

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra rostlinné výroby

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie



**Srovnání biolisticé a agrobakterií zprostředkované
transgenoze rajčete (*Solanum lycopersicum* L.)**

Diplomová práce

2008

Bc. Martina Novotná

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jindřich Bříza, CSc.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby
Akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina NOVOTNÁ**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**

Název tématu: **Srovnání biolistické a agrobakterií zprostředkované transgenozí rajčete (*Solanum lycopersicum* L.)**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod: Stručný nástin významu tématu a cíl práce.
Cílem práce je zavést na pracovišti školitele metodu biolistické transformace jaderné DNA u rajčete.
Literární přehled: Princip přímé metody transformace a její srovnání s nepřímými metodami transformace, rešerše výsledků různých metod transformace u čeledi Solanaceae.
Materiál a metody: Popis obou metod transformace, selekce transgenních prýtů a rostlin, histochemického a fluorimetrického stanovení GUS a PCR vnesených genů.
Výsledky: Vyhodnocení získaných výsledků, uspořádání do tabulek a grafů.
Diskuse: Porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, srovnání obou metod na základě vlastních výsledků a posouzení možností praktického využití biolistické transformace pro transgenozí rajčete.
Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších výsledků a z nich vyplývajících doporučení.
Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace".
Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: fingerprinty, databáze spekter, grafy a tabulky
Rozsah pracovní zprávy: 30-40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Mlynářová, L., Nap, J.-P.: Gene Transfer and Expression in Plants, Veda, 1997

Ondřej, M., Drobník, J.: Transgenoze rostlin, Academia Praha, 2002

Gelvin S.B., Scilperoot R.A. (eds.): Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Acad. Publ., 1995

Stewart C.N.: Transgenic Plants: Current Innovations and Future Trends, Horizon Scientific, 2003

Příkrylová, P.: Použití genu pro manóza-6-fosfátizomerázu jako alternativního selektovatelného genu při transformaci rajčete. Bak. práce BF JU, 2004


Jefferson, R.A.: Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion systém. Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405, 1987

Články z vědeckých časopisů, týkající se dané problematiky.

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jindřich Bříza, CSc.
Katedra genetiky
Konzultant diplomové práce: doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby
Datum zadání diplomové práce: 10. ledna 2007
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2008

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
270 06 České Budějovice

L.S.


prof. Ing. Martin Křížek, CSc.
děkan

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 20. února 2007

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

25. 4 2008

Martina Novotná

Datum

Podpis studenta

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli, docentu Jindřichu Břízovi za trpělivost a ochotu při vedení této práce, doktorce Haně Niedermeierové a Vlastě Tetourové za pomoc při experimentální práci a za čas, který mi věnovaly. Dále bych chtěla poděkovat docentu Vladislavu Čurnovi za cenné rady a připomínky k této práci. Děkuji také svým rodičům, kteří mi umožnili studovat.

1	ÚVOD	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	Metody transformace rostlinných buněk	8
2.1.1	Nepřímá transformace – transformace prostřednictvím <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
2.1.1.1	Tvorba nádorů (onkogeny)	8
2.1.1.2	Mechanismus transformace	9
2.1.1.3	Vektory pro transformaci bakteriemi <i>A. tumefaciens</i>	9
2.1.1.4	Selekční geny	10
2.1.1.5	Reportérové geny	11
2.1.1.6	Disková metoda transformace.....	13
2.1.2	Přímé metody transformace	13
2.1.2.1	Aplikace exogenní bakteriální DNA na klíčící semena a rostlinná embrya	14
2.1.2.2	Transformace protoplastů	14
2.1.2.3	Transformace buněk a pletiv.....	15
2.1.3	Biolistická metoda (mikroprojektily).....	15
2.1.3.1	Historie a úspěchy	15
2.1.3.2	Princip	16
2.1.3.3	Aplikace metody, potenciál a omezení	18
2.1.3.4	Optimalizace podmínek transformace	19
2.1.3.5	Tranzientní exprese	19
2.2	Transgenoze rajčete	20
3	MATERIÁL A METODIKA	22
3.1	Použitý materiál	22
3.1.1	Rostlinný materiál	22
3.1.2	Bakteriální kmen a plazmidový konstrukt	22
3.2	Metodika práce	22
3.2.1	Postup přípravy kultivačních medií.....	22
3.2.2	Sterilizace a výsev semen rajčat na misky	22
3.2.2.1	Sterilizace semen	22
3.2.2.2	Výsev semen	23
3.2.3	Transformace rostlin pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
3.2.3.1	Zaočkování bakterií a jejich příprava pro transformaci.....	23
3.2.3.2	Vlastní transformace	23
3.2.4	Biolistická transformace rostlin	24
3.2.4.1	Příprava mikročástic zlata.....	24
3.2.4.2	Vlastní biolistická transformace	25

3.2.5	Histochemické stanovení GUS.....	26
3.2.6	Fluorometrické stanovení GUS.....	26
3.2.7	Stanovení proteinů metodou podle Bradfordové na mikrotitrační destičce.....	28
3.2.8	PCR (detekce přítomnosti transgenu)	29
3.2.8.1	Použité primery	29
3.2.8.2	Příprava vzorků.....	29
3.2.8.3	Vlastní PCR	30
3.2.8.4	Elektroforéza v agarózovém gelu	30
3.3	Složení kultivačních médií	31
3.3.1	LK médium pro kultivaci <i>A. tumefaciens</i>	31
3.3.2	Médium pro výsev semen rajčat.....	31
3.3.3	MS-2,4D-B médium.....	31
3.3.4	Neselekční regenerační médium (+T-K).....	32
3.3.5	Selekční regenerační médium s kanamycinem (+T+K).....	32
3.3.6	Neselekční zakořeňovací médium (+T-K)	33
3.3.7	Selekční zakořeňovací médium s kanamycinem (+T+K)	33
4	VÝSLEDKY	34
4.1	Transformace prostřednictvím <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
4.2	Biolistická metoda transformace	43
5	DISKUZE.....	53
6	ZÁVĚR.....	58
7	SEZNAM LITERATURY	59

1 ÚVOD

Nejběžnější metoda cíleného vnášení konkrétních genů do rostlinného genomu vychází z přirozené, v přírodě běžně pozorované strategie gram-negativní půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie infikuje dvouděložné rostliny, do jejichž genomu vnáší část vlastních genů nesených úsekem plazmidu Ti nazývaným T-DNA. V současné době jsme schopni s využitím této metody modifikovat značné množství hospodářsky významných plodin. Jisté problémy nastávají v případě, že se snažíme pomocí *A. tumefaciens* transformovat rostliny jednoděložné. Ty nespadají do okruhu rostlin běžně *A. tumefaciens* infikovaných. Transformace některých druhů jednoděložných rostlin pak dosáhneme buď použitím supervirulentních kmenů *A. tumefaciens*, nebo se nabízí možnost využití přímých metod transformace. Za jednu z neúčinnějších přímých metod transformace pak považujeme metodu biolistickou (biologická balistika). Konkrétní geny jsou v tomto případě vnášeny do rostlinného genomu za pomoci mikročástic inertních kovů, na kterých je žádoucí genetický materiál vysrážen, a dále za pomoci speciálního zařízení, které má za úkol urychlit mikročástice s navázaným genetickým materiálem tak, aby byly schopny penetrovat rostlinnou buněčnou stěnou. I přes fakt, že metoda často vede k vyšší frekvenci přestaveb transgenů, což v konečné fázi může vést k umlčování genů, a že frekvence integrace transgenů je nízká, bylo doposud pomocí metody dosaženo stabilní integrace a exprese cizích genů u mnoha jedno i dvouděložných rostlin.

Cíle genových manipulací mohou být praktické, kdy se snažíme vylepšit genom hospodářsky významných rostlin nebo získat nové odrůdy s žádoucími vlastnostmi (vyšší výnos kulturních rostlin a lepší kvalita produktů z nich vyrobených, odolnost vůči nepříznivým podmínkám prostředí, škůdcům a chorobám). Využití nacházíme i ve vědě, kdy za pomoci těchto metod můžeme sledovat vzájemné vztahy genů v genomu a můžeme též pochopit, jaké jsou funkce jednotlivých genů a jaká je jejich regulace. V souvislosti s genetickými modifikacemi rostlin se samozřejmě diskutují i ekologická a zdravotní rizika. Lidé se obávají vstupu nežádoucích látek jak do životního prostředí tak do potravního řetězce. Nicméně doposud nebyly prokázány žádné negativní účinky transgenních plodin na lidské zdraví.

Tato práce si klade za cíl srovnat účinnost biolistické a *A. tumefaciens* zprostředkované transgenóze u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Cílem je také zavést metodu biolistické transformace jaderné DNA u rajčete na pracovišti školitele (oddělení genových manipulací ústavu molekulární biologie rostlin BC AV ČR, v. v. i.).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Metody transformace rostlinných buněk

Metody, kterými lze přenést geny do eukaryotických buněk, je možno rozdělit do dvou skupin, a to na metody přímé a nepřímé. Jakou metodu vybereme pak záleží na konkrétním cíli daného experimentu, na vlastnostech dané buněčné linie a na požadované účinnosti systému (Šmarda et al., 2005).

Zatímco je relativně jednoduché získat v rostlinách vysoký stupeň přechodné genové exprese, získání trvale transformované rostliny je někdy značně obtížné. Přechodná exprese může být snadno dosažitelná u většiny rostlinných druhů ve vysokých stupních s použitím elektroporace nebo biolistických metod. Přechodná exprese slouží k testování účinnosti různých návrhů genových konstruktů a je také užitečným nástrojem pro studování metabolismu (Vyroubalová, 2004).

2.1.1 **Nepřímá transformace – transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens***

Bakterie rodu *Agrobacterium* jsou gram-negativní půdní bakterie z čeledi *Rhizobiaceae*, které způsobují nádorová onemocnění dvouděložných rostlin. K transformacím rostlinných buněk v laboratořích se nejčastěji používá *Agrobacterium tumefaciens*. Infekce *A. tumefaciens* způsobuje tvorbu neorganizovaných nádorů („crown galls“) (Mlynářová a Nap, 1997).

2.1.1.1 **Tvorba nádorů (onkogeny)**

A. tumefaciens přenáší do rostlinného genomu část svého Ti (tumor-inducing) plazmidu zvanou T-DNA. T-DNA je velká přibližně 25000 bp. Nese geny pro auxiny a cytokininy a speciální proteiny opiny a agropiny. Auxiny a cytokininy podporují dělení buněk a vytvoření nádorů. Tyto buňky produkují opiny a agropiny, které *A. tumefaciens* využívá jako zdroj uhlíku, dusíku a energie (Striekema a Visser, 1993). Podle typu produkovaných opinů se *A. tumefaciens* dělí na čtyři hlavní skupiny (kmeny): nopalinové kmeny, oktopinové kmeny, kmeny produkující manopin a agropin bakterií *A. tumefaciens* a kmeny *A. rhizogenes* produkující agropin (Wostemeyer et al., 1983). Oblast T-DNA je ohraničena pravou a levou hraniční sekvencí, které mají délku 24 nebo 25 bp a jsou tvořeny přímými repeticemi (Van Haaren et al., 1988). Obvykle může být do genomu hostitelské rostliny přenesena jakákoliv sekvence DNA obsažená mezi hraničními sekvencemi (Zambryski et al., 1983). Geny zodpovědné za přenos T-DNA do hostitelské rostliny se nacházejí na bakteriálním

chromozomu - (chv) geny a na Ti-plazmidu mimo oblast T-DNA - virulentní (vir) geny. Do mechanismu transformace jsou zahrnuty také proteiny hostitelské rostliny (Gelvin, 2003).

2.1.1.2 Mechanismus transformace

Proces transformace začíná navázáním *A. tumefaciens* na rostlinnou buňku. *Agrobacterium* dokáže rozpoznat fenolické látky (acetosyringon) uvolňované poraněnými rostlinnými buňkami do prostředí. Tuto schopnost bakterii umožňují proteiny kódované geny *virA* a *virG*. *VirG* potom indukuje expresi všech *vir* genů. Chemotaxí se *Agrobacterium* dostane k poraněné buňce a přichytí se na buněčnou stěnu (Filichkin a Gelvin, 1993; Weising a Kahl, 1996). Pomocí *virD1* a *virD2* je vyštěpena jednořetězcová molekula DNA (T-řetězec). Na 5' konec řetězce je navázán *virD2* a tento komplex je s dalšími *vir* proteiny exportován do hostitelské buňky T-pilusem, který je tvořen proteiny kódovanými operonem *virB* a proteinem *virD4* (Ondřej et al., 1999; Christie, 2004). V cytoplasmě hostitelské buňky se T-řetězec pokryje *virE2* proteiny, které ho chrání před nukleázami a dodávají T-řetězci správnou konformaci. Komplex T-DNA a polypeptidů kódovaných geny *virD1*, *virD2* a *virE2* je transportován do jádra. V jádře T-řetězec putuje do místa integrace a před integrací do hostitelského genomu se z něho odpojí navázané proteiny. Integrace T-DNA do rostlinného genomu je částečně závislá na proteinech, které jsou kódovány bakteriemi *Agrobacterium*, i na rostlinných systémech reparace (Ondřej et al., 1999; Tzfira a Citovsky, 2006).

Přenos a integrace cizorodé DNA do rostlinného genomu byla poprvé jednoznačně prokázána Mary-Dell Chiltonovou v roce 1977. Od té doby se *A. tumefaciens* zprostředkovaná transformace stala u mnoha, zejména dvouděložných rostlin, rutinní záležitostí. Dvouděložné rostliny jsou totiž přirozeným cílem pro transformaci. Jiná situace je u rostlin jednoděložných. Ty nejsou bakteriemi *A. tumefaciens* přirozeně infikovány, proto je jejich transformace touto metodou obtížnější (De Cleene a De Ley, 1976).

2.1.1.3 Vektory pro transformaci bakteriemi *A. tumefaciens*

Přirozený systém přenosu genů *A. tumefaciens* do hostitelské buňky byl využit ke konstrukci vektorů odvozených z Ti-plazmidu pro přenos cizorodých genů do rostlinného genomu. Pro využití bakterií rodu *Agrobacterium* jako vektorů transgenů je třeba upravit sekvenci T-DNA, z níž je nutné odstranit některé původní sekvence, ponechat hraniční sekvence a původní geny nahradit novými (Ondřej et al., 1999). Využívají se dva druhy vektorů. Jsou to vektory intermediární a binární (Ondřej a Drobník, 2002).

- **Intermediární vektory**

Intermediární vektory vznikají klonováním restričních štěpů T-DNA do malých plazmidových vektorů a následnou ligací. Takové plazmidy se pak skládají z úseků pravé a levé hraniční sekvence, mezi nimiž jsou inkorporovány geny, jejichž produkt chceme studovat (Griffiths et al., 1998). Plazmid je konjugací, nebo transformací vnesen do buněk *A. tumefaciens*, kde dojde k homologní rekombinaci mezi úseky plazmidů Ti a malého intermediárního plazmidu (Ondřej, 1992).

- **Binární vektory**

Binární vektory jsou založeny na principu rozdělení Ti plazmidu na dva plazmidy. Na větším plazmidu se nachází vir oblast a neobsahuje T-DNA. Tento takzvaný pomocný (helper) plazmid se může replikovat a produkovat faktory nezbytné pro přenos T-DNA. Menší plazmid obsahuje T-DNA, ze které byly odstraněny onkogeny a nahrazeny genem, jehož produkt nás zajímá. Dále obsahuje vhodná restriční místa a je dostatečně malý, aby bylo možné vnášet cizorodé sekvence DNA přímo do T-DNA. Nedokáže se však sám replikovat (Hoekema et al., 1983). Součástí vkládané T-DNA jsou také geny, podle jejichž fenotypu se mohou transformované buňky selektovat. Nejčastěji to jsou geny pro rezistenci k antibiotikům (Hellens et al., 2000).

