.
- Fromm M. E., Morrish F., Armstrong Ch., Williams R., Thomas J., Klein T. M. (1990):** Inheritance and expression of chimeric genes in progeny of transgenic maize plants. *Biotechnology*, 8: 833-839.
- Fujimura T., Sakurai M., Akagi H., Negishi T., Hirose A. (1985):** Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Letters*, 2: 74-75.

- Furth P. A. (1997):** Gene transfer by biolistic process. *Molecular Biotechnology*, 7 (2): 139-143.
- Gad A. E., Rosenberg N., Altman A. (1990):** Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Plant Physiology*, 79 (1): 177-183.
- Gartland K. M. A., Phillips J. P., Vitha S., Beneš K. (1995):** Fluorometric GUS analysis for transformed plant material. *Methods in Molecular Biology*, 44: 195-199.
- Gelvin S. B. (2003):** *Agrobacterium* - mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (1): 16-37.
- Gilissen L. J. W., Ramulu K. S., Flipse E., Meinen E., Stiekema W. J. (1991):** Transformation of diploid potato genotypes through *Agrobacterium* vectors and expression of T-DNA marker in root clones, regenerated plants and suspension cells. *Acta Botanica of Netherlands*, 40 (1): 53-61.
- Graves A. C., Goldman S. L. (1987):** *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of the monocot genus *Gladiolus*: detection of expression of T-DNA encoded genes. *Bacteriology*, 169 (4): 1745-1746.
- Grevich J. J., Daniell H. (2005):** Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (2): 83-107.
- Gustafson V., Mallubhotla S., MacDonnell J., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty B., Wang-Pruski G., Rothwell C., Audy P., DeKoeper D., Siahbazi M., Flinn B., Regan S. (2006):** Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. 'Shepody'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 361-366.
- Hadi M. Z., McMullen M. D., Finer J. J. (1996):** Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 15 (7): 500-505.
- Haldrup A., Petersen S. G., Okkels F. T. (1998):** Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in food industry. *Plant Cell Reports*, 18 (1-2): 76-81.
- Hamilton C. M., Frary A., Lewis C., Tanksley S. D. (1996):** Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 (18): 9975–9979.

- Harrison B. D. (1992):** Advances and prospects in potato virology with special reference to virus resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 98 (2): 1-12.
- Heeres P., Jacobsen E., Visser R. G. F. (1997):** Behaviour of genetically modified amylose free potato clones as progenitors in a breeding program. *Euphytica*, 98: 169–175.
- Heeres P., Schippers-Rozenboom M., Jacobsen E., Visser R. G. F. (2002):** Transformation of a large number of potato varieties: genotype - dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica*, 124: 13-22.
- Heiser W. (1998):** Optimization of biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He system. http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1688.pdf
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2007):** Wild potato species: characterization and biological potential for potato breeding. *Czech Journal of Genetic Plant Breeding*, 43 (3): 73–81.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994):** Efficient transformation of rice (*Oryza Sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence-analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6 (2): 271-282.
- Higgins E. S., Hulme J. S., Shields R. (1992):** Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 82 (1): 109-118.
- Hilliou F., Christou P., Leech M. J. (1999):** Development of an efficient transformation system for *Catharanthus roseus* cell cultures using particle bombardment. *Plant Science*, 140: 179-188.
- Hmida-Sayari A., Gargouri-Boudiz R., Bidani A., Jaoua L., Savoure A., Jaoua S. (2005):** Overexpression of delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science*, 169 (4): 746-752.
- Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T. (1985):** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227 (4691): 1229-1231.
- Huisman M. J., Cornelissen B. J. C., Jongedijk E. (1992):** Transgenic potato plants resistant to viruses. *Euphytica*, 63 (1-2): 187-197.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994):** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802-805.

- Chang H. H., Chan M. T. (1991):** Improvement of potato (*Solanum tuberosum* L.) transformation efficiency by *Agrobacterium* in the presence of silver thiosulfate. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 32 (1): 63-70.
- Charest P. J., Holbrook L. A., Gabard J., Iyer V. N., Miki B. L. (1988):** *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. Theoretical and Applied Genetics, 75 (3): 438-445.
- Chen L. L., Marmey P., Taylor N. J., Brizard J. P., Espinoza C., D’Cruz P., Huet H., Zhang S. P., DeKochko A., Beachy R. N., Fauquet C. M. (1998):** Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. Nature Biotechnology, 16 (11): 1060-1064.
- Christou P. (1992):** Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. Plant Journal, 2 (3): 275-281.
- Christou P. (1996):** Transformation technology. Trends in Plant Science, 1 (12): 423-431.
- Christou P., McCabe D. E., Swain W. F. (1988):** Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. Plant Physiology, 87 (3): 671-674.
- Ibrahim A. F. M., Watters J. A., Clark G. P., Thomas C. J. R., Brown J. W. S., Simpson C. G. (2001):** Expression of intron-containing GUS constructs is reduced due to activation of a cryptic 5’ splice site. Molecular Genetics and Genomics, 265: 455-460.
- Ishida B. K., Snyder G. W., Belknap W. R. (1989):** The use of in vitro-grown microtuber disks in *Agrobacterium*-mediated transformation of Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. Plant Cell Reports, 8 (6): 325-328.
- Janssen B. J., Gardner R. C. (1989):** Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. Plant Molecular Biology, 14: 61-72.
- Jefferson R. A., Burgess S. M., Hirsh D. (1986):** β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 83 (22): 8447-8451.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987):** GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO, 6 (13): 3901-3907.
- Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S. G., Brunstedt J., Okkels F. T. (1998):** Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. Molecular Breeding, 4 (2): 111-117.

- Joersbo M., Okkels F. T. (1996):** A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports*, 16: 219-221.
- Jouanin L., Bonade-Bottino M., Girard C., Morrot G., Giband M. (1998):** Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*, 131 (1): 1-11.
- Kaeppler H. F., Somers D. A., Rines H. W., Cockburn A. F. (1992):** Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 (5-6): 560-566.
- Kartha K. K., Chibbar R. N., Georges F., Leung N., Caswell K., Kendall E., Qureshi J. (1989):** Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 8 (8): 429-432.
- Khan M. R. I., Tabe L. M., Health L. C., Spencer D., Higgins T. J. V. (1994):** *Agrobacterium* - mediated transformation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant Physiology*, 105 (1): 81-88.
- Kim Y. S., Kang T. J., Jang Y. S., Yang M. S. (2005):** Expression of neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus in potato plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82 (2): 125-130.
- Kirch H. H., Van Berkel J., Glaczinski H., Salamini F., Gebhardt Ch. (1997):** Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Molecular Biology*, 33 (5): 897-909.
- Klein T. M., Arentzen R., Lewis P. A., Fitzpatrick-McElligott S. (1992):** Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology*, 10: 286-291.
- Klein T. M., Gradziel T., Fromm M. E., Sanford J. C. (1988):** Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology*, 6: 559-563.
- Klein T. M., Kornstein L., Sanford J. C., Fromm M. E. (1989):** Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiology*, 91 (1): 440-444.
- Kuipers A. G. J., Soppe W. J. J., Jacobsen E., Visser R. G. F. (1994):** Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: increase of the antisense effect during tuber growth. *Plant Molecular Biology*, 26 (6): 1759-1773.