2.1.1.4 Selekční geny

Abychom zjistili, které buňky byly transformované, obsahují vektory prostředek pro selekci transformovaných rostlinných tkání. Nejčastěji je využíván systém selekce, kdy se do kultivačního média přidá látka, která je toxická pro rostliny. Expresí selekčního genu pak dovoluje růst na médiu s příslušnou látkou. Jako selekční marker se často používají geny pro rezistenci k antibiotikům. Asi nejrozšířenější selekční marker je gen *nptII*, který díky fosforylaci 3'-hydroxylové skupiny aminoglykosidických vazeb jím kódovaného enzymu navozuje rezistenci ke kanamycinu, paromomycinu, gentamicinu nebo neomycinu (Bevan et al., 1983). Antibiotika se v procesu transgenóze používají také k eliminaci vektorových bakterií po inokulaci bakteriemi *A. tumefaciens* či k eliminaci endofytických mikroorganismů v explantátech z rostlin, které byly odebrány z polních podmínek. Do této skupiny antibiotik patří Timentin (ticarcillin/klavulanová kyselina), Claforan (cefotaxim), carbenicilin, rifampicilin a řada dalších (Kobelková, 2002). V této práci byla použita kombinace antibiotik Timentinu a kanamycinu. Timentin je velmi vhodným kombinovaným antibiotikem pro

potlačení růstu bakterií *A. tumefaciens*. Navíc u rajčete byl prokázán jeho pozitivní vliv na regeneraci výhonů z děložních explantátů při koncentraci 150 mg.l⁻¹ (Ling a Kriseleit, 1998). Jako selekční markery se také používají geny pro rezistenci k herbicidům (chlorsulphuronu, bialaphosu, fosfinotricinu) (Ondřej a Drobník, 2002). Další způsob selekce je založen na umožnění využití alternativních zdrojů uhlíku (manóza, galaktóza), které jinak rostlinné buňky nedokážou asimilovat. Schopnost asimilovat takovéto uhlíkové zdroje rostlinám dávají enzymy, které přeměňují nepoužitelné uhlíkové zdroje do formy sacharidů, které jsou pro rostlinu přijatelné. Transgenní rostliny jsou pak selektovány a regenerovány na médiu obsahujícím manózu, galaktózu atd. jako uhlíkový zdroj (Lessard et al., 2002).

2.1.1.5 Reportérové geny

Reportérové (signální) transgeny jsou transgeny, jejichž expresi lze snadno detekovat a kvantitativně stanovovat. Slouží jako měřítko stupně exprese transgenů s různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypech, v různých pletivech a za různých podmínek. Jsou vždy chimérické – obsahují regulační sekvence pro projev v rostlinném genomu, ale kódující sekvence bývá bakteriální nebo živočišná (Ondřej a Drobník, 2002).

- **β-glukuronidáza**

Je to nejčastěji používaný reportérový gen v rostlinných transformačních vektorech. β-glukuronidáza (GUS) je kódována bakteriálním genem *uidA (gus)* z *E. coli*. Jedná se o kyselou hydrolázu, která katalyzuje štěpení mnoha různých β-glukuronidů. Expese genu *gus* může být stanovena fluorometricky a histochemicky (Jefferson et al., 1987). Fluorescenční metoda se provádí v homogenátu se substrátem MUG (4-metyl-umbelliferylglukuronidem). Tato látka nemá schopnost fluorescence, pokud není rozštěpena na β-glukuronid a 4-metylbelliferon. Při ozáření dlouhovlnným (365 nm) UV-zářením modře fluoreskuje (vlnová délka 570 a 590 nm) (Ondřej a Drobník, 2002). Histochemická analýza je prováděna *in situ* s chromogenním substrátem X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D glukuronid). Aktivita GUS vede k vytvoření nerozpustné modré sraženiny, která označuje přesnou lokalizaci exprese (Ferrando et al., 2000).

V rostlinách se obvykle používá gen, do něhož byl zabudován intron. Intron zaručuje, že k expresi genu *gus* nebude docházet v *A. tumefaciens*. V transgenních rostlinách obsahujících tento chimérický gen je intron efektivně vystřižen, čímž je zesílena enzymatická aktivita β-glukuronidázy. Naopak GUS aktivita nebude detekována v prokaryotních organismech, neboť

tyto organismy neobsahují aparát pro vystřížení intronu. Tento aparát je vlastní pouze eukaryotním organismům (Vancanneyt et al., 1990).

- **Zelený fluorescenční protein (GFP)**

V současnosti se jako reportérového genu často používá *gfp*. Gen byl klonován z medúzy *Aequorea victoria* (Chalfie et al., 1994; Niedz et al., 1995). GFP absorbuje modré nebo dlouhovlnné UV záření a emituje zelené fluoreskující světlo, přičemž není třeba dodávat žádný substrát - GFP je jediný protein, který fluoreskuje bez dodávání substrátů nebo kofaktorů (Mlynářová a Nap, 1997). Jde o stabilní protein v širokém rozmezí hodnot pH, při působení denaturačních látek a je termostabilní (do 65°C). Kromě toho si zachovává fluorescenci, i když fúzuje s jiným proteinem, a to jak na C-konci, tak na N-konci, takže je velmi vhodný ke sledování subcelulární lokalizace různých proteinů. Tento systém ve svých počátcích narazil na problém slabé exprese původního genu v rostlinných buňkách. Původní gen se dobře expimoval v živočišných buňkách, ale v rostlinných buňkách byla exprese slabá. Vysvětlením problému je, že v kódující sekvenci původního genu je úsek podobný sekvenci, která je v mRNA rozeznávána jako intron. Tato sekvence má délku 84 bp. Z tohoto důvodu byl odpovídající úsek nasyntetizován *in vitro* tak, aby při kódování stejných aminokyselin obsahoval jiné triplety, čímž bylo dosaženo zvýšené stability mRNA a tím i exprese (Ondřej a Drobník, 2002).

- **Luciferázy**

Gen světlušky (*Photinus pyralis*) pro luciferázu (*luc*) kóduje enzym, který katalyzuje oxidaci D-luciferinu ATP-dependentním způsobem. Tato oxidace způsobuje emisi žluto-zeleného světla (Luehrsen et al., 1992). Emitované záření je možno měřit luminometrem, scintilačním počítačem, CCD-televizní kamerou nebo zachytit na fotografický materiál. Nevýhodou tohoto systému je, že luciferin špatně proniká do pletiv a substrát je značně drahý. V některých transformačních vektorech se používají bakteriální geny pro luciferázu (*luxA* a *luxB* z *Vibrio harvei*) (Ondřej a Drobník, 2002).

- **Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu**

Chloramfenikolacetyltransferáza je bakteriální enzym, který nepůsobí u rostlin rezistenci k chloramfenikolu, protože rostliny mají dosti vysoký stupeň spontánní rezistence. Enzym působí acetylaci chloramfenikolu na dvou místech molekuly. Po dodání chloramfenikolu

značeného izotopem ^{14}C k proteinovým extraktům transgenních rostlin se takto značená sloučenina přeměňuje na acetylované produkty. Ty je možno od neacetylovaného chloramfenikolu oddělit chromatografií na tenké vrstvě. Tak získáme na autoradiogramu stopy odpovídající chloramfenikolu a jeho acetylovaným produktům (Ondřej a Drobník, 2002). CAT se často používá jako reportérový gen v savčích buňkách. Některé rostlinné transformační vektory tento reportérový gen nesou, a to z důvodu, že může být velmi citlivě analyzován. Analýza však vyžaduje radioaktivní metody (Seed a Sheen, 1988).

2.1.1.6 Disková metoda transformace

Metoda transformace listových disků byla poprvé popsána v roce 1985 (Horsch et al., 1985). Metoda je založena na kokultivaci nastříhaných či korkovrtem vysekaných listových terčů s bakteriemi *Agrobacterium*, které nesou vektor s cílovým a selekčním genem. Délka kokultivace závisí na použitém rostlinném materiálu. Většinou se pohybuje v řádech minut až dnů. Po uplynutí doby, dostatečné pro začlenění vektoru do rostlinného genomu, je rostlinný materiál přenesen na agarové médium obsahující antibiotika pro eliminaci bakterií *Agrobacterium*, selekční agens pro selekci transformovaných rostlin a růstové látky indukující na řezných plochách tvorbu kalusů a následně i výhonů (Ondřej a Drobník, 2002). V optimálním případě obsahuje výsledná transgenní rostlina transgen ve všech buňkách a přenáší ho na potomstvo podle mendelistické dědičnosti. V případě, že rostlina vznikla organogenezí, tedy z více buněk, jedná se často pouze o rostlinu chiméru. Pouze v případě somatické embryogeneze získáme primárního transformanta, jehož všechny buňky budou transgenní.

Obtíže s transformací mohou nastat u jednoděložných rostlin. Nicméně se ukázalo, že transformace jednoděložných rostlin je možná. Přenosu do jednoděložných rostlin se docílí po doplnění kultivačního média o fenolické látky, které navodí chemotaxi a umožní kontakt bakterií s rostlinnými buňkami (Rosypal et al., 2002).

2.1.2 Přímé metody transformace

Přímé metody transformace nevyužívají k přenosu DNA bakterie rodu *Agrobacterium*. Přenosu DNA zde můžeme docílit pomocí metod biochemických a fyzikálních. Tyto metody se zejména používají k transformaci jednoděložných rostlin (Šmarda et al., 2005). Přenášené fragmenty DNA jsou kratší než při transformaci pomocí *A. tumefaciens* a jistou nevýhodou je, že tyto metody vedou k vyšší frekvenci přestaveb transgenu a fragmenty se do genomu

začleňují v tandemových opakováních. Tato skutečnost může často vést k umlčování genů (Ondřej a Drobník, 2002).

2.1.2.1 Aplikace exogenní bakteriální DNA na klíčící semena a rostlinná embrya

Jde o nejstarší metodu, kterou používali v pokusech s bakteriální DNA Ledoux a Huart (1969) a Kleinhofs a Behki (1977). Metoda využívá faktu, že známé biochemické a fyzikální změny objevující se při hydrataci semen napomáhají příjmu exogenní DNA. Úspěchem této metody bylo dosažení přechodné exprese transgenů u vysušených embryí vojtěšky kultivovaných v roztoku s exogenní DNA (Senaratna et al., 1991).

2.1.2.2 Transformace protoplastů

V případě, že transformujeme rostlinné buňky, představuje buněčná stěna těchto buněk významnou bariéru průniku cizorodé DNA. Proto je výhodné buněčnou stěnu odstranit. Cizorodá DNA pak může být přijata endocytózou. Jisté problémy nastávají s regenerací rostlin z protoplastů a s tím spojenou somaklonální variabilitou. Z tohoto důvodu se dnes dává přednost transgenozí celých pletiv. Způsoby, jak stimulovat endocytózu, mohou být dodání polyethylenglykolu do roztoku DNA, působení iontů vápníku a zvýšeného pH, elektroporace a mikroinjekce do jader (Ondřej a Drobník 2002).

- **Transformace pomocí polyethylenglykolu**

Rostlinné protoplasty mohou být transformovány exogenní DNA pomocí polyethylenglykolu (PEG) v přítomnosti bivalentních kationů (obvykle vápenatých) (Krens et al., 1982). Dodáním polyethylenglykolu a bivalentních kationů do roztoku s DNA se navodí změny plazmatické membrány, které vedou k přijetí DNA endocytózou (Ondřej a Drobník, 2002). Stabilní transformace bylo s využitím PEG poprvé dosaženo u rostlin tabáku a petúnie (Krens et al., 1982; Draper et al., 1982).

- **Elektroporace**

Transformace pomocí elektroporace je založena na navození vzniku dočasných pórů v cytoplazmatické membráně krátkými vysokonapěťovými elektrickými pulzy. Vzniklé póry usnadňují vstup DNA do buňky, je-li v přímém kontaktu s membránou (Neumann a Rosenheck, 1972). Jednou z prvních zpráv o úspěšné transformaci s využitím metody elektroporace byla zpráva o transformaci mezofylových buněk tabáku RNA viru tabákové

mozaiky (Morikawa et al., 1986).

- ***Mikroinjekce***

Transformace pomocí mikroinjekce je založena na zavedení DNA do jádra nebo cytoplazmy prostřednictvím skleněné mikrokapilární injekční pipety. Tento postup vyžaduje mikromanipulátor (Blažíčková, 2007). Prvním úspěchem metody bylo dosažení transformace tabáku plazmidovou DNA bakterií rodu *Agrobacterium* (Crossway et al., 1986; Reich et al., 1986).

- ***Lipozómy***

Vnášená DNA obsažená v lipozómech je aplikována na rostlinná pletiva (Gad et al., 1990) a pylové láčky (Ahokas, 1987). Metoda využívá schopnosti lipozómů přenést DNA přes membránu a zároveň schopnosti DNA chránit před nukleázami.

2.1.2.3 Transformace buněk a pletiv

Tyto metody doznaly v poslední době většího rozšíření pro jejich univerzálnost. Výsledek je v podstatě závislý na genotypu akceptoru. Způsoby, jak vnést cizorodou DNA do pletiva či buňky, mohou být mikroinjekce do buněčných jader (mikroinjekce se aplikují do buněk rostlinných embryí), makroinjekce DNA (makroinjekce se aplikují do celých pletiv), kokultivace mikrospor nebo pylových láček s exogenní DNA a mikroprojektily (Ondřej a Drobník, 2002).

2.1.3 Biolistická metoda (mikroprojektily)

2.1.3.1 Historie a úspěchy

Biolistická metoda byla vyvinuta v osmdesátých letech dvacátého století za účelem dosažení transformace rostlin, které nebylo možno transformovat pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*. Mezi rostliny, které je možno pomocí bakterií *Agrobacterium* transformovat jen s obtížemi, nebo jsou v horším případě tomuto druhu transformace rezistentní, patří např. obilniny a leguminózy, které představují světově nejdůležitější zemědělské plodiny využívané v potravinářství.

Prvotní pokusy se omezily na snahu dosáhnout tranzientní exprese signálních genů v rostlinách cibule, pšenice, sojových bobů, kukuřice a rýže (viz přehled Klein et al., 1992). Tyto pokusy byly brzy následovány produkcí transgenních rostlin sóji (McCabe et. al., 1988)

a kukuřice (Fromm et al., 1990; Gordon-Kamm et al., 1990). Technologie bylo využito také k transferu exogenní DNA do bakterií (Klein et al., 1992; Smith et al., 1992), hub (Armaleo et al., 1990), řas (Mayfield a Kindle, 1990), hmyzu a savců.

První zařízení pro transformaci buněk a pletiv pomocí mikroprojektilů bylo zkonstruováno v roce 1987 (Sanford et al., 1987). Od té doby došlo k četným modifikacím na tomto zařízení a v současnosti se nejčastěji využívají přístroje PDS-1000/He (viz obr. 1) nebo Helios gene gun.

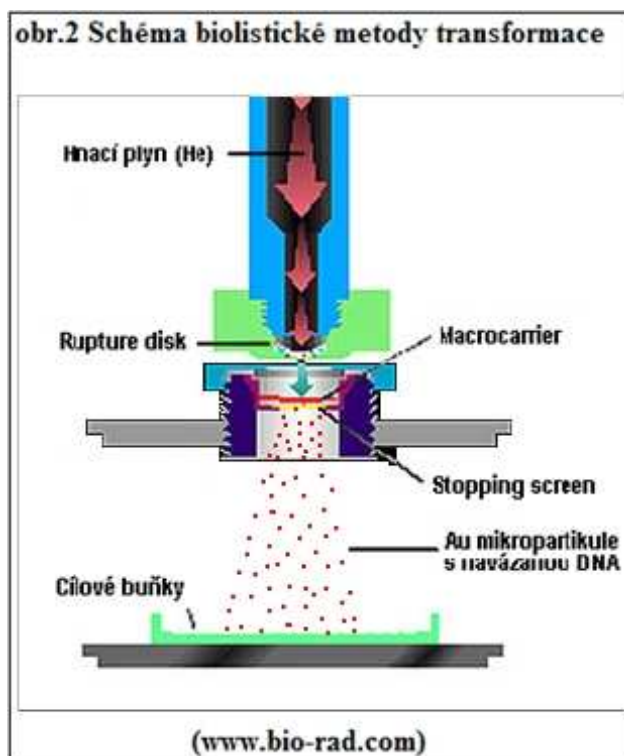


2.1.3.2 Princip

Při biolistické metodě transformace se používá wolframových nebo zlatých částic (mikroprojektily) o velikosti 0.4-3 μm . Zlato je biologicky inertní, zatímco wolfram po nějaké době degraduje DNA a může být pro některé typy buněk toxický (Russell et al., 1992). Co se týče výběru velikosti částic, tak obecně platí, že menší částice dávají lepší výsledky při tranzientní i stabilní transformaci.

Mikroprojektily slouží jako nosič plazmidové DNA. Aby DNA ulpěla na povrchu částic, musí se na sterilních částicích vysrážet za pomoci přídatku CaCl_2 a spermidinu (Russell, 1993; Barcelo a Lazzeri, 1998). Do pletiv jsou pak mikroprojektily s navázanou DNA

vstřelovány pomocí genového děla (PDS-1000/He; Helios gene gun). Přístroj PDS-1000/He využívá jako pohon helium. Helium je nepřetržitě přiváděno do komory umístěné v horní části přístroje, kde je zadržováno pomocí průtržné membrány („rupture disc“). K dispozici jsou různé typy těchto membrán vyrobených tak, aby docházelo k jejich protržení při tlaku helia 450-2200 psi (pound per square inch, 1 psi=6895 Pa). Pod průtržnou membránou je umístěn „macrocarrier“- nosič mikroprojektilů, což je kruhová plastická membrána, na které jsou rovnoměrně rozestřeny mikroprojektily s navázanou DNA. Jakmile dojde k protržení průtržné membrány, vznikne proud hélia, který uvede nosič mikroprojektilů do pohybu. Jeho pohyb je zastaven pomocí „stopping screen“, což je záchytná kovová mřížka, zatímco mikroprojektily pokračují v letu a posléze pronikají do buněk pletiva na Petriho misce (Kikkert, 1993). Vše se odehrává ve vakuové komoře, kdy snížení tlaku vzduchu brání zpomalení mikroprojektilů, ke kterému by došlo v důsledku tření o částice vzduchu. Velikost snížení tlaku v komoře je možné měnit, čímž lze dosahovat různých rychlostí mikroprojektilů a tím i frekvencí transformace různých typů rostlinných buněk. Po optimalizaci vakua, ale i řady dalších parametrů, lze dosáhnout pro daný typ buňky účinnosti tranzientní transformace větší než 10000 buněk na střelu (Kikkert, 1993) nebo více jak 1000 buněk na centimetr ostřelovaného pletiva (Schopke et al., 1997). Schéma biolistické metody transformace je znázorněno na obrázku 2.