- Kumar A. (1995):** *Agrobacterium* - mediated transformation of potato genotypes. *Methods in Molecular Biology*, 44: 121-128.
- Kuvshinov V., Koivu K., Kanerva A., Pehu E. (2001):** Transgenic crop plants expressing synthetic cry9Aa gene are protected against insect damage. *Plant Science*, 160 (2): 341-353.
- Lang Ch., Schulze J., Mendel R. R., Hänsch R. (2006):** HaloTag (TM): a new versatile reporter gene system in plant cells. *Experimental Botany*, 57 (12): 2985.
- Langley R. A., Kado C. I. (1972):** Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-Nitrosoquandine and relationships of *A. tumefaciens* mutants to crown gall induction. *Mutation Research*. 14 (3): 277-286.
- Maliga P. (2004):** Plastid transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 289-313.
- Marks M. S., Kemp J. M., Woolston C. J., Dale P. J. (1989):** Agroinfection of wheat: a comparison of *Agrobacterium* strains. *Plant Science*, 63 (2): 247-256.
- Matzk A., Mantell S., Schiemann J. (1996):** Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (5): 373-381.
- Mayfield S. P., Kindle K. L. (1990):** Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 (6): 2087-2091.
- McCabe D. E., Martinell B. J. (1993):** Transformation of elite cotton cultivars by particle bombardment of meristems. *Biotechnology*, 11: 596-598.
- McCabe D. E., Swain W. F., Martinelli B. J., Christou P. (1988):** Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology*, 6 (8): 923-926.
- Mlynárová L., Nap J. P. (1997):** *Gene Transfer and Expression in Plants*. Veda, Bratislava.
- Moravcikova J., Libantova J., Matusikova I., Libiakova G., Nap J. P., Mlynarova L. (2003):** Genetic transformation of Slovak cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.): efficiency and the behaviour of the transgene. *Biologia*, 58 (6): 1075-1080.
- Murashige T., Skoog F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 437-497.
- MŽP (2007):** Ministerstvo životního prostředí – registr povolených geneticky modifikovaných organismů. <http://www.env.cz>.

- Nadolska-Orczyk A., Milkowska L., Palucha A., Czembor P., Orczyk W. (1995):** Regeneration and transformation of Polish cultivars of potato. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64 (4): 335-340.
- Nadolska-Orczyk A., Pietrusinska A., Binka-Wyrwa A., Kuc D., Orczyk W. (2007):** Diploid potato (*Solanum tuberosum* L.) as a model crop to study transgene expression. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 12 (2): 206-219.
- Navrátil O. (2004):** Brambor jako geneticky manipulovaná rostlina. *Bramborářství* 12 (3): 2-4.
- Neuhaus G., Spangenberg G. (1990):** Plant transformation by microinjection techniques. *Plant Physiology*, 79 (1): 213-217.
- O'Kane D. J., Lingle W. L., Wampler J. E., Legocki M., Legocki R. P., Szalay A. A. (1988):** Visualization of bioluminescence as a marker of gene expression in rhizobium infected soybean root nodules. *Plant Molecular Biology*, 10 (5): 387-399.
- Ondřej M. (1992):** Genové inženýrství kulturních rostlin. Academia, Praha.
- Ondřej M., Drobník J. (2002):** Transgenozé rostlin. Academia, Praha.
- Ondřej M., Drobník J., Gartland K. M. A., Gartland J. S. (1999):** Genové inženýrství rostlin. VŠCHT, Praha.
- Ottaviani M. P., Smits T., Tencate Ch. H. H. (1993):** Differential methylation and expression of the beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase genes in transgenic plants of potato cv Bintje. *Plant Science*, 88 (1): 73-81.
- Ottaviani M. P., Tencate Ch. H. H. (1991):** Cotransformation and differential expression of introduced genes into potato (*Solanum-tuberosum* L.) cv Bintje. *Theoretical and Applied genetics*, 81 (6): 761-768.
- Park Y. D., Papp I., Moscone E. A., Iglesias V. A., Vaucheret H., Matzke A. J. M., Matzke M. A. (1996):** Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant Journal*, 9 (2): 183-194.
- Paszkowski J., Shillito R. D., Saul M., Mandák V., Hohn T., Hohn B., Potrykus I. (1984):** Direct gene transfer to plants. *EMBO*, 3 (12): 2717-2722.
- Pavingerová D., Bříza J., Kodýtek K., Niedermeierová H. (1997):** Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with a GUS-intron chimeric gene. *Plant Science*, 122 (2): 165-171.