2.1.3.3 Aplikace metody, potenciál a omezení

Biolistická metoda může být použita jako experimentální nástroj pro výzkum tranzientní exprese genů a genových konstruktů v rostlinných buňkách. V takových studiích jsou ostřelovaná pletiva kultivována po omezený čas, obvykle 24-48 hodin, než je vyhodnocena tranzientní exprese. Kvalitativní a kvantitativní stanovení úrovně exprese transgenů umožňuje použití reportérových genů zahrnující gen pro GUS (Jefferson et al., 1987), gen pro luciferázu (Millar et al., 1992) nebo gen pro GFP (Davis a Vierstra, 1998). Metoda umožňuje studovat efekt mutací, intronů a účinnosti promotorů na genovou expresi v různých rostlinných materiálech (Vain et al., 1996; Komari et al., 1998; Finer et al., 1999).

Dalším způsobem využití je produkce geneticky transformovaných rostlin a pletiv. Transgenní pletiva a rostliny jsou důležitým laboratorním nástrojem pro výzkum genové regulace či ochranných mechanismů proti biotickým a abiotickým stresům (James, 2001). Biolistická metoda transformace byla dosud použita u významných druhů obilnin ke vnášení genů pro rezistenci k bakteriálním, virovým a houbovým patogenům, nematodům a škůdcům z řady členovců, rezistenci k herbicidům, toleranci k suchu, prodlouženou skladovatelnost a pro některé další geny.

Je také možno využít schopnosti biolistické metody transformace dopravit nukleové kyseliny do neporušených buněk a orgánů k inokulaci celých rostlin a buněčných kultur virovými patogeny. Touto cestou bylo manipulováno s DNA i s RNA viry. Metoda poskytuje možnost kontrolovaného experimentování v laboratoři a možnost obejít potřebu využití hmyzu či jiných vektorů pro přenos patogena (Gal-On et al., 1997). Fúze virového genomu s markery jako je GFP představuje výkonnou techniku pro výzkum virové replikace a pohybu viru v buňce a mezi buňkami (Briddon et al., 1998; Brown et al., 1999).

Jednou z předností metody je možnost přenášet geny do genomu plastidů (chloroplastů) a ovlivňovat tak procesy fotosyntézy. Transformování plastidového genomu namísto jaderného rostlinného genomu může být velmi výhodné. Plastidová transformace může vést k podstatnému rozšíření genu, neboť plastidový genom je často kopírován několikanásobně uvnitř jediného plastidu a plastidy existují ve vysokém počtu uvnitř buněk (Vyroubalová., 2004).

Další výhodou je, že jeden výstřel může způsobit mnoho zásahů, a tím přenést geny do většího množství buněk. Cílové buňky mohou být umístěny na povrchu, ale také v hlubší vrstvě orgánů (Portykus, 1991). Je také možno transformovat rostliny, u nichž není vyvinut úspěšný systém regenerace v podmínkách *in vitro*.

Metoda má i své nevýhody. V mnoha cílových pletivech je sice dosaženo vysoké účinnosti přenosu DNA, ale frekvence stabilní transformace je mizivá. Důvodem je nízká frekvence integrace transgenů a dále také nízká regenerační schopnost cílových buněk a poškození pletiv při ostřelování (Barcelo a Lazzeri, 1998).

2.1.3.4 Optimalizace podmínek transformace

K získání transgenních rostlin musí být podmínky transformace pečlivě optimalizovány. Musí být dosažena rovnováha mezi počtem a velikostí částic vstřelovaných do buněk, poškozením, které způsobí a množstvím DNA, které doručí. Příliš málo DNA může vést k nižší frekvenci transformace, ale příliš mnoho DNA může vést k velkému množství kopií a k přestavbám transgenů (Blažíčková, 2007). Je tedy možné měnit velikost, množství a typ mikroprojektilů a určovat tím hloubku penetrace urychlených částic. Lze manipulovat s tlakem helia a měnit vzdálenosti mezi průtržnou membránou a nosičem mikroprojektilů (tato vzdálenost je označována jako „gap distance“), vzdálenosti mezi nosičem mikroprojektilů a záchytnou kovovou mřížkou (tato vzdálenost je označována jako „macrocarrier travel distance“) a vzdálenosti mezi záchytnou kovovou mřížkou a biologickým materiálem, který chceme transformovat (tato vzdálenost je označována jako „target distance“). Za účelem získání maximálního počtu transformovaných rostlin je také nezbytné optimalizovat biologické parametry spojené s cílovým pletivem. Tyto faktory zahrnují výběr vhodného stádia růstu cílových pletiv, hustotu buněk, osmolaritu média, ošetření rostlin po střelení a typ expresního vektoru použitého pro transformaci (Sanford et al., 1993). Pomocí metody bylo úspěšně dosaženo vnesení transgenů do intaktních listů, kořenů a stonků, nezralých embryí a částí sazenic, pylu, meristémů, nediferencovaných kalusů a suspenzních kultur (Christou., 1995; Southgate et al., 1995; Finer et al., 1999).

2.1.3.5 Tranzientní exprese

Tranzientní neboli dočasná exprese je exprese signálního transgenů, ke které dochází v důsledku toho, že do buněčných jader pronikne větší množství úseků T-DNA. Ještě dříve, než se stačí integrovat do genomu nebo degradovat nukleázami, dojde k jejich expresi. Prakticky je využitelná k orientačnímu porovnání účinnosti různých promotorů nebo různých způsobů aplikace u určitého materiálu nebo k porovnání účinnosti téhož konstruktů v různých materiálech (Ondřej a Drobník, 2002).

Expres T-DNA genů se obvykle objevuje 48 hod. od počátku kokultivace rostlinných

buněk s bakteriemi *Agrobacterium* (Fraley et al., 1984; Janssen a Gardner, 1989; Castle a Morris, 1990; Yoshioka et al., 1996; Kapila et al., 1997) a trvá poměrně krátce, tj. několik dalších dnů. Tranzientní expresi lze provádět jak s bakteriemi *Agrobacterium*, tak přímým vnášením plazmidové DNA do protoplastů elektroporací, biolisticou metodou a v neposlední řadě také vnášením cizorodých genů do rostlinných buněk virovými vektory. Tranzientní exprese má několik výhod:

1. Může být aplikována na intaktní pletiva a orgány nebo dokonce na celé rostliny.
2. Mohou být současně ovlivněna velká množství různých rostlinných tkání, což umožňuje rozmanitou produkci heterologních proteinů.
3. Výsledek, který informuje o účinnosti použitých regulačních sekvencí v daném genomu, lze získat již za dva dny.
4. Může docházet k expresi několika genů najednou.
5. Tento typ hodnocení exprese je možný u mnoha různých druhů rostlin a mnoha různých genotypů, dokonce i u takových, u kterých nedochází k integraci T-DNA.

Jako indikačního systému exprese se obvykle používá transgen pro β -glukuronidázu GUS (někdy transgen pro zeleně fluoreskující protein GFP) (Ondřej a Drobník, 2002).

2.2 Transgenoze rajčete

Téměř veškeré práce zabývající se genetickými modifikacemi plodů se provádí na rajčatech (Grierson et al., 1986; Grierson a Schuch, 1993; Gray et al., 1992; Grierson a Fray, 1994). Děje se tak z důvodu, že rajče nabízí mnoho výhod pro studium fyziologických a biochemických změn během dozrávání plodů. Má relativně krátký životní cyklus, dlouhou historii genetického výzkumu a ukázalo se, že je relativně jednoduché rajče geneticky transformovat. Připojí-li se fakt, že rajče je jednou ze zemědělsky významných plodin, pak nás nepřekvapí, že se tato plodina stala roku 1994 první GM plodinou uvolněnou pro trh. Tato transgenní odrůda rajčete dostala název FlavrSavr a nesla v antisence orientaci transgen pro polygalakturonázu. Díky tomu byla blokována činnost tohoto enzymu s následkem prodloužení životnosti sklizených plodů (Grierson, 1998; Redenbaugh et al., 1993; Smith et al., 1988; Sheetty et al., 1988).

Poprvé byl cizí gen do genomu rajčete vnesen již v roce 1986. Stalo se tak pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Chyi et al., 1986). Od té doby se vědci pomocí genetických modifikací snažili učinit rostliny odolnější vůči některým chorobám, škůdcům a stresovým faktorům vnějšího prostředí jako je mráz, nedostatek vody a vyšší obsah solí v půdě. Objevily se tak transgenní rostliny rajčete nesoucí mimo jiné gen pro rezistenci k viru tabákové

mozaiky (TMV) (Witham et al., 1996), geny pro rezistenci k háďátkům *Globodera rostrichoides* a *Meloidogyne incognita* (Jung et al., 1998) a gen pro σ -endotoxin z bakterie *Bacillus thuringiensis*, způsobující rezistenci k hmyzím škůdcům (Rhim et al., 1995). Podařilo se také vnést do genomu rajčete gen *cbf1* z *Arabidopsis thaliana*, který u transformovaných rostlin zvyšuje toleranci k mrazu, nedostatku vody a vyššímu obsahu solí v půdě (Lee et al., 2003). Požadavkem pěstitelů bylo i zlepšení skladovatelnosti. Toho bylo docíleno zpomalením zrání plodů vnesením genů narušujících syntézu ethylenu (Picton et al., 1993). Dalším způsobem, jak prodloužit životnost plodů, bylo vytvoření rostlin nesoucích v antisense orientaci geny pro expanziny (způsobují měknutí plodů) inhibující jejich činnost (Brummell et al., 1999). Za účelem vývoje „potravinové vakcíny“ byl do genomu rajčete vnesen chimérický gen *LIE7* z lidského papillomaviru. Lidské papillomaviry (HPV) jsou považovány za původce rakoviny děložního čípku a možná také některých jiných zhoubných nádorů u lidí (Žaludová, 2002).

Výsledky přineslo i využití biolistické metody transformace. Pomocí této metody bylo dosaženo stabilní transformace u rostlin rajčete. Transformována byla buněčná suspenze *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry a *L. pennellii*. Suspenze byla bombardována wolframovými částicemi obalenými buď plazmidovou (6,3 kb) nebo umělou kvasinkovou chromozomální YAC (80 kb) DNA obsahující *gus* a *nptII* geny (Van Eck et al., 1995).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

K transformaci byly použity rostliny rajčete *Solanum lycopersicum* L., anglické odrůdy MoneyMaker.

3.1.2 Bakteriální kmen a plazmidový konstrukt

Pro transformaci byl použit kmen GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* obsahující binární vektor 35Sgus-int. Tento konstrukt obsahuje ve své T-DNA selekční gen *nptII* navozující rezistenci ke kanamycinu a signální gen *gus* s intronem pro β -glukuronidázu.

3.2 Metodika práce

3.2.1 Postup přípravy kultivačních medií

Základem všech kultivačních medií použitých v této práci bylo médium podle Murashige a Skooga (1962), tzv. MS médium. Postup při přípravě byl následující: Do kádinky s destilovanou vodou byly postupně za stálého míchání přidávány všechny chemikálie kromě agaru. Roztok byl doplněn na požadovaný objem destilovanou vodou a byla upravena kyselost použitím 1N KOH či 1N HCl na požadované pH. Médium bylo rozděleno po 200 ml do Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml. Do každé Erlenmayerovy baňky byl přidán agar a baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií. Pak následovala sterilizace v autoklávu (121°C, 20 min.). Po zklávkování bylo médium zchlazeno na 60 °C a buď následovalo rozlévání média do různých kultivačních nádob (sterilně, ve flowboxu), nebo byly sterilně přidány další termolabilní složky (antibiotika, růstové látky) a až poté následovalo rozlévání do kultivačních nádob.

3.2.2 Sterilizace a výsev semen rajčat na misky

3.2.2.1 Sterilizace semen

Semena byla sterilizována ve zkumavce se 2-3 ml 70 % ethanolu. Ethanol byl po dvou minutách slit a do zkumavky se semeny bylo přidáno 10 ml 10 % roztoku Domestosu, který se nechal působit 30 minut (každých 5 minut se zkumavky protřepávaly). Po uplynutí 30 minut byly zkumavky přeneseny do flowboxu, kde byl Domestos slit a semena byla

propláchnuta sterilní destilovanou vodou (4-5x).

3.2.2.2 Výsev semen

Takto sterilizovaná semena byla převedena do kultivační nádoby s kultivačním médiem pro výsev rajčat a sterilní pinzetou byla v nádobě rozmístěna pokud možno rovnoměrně po povrchu. Bylo potřeba lehce semena zapíchat pinzetou do agaru, aby nesjížděla. Po vysetí následovala kultivace při teplotě 25 °C, fotoperiodě 16 hodin a intenzitě osvětlení 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 2-3 týdny, dokud se u semenáčků nevyvinuly děložní lístky dostatečně velké pro transformaci.

3.2.3 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.3.1 Zaočkování bakterií a jejich příprava pro transformaci

Kmen bakterií GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* s příslušným binárním vektorem (sbírkové číslo 105) byl zaočkován sterilní klíčkou do 10 ml tekutého LK média a kultivován na třepačce přes noc při teplotě 28 °C. Médium s narostlou bakteriální kulturou bylo rozděleno do 10 mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky bylo pipetováno po dvou mililitrech bakterií. Následovala centrifugace bakterií 2 min. při 17320 g. Supernatant byl slit a bakterie v každé zkumavce byly resuspendovány v 1 ml 10 mM MgSO_4 . Obsah všech zkumavek byl nalit na sterilní Petriho misku o průměru 9 cm a byl doplněn 4 ml 10 mM MgSO_4 .

3.2.3.2 Vlastní transformace

K transformaci prováděné sterilně ve flowboxu byly použity děložní lístky rostlin sterilně vysetých a pěstovaných. Děložní lístky byly z obou stran šikmo nastříženy, aby vznikla co největší řezná plocha. Nastříhání bylo do Petriho misky s destilovanou vodou. Pak byly pinzetou přeneseny do bakteriální suspenze, kde byly po dobu dvaceti minut za občasného míchání kokultivovány s bakteriemi. Část lístků nebyla působení *A. tumefaciens* vystavena, ale byla ponechána ve vodě. Tato část pak sloužila jako kontrola. Po uplynutí dvaceti minut byly lístky osušeny na sterilním filtračním papíře, položeny svrchní stranou dolů na médium 2,4-D a kultivovány 2 dny v temnu při teplotě 25 °C. Poté byly přeneseny na misky s regeneračním médiem (část lístků na regenerační médium s Timentinem a kanamycinem, část na médium s Timentinem bez kanamycinu = kontroly) spodní stranou dolů a byly kultivovány při fotoperiodě 16 hodin, intenzitě osvětlení 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a při teplotě 25 °C po dobu asi

jednoho měsíce. Po uplynutí této doby byly explantáty přeneseny na čerstvé regenerační médium o stejném složení. Prýty, které zregenerovaly z narostlých kalusů, byly ustříženy tak, aby řez byl veden šikmo (pro dosažení lepšího zakořenění). Prýty byly vždy odstříženy sterilně ve flowboxu pomocí sterilních nůžek a přeneseny na zakořeňovací médium. Z každého vytvořeného kalusu, kterému bylo přiděleno číslo, byly odstříženy maximálně tři prýty. Ty byly označeny písmeny a, b, c, a pod tímto značením pěstovány odděleně. Na zakořeňovacím médiu byly prýty kultivovány po dobu zhruba jednoho měsíce a pak následovalo hodnocení jejich vzhledu a pasáž na čerstvé zakořeňovací médium. Ze všech kořenicích prýtů byla odebrána část tkáně listu, ze které byl níže popsaným způsobem připraven vzorek pro metodu PCR.

3.2.4 Biolistická transformace rostlin

3.2.4.1 Příprava mikročástic zlata

Na 12 střel:

- Navážit 30 mg mikročástic Au o velikosti 1 μm do 1,5 ml mikrokumavky.
- Přidat 1 ml 70 % ethanolu a intenzivně třepat 3 – 5 min.
- Nechat stát 15 min.
- Stočit 5 sec. a odstranit supernatant.
- Přidat 1 ml sterilní destilované vody, třepat 1 min., nechat ustát 1 min., krátce stočit a supernatant odstranit – tento bod opakovat 3x.
- Přidat 500 μl sterilního 50 % glycerolu. Takto připravené mikročástice mohou být skladovány až 2 týdny.
- Třepat mikročástice z předchozího bodu (v glycerolu) po dobu 5 min.
- Za neustálého třepání odebrat 100 μl (= 6 mg) mikročástic do 1,5 ml mikrokumavky.
- Za neustálého třepání přidat postupně 10 μl DNA (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 100 μl 2,5 M $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 40 μl 0,1 M spermidinu (free base, čistota pro tkáňové kultury) a pokračovat v třepání 2 – 3 min.
- Nechat sedimentovat 1 min., stočit 2 sec. a odstranit supernatant.
- Přidat 280 μl 70 % ethanolu (ultračistého) a po krátké centrifugaci opět

odstranit.

- Přidat 280 μ l 100 % ethanolu (ultračistého) a po krátké centrifugaci opět odstranit.
- Přidat 72 μ l 100 % ethanolu, opatrně resuspendovat poklepáním a pak opatrným (tj. pomalým) třepáním 2 – 3 sec.
- Aplikovat 6 μ l na 1 nosič mikroprojektilů

3.2.4.2 *Vlastní biolistická transformace*

Nejprve byly v autoklávu sterilizovány nosiče mikroprojektilů, držáky nosičů, záchytné kovové mřížky a kovové části přístroje, které bylo možno z přístroje vyjmout (nejlépe den před transformací).

V den transformace pak následovala sterilizace částí přístroje, které nebylo možno klávkovat, a to 70 % ethanolem. Části přístroje, které bylo možné demontovat, byly ponechány v ethanolu po dobu minimálně 20 minut a pak pomocí sterilní pinzety přeneseny na Petriho misky, na kterých byly ponechány, dokud neoschly. Sterilizace vnitřního prostoru aparatury byla uskutečněna pomocí buničiny namočené v 70 % ethanolu. Během doby, kdy osychaly části přístroje sterilizované popsáním způsobem, byl dostatečný prostor pro přípravu mikroprojektilů (připravených výše uvedeným způsobem). V Petriho misce s obsahem 70 % isopropylalkoholu byly po dobu zhruba 4 sec. sterilizovány tzv. “rupture discs” – průtržné membrány. Ty určují rychlost hnacího plynu mikroprojektilů, tj. hélia. Do držáků byly vtlačeny pomocí speciálního plastového přípravku nosiče mikroprojektilů, na ně bylo pomocí mikropipety nanášeno 6 μ l suspenze Au mikročástic s navázanou DNA a minimálně 10 minut se nechalo zasychat. Vlastní biolistická transformace probíhala přesně podle návodu výrobce aparatury. Tj. do speciální šroubovací hlavy byla vložena průtržná membrána, nosič s mikročásticemi Au a záchytnou kovovou mřížkou byly vloženy na svá místa a nakonec byla do biolistické komory vložena plastová deska s Petriho miskou s děložními lístky. Vakuová komora byla uzavřena a tlak uvnitř byl redukován olejovou vývěvou až o 28'' Hg. Následovalo otevření přívodu hélia, které při určitém tlaku, daném typem použité průtržné membrány, vedlo k jejímu protržení. Tím vznikl proud hélia, který uvedl mikročástice Au do pohybu. Po skončení tlakové vlny byla komora zavzdušněna, P. miska vyjmuta a následně kultivována 48 hod. ve tmě při 24 °C. Po uplynutí této doby bylo možno histochemicky studovat tranzientní expresi genu *gus*.

3.2.5 Histochemické stanovení GUS

Při histochemické metodě detekce aktivity GUS se sleduje působení β -glukuronidázy na bezbarvý substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid (X-Gluc), který se v místě enzymové aktivity mění na intenzivně modrou sraženinu.

Postup: Do každého oddílu testovací destičky byl pipetován 1 ml roztoku X-Gluc a do roztoku byly vloženy děložní lístky. Po 15 minutové infiltraci roztoku do lístků dosažené snížením tlaku v exikátoru byly vzorky inkubovány v roztoku po dobu 24 hod. v termostatu při 37 °C. Chlorofyl byl po uplynutí této doby z explantátů odstraněn pomocí 96 % ethanolu.

X-Gluc: 4 mg X-Gluc rozpustit ve 150 μ l dimethylformamidu

přidat 45 ml 50 mM NaPO₄

pH = 7 (připravujeme vždy čerstvý)

3.2.6 Fluorometrické stanovení GUS

Při fluorometrické metodě detekce aktivity GUS se sleduje působení β -glukuronidázy na substrát 4-metyl-umbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG), kdy vzniká fluoreskující 4-metylbelliferon (MU). Reakce se zastaví přidáním alkalického roztoku sody (Na₂CO₃, STOP-puf), který zároveň umožní ionizaci hydroxyly MU, nutnou pro fluorescenci. MU fluoreskuje modře (445 nm) po excitaci UV světlem kolem 365 nm.

Postup: Do každého homogenizátoru bylo pipetováno 75 μ l extrakčního pufru a přidáno přibližně 3-5 mg listu z každé testované rostliny. Listy byly důkladně zhomogenizovány a homogenát byl převeden do označených mikrozkušavek. Dále byly připraveny 2 řady mikrozkušavek se stejným označením, jako zkumavky původní. Do první řady bylo pipetováno 75 μ l čerstvě připraveného roztoku substrátu (MUG), předehřátého v termostatu na 37°C, do druhé řady bylo pipetováno 1,5 ml STOP-pufu. K 75 μ l substrátu bylo přidáno 4,5 μ l supernatantu vzorku. Mikrozkušavka byla uzavřena, její obsah promíchán a reakční směs byla inkubována v termostatu při 37°C požadovanou dobu. Původní vzorek byl uložen při -70°C pro případné stanovení proteinů. Po uplynutí požadované doby inkubace bylo z reakční směsi odebráno 20 μ l, které byly přidány do mikrozkušavky se STOP-pufem. Mikrozkušavka byla ihned uzavřena a její obsah byl důkladně několikanásobným převrácením promíchán. Vzorek ve STOP-pufu byl přelit do kyvety fluorometru a změřen. Fluorometr musel být předem kalibrován na roztok metylumbelliferonu (MU) známé koncentrace tak, že

100 nM roztok MU, tj. 100 pmol ml⁻¹ dával čtenou hodnotu 1000. Následoval výpočet aktivity β-glukuronidázy obsažené v celém vzorku (3-5 mg) v pikomolech MUG min⁻¹ podle vzorce:
$$A = 1/t * (\check{c}h * 0,1 * 1,52 * V_R/vz_{II} * V_H/vz_I)$$

kde: t = délka inkubace v min.

čh = čtená hodnota (hodnota čtená na displeji fluorometru) zmenšená o průměrnou hodnotu srovnávacích vzorků

0,1 = 1 nM MU odpovídá při kalibraci čtené hodnotě 10

1,52 = objem STOP-pufru s 20 μl objemu odebraného vzorku reakční směsi

V_R = objem reakční směsi (79,5 μl)

vz_{II} = odebraný vzorek reakční směsi (20 μl)

V_H = objem homogenátu (75 μl)

vz_I = odebraný vzorek homogenátu (4,5 μl)

V případě, že aktivita vzorku byla příliš vysoká, bylo nutno ředit měřený vzorek STOP-pufrem.

Aktivitu β-glukuronidázy lze po změření proteinů přepočítat na pmol MU min⁻¹ μg⁻¹ proteinu podle následujícího vztahu
$$A = (10 * \check{c}h) / (6 * tp), \text{ kde:}$$

$$10 = 0,1 * 1,52 * V_R/vz_{II} * V_H/vz_I$$

čh = čtená hodnota (hodnota čtená na displeji fluorometru)

zmenšená o průměrnou hodnotu srovnávacích vzorků

6 = délka inkubace v minutách

tp = celkové množství proteinu ve vzorku (μg)

Pufry a zásobní roztoky:

Substrát: 1mM 4-metylbelliferyl-β-D-glukuronid (MUG) v extrakčním pufru
připravuje se vždy čerstvý

STOP-pufr: 0,2 M Na₂CO₃

Poté bylo do všech jamek přidáno 8-kanálovou pipetou 200 µl pečlivě promíchaného činidla Bradfordové ředěné vodou 5x. Po 5 – 20 min. se provádělo měření hodnot absorbance všech vzorků a standardu na spektrofotometru při 595 nm. Množství proteinu ve vzorku v (µg) bylo vypočítáno podle následujícího vzorce:

$$\text{Celkové množství proteinu} = (\text{OD}/k) * (75/5)$$

Kde: OD = optická denzita (měřeno na spektrofotometru)

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

75 = objem GUS pufru v (µl), ve kterém byl vzorek homogenizován

5 = objem vzorku v (µl)

3.2.8 PCR (detekce přítomnosti transgenů)

3.2.8.1 Použité primery

K detekci genu pro GUS (β-glukuronidázu) byly použity primery GUS 1 (5'-TCG ATG CGG TCA CTC ATT AC-3') a GUS 2 (5'-CCA CGG TGA TAT CGT CCA C-3'), které amplifikují fragment dlouhý 495 bp. Pro ověření, že PCR reakce ve zkumavce skutečně proběhla, byly použity primery 2995AL (5'-CGA GAG AGA TTC AAG AAT AGA CCC-3') a 2995AR (5'-TAT AAC CAA ATG CAA CTC CGT CTT-3'), které vymezují na rajčatovém chromozómu č. 11 sekvenci o délce 141 bp. Primery byly navrženy v laboratoři J. Macase resp. v Sainsbury Laboratory v Norwichi.

3.2.8.2 Příprava vzorků

Ke kousku rostlinné tkáně (maximálně 4mm x 4mm) odstřižené do mikrozukavky bylo přidáno 40 µl 0,25 M NaOH. Víčko mikrozukavky bylo propíchnuto a vzorky byly inkubovány 30 s ve vodní lázni o teplotě 100 °C a vzápětí zchlazeny na ledu. Ke zchlazeným vzorkům bylo poté přidáno 40 µl 0,25 M HCl a 20 µl 0,5 M Tris pH 8,0, který navíc obsahoval 0,25 % neiontového detergentu Nonidet 40. Vše bylo dobře promícháno, inkubováno ve vodní lázni 100 °C 2 minuty a prudce zchlazeno na ledu. Takto připravené vzorky byly buď ihned použity k PCR nebo byly uchovány při –20 °C a před použitím byly opět 2 min. inkubovány ve vodní lázni 100 °C.

3.2.8.3 *Vlastní PCR*

Do reakce PCR byl použit velmi malý kousek rostlinné tkáně (tj. zhruba 0,25 mm²), připravený výše uvedeným způsobem. Polymerázová řetězová reakce probíhala v reakční směsi o objemu 25 µl v 0,5 ml mikrozkuvkách. **Složení reakční směsi bylo následující:**

10 % (v/v) 10x koncentrovaného PCR pufu (100 mM Tris-HCl o pH=8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂ ; 0,5 % Nonidet P-40)

10 % (v/v) 10x koncentrovaného roztoku dNTPs (každý nukleotid o koncentraci 2,5 mM)

1 % (v/v) 20 µM primeru 1

1 % (v/v) 20 µM primeru 2

1,2 % (v/v) Taq DNA polymerázy (Takara)

sterilní destilovaná voda – doplnit do celkového objemu 25 µl

Složení reakční směsi pro duplexovou PCR, tedy pro současnou amplifikaci fragmentu genu pro GUS a fragmentu chromozómu č. 11, bylo analogické jako v reakci jednoduché. PCR probíhala v cykleru T3 Thermocycler (Biometra) v 35 cyklech, přičemž každý cyklus měl následující teplotní průběh:

denaturace DNA (94 °C)..... 45 s

nasedání primerů (55 °C)..... 30 s

prodlužování nového řetězce (72 °C).....2 min

3.2.8.4 *Elektroforéza v agarózovém gelu*

K elektroforéze byl použit 1,5 % agarózový gel (agaróza SERVA), TBE pufr a ethidium bromid v množství 10 µl zásobního roztoku (1 mg.ml⁻¹) na 100 ml gelu. Na gel bylo nanášeno po 20 µl od každého amplifikovaného vzorku smíchaného se 3,5 µl nanášecího pufu (Takara). Jako velikostní standard bylo použito 5 µl (0,25 µg) 500 bp DNA Ladder (New England Biolabs). Elektroforéza probíhala asi 40-60 min při napětí 80 – 100 V. Výsledné elektroforetogramy byly získány pomocí UV transluminátoru a zobrazovacího systému ImageStore 5000 firmy Vilber Lourmat.

TBE pufr:

Na 1 litr

Tris base	54,0 g
kyselina boritá	27,5 g
0,2 M EDTA (pH = 8)	50 ml
destilovaná voda	950 ml

3.3 Složení kultivačních médií

3.3.1 LK médium pro kultivaci *A. tumefaciens*

Složení na 1000 ml

Sacharóza	10,0 g
Kasein hydrolyzát	8,0 g
Kvasinkový extrakt	4,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3g
pH	6,8
tetracyklin (po klávkování)	0,005g

3.3.2 Médium pro výsev semen rajčat

Složení na 250 ml

MS s vitamíny (DUCHEFA)	1,10 g
glukóza	2,5g
myo-inositol	0,025 g
pH	5,8
plant agar (DUCHEFA)	1,5 g

3.3.3 MS-2,4D-B médium

Složení na 250 ml

MS s vitamíny (DUCHEFA)	1,1 g
sacharóza	7,5 g
kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4D) (2 mg.ml ⁻¹)	25,0 µl

kinetin (0,1 mg.ml ⁻¹)	250,0 µl
pH	5,8
agaróza (SERVA)	1,5 g

pozn. Děložní lístky pokládáme na toto médium horní stranou dolů na 72 hod.

3.3.4 Neselekční regenerační médium (+T-K)

Složení na 250 ml

MS bez vitamínů (DUCHEFA)	1,10 g
myo-inositol	0,025 g
sacharóza	5,0 g
pH	6,0
micro agar (DUCHEFA)	1,5 g

po zklávování přidat do 200 ml:	vitamíny podle Nitche*	200µl
	zeatin ribosid (1 mg. ml ⁻¹)	200µl
	IAA (0,1 mg.ml ⁻¹)	200µl
	kyselina listová (0,1 mg.ml ⁻¹)	1 ml
	Timentin (25 mg.ml ⁻¹)	1,6 ml

*Složení vitamínů podle Nitche v mg. l⁻¹

thiamin	0,5
glycin	2,0
kyselina nikotinová	5,0
pyridoxin-HCl	0,5
biotin	0,05
kyselina listová	0,5

3.3.5 Selektivní regenerační médium s kanamycinem (+T+K)

Jako neselekční regenerační médium, avšak na 200 ml navíc přidán po zklávování:
kanamycin (10 mg.ml⁻¹) 2 ml

3.3.6 Neselekční zakořeňovací médium (+T-K)

Složení na 250 ml

MS s vitaminy (DUCHEFA)	0,55 g
sacharóza	1,25 g
pH	6,0
gerlite (DUCHEFA)	0,5 g
po zklávování přidat do 200 ml: Timentin (25 mg.ml ⁻¹)	0,64 ml

3.3.7 Selektivní zakořeňovací médium s kanamycinem (+T+K)

Jako neselekční zakořeňovací médium, avšak na 200 ml navíc přidán po zklávování:
kanamycin (10 mg.ml⁻¹) 1 ml

4 VÝSLEDKY

4.1 Transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

Pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmene GV3101 obsahující binární vektor 35Sgus-int byly transformovány děložní lístky odrůdy MoneyMaker rajčete (*Solanum lycopersicum* L.).

Byl proveden jeden transformační pokus. Transformované listové segmenty byly regenerovány na regeneračním médiu obsahujícím Timentin a kanamycin. Celkem bylo transformováno 315 děložních lístků. Netransformovaná kontrola byla kultivována na médiu s obsahem Timentinu bez kanamycinu a na médiu s obsahem Timentinu a kanamycinu. Na médiu s Timentinem a kanamycinem byla vedena pozitivní kontrola v počtu 40 děložních lístků a na médiu s Timentinem bez kanamycinu byla vedena negativní kontrola pro kontrolu regenerace v počtu 40 děložních lístků.

Během prvního měsíce selekce všech 40 explantátů kontroly vedené na médiu s kanamycinem zahynulo. Kontrola vedená na médiu bez kanamycinu velmi dobře prospívala. Již po prvním měsíci selekce vznikla kultura mnohonásobných prýtů. Počet negativních kontrol byl posléze redukován na 20 explantátů. Vznik prýtů byl pozorován i u některých transformovaných děložních lístků. U většiny transformantů se však během prvního měsíce selekce objevila pouze kalogeneze (viz obr. 1).