- Pavingerová D., Šedivá J. (1999):** The possibility of micropropagation and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Kalmia latifolia*. *Biologia Plantarum*, 42 (3): 441-444.
- Penna S., Sági L., Swennen R. (2002):** Positive selectable marker genes for routine plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 38 (2): 125-128.
- Plegt L., Bino R. J. (1989):** Beta-glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic plants and non-transgenic plants. *Molecular Genetics*, 216 (2-3): 321-327.
- Potrykus F. (1991):** Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 205-225.
- Rakosy-Tican E., Aurori C. M., Dijkstra C., Thieme R., Aurori A., Davey M. R. (2007):** The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium* mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Reports*, 26: 661-671.
- Rhodes C. A., Lowe K. S., Ruby K. L. (1988):** Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Biotechnology*, 6: 56- 60.
- Romano A., Raemakers K., Bernardi J., Visser R., Mooibroek H. (2003):** Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Research*, 12 (4): 461-473.
- Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. (2001):** Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 20: 198-204.
- Rommens C. M., Humara J. M., Ye J., Yan H., Richael C., Zhang L., Perry R., Swords K. (2004):** Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiology*, 135 (1): 421-431.
- Rotino G. L., Perrone D., Ajmone-Marsan P., Lupotto E. (1992):** Transformation of *Solanum integrifolium* Poir via *Agrobacterium tumefaciens*: plant regeneration and progeny analysis. *Plant Cell Reports*, 11 (1): 11-15.
- Ruf S., Hermann M., Berger I. J., Carrer H., Bock R. (2001):** Stable genetic transformation of tomato plastids: foreign protein expression in fruit. *Nature Biotechnology*, 19 (9): 870-875.

- Russell J. A., Roy M. K., Sanford J. C. (1992):** Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiology*, 98 (3): 1050-1056.
- Sanford J. C. (1990):** Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79 (1): 206-209.
- Sanford J. C., Devit M. J., Russell J. A., Smith F. D., Harpending P. R., Roy M. K., Johnston S. A. (1991):** An improved, helium-driven biolistic device. *Methods in Cell and Molecular Biology-Technique*, 3: 3-16.
- Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E., Allen N. (1987):** Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. *Plant Science Technology*, 5 (1): 27-37.
- Sanford J. C., Smith F. D., Russell J. A. (1993):** Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, 217: 483-509.
- Sano T., Nagayama A., Ogawa T., Ishida I., Okada Y. (1997):** Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid. *Nature Biotechnology*, 15 (12): 1290-1294.
- Sarker R. H., Mustafa B. M. (2002):** Regeneration and *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of two indigenous potato varieties of Bangladesh. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12 (1) : 69-77.
- Sawahel W. A. (2002):** The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7 (1): 19-29.
- Sharma K. K., Bhatnagar-Mathur P., Thorpe T. A. (2005):** Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 41: 102-112.
- Sheerman S., Bevan M. W. (1988):** A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Plant Cell Reports*, 7 (1): 13-16.
- Shewmaker C. K., Boyer C. D., Wiesenborn D. P., Thompson D. B., Boersig M. R., Oakes J. V., Stalker D. M. (1994):** Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched starch. *Plant Physiology*, 104 (4): 1159–1166.

- Sidorov V. A., Kasten D., Pang S. Z., Hajdukiewicz P. T. J., Staub J. M., Nehra N. S. (1999):** Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant Journal*, 19 (2): 209-216.
- Snyder G. W., Belknap W. R. (1993):** A modified method for routine *Agrobacterium*-mediated transformation of in vitro grown potato microtubers. *Plant Cell Reports*, 12 (6): 324-327.
- Southgate E. M., Davey M. R., Power J. B., Marchant R. (1995):** Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances*, 13 (4): 631-651.
- Sporlein B., Streubel M., Dahlfeld G., Westhoff P., Koop H. U. (1991):** PEG-mediated plastid transformation – a new system for transient gene expression assays in chloroplast. *Theoretical and Applied Genetics*, 82 (6): 717-722.
- Stiekema W. J., Heidekamp F., Louwerse J. D., Verhoeven H. A., Dijkhuis P. (1988):** Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Désirée using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Reports*, 7 (1): 47-50.
- Sunil-Kumar G. B., Ganapathi T. R., Srinivas L., Revathi C. J., Bapat V. A. (2006):** Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Science*, 170 (5): 918-925.
- Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. (1990):** Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 87 (21): 8526-8530.
- Taylor N. J., Fauquet C. M. (2002):** Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology*, 21 (12): 963-977.
- Tavazza R., Tavazza M., Ordas R. J., Ancora G., Benvenuto E. (1989):** Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): An efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Science*, 59 (2): 175-181.
- Tencate Ch. H., Ramulu K. S. (1987):** Callus growth, tumour development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar Bintje. *Plant Science*, 49: 209-216.
- Trujillo C., Rodríguez-Arango E., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S., Arango R. (2001):** One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*). *Plant Cell Reports*, 20: 637-641.

- Twell D., Klein T. M., Fromm M. E., McCormick S. (1989):** Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. *Plant Physiology*, 91 (4): 1270-1274.
- Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M. (1990):** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Molecular Genetics and Genomics*, 220: 245 – 250.
- Van den Elzen P., Lee K. Y., Townsend J., Bedbrook J. (1985):** A simple binary vectors for DNA transfer to plant cells. *Plant Molecular Biology*, 5 (3): 149-154.
- Van den Elzen P. J. M., Huisman M. J., Willink D. P. L., Jongedijk E., Hoekema A., Cornelissen B. J. C. (1989):** Engineering virus resistance in agricultural crops. *Plant Molecular Biology*, 13: 337-346.
- Van den Elzen P. J. M., Jongedijk E., Melchers L. S., Cornelissen B. J. C. (1993):** Virus and fungal resistance: from laboratory to field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*, 342 (1301): 271-278.
- Vejl P. (2007):** Geneticky modifikovaný organismus z pohledu genetiky a šlechtění, 3-14. In: Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí. Sborník ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze.
- Veluthambi K., Gupta A. K., Sharma A. (2003):** The current status of plant transformation technologies. *Current Science* 84 (3): 368-380.
- Visser R. G. F., Jacobsen E., Hesselting-Meinders A., Schans M. J., Witholt B., Feenstra W. J. (1989):** Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology*, 12: 329-337.
- Vitha S., Beneš K., Phillips J. P., Gartland K. M. A (1995):** Histochemical GUS analysis. *Methods in Molecular Biology*, 44: 185-195.
- Wakita Y., Otani M., Iba K., Shimada T. (1998):** Co-integration, co-expression and co-segregation of an unliked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Genes and Genetic System*, 73: 219-226.

- Wallis J. G., Wang H., Guerra D. J. (1997):** Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. *Plant Molecular Biology*, 35 (3): 323-330.
- Weising K., Kahl G. (1996):** Natural genetic engineering of plant cell: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12 (4): 327-351.
- Weising K., Schell J., Kahl G. (1988):** Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Annual Review of Genetics*, 22: 421-477.
- Xu H., Khalilian H., Eweida M., Squire S., Abouhaidar M. G. (1995):** Genetically engineered resistance to potato virus X in four commercial potato cultivars. *Plant Cell Reports*, 15 (1-2): 91-96.
- Ye G. N., Daniell H., Sanford J. C. (1990):** Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, 15 (6): 809-819.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983):** Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO*, 2 (12): 2143-2150.