Po pěti týdnech selekce z celkového počtu 315 transformovaných explantátů 95 explantátů vytvořilo kalus, 74 začalo tvořit prýty, 67 teprve započalo proces kalogeneze, 61 zatím kalus nevytvořilo a 18 bylo vyřazeno z důvodu nekrotizace vytvořených kalusů.

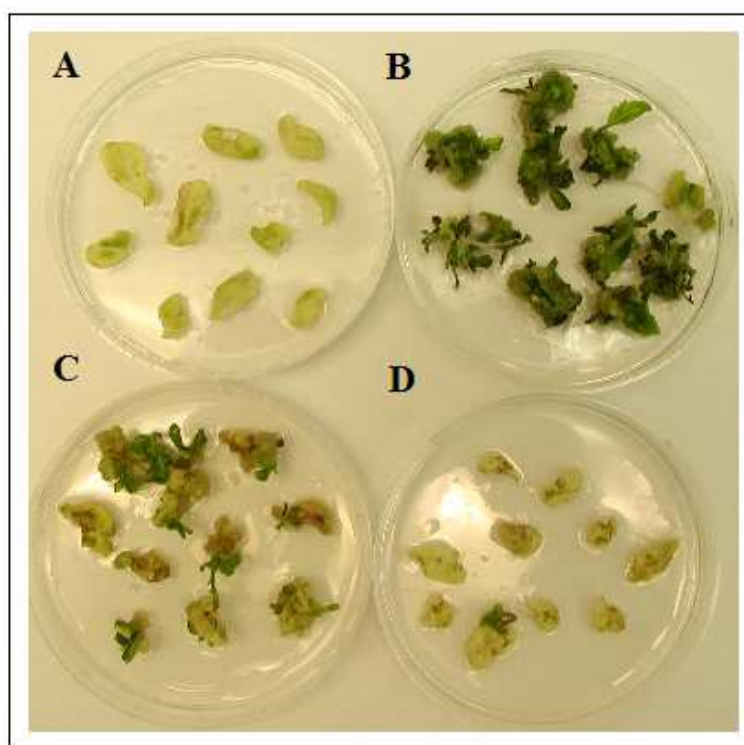
Po sedmi týdnech selekce došlo k ukončení kultivace devíti kontaminovaných explantátů. Kultivace byla dále ukončena u 58 explantátů, u nichž buď nedocházelo ke kalogenezi, nebo se na listech regenerovaných prýtů objevily nekrózy. Na 17 explantátech vznikly během této doby organogenezí prýty, které již bylo možno přenést na zakořeňovací médium s obsahem Timentinu a se stejnou koncentrací kanamycinu (100 mg.l⁻¹). Po jedenácti týdnech bylo možno přenést na zakořeňovací médium dalších 34 prýtů.

Posledních 27 prýtů bylo přeneseno na zakořeňovací médium po patnácti týdnech selekce. Po uplynutí této doby byla ukončena kultivace explantátů, které na regeneračním médiu buď nekrotizovaly, tvořily pouze kořeny nebo vytvářely zelené prýty, které ale vykazovaly morfologické abnormality (netypický tvar listů stonků, vitifikace).

Z každého vytvořeného kalusu, kterému bylo přiděleno číslo, byly odstřiženy maximálně tři prýty. Ty byly označeny písmeny a, b, c. Zhruba tři měsíce po přenosu na zakořeňovací médium

bylo vyhodnoceno, zda rostliny zakořenily. Kořenící rostliny byly považovány za rezistentní vůči kanamycinu a tedy za potenciálně transgenní. Ze všech kořenících prýtů byl odebrán kousek tkáně listu, který posloužil pro přípravu vzorku pro PCR. Obrázky 3 a 4 jsou příkladem elektroforetogramů PCR reakcí. U 21 vybraných rostlin byl důkaz přítomnosti či nepřítomnosti amplifikovaných fargmentů genu *gus* podán pomocí histochemické a fluorometrické analýzy. U těchto rostlin byl také vyhodnocen jejich vzhled (viz tab. 2). V tab. 1 jsou uvedeny výsledky stanovení aktivity β -glukuronidázy u vybraných 21 vzorků. Obr. 2 představuje výsledek histochemické analýzy vybraných 21 explantátů.

Obr. 1 Makrofotografie regenerujících rostlin po měsíční kultivaci na selekčním médiu. A - pozitivní kontrola, B – negativní kontrola, C – transformované explantáty, D – transformované explantáty



Tab. 1 Výsledky měření aktivity β -glukuronidázy (OD - optická denzita (měřeno na spektrofotometru); A – aktivita β -glukuronidázy; K – netransgenní kontrola regenerace)

Číslo vzorku	Označení rostliny	Navážka (mg)	Aktivita 2 min	Aktivita 6 min	OD	Celkový obsah proteinů (μ g)	A (pmol MU/mg listu/min)	A (pmol MU/ μ g proteinu/min)
1	2c	3,1	-	38	0,288	68	12	0,5
2	4b	3,3	-	26	0,369	87	5	0,2
3	7a	5,0	-	2445	0,340	80	810	51
4	15a	4,0	-	15	0,445	104	0	0
5	16a	2,9	-	14	0,395	93	0	0
6	17a	3,7	-	2409	0,277	65	1078	61
7	30a	2,0	20	26	0,261	61	8	0
8	43b	3,9	728	2325	0,425	100	987	39
9	45b	4,4	793	2707	0,412	97	1019	46
10	46a	3,1	123	381	0,312	73	196	8
11	46c	1,8	146	491	0,353	83	10	10
12	50a	4,0	1164	3576	0,475	112	1483	53
13	53a	4,8	19	27	0,327	77	4	0
14	58a	3,6	19	38	0,409	96	10	0
15	60d	3,5	39	103	0,260	61	41	2
16	67a ₂	4,3	17	19	0,300	70	1	0
17	75a	4,6	1394	3953	0,352	83	1426	79
18	78a	3,8	1413	4259	0,320	75	1861	94
19	78c	3,8	803	2164	0,337	79	942	45
20	79a	3,7	328	816	0,358	84	360	16
21	K	4,4	15	13	0,412	97	0	0
01		4,5 μ l GUS pufru	17	12				
02		4,5 μ l GUS pufru	18	18				

Tab. 2 Popis vybraných explantátů po tříměsíční kultivaci na zakořeňovacím médiu a výsledky PCR reakce na zjištění přítomnosti fragmentů genu *gus* a 141 bp dlouhého fragmentu z rajčatového chromozómu č. 11, fluorometrického a histochemického stanovení GUS aktivity. (Negativní výsledek označen znaménkem - ; pozitivní výsledek označen znaménkem + ; nf – zkratka pro normální fenotyp; A – enzymatická aktivita z fluorometrického stanovení GUS; K – netransgenní kontrola regenerace).

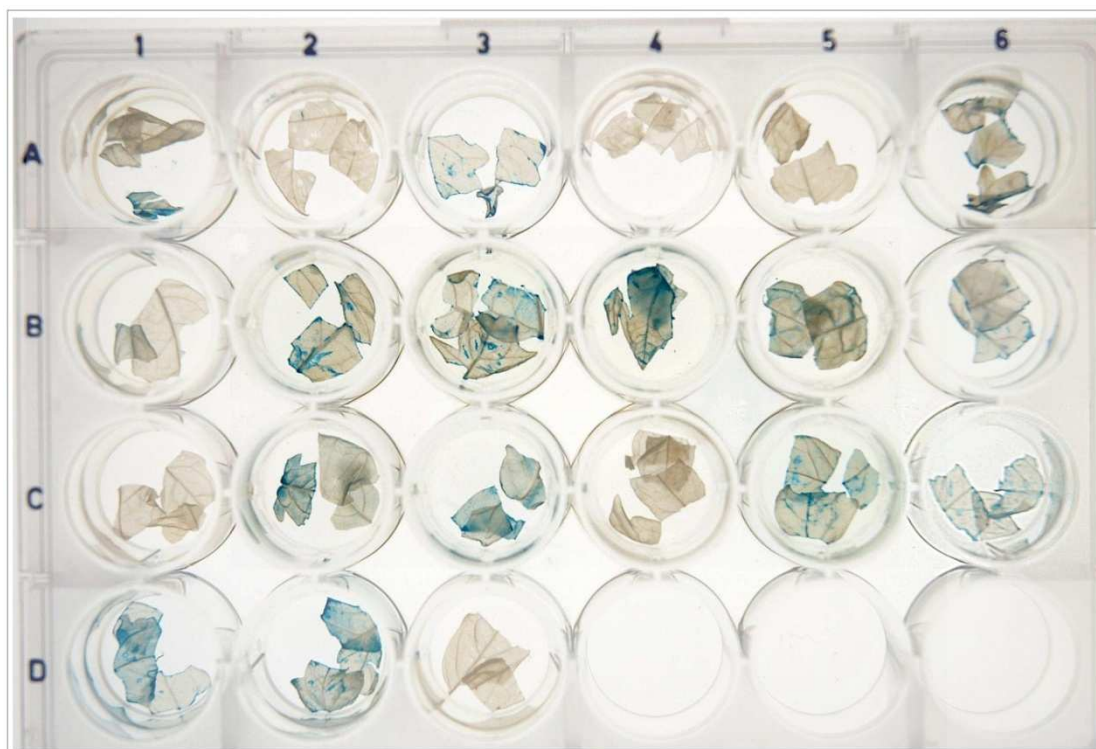
Číslo vzorku	Označení rostliny	PCR GUS intron	Histochem. stanovení GUS aktivity	A(pmol MU/μg proteinu/min)	Celkový vzhled explantátů
1	2c	+	+	0,5	Kořeny pravé a vzdušné, nf
2	4b	+	+	0,2	Kořeny pravé a vzdušné, menší vzrůst
3	7a	+	+	51	Kořeny pravé, nf
4	15a	+	-	0	Kořeny pravé a vzdušné, nf
5	16a	-	-	0	Kořeny vzdušné, malý vzrůst a deformované listy
6	17a	+	+	61	Kořeny pravé, nf
7	30a	+	+	0	Kořeny pravé, nf
8	43b	+	+	39	Kořeny pravé, nf
9	45b	+	+	46	Kořeny pravé, nf
10	46a	+	+	8	Kořeny pravé, nf
11	46c	+	+	10	Kořeny pravé, nf

Tab. 2 pokračování

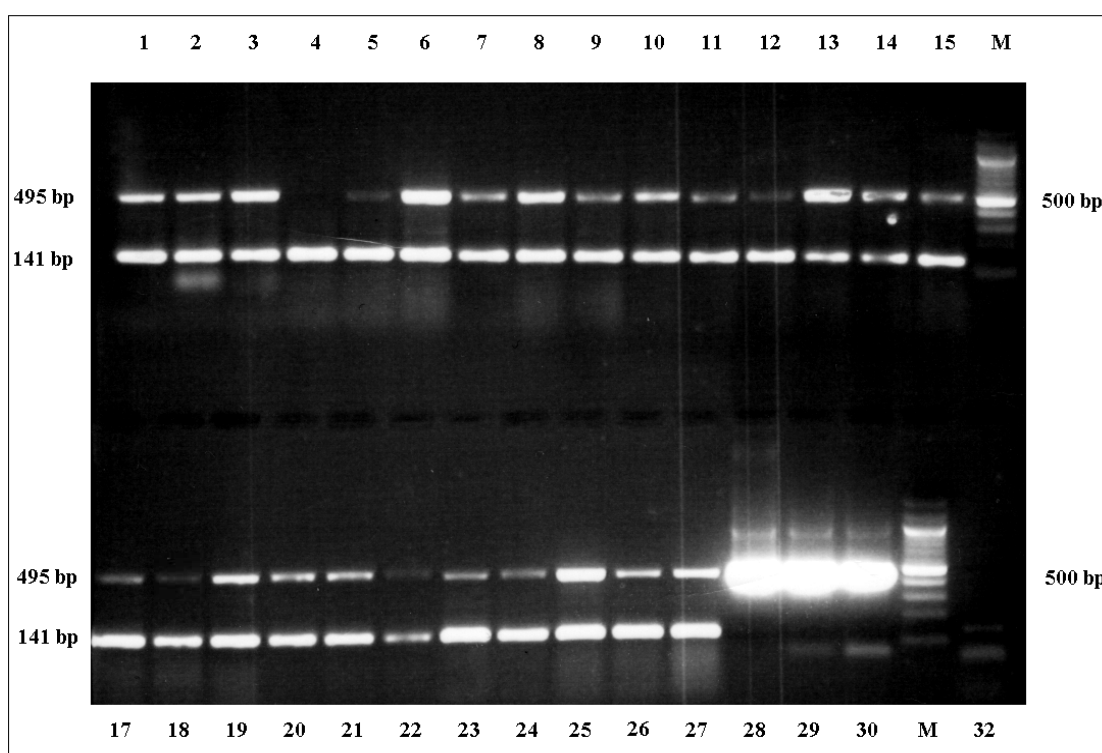
Číslo vzorku	Označení rostliny	Test PCR	Histochem. stanovení GUS aktivity	A(pmol MU/ μ g proteinu/min)	Celkový vzhled explantátů
12	50a	+	+	53	Kořeny pravé a vzdušné, nf
13	53a	+	-	0	Kořeny pravé a vzdušné, nf
14	58a	+	+	0	Kořeny pravé, a vzdušné, menší vzrůst
15	60d	+	+	2	Kořeny pravé, nf
16	67a ₂	-	-	0	Kořeny vzdušné, deformované listy
17	75a	+	+	79	Kořeny pravé, nf
18	78a	+	+	94	Kořeny pravé, nf
19	78c	+	+	45	Kořeny pravé, nf
20	79a	+	+	16	Kořeny pravé, nf
21	K	-	-	0	Kořeny pravé, nf

Z tab. 2 je patrné, že některé výsledky PCR a histochemického stanovení GUS aktivity se neshodovaly s výsledky fluorometrické metody stanovení GUS aktivity. I po opakovaném provedení PCR a fluorometrického stanovení GUS aktivity bylo u těchto rostlin dosaženo stejných výsledků. Zřejmě se tak jednalo o chiméřní rostliny, které exprimovaly transgen *gus* pouze v některých částech rostlinného těla. O chiméry se zřejmě jedná i v případě vzorků č. 4 a 13, kde byla pomocí PCR reakce opakovaně prokázána přítomnost transgenu *gus*, ačkoli výsledky histochemického a fluorometrického stanovení GUS aktivity naznačovaly, že se nejedná o transgenní rostlinu. V obou těchto případech rostliny kořenily v substrátu s Kanamycinem i mimo něj, což může být potvrzením předpokládané chimerity.

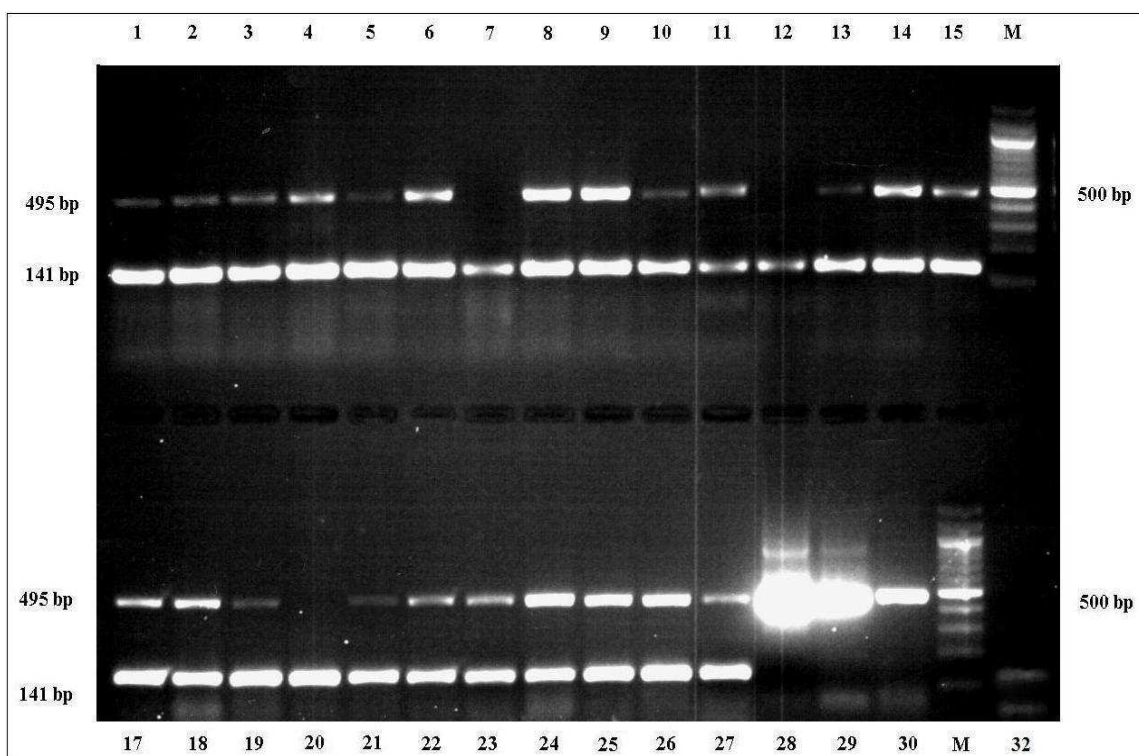
Obr. 2 Výsledek histochemického stanovení GUS aktivity. V jamkách A1 – A6 jsou vzorky č. 1 – 6, v jamkách B1 – B6 jsou vzorky č. 7 – 12, v jamkách C1 – C6 jsou vzorky č. 13 – 18, v jamkách D1 a D2 jsou vzorky č. 19 a 20, v jamce D3 je umístěna kontrola regenerace.



Obr. 3 Příklad elektroforetogramu PCR reakce, ve které byl amplifikován 495 bp dlouhý fragment signálního genu pro GUS a 141 bp dlouhý fragment z rajčatového chromozomu č. 11, ohraničený primery 2995AL a 2995AR. Každá reakce probíhala v objemu 25 µl reakční směsi, z čehož bylo 20 µl spolu s 3,5 µl nanášecího pufru nanášeno do jamky v 1,5 % agarózovém gelu. Dráha: 1-vzorek 9c, 2-vzorek 10a₁, 3-vzorek 10a₂, 4-vzorek 12a, 5-vzorek 15a, 6-vzorek 17a, 7-vzorek 17c, 8-vzorek 18c, 9-vzorek 19a, 10-vzorek 19b, 11-vzorek 21b, 12-vzorek 29a, 13-vzorek 30a, 14-vzorek 31a, 15-vzorek 34b, M-velikostní standard (100 bp ladder), 17-vzorek 34c, 18-vzorek 35b, 19-vzorek 39a, 20-vzorek 40c, 21-vzorek 41b, 22-vzorek 42a, 23-vzorek 43a, 24-vzorek 43b, 25-vzorek 44a, 26-vzorek 45a, 27-vzorek 45b, 28-kontrolní DNA 10x zředěná, 29-pozitivní kontrola 100x zředěná, 30-pozitivní kontrola 1000x zředěná, M-velikostní standard (100 bp ladder), 32-negativní kontrola.



Obr. 4 Příklad elektroforetogramu PCR reakce, ve které byl amplifikován 495 bp dlouhý fragment signálního genu pro GUS a 141 bp dlouhý fragment z rajčatového chromozomu č. 11, ohraničený primery 2995AL a 2995AR. Každá reakce probíhala v objemu 25 µl reakční směsi, z čehož bylo 20 µl spolu s 3,5 µl nanášecího pufru nanášeno do jamky v 1,5 % agarózovém gelu. Dráha: 1-vzorek 75a, 2-vzorek 77a, 3-vzorek 77b, 4-vzorek 2a, 5-vzorek 1b, 6-vzorek 2b, 7-vzorek 4b, 8-vzorek 4c, 9-vzorek 9a, 10-vzorek 14c, 11-vzorek 15b, 12-vzorek 16a, 13-vzorek 49a, 14-vzorek 17b, 15-vzorek 18a, M-velikostní standard (100 bp ladder), 17-vzorek 9b, 18-vzorek 4b, 19-vzorek 20a, 20-vzorek 27a, 21-vzorek 34a, 22-vzorek 35a, 23-vzorek 37a, 24-vzorek 41a, 25-vzorek 41c, 26-vzorek 44b, 27-vzorek 46c, 28-pozitivní kontrola 1000x zředěná, 29-pozitivní kontrola 10000x zředěná, 30-pozitivní kontrola 100000x zředěná, M-velikostní standard (100 bp ladder), 32-negativní kontrola.



Z celkového počtu transformovaných děložních lístků a počtu transgenních rostlin byla vypočítána účinnost transformace jako podíl explantátů, které daly vzniknout alespoň jedné transgenní rostlině (viz tab. 3).

Tab. 3 Dosažená transformační účinnost

Celkový počet explantátů (děložních lístků)	315
Počet regenerovaných prýtů (včetně klonů)	162
Počet nezávislých transgenních rostlin (počet pozitivních výsledků PCR analýz rostlin regenerovaných na různých kalusech)	73
Účinnost transformace v %	23,2 %

4.2 Biolistická metoda transformace

S použitím genového děla PDS-1000/He a binárního vektoru 35Sgus-int byly transformovány děložní lístky odrůdy MoneyMaker rajčete (*Solanum lycopersicum* L.).

V 6 transformačních pokusech bylo celkem transformováno 698 děložních lístků. Stáří transformovaných děložních lístků bylo 3 – 4 týdny. Polovina transformovaných děložních lístků byla vždy podrobena histochemické analýze a druhá polovina byla přenesena na regenerační médium s kanamycinem. Netransformovaná kontrola byla kultivována na médiu s přídatkem kanamycinu a na médiu bez přídatku kanamycinu. Pro každý experiment bylo na obou typech médií kultivováno po deseti děložních lístcích kontrol.

V prvním transformačním experimentu bylo transformováno 114 děložních lístků, které byly rozmístěny na dvanácti Petriho miskách. Jako nosič navázané DNA byly použity 1 μm velké částice zlata. Mikroprojektily byly do pletiva vstřelovány pod tlakem 900 nebo 1100 psi. Petriho misky s děložními lístky byly umístěny ve vzdálenosti 6, 9 nebo 12 cm od záchytné kovové mřížky. Parametry uvedené v tab. 4 zůstávaly během všech šesti pokusů konstantní. V tab. 5 je uvedeno schéma a výsledek prvního transformačního experimentu.

Tab. 4 Parametry transformačního procesu, které zůstávaly v průběhu všech šesti experimentů neměnné (1“ Hg = 0,03386 bar = 3386,38 Pa = 33,8638 HPa => při redukci tlaku o 28“ Hg je tlak \approx 2“ Hg = 65,1 hPa).

Vakuum (snížení tlaku v palcích rtuťového sloupce)	28“ Hg
„Gap distance“	6 mm
„Macrocarrier travel distance“	11 mm
Množství DNA/střelu	0,8 μg
Množství Au/střelu	0,5 mg

Tab. 5 Schéma prvního transformačního experimentu a výsledek histochemického stanovení tranzientní exprese genu *gus* provedeného 2 dny po transformaci. Tranzientní exprese genu *gus* se projevila ve formě modrých skvrn viditelných na povrchu chlorofylu zbavených děložních lístků.

Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Číslo vzorku	Počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Celkový počet skvrn nalezený na děložních lístcích při histochem. analýze
900	6	1/A	5	2
900	6	1/B	4	2
900	9	2/A	6	7
900	9	2/B	6	0
900	12	3/A	6	2
900	12	3/B	5	0
1100	6	4/A	4	2
1100	6	4/B	4	1
1100	9	5/A	4	4
1100	9	5/B	5	3
1100	12	6/A	5	3
1100	12	6/B	3	0

Po dvou měsících kultivace na selekčním regeneračním médiu byly všechny vzorky odstraněny, neboť ani v jednom případě nebyla pozorována regenerace. Nedošlo ke kalogenezi a děložní lístky nekrotizovaly. Kontrola vedená na neselekčním regeneračním médiu během dvouměsíční kultivace prošla procesem kalogeneze i organogeneze. Kontrola vedená na selekčním regeneračním médiu zahynula již během prvního měsíce kultivace.

Ve druhém transformačním experimentu bylo transformováno 86 děložních lístků, které byly rozmístěny na dvanácti Petriho miskách. Jako nosič navázané DNA byly opět použity 1 µm velké částice zlata. Mikroprojektily byly do pletiva vstřelovány pod tlakem 1350 nebo 1550 psi. Petriho misky s děložními lístky byly umístěny ve vzdálenosti 6, 9 nebo 12 cm od záchytné kovové mřížky. V tab. 6 je uvedeno schéma a výsledek druhého transformačního experimentu.

Tab. 6 Schéma druhého transformačního experimentu a výsledek histochemického stanovení tranzientní exprese genu *gus* provedeného 2 dny po transformaci. Tranzientní exprese genu *gus* se projevila ve formě modrých skvrn viditelných na povrchu chlorofylu zbarvených děložních lístků.

Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Číslo vzorku	Počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Celkový počet skvrn nalezený na děložních lístcích při histochem. analýze
1350	6	1/A	3	12
1350	6	1/B	3	2
1350	9	2/A	5	1
1350	9	2/B	4	2
1350	12	3/A	4	3
1350	12	3/B	4	1
1550	6	4/A	4	3
1550	6	4/B	4	2
1550	9	5/A	3	2
1550	9	5/B	3	3
1550	12	6/A	4	2
1550	12	6/B	2	0

Po dvou měsících kultivace na selekčním regeneračním médiu byly téměř všechny vzorky odstraněny, neboť u nich nebyla pozorována regenerace. Nedocházelo ke kalogenezi a děložní lístky nekrotizovaly. Pouze děložní lístky vzorků 1/A, 2/B a 5/B byly přeneseny na čerstvé regenerační médium, neboť si zachovaly zelenou barvu. Dosud ale nezačaly tvořit kalusy. Po třech měsících začal jeden lístek vzorku 2/B tvořit kalus. Po pěti měsících kultivace na selekčním médiu byly děložní lístky vzorků 1/A, 2/B a 5/B odstraněny, neboť došlo k jejich nekrotizaci. Kontrola vedená na neselekčním regeneračním médiu během dvouměsíční kultivace prošla procesem kalogeneze i organogeneze. Kontrola vedená na selekčním regeneračním médiu zahynula již během prvního měsíce kultivace.

Ve třetím transformačním experimentu bylo transformováno 191 děložních lístků, které byly rozmístěny na 24 Petriho miskách. Jako nosič navázané DNA byly použity 1 µm velké částice zlata. Mikroprojektily byly do pletiva vstřelovány pod tlakem 900, 1100, 1350 nebo 1550 psi. Petriho misky s děložními lístky byly umístěny ve vzdálenosti 6, 9 nebo 12 cm od záchytné kovové mřížky. V tab. 7 je uvedeno schéma a výsledek třetího transformačního experimentu.

Tab. 7 Schéma třetího transformačního experimentu a výsledek histochemického stanovení tranzientní exprese genu *gus* provedeného 2 dny po transformaci. Tranzientní exprese genu *gus* se projevila ve formě modrých skvrn viditelných na povrchu chlorofylu zbarvených děložních lístků.

Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Číslo vzorku	Počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Celkový počet skvrn nalezený na děložních lístcích při histochem. analýze
900	9	1/A	4	7
900	9	1/B	4	6
900	9	1/C	4	1
900	9	1/D	4	13
1100	9	2/A	4	12
1100	9	2/B	4	10
1100	9	2/C	4	5
1100	9	2/D	3	7
1100	12	3/A	4	11
1100	12	3/B	4	14
1100	12	3/C	4	8
1100	12	3/D	4	32
1350	6	4/A	4	2
1350	6	4/B	4	6
1350	6	4/C	4	6
1350	6	4/D	4	3
1550	6	5/A	4	6
1550	6	5/B	4	5
1550	6	5/C	4	2
1550	6	5/D	4	2
1550	9	6/A	4	7
1550	9	6/B	4	19
1550	9	6/C	4	4
1550	9	6/D	4	8

Po dvou měsících kultivace na selekčním regeneračním médiu byla odstraněna většina vzorků. U těchto vzorků nedocházelo ke kalogenezi a děložní lístky nekrotizovaly. Pouze děložní lístky vzorků 4/A a 4/C byly přeneseny na čerstvé regenerační médium, neboť nedošlo k jejich nekrotizaci. Jeden z lístků vzorku 4/A vytvořil kalus a ostatní lístky zůstávaly stále zelené. Kalus vytvořil také jeden z lístků vzorku 4/C. Na tomto kalusu pak byly patrné i dva prýty menšího vzrůstu (cca 2 mm). Kontrola vedená na neselekčním regeneračním médiu během dvouměsíční kultivace odumřela. Došlo ke kalogenezi, ale vzniklé prýty z neznámého důvodu odumřely. Kontrola vedená na selekčním regeneračním médiu zahynula již během prvního měsíce kultivace. Po čtyřech měsících kultivace byly odstraněny i zbývající děložní lístky (4/A, 4/C). U obou vzorků došlo k nekrotizaci vzniklých kalusů.

Ve čtvrtém transformačním experimentu bylo transformováno 93 děložních lístků, které byly rozmístěny na dvanácti Petriho miskách. Jako nosič navázané DNA byly použity 1 μm velké částice zlata. Mikroprojektily byly do pletiva vstřelovány pod tlakem 1100 nebo 1550 psi. Petriho misky s děložními lístky byly umístěny ve vzdálenosti 9 nebo 12 cm od záchytné kovové mřížky. V tab. 8 je uvedeno schéma a výsledek čtvrtého transformačního experimentu.

Tab. 8 Schéma čtvrtého transformačního experimentu a výsledek histochemického stanovení tranzientní exprese genu *gus* provedeného 2 dny po transformaci. Tranzientní exprese genu *gus* se projevila ve formě modrých skvrn viditelných na povrchu chlorofylu zbavených děložních lístků.

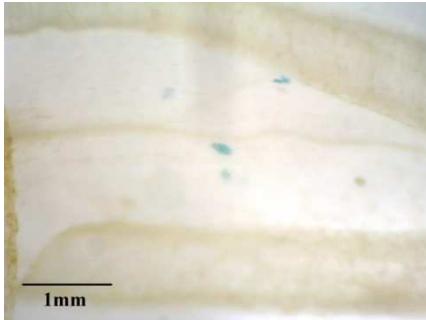
Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Číslo vzorku	Počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Celkový počet skvrn nalezený na děložních lístcích při histochem. analýze
1100	9	1/A	4	11
1100	9	1/B	4	41
1100	9	1/C	4	36
1100	9	1/D	2	0
1100	12	2/A	4	43
1100	12	2/B	4	4
1100	12	2/C	4	17
1100	12	2/D	4	33
1550	9	3/A	4	7
1550	9	3/B	4	6
1550	9	3/C	4	19
1550	9	3/D	4	23

Po dvou měsících kultivace na selekčním regeneračním médiu byly všechny vzorky odstraněny, neboť ani v jednom případě nebyla pozorována regenerace. Nedocházelo ke kalogenezi a děložní lístky nekrotizovaly. Kontrola vedená na neselekčním regeneračním médiu byla odstraněna již po měsíci kultivace. Vytvořila kalusy, které ale nekrotizovaly. Příčinou mohlo být použití staršího média, či starších roztoků růstových látek používaných k přípravě regeneračního média. Kontrola vedená na selekčním regeneračním médiu zahynula během prvního měsíce kultivace.

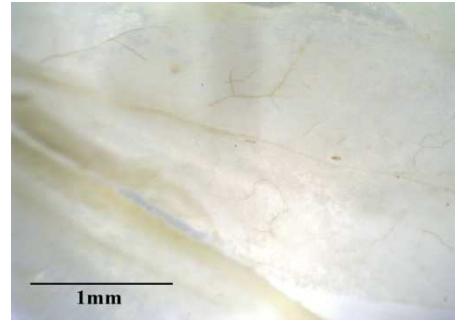
V pátém transformačním experimentu bylo transformováno 144 děložních lístků, které byly rozmístěny na 24 Petriho miskách. Jako nosič navázané DNA byly použity 1 nebo 1,6 μm velké částice zlata. Mikroprojektily byly do pletiva vstřelovány pod tlakem 900, 1100 nebo 1350 psi. Petriho misky s děložními lístky byly umístěny ve vzdálenosti 6, 9 nebo 12 cm od záchytné kovové mřížky. V tab. 9 je uvedeno schéma a výsledek pátého transformačního experimentu. Obr. 5 představuje děložní lístek, jehož některé buňky vykazují tranzientní expresi genu *gus*. a obr. 6 představuje netransgenní kontrolu regenerace.

Tab. 9 Schéma pátého transformačního experimentu a výsledek histochemického stanovení tranzientní exprese genu *gus* provedeného 2 dny po transformaci. Tranzientní exprese genu *gus* se projevila ve formě modrých skvrn viditelných na povrchu chlorofylu zbarvených děložních lístků.

Velikost mikroprojektilů (μm)	Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Číslo vzorku	Počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Celkový počet skvrn nalezený na děložních lístcích při histochem. analýze
1	1100	9	1/A	3	69
1	1100	9	1/B	3	28
1	1100	9	1/C	3	31
1	1100	12	2/A	3	55
1	1100	12	2/B	3	11
1	1100	12	2/C	3	33
1,6	900	6	3/A	3	25
1,6	900	6	3/B	3	23
1,6	900	6	3/C	3	8
1,6	900	9	4/A	3	24
1,6	900	9	4/B	3	16
1,6	900	9	4/C	3	9
1,6	1100	9	5/A	3	8
1,6	1100	9	5/B	3	5
1,6	1100	9	5/C	3	4
1,6	1100	12	6/A	3	18
1,6	1100	12	6/B	3	3
1,6	1100	12	6/C	3	30
1,6	1350	9	7/A	3	0
1,6	1350	9	7/B	3	6
1,6	1350	9	7/C	3	0
1,6	1350	12	8/A	3	9
1,6	1350	12	8/B	3	2
1,6	1350	12	8/C	3	3



Obr. 5 Fotografie děložního lístku, jehož některé buňky vykazují tranzientní expresi genu *gus*.



Obr. 6 Fotografie děložního lístku, který sloužil jako kontrola regenerace.

Po dvou měsících kultivace na selekčním regeneračním médiu byla odstraněna většina vzorků. U těchto vzorků nedocházelo ke kalogenezi a děložní lístky nekrotizovaly. Pouze jeden děložní lístek vzorku 1/A byl přenesen na čerstvé regenerační médium, neboť se jevil jako životný. Pletivo bylo zelené, ale lístek zatím nevykazoval tvorbu kalusu. Po třech měsících kultivace děložní lístek nekrotizoval. Kontrola vedená na neselekčním regeneračním médiu během dvouměsíční kultivace prošla procesem kalogeneze i organogeneze. Kontrola vedená na selekčním regeneračním médiu zahynula již během prvního měsíce kultivace.

V šestém transformačním experimentu bylo transformováno 73 děložních lístků, které byly rozmístěny na dvanácti Petriho miskách. Jako nosič navázané DNA byly použity 1 µm velké částice zlata. Mikroprojektily byly do pletiva vstřelovány pod tlakem 1100 psi. Petriho misky s děložními lístky byly umístěny ve vzdálenosti 9 nebo 12 cm od záchytné kovové mřížky. V tab. 9 je uvedeno schéma a výsledek šestého transformačního experimentu.

Tab. 9 Schéma šestého transformačního experimentu a výsledek histochemického stanovení tranzientní exprese genu *gus* provedeného 2 dny po transformaci. Tranzientní exprese genu *gus* se projevila ve formě modrých skvrn viditelných na povrchu chlorofylu zbavených děložních lístků.

Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Číslo vzorku	Počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Celkový počet skvrn nalezený na děložních lístcích při histochem. analýze
1100	9	1/A	3	18
1100	9	1/B	3	10
1100	9	1/C	3	2
1100	9	1/D	3	6
1100	9	1/E	3	8
1100	9	1/F	3	1
1100	12	2/A	3	0
1100	12	2/B	3	3
1100	12	2/C	3	15
1100	12	2/D	3	7
1100	12	2/E	3	1
1100	12	2/F	3	8

Po dvou měsících kultivace na selekčním regeneračním médiu byly všechny vzorky odstraněny, neboť ani v jednom případě nebyla pozorována regenerace. Nedocházelo ke kalogenezi a děložní lístky nekrotizovaly. Kontrola vedená na neselekčním regeneračním médiu prošla během dvouměsíční kultivace procesem kalogeneze i organogeneze. Kontrola vedená na selekčním regeneračním médiu zahynula během prvního měsíce kultivace.

Tab. 10 uvádí, jaký efekt na tranzientní expresi genu *gus* mají změny velikosti tří parametrů – velikosti mikroprojektilů, tlaku hélia a vzdálenosti cílové tkáně od záchytné kovové mřížky. Jedná se o souhrn výsledků všech šesti prováděných transformačních experimentů. Úspěšnost transformačních pokusů, je zde hodnocena jako počet skvrn nalezených při histochemické analýze přepočítaný na jeden děložní lístek.

Tab. 10 Souhrn výsledků transformačních experimentů 1 – 6. Účinek změn velikosti mikroprojektilů, tlaku helia a vzdálenosti cílové tkáně od záchytné kovové mřížky na tranzientní expresi genu *gus*.

Velikost mikroprojektilů (μm)	Tlak helia (psi)	Vzdálenost cílové tkáně (cm)	Celkový počet histochem. analyzovaných děložních lístků	Počet skvrn nalezených při histochem. analýze přepočítaný na jeden děložní lístek
1	900	6	15	1,2
1	900	9	37	1,0
1	900	12	19	0,3
1	1100	6	16	0,5
1	1100	9	71	4,7
1	1100	12	73	4,1
1	1350	6	16	1,1
1	1550	6	16	0,9
1	1550	9	32	2,9
1,6	900	6	9	6,2
1,6	900	9	9	5,4
1,6	1100	9	9	1,8
1,6	1100	12	9	5,6
1,6	1350	9	9	0,6
1,6	1350	12	9	1,5

Z tab. 10 vyplývá, že jako nejméně úspěšný se jeví použití 1,6 μm velkých mikroprojektilů, tlaku 900 psi a vzdálenosti cílové tkáně od záchytné kovové mřížky 6 cm. Jedná se však o výsledky získané na základě pouze jednoho pokusu, takže by bylo vhodné úspěšnost ověřit opakováním daného pokusu.

5 DISKUZE

Cílem práce bylo posouzení a srovnání předností a účinnosti *A. tumefaciens* zprostředkované transformace rajčete a transformace biolistické.

Za použití bakterie *A. tumefaciens* kmene GV3101 obsahující binární vektor 35Sgus-int bylo v jednom transformačním pokusu transformováno 315 děložních lístků rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) odrůdy MoneyMaker, které byly následně selektovány na médiu s kanamycinem. Takto bylo získáno celkem 73 nezávislých transgenních rostlin. Jednalo se o rostliny, které na zakořeňovacím médiu s obsahem kanamycinu vytvořily pravé kořeny. Tyto rostliny byly podrobeny PCR analýze, která u všech potvrdila přítomnost signálního genu *gus*. Vzhledem ke skutečnosti, že nebyla provedena analýza získaných transgenních prýtů Southernovou hybridizací, byly všechny prýty získané z jednoho kalusu považovány za klon a do výpočtu transformační účinnosti tak byl zahrnut vždy pouze jeden prýt regenerovaný na jednom kalusu. Celkový počet regenerovaných prýtů byl značně vyšší než počet prýtů, které posloužily pro výpočet transformační účinnosti, a činil 162. Z nich však na zakořeňovacím médiu s obsahem kanamycinu 51 nezakořenilo. Nabízí se vysvětlení, že bylo dosaženo pouze tranzientní exprese genu *nptII*, která umožní regenerujícímu kalusu po určitou dobu na selekčním médiu přežít, ačkoli není stabilně transformován. Také mohlo jít o důsledek ztráty aktivity (umlčování) transgenů, kterou mohly způsobit přestavby vyvolané vysokým počtem kopií integrovaného transgenů. Kosuprese (potlačení) genové aktivity pak nemusí postihnout celou rostlinu, ale jen některé části. Tato skutečnost může být vysvětlením, proč některé rostliny kořenily částečně v médiu a částečně vytvářely kořeny vzdušné. Kosuprese je buněčně autonomní, ale současně se může přenášet po rostlině např. roubováním. Důkazem, že vysoký počet kopií integrovaného transgenů může způsobit jeho umlčení, je např. práce Meinse (2000), ve které byl jeden list transgenního tabáku s aktivním genem pro GFP (bez oddělení od rostliny) infiltrován bakteriemi *A. tumefaciens*, jejichž T-DNA obsahovala gen GFP, a tím došlo ke ztrátě aktivity tohoto genu v celé rostlině.

U vybraných rostlin byl důkaz přítomnosti či nepřítomnosti genu *gus* podán pomocí histochemického a fluorometrického stanovení. Z porovnání výsledků použitých tří analýz (PCR, histochemie, fluorometrie) vyplynulo, že některé výsledky PCR analýzy a histochemického stanovení GUS aktivity se neshodovaly s výsledky fluorometrické metody stanovení aktivity GUS. Tuto skutečnost bylo možné vysvětlit tím, že se jednalo o chimérické rostliny, které exprimovaly gen *gus* pouze v některých částech rostlinného těla. O chiméry se zřejmě jednalo i v případě 2 vzorků, u nichž byla pomocí PCR reakce opakovaně prokázána

přítomnost genu *gus*, ačkoli výsledky histochemického a fluorometrického stanovení GUS aktivity naznačovaly, že se o transgenní rostliny nejedná. U těchto 2 vzorků se dále nabízí možnost, že došlo pouze k dočasné expresi genu *gus*, která byla po určité době umlčena. Potvrzením předpokládané chimerity může být fakt, že rostliny, u jejichž analýz byly tyto výsledky pozorovány, kořenily v agaru i nad jeho povrchem, tzn. že i k expresi genu *nptII* docházelo pouze v některých částech rostliny. Pro potvrzení či vyvrácení těchto teorií by bylo vhodné ověřit výsledky PCR analýzou, která by nebyla prováděna s rostlinným pletivem, ale s genomickou DNA nebo provedením Southernovy hybridizace, jak ve své práci uvádí Žaludová (2002).

Zjištěná transformační účinnost činila 23,2 %. Hodnoty transformační účinnosti u rajčete jsou velmi rozličné. Pohybují se od 6 % (Vidya et al., 2000), přes více než 20 % (Park et al., 2003) až ke 40 % (Sun et al., 2006). Přikrylová (2004) např. dosáhla u odrůdy MoneyMaker při dvoudenní kokultivaci s *A. tumefaciens* transformační účinnosti 10 %. V práci Žaludové (2002) činila transformační účinnost dosažená při transformaci rajčete odrůdy MoneyMaker kmenem LBA 4404 *A. tumefaciens* 7,7 %. Pro srovnání je možno uvést, že Meissner et al. (1997), kteří použili k transformaci odrůdy MikroTom kmene *A. tumefaciens* LBA 4404 uvádějí, že transformací děložních lístků pomocí *A. tumefaciens* může transformační účinnost dosáhnout až 80 %. Tato veličina značně závisí na několika faktorech. Těmi jsou použitý rostlinný materiál a odrůda, kmen bakterie *A. tumefaciens*, koncentrace bakterií v suspenzi při transformaci, složení kultivačních médií a některé další. Autoři Hu a Phillips (2001) například vyhodnotili za nejdůležitější faktor, vedoucí ke zvýšení transformační účinnosti, antibiotika pro potlačení přerůstání *A. tumefaciens*. Problémy s přerůstáním *A. tumefaciens*, jejichž příčinou může být zvýšená virulence bakterie, řešily ve své práci také Žaludová (2002) a Přikrylová (2004). V mé práci však v žádném okamžiku problém s přerůstáním *A. tumefaciens* nenastal. Přikrylová (2004) uvedla, že faktorem, kterým lze ovlivnit účinnost transformace, může být i délka kokultivace děložních lístků s *A. tumefaciens*. Jako neúspěšnější pak vyhodnotila délku kokultivace rajčete odrůdy MoneyMaker s *A. tumefaciens* jeden den, která byla dostačující pro vnesení plazmidu. Krasnyanski et al. (2001) pozorovali nejvyšší transformační účinnost po dvoudenní kokultivaci děložních lístků s *A. tumefaciens*. Také Cortina a Culiánez-Marcia (2004) transformovali děložní lístky rajčete a explantáty kokultivovali s *A. tumefaciens* 2 dny. Jako nevhodná se autorům Krasnyanski et al. (2001) jevila třídenní kokultivace děložních explantátů rajčete (na médiu bez antibiotika eliminujícího bakterie) s *A. tumefaciens*. Ta totiž podpořila přílišné namnožení bakterií v rostlinné tkáni a následné přerůstání explantátů koloniemi bakterie.

Pomocí genového děla PDS-1000/He za použití binárního vektoru 35Sgus-int byly v šesti pokusech transformovány děložní lístky rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) odrůdy MoneyMaker. Celkem bylo transformováno 698 děložních lístků. Většina těchto explantátů po transformaci mikroprojektily vykazovala tranzientní expresi genu *gus*, která se po histochemické analýze projevovala jako „modré skvrny“ viditelné na povrchu chlorofylu zbavených děložních lístků. Pouze 35 děložních lístků tranzientní expresi nevykazovalo. Nejvyšší počet skvrn nalezený při histochemické analýze přepočtený na jeden děložní lístek činil 6,2. Klein (1988) dosáhl při transformaci listů a suspenzních kultur tabáku v průměru počtu 83,3 GUS exprimujících buněk na list. Podařilo se mu dokonce vnesený gen stabilně integrovat. V mé práci se v žádném z pokusů nepodařilo docílit stabilní transformace. Stabilní transformace buněčných suspenzních kultur rajčete (*Lycopersicon esculentum* odrůdy VFNT Cherry a *L. pennellii*) dosáhli ve své práci Van Eck et al. (1995).

Důležitým momentem při transformaci mikroprojektily je bezesporu optimalizace několika faktorů, které úspěšnost této metody významně ovlivňují. Někteří autoři se pak shodují, že maximální transformační účinnosti lze dosáhnout zejména optimalizací velikosti mikroprojektilů, tlaku hélia a vzdálenosti cílové tkáně (např. Heiser, 1998; Sanford et al., 1993). Na základě těchto úvah se základními proměnnými pokusů prováděných v této práci staly právě zmiňované tři parametry. Sledována byla transformační účinnost při velikostech zlatých částic (1,0 a 1,6 μm), při tlaku hélia (900, 1100, 1350 a 1550 psi) a při vzdálenostech cílové tkáně (6, 9 a 12 cm). Zlaté částice byly vybrány z důvodu sférického tvaru, u kterého je předpoklad, že způsobí menší poškození buněk (Southgate et al., 1995). Oproti wolframovým částicím mají výhodu v tom, že nejsou toxické pro žádné typy buněk (Sanford et al., 1993) a nepodléhají povrchové oxidaci, která ovlivňuje navazování DNA na povrch částic a způsobuje degradaci navázané DNA (Russell et al., 1992; Sanford et al., 1993).

Při použití mikroprojektilů o velikosti 1,0 μm se jako nejúspěšnější z hlediska výsledků histochemického stanovení aktivity β -glukuronidázy jevílo použití tlaku 1100 psi a vzdálenosti cílové tkáně 9 cm. V pokusech, kde byly výše uvedené parametry použity, však nikdy nedošlo ke kalogenezi transformovaných explantátů. Kalogeneze byla pozorována při použití tlaku hélia 1350 psi a vzdálenosti cílové tkáně 6 a 9 cm, kde se hodnoty tranzientní exprese pohybovaly v rozmezí pouze 0,5-1,5 modrých skvrn na list. Jeden děložní lístek transformovaný při použití tlaku hélia 1350 psi a vzdálenosti cílové tkáně 6 cm dokonce vytvořil 2 prýty, které však v konečné fázi dosáhly velikosti pouze zhruba 2 mm a pak náhle nekrotizovaly. Jednalo se s největší pravděpodobností o netransformované pletivo, které nebylo schopné děle přežít na médiu, kde bylo ve styku se selekčním agens (kanamycin),

nebo bylo na vině předčasnému odumření prýtů použití staršího média, či starších roztoků růstových látek používaných k přípravě regeneračního média. Tomuto tvrzení by nasvědčoval fakt, že došlo k nekrotizaci i kontrolních rostlin vedených na neselekčním regeneračním médiu. Jako nejúspěšnější se z hlediska histochemického stanovení aktivity β -glukuronidáz jevil pokus, ve kterém bylo použito částic zlata o velikosti 1,6 μm , tlaku hélia 900 psi a vzdálenosti cílové tkáně od záchytné kovové mřížky 6 cm. V tomto případě se však jedná o výsledek na základě pouze jednoho pokusu, takže by bylo vhodné tento výsledek ještě ověřit opětným provedením pokusu.

Důvodem, proč nebylo dosaženo vyšších hodnot tranzientní exprese, mohou být problémy, které nastávají při procesu navazování DNA na mikroprojektily, tzn. nerovnoměrná precipitace DNA na povrchu mikroprojektilů a agregace mikroprojektilů během tohoto procesu. Aby k agregaci nedocházelo, je nutné prodloužit dobu vortexování a minimalizovat dobu precipitace. Někteří autoři (např. Sanford et al., 1993; Southgate et al., 1995) uvádějí, že důležitou roli při úspěšném navázání DNA na povrch mikroprojektilů hraje stáří spermidinu, který se společně s chloridem vápenatým používá k precipitaci DNA na povrchu mikroprojektilů. Autoři dále uvádějí, že stáří spermidinu by nemělo přesáhnout 2 měsíce. Stejně závěry byly vyvozeny i z výsledků mé práce. Další problém nastal při nanášení částic zlata s navázanou DNA na nosič mikroprojektilů. Tehdy docházelo k agregaci mikroprojektilů na určitých místech nosiče. Důsledkem tohoto jevu pak bylo přílišné poranění transformované tkáně a následně její snížená regenerační schopnost. Taylor a Vasil (1991) se setkávali s problémem poškození tkáně v důsledku agregace mikroprojektilů při zkrácení vzdálenosti cílové tkáně od záchytné kovové mřížky.

Na základě výsledků histochemického stanovení aktivity GUS, které poukazovaly na výraznou variabilitu v rámci opakování jednoho pokusu, je možné říci, že transformace mikroprojektily je velmi náhodný proces. Do jisté míry lze účinnost transformace ovlivnit úpravou výše zmiňovaných parametrů, avšak stále se v průběhu celého procesu nacházejí okamžiky, jako např. nerovnoměrná precipitace DNA na povrchu mikroprojektilů a agregace mikroprojektilů, které lze jen stěží ovlivnit.

Závěrem je nutno uvést, že na základě výsledků této práce je možné vyhodnotit *A. tumefaciens* zprostředkovanou transformaci rajčete za úspěšnější a ve výsledku jistější metodu v porovnání s biolistickou transformací. Nevýhodou *A. tumefaciens* zprostředkované transformace však i přes možnost použití supervirulentních kmenů schopných infikovat i některé jednoděložné rostliny (Ishaida et al., 1996; Hiei et al., 1997; Gonzales et al., 1998) zůstává omezené spektrum hostitelských rostlin, nemožnost transformovat rostliny, u nichž

postrádáme vhodný regenerační systém a nemožnost transformovat plastidy (Veluthambi et al., 2003). Pomocí biolistické metody transformace je pak možné tyto nedostatky překonat. Pro transformaci rajčete se však prozatím transformace mikroprojektily nezdá být vhodná.

6 ZÁVĚR

V této práci byl proveden pokus o transformaci děložních lístků rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) odrůdy MoneyMaker za pomoci dvou metod – biolistické metody transformace a transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmene GV3101. K transformaci byl v obou případech použit plazmidový konstrukt 35S gus -int nesoucí gen gus pro β -glukuronidázu a gen $nptII$ pro rezistenci ke kanamycinu.

Mezi oběma metodami byl zjištěn značný rozdíl v dosažené transformační účinnosti. Zatímco *A. tumefaciens* zprostředkovaná transformace poskytla transformační účinnost 23,2%, biolistickou metodou se nepodařilo získat žádného transformanta. Pro potvrzení přítomnosti genu gus v transformovaném rajčatovém genomu (po transformaci zprostředkované *A. tumefaciens*) byla použita analýza pomocí PCR a u vybraných rostlin i analýza histochemická a fluorometrická. Na základě pozitivních výsledků těchto analýz bylo uznáno 73 jedinců jako konečný počet nezávislých transgenních rostlin. Při biolistické metodě transformace bylo z hlediska histochemického stanovení tranzientní aktivity β -glukuronidázy nejvyššího úspěchu dosaženo při použití částic zlata o velikosti 1,6 μm , tlaku helia 900 psi a vzdálenosti cílové tkáně od zachytné kovové mřížky 6 cm. Z hlediska schopnosti regenerace transformovaných explantátů se jako nejúspěšnější jevílo použití částic zlata 1,0 μm , tlaku helia 1350 psi a vzdálenosti cílové tkáně 6 cm, kdy byl transformovaný list schopen vytvořit 2 prýty o velikosti 2 mm.

Z demonstrovaných výsledků vyplývá, že pro transformaci rajčete bude nejvhodnější zvolit metodu transformace prostřednictvím *A. tumefaciens*, neboť biolistická metoda transformace představuje náhodný proces, u kterého nelze spoléhat na jeho účinnost. Transformaci mikroprojektily lze doporučit v případě transformace zejména jednoděložných rostlin, které nejsou *A. tumefaciens* přirozeně infikovány, či při transformaci plastidů a rostlin, u nichž postrádáme vhodný regenerační systém.

7 SEZNAM LITERATURY

Ahokas, H. (1987) Transfection by DNA-associated liposomes evidenced at pea pollination. *Hereditas* 106: 129-138

Armaleo, D., Ye, G-N., Klein, T., Shark, K., Sanford, J., Johnston, S. (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Cur. Genet.* 17: 97-103

Barcelo, P., Lazzeri, P.A. (1998) Direct gene transfer: Chemical, electrical and physical methods. In: Lindsey, K.: *Transgenic plant research*. Harwood academic publishers, Netherlands, 35-49

Bevan, M., Flavell, R. B., Chilton, M. D. (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 185-187

Blažíčková, Jitka. (2007) Rostlinné explantátové kultury a jejich využití pro studium biologie telomer. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Briddon, R., Liu, S., Pinner, M., Markham, P. (1998) Infectivity of African cassava mosaic virus clones to cassava by biolistic inoculation. *Arch. Virol.* 143: 2487-2492

Brown, J., Ostrow, K., Idris, A., Stenger, D. (1999) Biotic, molecular and phylogenetic characterization of bean calico mosaic virus, a distinct Begomovirus species with affiliation in the squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology* 89: 273-280

Brummell, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B., Dunsmuir, P. (1999) Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11: 2203-2216

Castle, L. A., Morris, R. O. (1990) A method for early detection of T-DNA transfer. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 28-39

Cortina, C., Culianez-Marcia, F.A. (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 269-275

Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., Shewmaker, C.K. (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 202: 179-185

Davis, S., Vierstra, R. (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 36: 521-528

De Cleene, M., De Ley, J. (1976) The host range of crown-gall. *Bot. Rev.* 42: 389-466

Draper, J., Davey, M.R., Freeman, J.P., Cocking, E.C., Cox, B.J. (1982) Ti-plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid transformed *Petunia* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 32: 451-458

Ferrando, A., Tartas, A., Jásik, J., Schell, J., Koncz, C. (2000) Intron tagged epitope: a

tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium* transformed plant cells. *Plant J* 22: 553- 560

Filichkin, S.A., Gelvin, S.B. (1993) Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. *Mol. Microbiol.* 8: 915–926

Finer, J., Finer, K., Ponappa, T. (1999) Particle bombardment mediated transformation. In: Hammond, J., McGarvey, P., Yusibov, V., (eds): *Plant Biotechnology*. Springer, Berlin, 59-80

Fraley, R. T., Horsch, R. B., Matzke, A., Chilton, M. D., Chilton, W. S., Sanders, P. R. (1984) In vitro transformation of petunia cells by an improved method of co-cultivation with *A. tumefaciens* strains. *Plant Mol. Biol.* 3: 371-378

Fromm, M., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J., Klein, T. (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize. *Bio/Technology* 8: 833-839

Gad, A. E., Rosenberg, N., Altmann, A. (1990) Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant.* 79: 154-157

Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, E., Gaba, V. (1997) Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *J. Virol. Methods* 64: 103-110

Gelvin, S.B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 16-37

Gonzalez, A., Schopke, C., Taylor, N., Beachy, R., Fauquet, C. (1998) Regeneration of transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 17: 827-831

Gordon-Kamm, W., Spencer, T., Mangano, M., Adams, T., Daines, R., Stuart, W., O'Brien, J., Chambers, S., Adams, W., Willets, N., Rice, T., Mackey, C., Krueger, R., Kausch, A., Lemaux, P. (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile plants. *Plant Cell* 2: 603-618

Gray, J., Picton, S., Shabbeer, J., Schuch, W., Grierson, D. (1992) Molecular Biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.* 19: 69-87

Grierson, D. (1998) Manipulation of fruit ripening by genetic modification. In: Lindsey, K.: *Transgenic plant research*. Harwood Academic Publishers, Netherlands, 109-121

Grierson, D., Fray, R.G. (1994) Control of ripening in transgenic tomatoes. *Euphytica* 79: 251-263

Grierson, D., Maunders, M.J., Slater, A., Ray, J., Bird, C.R., Schuch, W., Holdsworth, M.J., Tucker, G.A., Knapp, J.E. (1986) Gene expression during tomato ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B314*: 399-410

Grierson, D., Schuch, W. (1993). Control of ripening. *Philosophical Transactions of the*

Royal Society of London 342: 241-250

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (1998) An introduction to genetic analysis. WH Freeman and Company, New York.

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

Hellens, R., Mullineaux, P., Klee H. (2000) Technical focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5: 446-451

Hiei, Y., Komari, T., Kubo, T. (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35: 205-218

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179, 180

Horsch, R. B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231

Hu, W., Phillips, G.C. (2001) A combination of overgrowth-control and antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). *In Vitro Cell. Biol. Plant* 37: 12-18

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

Chilton M. D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1977) Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell* vol. 11: 263-271

Christie, P.J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochem. Biophys. Acta* 1694: 219–234

Christou, P. (1995) Particle bombardment. *Methods in Cell Biol.* 50: 375-382

Chyi, Y.S., Jorgensen, R.A., Goldstein, D., Tanksley, S.D., Loaizafigueroa, F. (1986) Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated transfer DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.* 204: 64-69

Ishaida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. (1996) High frequency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotech.* 14: 745-750

James, C. (2001) Global Review of Commercialized Transgenic Crops. ISAAA Briefs No. 24. ISAAA: Ithaca, NY

Janssen, B. J., Gardner, R. C. (1989) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.* 14: 61-72

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a

sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-7

Jung, C., Cai, D.G., Kleine, M. (1998) Engineering nematode resistance in crop species. *Trends Plant Sci.* 32: 266-270

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., Angenon, G. (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122: 101-108

Kikkert, J. (1993) The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 221-226

Klein, T., Arentzen, R., Lewis, P., Fitzpatrick-Mcelligott, S. (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10: 286-291

Klein, T., Harper, E., Svab, Z., Sanford, J., Fromm, M., Maliga, P. (1988) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8502-8505

Kleinhofs, A., Behki, R. (1977) Prospect for plant genome modification by nonconventional methods. *Annu. Rev. Genet.* 11: 79-101

Kobelková, A. (2002) Optimalizace transformačního procesu u lnu setého (*Linum usitatissimum* L.). Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta

Komari, T., Hiei, Y., Ishida, Y., Kumashiro, T., Kubo, T. (1998) Advances in cereal gene transfer. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 161-165

Krasnyanski, S.F., Sandhu, J., Domier, L.L., Buetow, D.E., Korban, S.S. (2001) Effect of an enhanced CaMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on UDA gene expression in transgenic tomato plants. *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Plant* 37: 427-433

Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Schilperoot, R.A. (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74

Ledoux, L., Huart, R. (1969) Fate of exogenous bacterial deoxyribonucleic acids in plant seedling. *J. Mol. Biol.* 2: 208-218

Lee, J.T., Prasad, V., Yang, P.T., Wu, J.F., Ho, T.H.D., Charng, Y.Y., Chan, M.T. (2003) Expression of Arabidopsis CBF1 regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell Environ.* 26: 1181-1190

Lessard, P., Kulaveerasingam, H., York, G., Strong, A., Sinskea, A. (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering* 4: 67-79

Ling, H.Q., Kriseleit, D., Ganal, M.W. (1998) Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep.* 17: 843-847

- Luehrsen, K.R., de Wet, J.R., Walbot, V.** (1992) Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol.* 216: 397-414
- Mayfield, S., Kindle, K.** (1990) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2087-2091
- McCabe, D., Swain, W., Martinell, B., Christou, P.** (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. *Bio/Technology* 6: 923-926
- Meins, F.** (2000) RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43: 261-273
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A.** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant J.* 112: 1465-1472
- Millar, A., Short, S., Hiratsuka, K., Chua, N., Kay, S.** (1992) Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 324-337
- Mlynárová, L', Nap, J-P.** (1997) *Gene Transfer and Expression in Plants.* Veda Publishing House of the Slovak Academy of Science, Bratislava
- Morikawa, H., Iida, A., Matsui, C., Ikegami, M., Yamada, Y.** (1986) Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. *Gene* 41: 121-124
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Neumann, E., Rosenheck, K.** (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology* 10: 279-290
- Niedz, R.P., Sussman, M.R., Satterlee, J.S.** (1995) Green fluorescent protein: an in vivo reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep.* 14: 403-406
- 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. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha*
- Park, S.H., Morris, J.L., Park, J.E., Hirschi, K.D., Smith, R.H.** (2003) Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J. Plant Physiol.* 160: 1253-1257
- Picton, S., Barton, S.L., Bouzayen, M., Hamilton, A.J., Grierson, D.** (1993) Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant L.* 3: 469-481
- Potrykus, F.** (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225

Příkrylová, P. (2004) Použití genu pro manóza-6-fosfátizomerázu jako alternativního selektovatelného genu při transformaci rajčete. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta

Redenbaugh, K., Berner, T., Emlay, D., Frankos, B., Hiatt, W., Houck, C., Kramer, M., Malyj, L., Martineau, B., Rachman, N., Rudenko, L., Sanders, R., Sheety, R., Wixtrom, R. (1993) Regulatory issues for commercialization of tomatoes with an antisense polygalacturonase gene. *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Plant* 29: 17-26

Reich, T. J., Iyer, V. N., Miki, B. L. (1986) Efficient transformation of alfalfa protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Biotechnology* 4: 1001-1004

Rhim, S.L., Cho, H.J., Kim, B.D., Schnetter, W., Geider, K. (1995) Development of insect resistance in tomato plants expressing the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*. *Mol. Breeding* 1: 229-236

Rosypal, S., Poškař, J., Petrzik, K., Růžičková, V. (2002) Úvod do molekulární biologie. GRAFEX, Brno.

Russell, J. A., Kikkert, J. (1993) The biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 221-226

Russell, J. A., Roy, M. K., Sanford, J. C. (1992) Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* 98: 1050-1056

Sanford, J., Klein, T., Wolf, E., Allen, N. (1987) Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech.* 5: 27-37

Sanford, J.V., Smith, F.D., Russell, J.A. (1993) Optimising the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217: 483-509

Seed, B., Sheen, J.Y. (1988) A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 30;67(2): 271-7

Senaratna, T., McKersie, B.D., Kasha, K., Procunier, J.D. (1991) Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells. *Plant Sci.* 879: 223-228

Sheety, R.E., Kramer, M., Hiatt, W.R. (1988) Reduction of polygalacturonase activity tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8805-8809

Schopke, C., Taylor, N., Cárcamo, R., Beachy, R., Fauquet, C. (1997) Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. *Plant Cell Rep.* 16: 526-530

Smith, C.J.S., Watson, C.F., Ray, J., Bird, C.R., Morris, P.C., Schuch, W., Grierson, D. (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene-expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334: 724-726

Smith, F., Herpending, P., Sanford, J. (1992) Biolistic transformation of prokaryotes-factors that affect transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.* 138: 239-248

Southgate, E., Davey, M., Power, J., Marchant, R. (1995) Factors affecting the genetic engineering of plants by microparticle bombardment. *Biotechnol. Adv.* 13: 631-651

Striekema, W.J., Visser, L. (1993) Přenos genů a přenášené geny. In: *Biotechnologické inovace ve šlechtění plodin*. Jones, L. (eds.), editor českého vydání Ondřej, M., Dům techniky, České Budějovice: 236-240

Sun, H.J., Uchii, S., Watanabe, S., Ezura, H.A. (2006) Highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.* 47: 426-431

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005) *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně, Brno

Taylor, M.G., Vasil, L.K. (1991) Histology of, and physical factors affecting, transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. *Plant Cell. Rep.* 10: 120-125

Tzfira, T., Citovsky, V. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion Bitech.* 17(2): 147-54

Vain, P., Finer, K., Enhler, D., Pratt, D., Finer, J. (1996) Intron-mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays* L.) and bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 489-494

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

Van Eck, J.M., Blowers, A.D., Earle, E.D. (1995) Stable transformation of tomato cell-cultures after bombardment with plasmid and YAC DNA. *Plant Cell Rep.* 14: 299-304

Van Haaren, M.J.J., Sedee, N.J.A., Krul, M., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J.J. (1988) Function of heterologous and pseudo border repeats in T region transfer via the octopine virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 11: 773-781

Veluthambi, K., Gupta, A.K., Sharma, A. (2003) The current status of plant transformation technologies. *Current Sci.* 84: 374

Vidya, C.S.S., Manoharan, M., Kumar, C.T.R., Savithri H.S., Sita, G.L. (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* var Pusa Ruby) with coat-protein gene of *Physalis* mottle tymovirus. *J. Plant Physiol.* 156: 106-110

Vyroubalová, Š. (2004) Sledování fenotypových změn u transgenních rostlin *Arabidopsis* over-exprimující cytokoninoxidasu/dehydrogenasu. *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta

Weising, K., Kahl, G. (1996) Natural genetic engineering of plant cells: The molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World Journal of Microbiology &*

Biotechnology 12: 327-351

Weising, K., Schell, J., Kahl, G. (1988) Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22: 421-77

Witham, S., McCormick, S., Baker, B. (1996) The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8776-8781

Wostemeyer, A., Otten, L., De Greeve, H., Hernalsteens, J. P., Leemans, J., Montagu, M. van, Schell, J. (1983) Regeneration of plants from crown gall cells: a step in the T-DNA mediated genetic engineering of plants. In: Lurquin, P. F., Kleinhofs, A. (eds): *Genetic Engineering in Eukaryotes*. Plenum Press, New York and London, 137-154

www.bio-rad.com

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

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 J.* 2: 2143-2150

Žaludová, J. (2002) Transformace rajčete pomocí *Agrobacterium tumefaciens* s různými expresními kazetami nesoucími hybridní gen z lidského papillomaviru. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta