

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

katedra rostlinné výroby

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Charakteristiky a úroveň exprese
transgenů v rostlinných
transformantech modifikovaných
jedním konstruktem s genem pro
inhibitor proteáz**

Akademická knihovna JU



3291022496

Jméno: František Bezunk

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.

Datum odevzdání: 30. 4. 2009

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby
Akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. František BEZUNK**

Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**

Název tématu: **Charakteristiky a úroveň exprese transgenů v rostlinných transformantech modifikovaných jedním konstruktem s genem pro inhibitor proteáz**

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

Cíl práce:

Určit a vzájemně porovnat molekulární charakteristiky a genovou expresi transgenních jedinců tabáku získaných při transformacích rostlin jedním konstruktem:

Chimérickým genem *SPI2-GFP* vzniklým spojením genu pro zeleně fluoreskující protein (GFP) a *spi-2* jako jedné z alternativ tvorby navozování odolnosti plodin vůči patogenním organismům a hmyzím škůdcům.

Úvod - stručné objasnění tématu a jeho významu pro zemědělství.

Literární přehled - možnosti využití technik genového inženýrství při navozování odolnosti plodin k mikrobiálním a houbovým patogenům, fytofágnímu hmyzu.

Metodický postup:

Odvodit transformanty s fúzním genem *SPI2-GFP*, ověřit expresi GFP na základě fluorescence a analyzovat na přítomnost transgenů (PCR). Kvantifikovat množství rekombinátního proteinu pomocí ELISA a intenzitu fluorescence.

Výsledková část - údaje o segregacích, výsledcích molekulárních detekcí a další uspořádat do tabulek a grafů. Zahrnout fotografickou dokumentaci gelů, mikroskopických pozorování a postupů.

Diskuze - porovnat vlastní dosažené výsledky s literárními údaji.

Závěr - shrnutí výsledků vlastní práce.

Seznam literatury - abecedně uspořádané citace prací použitých pro diplomovou práci.

Rozsah grafických prací: 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Ondřej, M.: Genové inženýrství rostlin. Academia, Praha 1992, 232 str.
Halford, N.: Plant Biotechnology. Current and Future Applications of Genetically Modified Crops. John Wiley -Sons, Ltd, Chichester 2006, 303 str.

Vědecké a odborné časopisy: Plant Cell Rep., Plant Mol. Biol., Theor. Appl. Genet., EMBO J. a další.


Internetové databáze Current Contents, Web of Science, Scopus, AGRIS, aj.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.
Katedra genetiky

Datum zadání diplomové práce: 14. března 2008

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2009

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13 ④
370 05 České Budějovice

V.Š. 
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 14. března 2008

Anotace

Rostliny tabáku byly transformovány bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidovým konstruktem nesoucím fúzní gen SPI2:GFP a selektovatelný znak rezistence rostlin ke kanamycinu (NPTII). Gen SPI2:GFP byl vytvořený fúzí genů SPI2 (kódujícího inhibitor proteáz serinového typu) a GFP (pro zeleně fluoreskující protein – „green fluorescent protein“). Selektce transgenních tabáků byla provedena na médiu s kanamycinem. U vyselektovaných jedinců byly stanoveny a statisticky vyhodnoceny štěpné poměry. Přítomnost a funkčnost transgenní DNA byla ověřena metodami PCR, RT-PCR, Western blot a studiem exprese reportérového genu GFP na základě fluorescence v rostlinách transformantů T₀ a T₁ generace pomocí stereomikroskopu se speciálním nástavcem pro GFP. Byla zjištěna nízká úroveň exprese reportérového genu GFP, která byla pravděpodobně způsobena, při tvorbě fúzního genu, odstraněním části sekvence zodpovědné za transport transgenního proteinu do endoplazmatického retikula. Jako výstup této diplomové práce prováděné v rámci projektu Výzkumných center MŠMT 1 M06030 byly získány transgenní genotypy *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana, SR1 WT, u nichž byla prokázána exprese transgenní DNA na úrovni syntézy mRNA a fluorescence produktu reportérového genu GFP.

klíčová slova: transformace rostlin, tabák, exprese transgenu, GFP, inhibitory proteáz, NPTII

Annotation

Tobacco plants were transformed by bacteria *Agrobacterium tumefaciens* bearing a plasmid construct with a fusion gene SPI2:GFP and selectable marker NPTII coding for resistance of transformants to antibiotic kanamycin. SPI2:GFP gene was created by a fusion of SPI2- (for serine protease inhibitor) and GFP gene (coding for a green fluorescent protein - GFP) sequences. Transformed tobacco plants were selected on a medium with kanamycin. Positively selected plants were selfed and segregation ratios for NPTII determined for each of genotypes. The presence and function of transgenic DNA was verified by methods of PCR, RT-PCR, Western blot and using the stereomicroscopic fluorescence study of transformants of T₀ and T₁ generations. This Transgenic genotypes of tobacco *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana, SR1 WT

showing the expression of the fused gene SPI2:GFP on a level of mRNA and GFP protein were obtained. Thesis was performed with a support of the project No. M106030 of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Key words: plant transformation, tobacco, transgene expression, GFP, protease inhibitors, NPTII

Děkuji RNDr. Slavomíru Rakouskému, CSc., za odborné vedení při tvorbě této magisterské práce. Dále děkuji Mgr. Martinu Divišovi za technickou spolupráci při zpracování obrazové dokumentace.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, a že jsem uvedl veškerou použitou literaturu.

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2009



.....
František Bezunk

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	10
2.1. Geneticky modifikované (GM) plodiny	10
2.2. GM plodiny s rezistencí k hmyzím škůdcům, houbovým patogenům a mikroorganismům	11
2.2.1. Plodiny s vneseným transgenem z bakterie <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt-plodiny)	11
2.2.2. Virus-rezistentní plodiny	12
2.2.3. Plodiny exprimující geny pro inhibitory proteáz	13
2.2.4. Další možnosti genového inženýrství k navození rezistence vůči rostlinným patogenům a škůdcům	15
3. Cíl magisterské práce	17
4. Materiál a metodický postup	18
4.1. Materiál použitý k transformaci	18
4.1.1. Fúzní gen SPI2:GFP	18
4.1.2. Média použitá při transformaci a kultivaci	19
4.2. Metodický postup	20
4.2.1. Transformace	20
4.2.2. Kultivace v kultivační místnosti	20
4.2.3. Pěstování rostlin T ₀ generace v GMO skleníku	21
4.2.4. Selektce rostlin tabáku T ₀ generace	22
4.2.5. Charakterizace vybraných jedinců T ₁ generace	22
4.2.5.1. Detekce transgenů	22
4.2.5.2. Molekulární průkaz exprese fúzního genu SPI2:GFP v rostlinách	24
4.2.6. Studium exprese genu SPI2:GFP	25
5. Výsledky	26
6. Diskuze	32
7. Závěr	35
8. Seznam použité literatury	36
9. Přílohy	42

1. Úvod

Rostliny si během svého dlouhého vývoje v průběhu evoluce vyvinuly různé obranné systémy, které navozují rezistenci k chorobám a škůdcům. Mezi tyto obranné systémy můžeme zařadit tvorbu některých rostlinných toxických látek (např. lektinů), inhibitorů proteolytických enzymů, glykohydrolázy, produkty genů rezistence atd.

V průběhu domestikace a šlechtění kulturních odrůd docházelo k postupnému vytrácení vloh pro tyto obranné systémy rostlin. V současné době je naopak šlechtění na rezistenci k chorobám a škůdcům téměř u všech plodin jedním z prvořadých šlechtitelských cílů. Rezistentní šlechtění je však z pohledu šlechtitelského velmi limitováno a to především:

- nedostatkem genetických zdrojů rezistence
- neznalostí či složitým založením znaků rezistence
- nutností zachovat požadovanou biologickou, morfologickou, biochemickou, a fyziologickou hodnotu šlechtěné plodiny

Nové poznatky v oblasti biologie, zejména molekulární biologie, rozšířily možnosti šlechtitelů v oblasti rezistenčního šlechtění. Metodami genového inženýrství lze upravovat či cíleně vkládat do genomu kulturních plodin geny, jejichž expresí mohou rostliny získávat nové vlastnosti, např. i rezistenci k chorobám a k fytofágním škůdcům. Názorným příkladem mohou být v současné době již velmi rozšířené a úspěšné Bt-plodiny rezistentní k různým hmyzím škůdcům. U těchto plodin se k navození rezistence k fytofágním škůdcům využívá gen získaný z bakterie *Bacillus thuringiensis*.

Cílem této práce byla transformace rostlin tabáku fúzním genem SPI2:GFP, získání transgenních rostlin exprimujících gen SPI2:GFP a studium exprese fúzního genu SPI2:GFP. Gen SPI2:GFP byl vytvořený fúzí dvou genů SPI2 (kódujícího inhibitor proteáz serinového typu) a GFP (zeleně fluoreskující protein – „green fluorescent protein“). Gen SPI2, respektive jeho cDNA, byla odvozena z mRNA, vyskytující se ve vláknech kokonu larvy zavíječe moučného (*Galleria mellonella*). Inhibitory proteáz jsou v přírodě velmi rozšířené a vykonávají různé funkce, včetně obrany rostlin a živočichů proti mikrobiálním patogenům [68]. To je zřejmě hlavní funkcí inhibitorů obsažených ve vláknech hmyzu [69, 70].

Pro usnadnění selekce transgenních rostlin a možnost sledování exprese transgenu SPI2:GFP byl použit markerový gen pro GFP. Expresi tohoto genu můžeme pozorovat s použitím fluorescenčního mikroskopu bez nutnosti přidání exogenních či endogenních látek.

Získané vybrané transgenní rostliny tabáku budou použity v dalším studiu pro testování rezistence k mikrobiálním patogenům. Očekává se, že by takto modifikované rostliny díky přítomnosti SPI2 proteinu, stejně jako vlákna kokonu hmyzu, mohly lépe odolávat mikrobiálnímu ataku.

2. Literární přehled

2.1. Geneticky modifikované (GM) plodiny

GM plodiny jsou rostliny jejichž dědičný materiál byl cíleně změněn vložením cizorodého dědičného materiálu nebo vynětím části vlastního dědičného materiálu technickým postupem stanoveným zákonem [1].

Zákon tedy přesně definuje, které techniky vedou ke vzniku geneticky modifikovaného organismu (GMO, genetically modified organism) a které nikoli. Zjednodušeně řečeno, těmito technikami, jejichž životaschopné produkty podléhají speciálnímu režimu, jsou metody genového inženýrství. Problematika GMO je však složitější, než by se na první pohled mohlo zdát.

Ve skutečnosti pojem GMO je pouze úředním označením organismu vzniklého určitou metodou. Z pohledu biologického je totiž každý organismus geneticky modifikovaný, například vlivem chromosomálních aberací, které vznikají spontánně a nebo mohou být indukovány mutageny. Mutace jsou zdrojem veškeré genetické a následně biologické diverzity (různorodosti živých organismů) [2].

S pěstováním GM plodin se začalo v USA v roce 1996 a výměra oseté plochy tehdy činila pouhých 1,7 mil. ha. V roce 2007 již byly GM plodiny pěstovány v celosvětovém měřítku na ploše 114 mil. ha [3]. Z hlediska praktické využitelnosti můžeme modifikace GM plodin rozdělit do tří základních skupin:

1. GM plodiny tolerantní k herbicidům – Z hlediska pěstování patří mezi nejpočetnější skupinu GM plodin. Tyto plodiny využívají genetickou modifikaci ke zvýšení odolnosti vůči aktivním látkám některých herbicidů (např. glyfosátu, fosfinotricinu, bromoxynilu).
2. GM plodiny rezistentní k hmyzím škůdcům, houbovým patogenům a mikroorganismům.
3. Ostatní GM plodiny – Do této skupiny můžeme zařadit plodiny se změněnými nutričními vlastnostmi (změněné složení škrobů a olejů, vyšší obsah vitamínů) a plodiny s uplatněním ve farmaceutickém průmyslu a zdravotnictví (jedlé vakcíny, výroba enzymů).

GM plodiny (stejně jako všechny GMO) podléhají vlastní legislativě a na jejich bezpečné nakládání dohlížejí kontrolní orgány. Ve Spojených státech amerických od roku 1986 kontrolu a bezpečné nakládání zajišťují tři federální úřady: Správa potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration), Úřad pro ochranu životního prostředí (EPA – Environment Protection Agency) a Veterinární a rostlinolékařská inspekce Ministerstva zemědělství (APHIS – Animal and Plant Health Inspection Service of the Department of Agriculture) [10].

V zemích EU je veškerá manipulace s GM plodinami (platí i pro ostatní GMO) ve vztahu k životnímu prostředí (pěstování na úrovni polních pokusů, běžné – velkoplošné pěstování, a další uvolnění na „trh“) řízena Směrnicí 2001/18/ES. Hodnocení rizik spojené s používáním GM plodin jako potravin a krmiv provádí Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA) podle Nařízení ES 1829/2003 (o GM potravinách a krmivech). Rozhodnutí k povolení o pěstování a využívání (uvádění do oběhu ve smyslu legislativy ČR) v zemích EU může vydat Rada ministrů pro životní prostředí, hlasováním členských států. Pokud při hlasování k rozhodnutí nedojde, rozhodne Evropská Komise.

2.2. GM plodiny s rezistencí k hmyzím škůdcům, houbovým patogenům a mikroorganismům

2.2.1. Plodiny s vneseným transgenem z bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt-plodiny)

Ekologičtí zemědělci již po mnoho desetiletí používají pesticidy vycházející z půdních bakterií, *Bacillus thuringiensis*. Tyto bakterie produkují tzv. krystalické (Cry) proteiny. Trávicí enzymy hmyzu rozkládají tyto proteiny a aktivují toxickou složku nazývanou δ -endotoxin. Tento toxin se specificky váže na receptory v apikální části kartáčovité membrány epitelu středního střeva citlivého hmyzu ve dvou fázích, z nich druhá je již ireverzibilní. Po průniku toxinu do buněk sliznice střeva dochází k poškození plasmatické membrány a postupné destrukci střeva. Celý děj je podobný plazmolýze [4]. Díky poměrně úzkému rozsahu působnosti δ -endotoxinu, toxin působí jen na cílového škůdce a ne například na užitečný hmyz a rostliny, se mohl stát součástí integrované ochrany rostlin [5].

Přímé používání bakterií *Bacillus thuringiensis* v bioinsekticidech má však jisté nevýhody. Především nestabilitu preparátu za deště a přímého slunečního záření a neefektivnost vůči škůdcům nacházejícím se uvnitř rostliny. Využití insekticidních vlastností této bakterie produkcí jejího proteinu samotnou GM rostlinou tyto nevýhody odstraňuje [6].

V současnosti je definováno 6 tříd klasifikujících Cry proteiny, Cry1 – Cry6, které jsou dále detailně členěny na podtřídy (např. Cry1A až Cry1F, Cry2A a B, Cry 3A až C). Každá z tříd Cry proteinů je charakterizována velikostí proteinů (molekulární hmotností v kDA) a je implicitně vázána na specifický okruh hostitelů (např. Cry1A – na larvy motýlů) [7].

V USA byly schváleny pro komerční pěstování čtyři Bt-plodiny (kukuřice, bavlna, brambory a sladká kukuřice) s několika variantami transgenů Cry. Bt-hybridy kukuřice rezistentní vůči zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) MON 810 a Bt11 produkují protein Cry1A(b).

Bt-kukuřice MON 863 produkuje protein Cry3Bb1, jenž je toxický pro larvy bázlivce kukuřičného. Larvy bázlivce kukuřičného se vyvíjejí v půdě, kde se živí požíráním kořínků kukuřice. Jen v USA v roce 2000 činily náklady vynaložené na insekticidy proti bázlivci kukuřičnému v konvenčním zemědělství 171 mil. US \$ [8].

U Bt-bavlníku jsou k získání rezistence proti černopásce bavlníkové (*Helicoverpa armigera*) a makadlovce bavlníkové (*Pectinophora gossypiella*) používány proteiny Cry1Ac a Cry2Ab. Z marketingových důvodů byly Bt-brambory a Bt-sladká kukuřice pěstovány jen v letech 1996 a 1998 [8].

2.2.2. Virus-rezistentní plodiny

Využití genu pro obalový protein viru (CP, coat protein) je nejběžnější používanou technikou genového inženýrství navozující u rostlin rezistenci k příslušnému viru. V USA jsou od roku 1998 pěstovány dvě virus-rezistentní plodiny papája a dýně [8]. GM papája rezistentní k viru kroužkovitosti papáji (PRSV, papaya ringspot virus) byla vytvořena vložením sekvence kódující CP z viru PRSV. GM dýně (*Curcubita pepo* L.) získala vložením tří různých sekvencí CP genu rezistenci proti třem typům virů: CMV (cucumber mosaic cucumovirus), ZYMV (zucchini yellow mosaic potyvirus) a WMV2 (watermelon mosaic potyvirus) [9]. Specifický mechanismus pro CP-zprostředkovanou rezistenci není dodnes zcela objasněn [10].

U GM bramboru (cv. Russet Burbank NewLeaf®Plus) byla rezistence k viru svinutky bramboru (PLRV, potato leafroll luteovirus) navozena vložením DNA sekvence z PLRV shodující se se sekvencí otevřeného čtecího rámce ORF-1 (open reading frame) a ORF-2 [9]. Tato rezistence je založena na principu umlčování genu „gene silencing“. K post-transkripčnímu umlčování genů dochází nejen v rostlinách ale i u jiných eukaryot. Také je známé jako RNA interference nebo RNA silencing. RNA interference je způsobena působením enzymů komplexů Dicer a RISC, které degradují dvouvláknové řetězce RNA [11, 12].

Transgenní rajče, exprimující protismyslovou RNA viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd, Potato spindle tuber viroid, Pospiviroidae) a akumulující vysoké množství této RNA, vykazovalo rezistenci k viroidu PSTVd [13]. RNA silencing může být také využit k navození rezistence proti DNA virům (caulimoviry, geminiviry) [14].

Rezistenci vůči virům můžeme navodit také pomocí nefunkčního nebo mutantního genu MP (movement protein). Transgenní rostlina exprimující MP viru mozaiky tabáku (TMV, tobacco mosaic virus) vykazovala příznaky rezistence. Účinná rezistence byla opětovně pozorována i vůči taxonomicky vzdáleným virům [15].

Teoreticky velké riziko může představovat rekombinace mezi virovou transgenní RNA a genomickou RNA a také s RNA necílového viru. Rekombinace v transgenních rostlinách exprimujících virovou sekvenci, by mohla být příčinou vzniku nového viru [15]. Tímto by mohla být narušena přirozená virová rezistence u některých jiných plodin rezistentních k viru.

Na základě podrobných analýz virových sekvencí použitých dosud jako transgeny však tato rizika zatím nebyla potvrzena [66, 67].

2.2.3. Plodiny exprimující geny pro inhibitory proteáz

Inhibitory proteáz (PI) jsou nesmírně širokou skupinou proteinů, vyskytující se u rostlin, živočichů i mikroorganismů. Z hlediska klasifikace představují značně heterogenní skupinu [16]. Rostlina produkuje inhibitory proteáz jako odpověď na její požíráání nebo poranění a PI jsou obvykle aktivovány proti endoproteázám [17]. Solomon et al. [18] prokázali, že geny pro inhibitory proteáz slouží v rostlinách také jako modulátory programované buněčné smrti (PCD, programmed cell death). Spuštěním PCD tak nepřímo chrání rostliny před infekcí patogenními organizmy [19].

PI jsou proteolytické enzymy a na základě typu jejich aktivní aminokyseliny v jejich reakčním centru je rozdělujeme do čtyř tříd [20]:

1. Inhibitory proteáz serinového typu (SPI) – SPI jsou univerzální pro celou říši rostlin a byly již charakterizovány u různých druhů rostlin. Jsou nejvíce prozkoumanou třídou PI a to především SPI Kunitzova-typu a Browman-Birkova.
2. Inhibitory proteáz cysteinového typu (CPI) – Jsou druhou nejprostudovanější třídou PI a byly identifikovány a charakterizovány u různých druhů rostlin. Dosud připravené transgenní plodiny s vloženým genem pro CPI vykazovaly dostatečnou úroveň ochrany proti hmyzu. Většina fytofágního hmyzu totiž využívá při trávení cysteinové proteázy [19].
3. Inhibitory proteáz asparátového typu (API) – API jsou proti předcházejícím dvou třídám méně známé.
4. Metaloproteázové inhibitory (MPI) – taktéž i MPI jsou méně známé. Inhibitory metalokarboxypeptidázy byly zjištěny u takových plodin jako jsou rajčata a brambory.

Je také známo, že rostlinné inhibitory proteáz účinkují jako přirozená ochrana proti hlísticím. Mnohé GM plodiny s vloženým transgenem pro CPI byly účinně chráněny proti parazitickému stadiu hlístice *Rotylenchulus reniformis* [21]. Gen pro rýžový CPI vložený do rostlin tabáku navozoval jejich rezistenci ke dvěma významným virům: TEV (tobacco etch virus) a Y viru brambor (PVY, potato virus Y) [22]. Inhibitory proteáz se také ukazují jako vhodná přirozená ochrana rostlin proti houbovým patogenům [23].

U hmyzu PI inhibují proteázovou aktivitu trávicích enzymů a tím snižují množství stráveného proteinu. Inhibice proteáz zároveň vede k nadprodukcí trávicích enzymů, což má za následek vyčerpání rezerv jejich sirných aminokyselin. V důsledku tohoto může dojít k oslabení hmyzu, omezení jeho vývoje a často i k jeho smrti [24]. Významným omezením strategií ochrany rostlin založených na využití transgenů pro PI proti fytofágnímu hmyzu může být nesmírně velká variabilita trávicích proteáz enzymů hmyzu.

GM plodiny s vloženými geny pro PI mohou vykazovat zvýšenou rezistenci k mikroorganismům, houbovým patogenům a hmyzu. V současné době ještě není komerčně pěstována žádná GM plodina využívající PI. Dosavadní výsledky výzkumu

ale naznačují, že by se tyto plodiny mohly stát součástí integrované ochrany rostlin. Současné není známo, že by PI měly toxický nebo škodlivý účinek na savce [19].

2.2.4. Další možnosti genového inženýrství k navození rezistence vůči rostlinným patogenům a škůdcům

Rostliny vyvinuly důmyslný obranný systém, který je často soustředěn v semenech, jež jsou prostředkem k jejich přežívání a množení. Mezi nejznámější rostlinné proteiny, které patrně mohou souviset s obranným mechanismem jsou lektiny, ribozomy-inaktivující proteiny, glykohydrolázy a již dříve zmiňované inhibitory proteolytických enzymů (PI).

Lektiny jsou v přírodě velice rozšířené a jejich přítomnost byla prokázána u rostlin, živočichů, virů i bakterií. Využití těchto glykoproteinů v genovém inženýrství, i přes jejich známou entomotoxicitu, je převážně omezeno jejich toxicitou k savcům a necílovému hmyzu [25].

Větší uplatnění pro genové inženýrství by mohly znamenat geny kódující inhibitory α -amyláz. α -Amylázy jsou přirozeně se vyskytující hydrolytické enzymy nacházející se v mikroorganismech, zvířatech a rostlinách. Inhibitory α -amyláz mohou být velkým přínosem jako možný významný prostředek přirozené a genovým inženýrstvím navozené rezistence GM plodin proti škůdcům [26, 27, 28].

Podle hypotézy „gen-pro-gen“ [29], rezistenci k chorobám, začínající rozpoznáním patogenní virulence, způsobují u rostlin R proteiny (R geny) [30]. Bylo zatím charakterizováno a zaklonováno přes 30 rostlinných R genů, navozujících rezistenci k bakteriím, houbám, virům, hlísticím nebo hmyzu [31, 32]. V Mexiku a Guatemale volně rostoucí diploidní (2n) druh brambor *Solanum bulbocastanum* je již dlouhou dobu známý svojí velkou rezistencí k plísni bramborové (*Phytophthora infestans*) [33]. Možnost začlenění genů podmiňujících tuto rezistenci do kulturních odrůd brambor (4n) pomocí šlechtitelských metod je velmi omezena rozdílným stupněm ploidie obou druhů. I přes 40 let trvající snahu šlechtitelů, nebyl dosud získán komerčně pěstovaný rezistentní kultivar [34]. V roce 2006 začaly být v polních pokusech ve Švédsku, v Holandsku a Německu testovány GM linie brambor s geny Rpi-blb2 a Rpi blb1. Tyto R geny by měly být zodpovědné za rezistenci rostlin *S. bulbocastanum* k plísni bramborové [35].

Předpokládá se, že mnohé geny kódující obranné systémy rostlin (R geny, lektiny, inhibitory proteolytických enzymů, ribozomy-inaktivující proteiny, atd.) mohly být z genomu kulturních rostlin ztraceny v průběhu domestikace a šlechtění vlivem nepřírozené selekce.

3. Cíl magisterské práce

Cílem magisterské práce byla transformace rostlin tabáku konstruktem obsahujícím chimérický gen SPI2:GFP. Analyzovat transformované jedince molekulárními metodami PCR, RT-PCR na přítomnost transgenů SPI2:GFP a NPTII. Ověřit, že dochází k translaci těchto genů na základě růstu transgenních tabáků na selekčním médiu a metodou Western blot.

Chimérický gen byl vytvořen spojením genu pro inhibitor proteáz serinového typu SPI2 s reportérovým (markerovým) genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP). Předpokládá se, že gen SPI2 by mohl v rostlinách navozovat větší odolnost proti některým chorobám a hmyzím škůdcům. Gen GFP patří mezi reportérské geny a jeho exprese v transgenních organismech může usnadnit selekci transformovaných jedinců. Transformované rostliny tabáku by měly sloužit jako modelový organismus k ověření účinku SPI2:GFP proteinu v rostlinách.



4. Materiál a metodický postup

4.1. Materiál použitý k transformaci

Pro transformaci byly použity rostliny tabáku *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana, SR1 WT [36], pěstované v *in vitro* podmínkách. Transformace byla provedena pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* kmene LBA 4404 obsahujícího plazmidový binární vektor pBINm-gfp5-ER (získaný od J. Hasseloffa, Department of Plant Sciences, University of Cambridge, UK), v případě fúzního genu upravený (dr. Navrátil, Ústav experimentální botaniky, v.v.i. AV ČR, Praha) a označovaný jako PRD400-FÚZE 15. Posledně uvedený plazmidový binární vektor (PRD400-FÚZE 15) obsahoval dvě přilehlé expresní kazety:

1. NPTII – Gen NPTII byl regulován NOS promotorem a zakončen terminační NOS polyadenylační sekvencí. Tento selekční gen (neo; synonymum NPTII) podmiňující rezistenci k antibiotiku kóduje enzym neomycin fosfotransferázu II (NPTII), který inaktivuje aminoglysidová antibiotika jako např. kanamycin a neomycin. Tento gen byl získán z bakteriálního transpozómu (Tn5 transpozónový element z *Escherichia coli*) [37].
2. SPI2:GFP – Gen SPI2:GFP je řízen promotorem viru žilkové mozaiky kvěťáku CaMV 35S a zakončen terminační NOS polyadenylační sekvencí. Byl získán fúzí dvou genů SPI2 a GFP.

Bakterie byly množeny v tekutém LK médiu [44] s 50 mg.l⁻¹ kanamycinu přes noc při 28 °C.

4.1.1. Fúzní gen SPI2:GFP

Gen GFP (green fluorescent protein) pochází z medúzy *Aequorea victoria* [38], kde její bílkovinný produkt (GFP) přeměňuje luminiscenční modré světlo vyzařované jiným proteinem aequorinem, na zelené světlo. Modifikovaný gen GFP používaný při transformacích vyzařuje světlo po excitaci UV zářením ($\lambda = 360\text{--}400$ nm) nebo modrým světlem ($\lambda = 440\text{--}480$ nm) v emisním spektru $\lambda = 509\text{--}540$ nm. Projev emise fluorescenčního záření nevyžaduje žádné další endogenní ani exogenní složky [39]. Tento gen je významným prostředkem v biologii pro studování exprese, lokalizace genů a transport proteinů.

Fúzní protein SPI2 byl nalezen ve vláknu kokonu larvy *Galleria mellonella* a řadí se do třídy inhibitorů proteáz Kazalova typu [40]. Inhibitory serinových proteáz jsou rozděleny do 11 strukturních tříd [41], z nichž třída Kazalova typu představuje ovomucoidy [42]. Relativně jednoduchá struktura bílkoviny SPI2 a její vysoká účinnost proti bakteriálním a houbovým proteinům vybízí k využití tohoto inhibitoru pro ochranu proti proteolytickému ataku mikroorganismů [41].

4.1.2. Média použitá při transformaci a kultivaci

Veškerá média byla před použitím sterilizována autoklávováním (121 °C, 30 min.). Pro pěstování výchozích rostlin, transformaci a kultivaci listových disků byla použita tato média (níže jsou uvedeny návody na přípravu a použití): Pokud není uvedeno jinak, veškeré chemikálie byly čistoty p.a.

Základní MS (Murashige a Skoog, 1962) [43] médium (pH 5,7; 1 l)

- 4,4 g soli MS s B5 vitamíny (Sigma, USA)
- 0,1 g inositol
- 30 g sacharóza
- 8 g agar

Toto médium bylo používáno pro předpěstování a klonování výchozích rostlin tabáku pro transformační pokusy.

C – médium (pH 5,7; 1 l), modifikované MS médium

- 4,4 g soli MS s B5 vitamíny (Sigma, USA)
- 0,1 g inositol
- 30 g sacharóza
- 8 mg BAP (benzylaminopurin)
- 0,4 mg NAA (kyselina α -naftylactová)
- 8 g agar

Dané médium bylo používáno k navození regenerace výhonů u listových explantátů tabáku po transformaci.

LK – médium [44] (pH 6,8; 1 l)

- 10 g sacharóza
- 0,8 g kasein hydrolyzát
- 4 g kvasničný extrakt
- 2 g KH_2PO_4
- 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Médium bylo využíváno pro kultivaci bakterií *A. tumefaciens*

Kokultivační roztok (1 l)

- 2,456 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10mM MgSO_4)

Médium pro kokultivaci listových explantátů tabáku s vektorovými bakteriemi *A. tumefaciens*.

4.2. Metodický postup

4.2.1. Transformace

Transformace byla provedena metodou listových disků pomocí bakterií *A. tumefaciens* (Horsch et al., 1985). Do Petriho misek (Pm) o průměru 9 cm s 16 ml kokultivačního roztoku byly nastříhány segmenty listové čepele o rozměrech přibližně $2 \times 2,5$ cm. Po zaplnění povrchu Pm ze 2/3 byly přidány 4 ml kokultivačního roztoku s bakteriemi *A. tumefaciens*, které byly namnoženy v tekutém LB médiu s $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kanamycinu přes noc při 28°C . Spektrofotometrem změřená denzita bakterií ve 20 ml kokultivačního roztoku činila $\text{OD}_{600} = 0,391$. Kokultivace listových disků s *A. tumefaciens* v kokultivačním roztoku probíhala 2 hodiny. Následně byly listové disky asepticky osušeny na filtračním papíru a přeneseny na Pm s C médiem. Misky byly uzavřeny dvěma vrstvami parafilmu a umístěny do kultivační místnosti (16hodinová perioda, $40 - 70 \mu\text{mol (PAR)} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 24°C) a přikryty třemi vrstvami filtračního papíru.

4.2.2. Kultivace v kultivační místnosti

Kokultivace listových explantátů s vektorovými bakteriemi na C médiu probíhala 2 dny. Po uplynutí této doby byla provedena subkultivace na C médium doplněné

o antibiotika (Timentin 500 mg.l⁻¹) k eliminaci bakterií a podpoře selekce transformantů (kanamycin 300 mg.l⁻¹). Veškerá kultivace probíhala v kultivační místnosti za konstantních podmínek teploty a osvětlení. Po 21 dnech proběhla subkultivace na čerstvé C médium se stejným obsahem antibiotik. Při další subkultivaci po 21 dnech byly listové disky přesázeny na základní MS (Murashige a Skoog) médium bez růstových látek a s antibiotiky kanamycin 500 mg.l⁻¹, Timentin 300 mg.l⁻¹. Organogenezi vyvíjející se prýty o velikosti větší jak 2 cm byly odebrány a přesázeny do kultivačních nádob s MS médiem a umístěny do kultivační místnosti.

Na regeneračním MS médiu byly transformované listové disky ponechány po dobu dvou subkultivačních intervalů. Při každém přesazování na MS médiu byly odebírány velikostně odpovídající prýty a přesázeny do kultivačních nádob s MS médiem a pěstovány v kultivační místnosti. Po skončení druhého subkultivačního intervalu na MS médiu byl pokus po odebrání prýtů ukončen.

4.2.3. Pěstování rostlin T₀ generace v GMO skleníku

Zdravé a dobře rostoucí prýty potenciálně transgenních rostlin T₀ generace byly v růstové fázi stonku o výšce 4 nody přesázeny z podmínek *in vitro* (z kultivačních nádob v kultivační místnosti) do podmínek *in vivo* (do květináčů se substrátem v GMO skleníku). Při přesazování do připravené a předem navlhčené zeminy, složené ze substrátu a zeminy (2 díly zeminy: 1 díl zahradnický substrát B) bylo důležité dobře odstranit z kořínků zbytky živného média. Přejít z převážně heterotrofní výživy na autotrofní je kritickou fází, při níž snadno dochází k přerůstání půdní mikroflóry a úhynu rostlin. Vysazené rostlinky byly okamžitě přikryty polyetylenovým sáčkem navlhčeným vodou (zajištění vyšší vzdušné vlhkosti). První tři dny zůstaly rostliny tabáku zcela přikryté a vyšší vzdušná vlhkost byla zajišťována pravidelným vlhčením vnitřního povrchu sáčku vodou (rozprašovačem). Po uplynutí tří dnů se začalo s postupným odkrýváním rostlin. Sedmý den od převodu do již byly rostliny tabáku zcela odkryty.

Po celou dobu pěstování ve skleníku, byly rostliny tabáku pravidelně zalévány. Vytvářející se květní orgány byly z důvodu zamezení cizosprašení přikryty papírovými sáčky. Hnědé tobolky se zralými semeny byly pravidelně a odděleně pro jednotlivé genotypy odebírány. Pro překonání dormance semen a k dlouhodobému udržení jejich klíčivosti byly vzorky semen uskladněny v ledničce při 4 až 7 °C.

4.2.4. Selekce rostlin tabáku T₀ generace

Po překonání dormance semen (cca. za 10 dnů) bylo započato s přípravou výsevu semen tabáku T₀ generace na selekční médium s kanamycinem. Semena jednotlivých genotypů byla sterilizována 2 min 70% ethanolem a po odsátí ethanolu, dále po 45 min ve zředěném roztoku chlornanu sodného (SAVO s vodou v poměru 1:9) s 0,1 % smáčedla Tween 20. Následně byla semena 4× po 5 min propláchnuta sterilní destilovanou vodou (dH₂O) a rozptýlena v 0,25% agaru (Difco Bacto Agar, Difco Laboratories, Sparks, USA). K aseptickému výsevu byla použita pipeta se špičkou s ustřiženým koncem. Semena jsem vyséval po jednotlivých kapkách (2 až 4 semena/kapku) ve vzdálenosti 1 × 1 cm na Pm se základním MS médiem obsahující selekční antibiotikum (kanamycin 500 mg.l⁻¹). Misky zalepené parafilmem byly umístěny na 4 týdny do kultivační místnosti.

Na MS médiu s takto vysokou koncentrací selekčního antibiotika šlo dobře vyhodnotit poměr vyvíjejících se transgenních a netransgenních rostlin tabáku. Zatímco vývoj transgenních jedinců probíhal zcela přirozeně (viz Příloha, Obr. 10), netransgenní jedinci po vyklíčení netvořili chlorofyl a jejich vývoj byl zastaven v růstové fázi děložních lístků a dále již nepokračoval. Z populace transgenních rostlin byla od každého genotypu náhodně odebrána minimálně 1 rostlina, která byla přesazena do kultivační nádoby se základním MS médiem a pěstována v kultivační místnosti při standardním režimu osvětlení a teploty. Tito vybraní jedinci byly dále charakterizováni použitím molekulárních metod a dle potřeby dále klonováni.

4.2.5. Charakterizace vybraných jedinců T₁ generace

4.2.5.1. Detekce transgenů

Po vytvoření asimilačních listů bylo od každého jedince odebráno přibližně 30 mg listové hmoty pro izolaci DNA. Izolace DNA byla provedena pomocí soupravy DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, SRN). Přítomnost transgenů NPTII a fúzní sekvence SPI2:GFP byla zjišťována metodou polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction).

Pro amplifikaci 774 bp velkého fragmentu z genu NPTII [45] byly použity primery:

- nptII-U (5'GAACAAGATGGATTGCACGCAGGA'3)

- nptII-L (5' AAGAAGGCGATAGAAAGGCGATGC'3)

PCR reakce o objemu 0,02 cm³ obsahovala:

- PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o, Praha, Česká republika) složený z 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 μM dATP a dTTP a dCTP a dGTP, 1 U Taq-Purple DNA Polymerázy,
- 0,16 μM f-primer a 0,16 μM r-primer,
- 50 ng DNA.

PCR reakce proběhla v termocykleru (Bioer, Version 2005-1,2, Japonsko) při tomto teplotním a časovém nastavení:

- denaturace 94 °C 5 minut
- 33 cyklů: denaturace 94 °C 1 minuta, nasednutí (annealing) primerů 56 °C 30 s, elongace 72 °C 1 minuta
- elongace 72 °C 5 minut

Pro amplifikaci 530 bp velkého fragmentu z genu SPI:GFP byly použity primery:

- f-primer (5'TGAGTGGGACCCTGTTTGTGGTAA'3),
- r-primer (5'TGTATTCCAACCTTGTGGCCGAGGA'3).

PCR reakce o objemu 0,02 cm³ obsahovala:

- PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o,) složený z 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 μM dATP a dTTP a dCTP a dGTP, 1 U Taq-Purple DNA Polymerázy,
- 0,16 μM f-primer a 0,16 μM r-primer,
- 50 ng DNA.

PCR reakce proběhla v termocykleru (Bioer, Version 2005-1,2, Japonsko) při tomto teplotním a časovém nastavení:

- denaturace 94 °C 5 minut
- 33 cyklů: denaturace 94 °C 1 minuta, annealing 56 °C 30 s, elongace 72 °C 1 minuta
- elongace 72 °C 5 minut

Rozdělení produktů PCR amplifikace proběhlo na 1,5% agarózovém gelu obsahujícím barvivo 2% ethidium bromid v TBE pufru při použití horizontální elektroforézy Wide Mini-Sub Cell GT Systém (BioRad, USA) při napětí 90 V po dobu 50 minut. Pro

zviditelnění fragmentů DNA bylo použito UV transluminátoru (Vilber Lourmat, Francie) a k dokumentaci CCD kamera.

4.2.5.2. Molekulární průkaz exprese fúzního genu *SPI2:GFP* v rostlinách

Z rostlin, u nichž byla prokázána přítomnost genu NPTII a *SPI2:GFP*, bylo odebráno 30 mg listové tkáňe pro izolaci RNA. Izolace RNA byla provedena kitem NucleoSpin[®] RNA Plant (Macherey-Nagel, SRN). Celková izolovaná rostlinná RNA byla použita k analýzám na přítomnost transgenní mRNA pomocí PCR založené na reverzní transkripci mRNA (RT-PCR). Reverzní transkripce mRNA byla provedena kitem Revert Aid[™] M-MuL V Reverse Transcriptase (Fermentas, Litva). Přítomnost příslušné cDNA byla ověřena PCR amplifikací fragmentu (530 bp, při použití f-primeru a r-primeru) z genu *SPI2:GFP*. Pro vyloučení možné kontaminace izolované RNA rostlinnou DNA byla současně provedena kontrolní PCR z izolované RNA.

U rostlin tabáku pozitivních na přítomnost transgenní mRNA byla následně zjišťována přítomnost transgenního proteinu. K tomuto ověření byla vybrána imunochemická metoda Western blot. Proteiny byly izolovány metodou dr. Kludkiewicz (nepublikovaný zdroj). Izolované proteiny byly rozděleny na 12% polyakrylamidovém (AA) gelu v 0,1M Tris pufru použitím vertikální elektroforézy (80V, 2,5 hod).

Elektrický přenos proteinů z AA gelu na nitrocelulóзовou membránu probíhal při 35 V, 5 °C, 12 hod. Po ukončení transferu následovalo krátké opláchnutí membrány v pufru PBS + 0,01% Tween a blokování nitrocelulóзовé membrány v PBS + 0,01% Tween + 1% Skim Milk Powder (SMP) (12 hod, při 4 °C).

Pak byla membrána promývána 3 × 10 min v PBS + 0,01% Tween. Navázání primární protilátky probíhalo při dvouhodinové inkubaci a byl použit Monoclonal Anti-Green Fluorescent Protein (GFP) CloneGSN 149 (Sigma-Aldrich, USA). Následovalo promývání 3 × 10 min v PBS + 0,01% Tween. Následně byla při dvouhodinové inkubaci navázána sekundární protilátka ANTI-MOUSE IgA (α -CHAIN SPECIFIC) Alkaline Phosphatase Conjugate (Sigma-Aldrich, USA) a opět následovalo promývání 3 × 10 min v PBS + 0,01% Tween.

Pro zviditelnění výsledku metody western blot byl použit Western blue[®] Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega, USA) při inkubaci 30 minut.

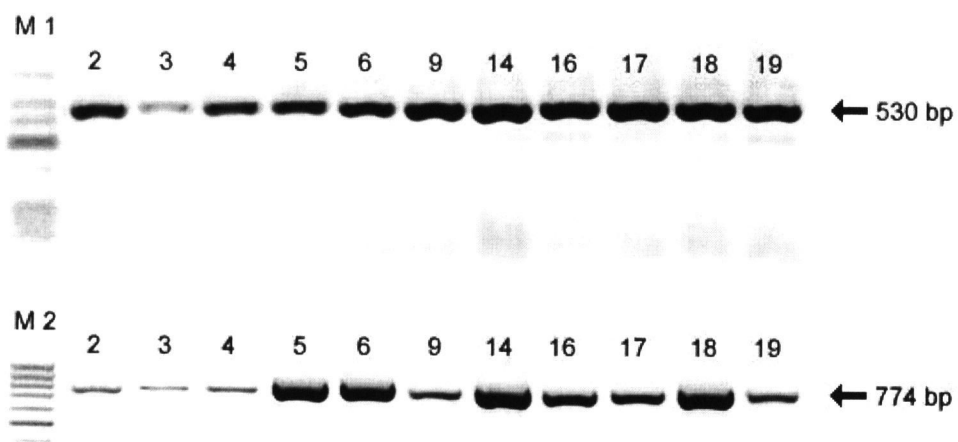
4.2.6. Studium exprese genu SPI2:GFP

Exprese genu SPI2:GFP byla sledována na základě studia fluorescence pletiv stereomikroskopem Leica MZ 12 vybaveným fluorescenčním nástavcem s 50W rtuťovou výbojkou a excitačním (395 ± 20 nm) a emisním (525 ± 20 nm) GFP filtrem (Leica, Švýcarsko). Pozorování exprese v průběhu kalogeneze a následné organogeneze prýtů z listových segmentů probíhalo přes víčko Petriho misek bez nutnosti narušovat průběh *in vitro* kultivace. U vyvíjejících se rostlin transformovaných tabáku T₀ i T₁ generace byly k pozorování exprese GFP proteinu používány asimilační listy z různých částí stonku.

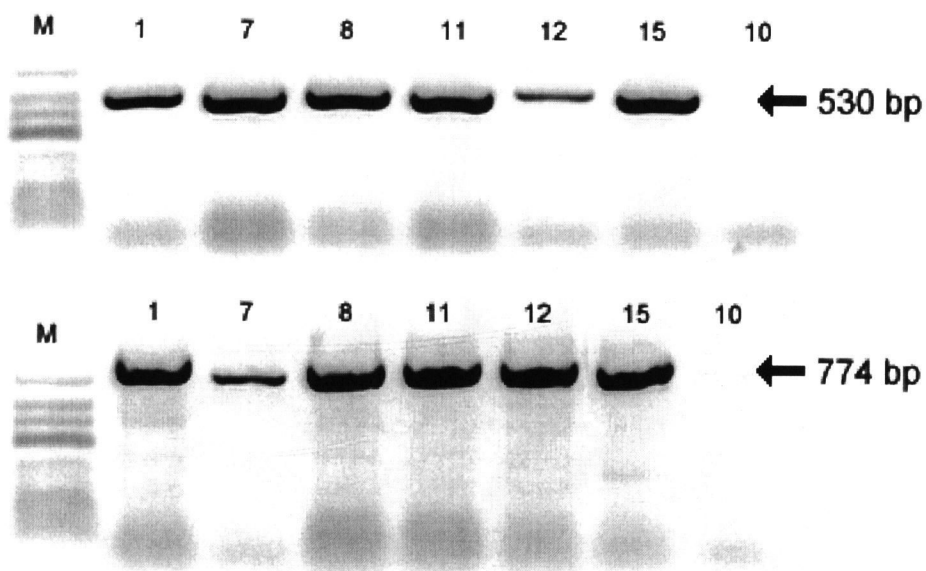
5. Výsledky

Z padesáti listových segmentů, použitých pro transformaci, bylo na selektivním médiu získáno dvacet nezávislých regenerantů (potenciálně různých genotypů) tabáku. Tito jedinci byli později přesazeni z *in vitro* podmínek do *in vivo* podmínek (květináčů s půdním substrátem v GMO skleníku). Z rostlin tabáku pěstovaných v GMO skleníku se podařilo vypěstovat a získat semena T₁ generace devatenácti genotypů. Tři týdny po výsevu semen těchto genotypů na základní MS medium s 500 mg.l⁻¹ kanamycinu byly na jednotlivých miskách spočteny počty zelených (potenciálně transgenních) a bílých semenáčků (netransgenních) (viz. Příloha, Obr. 9). Pro každý genotyp byly štěpné poměry hodnoceny nejméně ve třech Pm pocházející ze dvou až tří nezávisle provedených výsevů. Pro statistické vyhodnocení průkaznosti dat štěpných poměrů byl použit softwarový produkt STATISTICA® s programem pro Chí-kvadrát test na 5% hladině významnosti. Statistickou analýzou byly potvrzeny štěpné poměry 3:1 (genotypy 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17), 15:1 (genotyp 19) a dále genotypy neštěpící (genotypy 6, 10) a nepravidelně štěpící (genotypy 7, 8, 14, 18) (viz Tab. 1). Pouze semena tabáku genotypu 13 i přes opakované výsevy nevzklíčila a to ani na MS médiu bez selektivního antibiotika. Současně se na základě vyhodnocení výsledků výsevů na selektivní médiu ukázalo, že z osmnácti genotypů tabáku T₁ generace pouze jediný (genotyp 10) nejevil známky rezistence k selektivnímu antibiotiku.

Z vcházejících jedinců, včetně genotypu 10 (jako jediného vypěstovaného na MS médiu bez selektivního antibiotika), byla vybrána od každého genotypu tabáku jedna rostlina. Z těchto náhodně vybraných jedinců byla izolována DNA, která byla použita ke zjištění, zda došlo k zabudování transgenní DNA do genomu rostlin. Molekulární metoda PCR prokázala přítomnost transgenů NPTII a SPI2:GFP, kromě genotypu 10, u všech vybraných genotypů T₁ generace (Obr. 1, 2 a Tab. 1).

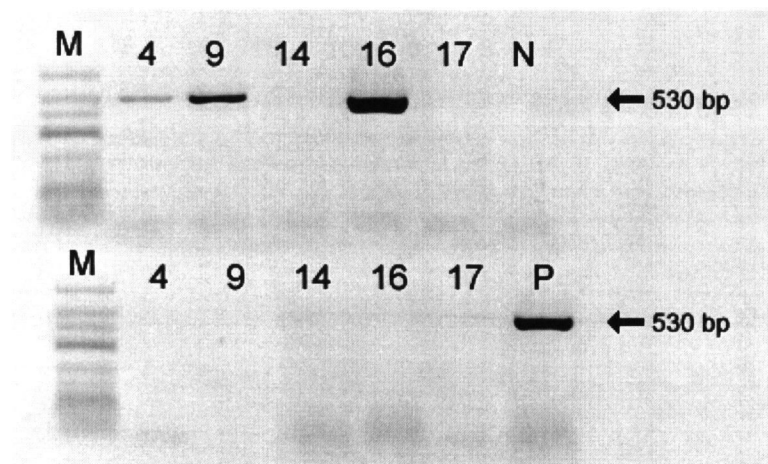


Obr. 1. PCR produkty transgenů SPI2:GFP (velikost produktu 530 bp) a NPTII (velikost produktu 774 bp) tabáku T_0 generace u genotypů 2, 3, 4, 5, 6, 9, 14, 16, 17, 18, 19, rozdělené elektroforézou na 1,5% agarorózovém gelu. M1 - GeneRulerTM DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Litva). M2 – Mass RulerTM DNA Ladder, Low Range, ready-to-use (Fermentas, Litva).

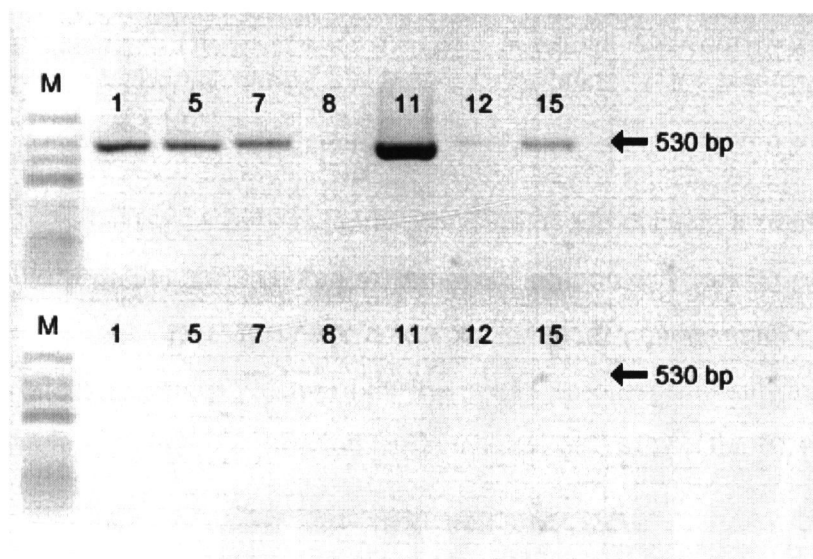


Obr. 2. PCR produkty transgenů SPI2:GFP (velikost produktu 530 bp) a NPTII (velikost produktu 774 bp) tabáku T_0 generace u genotypů 1, 7, 8, 11, 12, 15, 10. M - GeneRulerTM DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Litva).

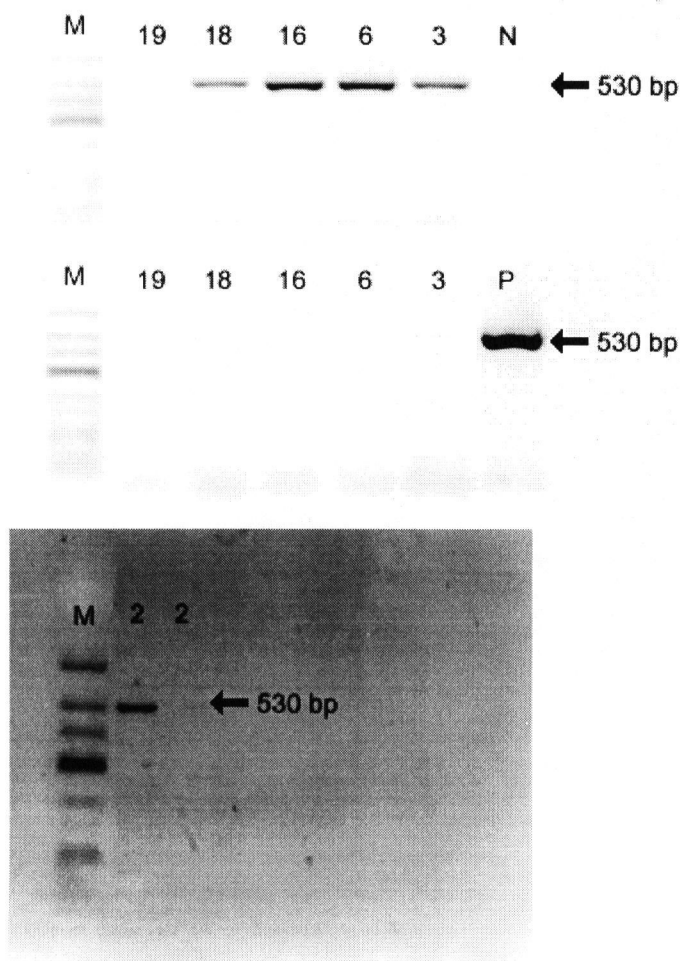
Ze všech jedinců pozitivních na přítomnost transgenů byla pro zjištění transkripce SPI2:GFP genu izolována RNA a provedena RT-PCR. Pomocí metody RT-PCR jsem prokázal přítomnost transgenní SPI2GFP mRNA u třinácti genotypů (genotyp 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 18, viz. Obr. 3, 4, 5 a Tab. 1).



Obr. 3. RT-PCR produkty transgenů SPI2:GFP (velikost produktu 530 bp) tabáku T_0 generace u genotypů 4, 9, 14, 16, 17, , N – negativní kontrola (bez DNA), P – pozitivní kontrola, vzorek plazmidové DNA, M - GeneRulerTM DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Litva). U každé RT-PCR byla souběžně prováděna kontrolní PCR na přítomnosti kontaminující DNA ve vzorcích izolované celkové RNA. U žádné izolované RNA nebyl detekován DNA produkt odpovídající velikosti (hmotnosti) transgenů SPI2GFP.

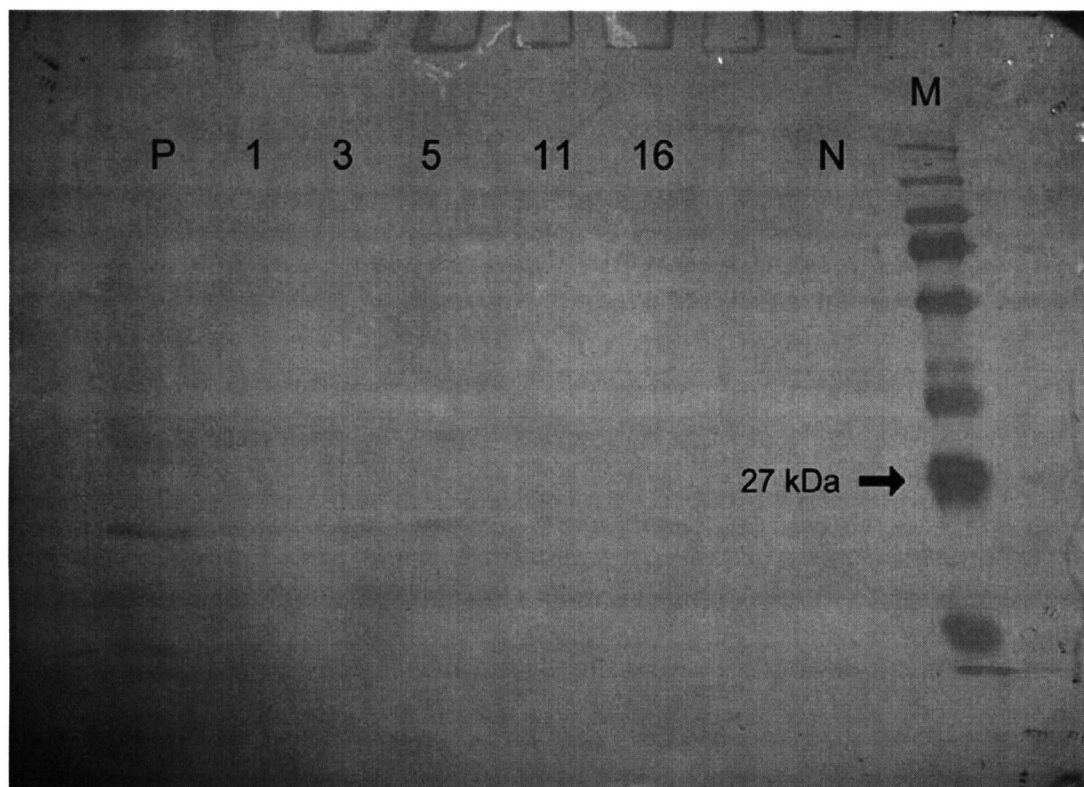


Obr. 4. RT-PCR produkty transgenů SPI2:GFP (velikost produktu 530 bp) tabáku T_0 generace u genotypů 1, 5, 7, 8, 11, 12, 15, M - GeneRulerTM DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Litva).



Obr. 5. RT-PCR produkty transgenu SPI2:GFP (velikost produktu 530 bp) tabáku T_0 generace u genotypů 19, 18, 16, 6, 3. , N – negativní kontrola (bez DNA), P – pozitivní kontrola, vzorek plasmidové DNA, M – GeneRulerTM DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Litva).

Genotypy 1, 3, 5, 11 a 16 byly vybrány pro zjištění, zda dochází k translaci mRNA a tvorbě fúzního proteinu SPI2:GFP. Pro stanovení přítomnosti daného proteinu byla vybrána imunochemická metoda Western blot využívající imunochemické reakce. Pro zviditelnění výsledku metody Western blot byl použit chromogenní substrát. Výsledek detekce na přítomnost SPI2GFP proteinů nebyl výrazně průkazný (Obr. 6).



Obr. 6. Western blot provedený u genotypů 1, 3, 5, 11, 16. P – transgenní tabák transformovaný samotným konstruktem *mGFP5-ER*, u něhož byla viditelná GFP fluorescence. Očekávaná velikost *SPI2GFP* proteinu je blízka 27 kDa. N – netransformovaný *Nicotiana tabacum*, cv. *Petit Havana*, SR1 WT. M – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, Litva).

Expresi reportérového genu GFP, přítomného ve fúzním genu *SPI2:GFP*, byla pozorována fluorescenčním mikroskopem Leica MZ 12 vybaveným fluorescenčním nástavcem s 50W rtuťovou výbojkou a excitačním (395 ± 20 nm) a emisním (525 ± 20 nm) GFP filtrem (Leica, Švýcarsko). U kultivovaných listových disků a organogenezí se vyvíjejících prýtů nebyla fluorescenčním mikroskopem pozorována výrazně zvýšená úroveň fluorescence. Pouze u několika genotypů T_0 generace, pěstovaných ve skleníku, byla u listových čepelů pozorována mozaikovitá fluorescence. U tabáků T_1 generace nebyla pod fluorescenčním mikroskopem zaznamenána žádná fluorescence u vyvíjejících se tkání.

Tabulka 1. Výsledky molekulární charakterizace a štěpných poměrů na selektivním médiu rostlin tabáku T_0 generace.

Genotyp	Kn-R:Kn-S	Testováno se štěpným poměrem	X^2	p	Metody	
					PCR	RT-PCR
1	152:46	3:1	0,3299663	0,565679	+	+
2	447:144	3:1	0,1269036	0,721665	+	+
3	272:80	3:1	0,9696970	0,324756	+	+
4	67:20	3:1	0,1877395	0,664805	+	+
5	188:49	3:1	2,364276	0,124143	+	+
6	241:3	1:0	0,0368852	0,847699	+	+
7	165:74	3:1	4,531381	0,033280	+	+
8	51:198	3:1	394,7108	0,000001	+	-
9	310:110	3:1	0,3174603	0,573138	+	+
10	0:300	—	—	—	-	—
11	230:66	3:1	1,153153	0,282891	+	+
12	175:45	3:1	2,424242	0,119472	+	-
13	—	—	—	—	—	—
14	49:319	3:1	746,7971	0,000001	+	-
15	373:130	3:1	0,1915176	0,661657	+	+
16	234:85	3:1	0,4608150	0,497244	+	+
17	196:72	3:1	0,4975124	0,480596	+	+
18	93:420	3:1	884,9181	0,000001	+	+
19	317:25	15:1	0,6557505	0,418065	+	-

6. Diskuze

Ze získaných sedmnácti transgenních jedinců rostlin tabáku T₁ generace vykazovalo potomstvo jedenácti genotypů na selektivním médiu s antibiotikem (kanamycin 500 mg.l⁻¹) štěpný poměr 3:1. Geny vložené transformací do genomu rostlin se obvykle předávají na potomstvo v poměru 3:1 [46]. Občas je však T-DNA (transgenní DNA) vložená do dvou nebo více míst rostliného genomu, v důsledku toho jsou pak štěpné poměry komplikovanější [47]. V mém případě štěpný poměr 15:1 nasvědčující o integraci T-DNA do dvou rozdílných genetických míst (lokusů), byl zaznamenán u genotypu 19. Naproti tomu na selektivním médiu neštěpící genotyp 6 (všechny klíčnicí rostliny byly odolné k antibiotiku) nasvědčoval vložení více než dvou kopií T-DNA do rostliného genomu. Potomstva dalších čtyř genotypů (7, 8, 14, 18) transgenních jedinců vykazovala nepravidelné štěpení, z nichž pouze u genotypů 8, 14 a 18 byla průkaznost dat prokázána jako statisticky významná. Někteří autoři [48, 49] ve svých pokusech zaznamenali transgenní linie více citlivé (pozitivně testované na přítomnost selekčního antibiotika – kanamycin a hygromycin) na selekční antibiotikum kanamycin a hygromycin, které z důvodů vyšší citlivosti vykazovaly na selekčním médiu nepravidelné štěpné poměry. Různými autory byly publikovány potíže s kanamycinovou selekcí [50]. V naší laboratoři [51], i při mé práci, se pro selekci klíčnicích rostlin tabáku T₁ generace osvědčila koncentrace selekčního antibiotika kanamycinu 500 mg.l⁻¹. Nepravidelné štěpné poměry mohou být také způsobeny různými genetickými a epigenetickými příčinami [52, 53, 54, 55]. Je však třeba zdůraznit, že tyto výsledky štěpných poměrů a tvrzení mohou být zcela jednoznačně potvrzeny až analýzou následujících, tj. pravidelně štěpících generací semenáčků (vlivem možného chimérizmu rostlin T₀ generace vzniklých organogenezí mohou být výsledky analýz štěpných poměrů potomstva T₀ generace pozměněny).

Metodou RT-PCR provedenou u sedmnácti genotypů tabáku T₁ generace (pozitivně testovaných na přítomnost transgenních sekvencí T-DNA), odolných vůči kanamycinu se nepodařilo prokázat přítomnost transgenní mRNA u čtyřech genotypů (8, 12, 14, 19). Nepřítomnost dané mRNA u těchto tabáků může být způsobena potlačením exprese příslušného transgenů. Potlačení exprese endogenních genů s vysokou homologií je známé jako transkripční umlčování genů „gene silencing“ (TGS) nebo post-transkripční „gen silencing“, který je způsoben takzvanou RNA interferencí [52, 53]. Při TGS je

promotorová oblast transgenů silně methylována a tím je i transkripce genu řízená tímto promotorem inhibována [54]. Přítomnost konstitutivního promotoru CaMV 35S a vyšší počet vložených kopií jsou u transgenních rostlin nejčastějším důvodem nestability exprese transgenů v rostlinách [55].

U vybraných genotypů (1, 3, 5, 11, 16) rostlin T₁ generace tabáku byla provedena Western blot analýza přítomnosti genového produktu – proteinu SPI2GFP. Tato práce probíhala pod odborným dohledem dr. Kludkiewicz (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science, Warszawa, Poland). Pro zviditelnění výsledků reakce byl použit chromogenní substrát pro alkalickou fosfatázu. Metoda detekce chromogenním substrátem je jednoduchá a cenově výhodná. V našem případě však nebyl výsledek dostatečně průkazný. Pro zlepšení viditelnosti produktu detekční metody je možné alternativně použít chemiluminiscenční substrát, který má několik předností. Především dovoluje provést mnohonásobnou expozici výsledku chemiluminiscenční reakce uskutečněné na hybridizační membráně, a tak získat co možná nejlepší snímek a oproti ostatním dostupným substrátům má i nejvyšší citlivost [56]. Tato alternativa však bude předmětem návazných studií prováděných v rámci projektu Výzkumných center I M06030.

V průběhu kalogeneze, organogeneze a při následném vývoji prýtlů tabáku nebyla oproti očekávání zaznamenána žádná fluorescence fúzního proteinu, ačkoliv v některých pokusech jiných autorů byla pozorována viditelná fluorescence GFP v nově vznikajících prýtech a mladých tkáních [57, 58, 59]. Při sledování GFP fluorescence u starších rostlin byl ve shodě s jinými autory také pozorován příležitostní výskyt malých fluoreskujících oblastí v různých tkáních [60] a fluorescence trichomů [61, 62]. Ta však byla pozorována i u netransgenních tabáků. Detekce fluorescence GFP proteinu v transgenních rostlinách je komplikován různými endogenními fluoreskujícími molekulami, nacházející se v rostlinných buňkách [63]. Tato přirozená fluorescence endogenních molekul je nazývána autofluorescencí [64] (viz Příloha, Obr. 8). U několika studovaných genotypů (4, 6) byl také zjištěn mozaikový projev fluorescence způsobený shluky, náhodně rozptýlených fluoreskujících buněk v jinak nefluoreskující tkáni [55] (viz Příloha, Obr. 7). Tato mozaikovitá skvrnitost byla také popsána při použití reportérového genu pro luciferázu [65]. U potomstva tabáků T₁ generace nebyla překvapivě zaznamenána žádná výrazná fluorescence tkání a buněk. Při zjišťování příčin tohoto jevu bylo zjištěno (dr. Navrátil, UÉB AV ČR, Praha - ústní sdělení), že při

tvorbě fúzního genu SPI2:GFP byla z genu mGFP5-ER odstraněna pomocí restrikčních enzymů část sekvence zodpovědná za transport transgenního proteinu do endoplazmatického retikula. Tato změna může být zodpovědná za nedostatečnou fluorescenci GFP v tkáních, jelikož u transgenních tabáků obsahujících T-DNA původního plazmidového binárního vektoru pBINm-gfp5-ER, nesoucího pouze gen pro GFP (získaný od J. Hasseloffa, Department of Plant Sciences, University of Cambridge, UK) byla prokázána fluorescence tkání způsobená přítomností GFP proteinu [51] (viz. Příloha, Obr. 9). Při transportu *GFP* proteinu (zaváděcí sekvencí) do endoplazmatického retikula, vykazují transgenní rostliny vyšší úroveň GFP fluorescence [68].

7. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium projevu fúzního genu SPI2:GFP kódujícího inhibitor proteáz serinového typu zavíječe voskového (*Galleria melonella*) se sekvencí reportérového genu pro zeleně fluoreskující protein – GFP, pocházejícího z medúzy *Aequorea victoria*, v rostlinách tabáku. Pro tento účel byly transformovány listové disky *in vitro* klonovaných rostlin genotypu *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana, SR1 WT [36] kokultivací s vektorovými bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*.

Analýzou štěpných poměrů, prováděnou aseptickým výsevem semen autogamizovaných transgenních rostlin T₀ generace na média s antibiotikem kanamycinem, byl prokázán pravidelný přenos příslušného selektovatelného znaku NPTII na potomstvo. V řadě případů byly potvrzeny jednoduché mendelistické štěpné poměry (3:1, genotypy 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17) nasvědčující o integraci jediné kopie T-DNA s insertem či dvou (15:1, genotyp 19) a více kopií (genotyp 6). Mimo to byly ojediněle nalezeny štěpné poměry (7, 8, 10, 13, 14, 18) ukazující na možné anomálie při integraci a expresi transgenu NPTII, případně inzertu.

U vybraných jedinců T₁ generace byla metodou polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-PCR) ověřována syntéza mRNA odpovídající fúznímu genu SPI2:GFP. V případech z celkových sedmnácti analyzovaných genotypů byl elektroforézou produktů RT-PCR nalezen DNA fragment velikostně odpovídající komplementární DNA (cDNA) fúzního genu (genotypy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 18). V případech (genotypy 8, 12, 14, 19) kdy s nejvyšší pravděpodobností daná mRNA nebyla vytvářena, mohlo dojít k umlčení projevu transgenu po transkripci nebo translaci.

Studiem exprese reportérového genu GFP v rostlinách transformantů T₀ a T₁ generace pomocí stereomikroskopu se speciálním nástavcem pro GFP byly nalezeny odlišnosti od očekávaného projevu fluorescence (mozaicismus u rostlin T₀ generace a absence fluorescence v rostlinách T₁ generace). Na základě tohoto mého zjištění bude nezbytné pro transformace některých objektů, u nichž je záměrem využít znak GFP ke koselekcii transformantů a studiu orgánové a tkáňové exprese cílového genu, vytvořit nový konstrukt s plně funkčním reportérovým genem GFP.

8. Seznam použité literatury

1. Zákon č. 78/2004 Sb
2. Řehout, V.: Genetika II. Biotechnologie GMO a transgenoze. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, 2005, str. 143-146, ISBN 80 70-40-774-3
3. www.transgen. Anbau 2007: Flächen steigen weltweit auf 114 Millionen Hektar.
http://www.transgen.de/anbau/eu_international/ cit. 25. 1. 2009
4. Ondřej, M., Drobník, J.: Transgenoze rostlin, ACADEMIA, 2002, str. 116 – 123, ISBN 80-200-0958-2
5. Ondřej, M., Drobník, J., Gartland, K. M. A., Gartland, J. S.: Genové inženýrství rostlin. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1999, str. 46, ISBN 80-7080-370-3
6. Petr, J.: Geneticky modifikované rostliny (1. část). Úroda, 2005, č. 1, ISSN 0139-6013
7. Landa, Z.: Klasifikace *B. thuringiensis* pomocí Cry proteinů. [online], Jihočeská univerzita Zemědělská fakulta, [cit. 21.1. 2009], dostupný z WWW:
<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/krv/rostlin/vyuka/pp/biopreparaty1/sld025.htm>
8. Halford, N.: Plant Biotechnology: Current and Future Applications of Genetically Modified Crops. WILEY, 2006, str. 30 – 41, ISBN 0-470-02181-0
9. www.agbios. <http://www.agbios.com/dbase.php> cit. 27. 1. 2009
10. Nelson, G. C.: Genetically Modified Organisms in Agriculture. Economics and Politics, ACADEMIC PRESS, 2001, str. 99-129, ISBN 0-12-515422-4
11. Ding, S-W., Voinnet, O.: Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell, 2007, 130, str. 413 – 426
12. Voinnet, O.: Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infection. Nat. Rev. Genet., 2005, 6, str. 206 – 221
13. Wang, M. B., Bian, X. Y., Wu, L. M., Liu, L. X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R. M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S. And Waterhouse, P. M.: On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2004, 101, str. 3275 – 3280
14. Al-Khaff, N. S., Covey, S. N., Kreike, M. M., Page, A. M., Pinder, R. and dále, P. J.: Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. Science, 1998, 279, str. 2113 – 2115

15. Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Shubert, J., Wassenegger, M and Tepfer, M.: Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.*, 2008, 9(1), str. 73 – 83
16. Hanusová, L., Čurn, V.: Inhibitory proteas v hlize bramboru. *Chem. Listy*, 2007, 101, str. 536 – 541
17. Ryan, C. A., *Annu: Rev. Phytopathol.*, 1990, 28, str. 425 – 449
18. Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A.: *Plant Cell*, 1999, 11, str. 431 – 443
19. Haq, S. K., Atif, S. M., Khan, R. H., Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Biochem. Biophys.*, 2004, 431, str. 145 – 159
20. Belew, M., Eaker, D.: *Eur. J. Biochem.*, 1976, 62, str. 499 – 508
21. Urwin, P. E., Levesely, M. J., McPherson, M. J., Atkinson, H. J.: *Mol. Breed.*, 2000, 6, str. 257 – 264
22. Campos-Gutierrez, R., Torres-Acosta, J. A., Saucedo-Arias, L. J., Gomez-Lim, M. A.: *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17 (12), str. 1223 – 1226
23. Soares-Costa, A., Beltramini, L., Thieman, O., Henrique-Silva, F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 296, str. 1194 – 1199
24. Hraška, M., Rakouský, S., Čurn, V.: Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgnozi rostlin. *Chem. Listy*, 2006, 100, str. 501 – 507
25. Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F.: Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 2002, 40, str. 1515 – 1539
26. Chrispeels, M. J., Grossi-de-Sá, M. F., Higgins, T. J. V.: Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. *Seed Sci. Res.*, 1998, 8, str. 257 – 263
27. Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A.: Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pest. Sci.*, 1998, 52, str. 165 – 175
28. Valencia, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E., Chrispeels, M. J.: α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2000, 30, str. 207 – 213

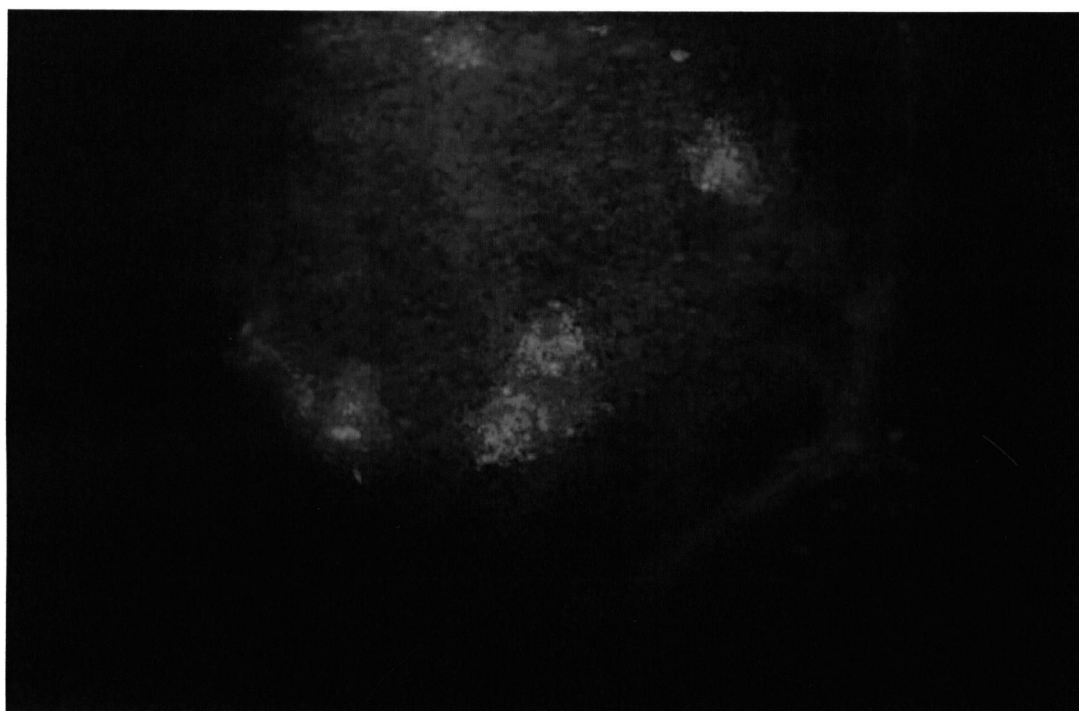
29. Flor, H. H.: Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1971, 9, str. 275 – 296
30. Dang, J. L., Dietrich, R. A. And Richberg, M. H.: Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 1996, 8, str. 1793 – 1807
31. Dangl, J.L. and Jones, J.D.G.: Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 2001, 411, str. 826 – 833
32. Hulbert, S. H., Webb, C. A., Smith, S. M. and Sun, Q.: Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 2001, 39, str. 285 – 312
33. Niederhauser, J. S. And Mills, W. R.: Resistance of *Solanum* species to *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology*, 1953, 43, str. 456 – 457
34. Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B. L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W., Allefs, S.: An ancient R gene from the wild potato *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.*, 2003, 36, str. 867 – 882
35. [www.mzp. oer-4697ENV07_BASF_rozhodnutí-20070517.pdf](http://www.mzp.cz/www/env-gmo.nsf/9a6263196f09b0a9c1256e7e0038efc2/a71f5ea407cf408bc12572e500257542?OpenDocument)
[http://www.mzp.cz/www/env-gmo.nsf/9a6263196f09b0a9c1256e7e0038efc2/a71f5ea407cf408bc12572e500257542?](http://www.mzp.cz/www/env-gmo.nsf/9a6263196f09b0a9c1256e7e0038efc2/a71f5ea407cf408bc12572e500257542?OpenDocument)
OpenDocument cit. 28.1.2009
36. Maliga, P., Sz.-Breznovits, A., Márton, L.: Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature*, 1973, 244, str. 29 – 30
37. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from insect-protected genetically modified maize MON 863 and MON 863 x MON 810, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto, *EFSA J.*, 2004, 50, str. 1 – 25
38. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J.: Primary structure of the *Aequorea victoria* gree-flourescent protein. *Gene*, 1992, 111, str. 229 – 233
39. Hraška, M., Rakouský, S., Čurn, V.: Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2006, 86, str. 303 – 318
40. Nirmala, X., Kodrík, D., Žurovec, M. and Sehnal, F.: Insect silk contains a Kunitz-type

- and a unique Kazal-type proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, str. 1 – 10
41. Kludkiewicz, B., Kodrik, D., Grzelak, K., Nirmala, X., Sehnal, F.: Structurally unique recombinant Kazal-type proteinase inhibitor retains activity when terminally extended and glycosylated. *Protein Expr. Purif.*, 2005, 43, str. 94 – 102
42. Laskowski, M., Kato, I., Ardelt, W., Cook, J., Denton, A., Empie, M. and et al.: Ovomuroid third domains from 100 avian species: isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues, *Biochemistry*, 1987, 26, str. 202 – 221
43. Murashige, T., Skoog, F.: A revise medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, 15, str. 473 – 497
44. Langley, R. A., Kado, C. I.: Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoquanidine and relationship of *A. tumefaciens* mutants to crown gall induction. *Mutat. Res.*, 1972, 14, str. 277 – 286
45. Chen, S., Li, X., Liu, X., Xu, H., Meng, K., Xiao, G., Wei, X., Wang, F., Zhu, Z.: Green fluorescent protein as a vital elimination marker to easily screen marker-free transgeny progeny derived from plants co-transformed with a double T-DNA bojary vector systém. *Plant Cell Rep.*, 2005, 23, str. 625 – 631
46. McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsh, R. B.: Leaf disis transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 1986, 5, str. 81 – 84
47. Feldmann, K. A.: T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spektrum. *Plant J.*, 1991, 5, str. 71 – 82
48. Nováková, S., Mazúrová, L., Čerovská N., Šubr, Z. W.: Transgenic tobacco plants carrying the non-structural gene of potato virus A. *Biol. Plant.*, 2005, 49, str. 593 – 598
49. Ondřej, M., Kocábek, T., Rakouský, S., Wiesnerová, D.: Segregation of T-DNA inserts in the offspring of *Arabidopsis thaliana* after *Agrobacterium* transformation. *Biol. Plant.*, 1999, 42, str. 185 – 195
50. Eu, Y. J., Lee, M. H., Chány, H. S., Rhew, T. H., Lee, H. Y., Lee, C. H.: Chlorophyll fluorescence assay for kanamycin resistance screening in transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 1998, 17, str. 189 – 194

51. Hraška, M., Rakouský, S., Kocábek, T.: Use of a simple semiquantitative method for appraisal of green fluorescent protein gene expression in transgenic tobacco plants. *Biol. Plant.*, 2005, 49, str. 313 – 316
52. Voinet, O.: RNA silencing as a plant immune system against et viruses. *Trends Genet.*, 2001, 17, str. 449 – 459
53. Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Finnegan, E. J.: Role of short RNA in gene silencing. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6, str. 297 – 301
54. Matzke, M. A., Matzke, A. J. M., Pruss, G. J., Vance, V. B.: Our RNA-based silencing strategie in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001, 11, str. 221 – 227
55. Bastar, M. T., Luthar, Z., Škof, S., Bohanec, B.: Quantitative determination of mosaic GFP gene expression in tobacco. *Plant Cell Rep.*, 2004, 22, str. 939 – 944
56. Pierce Protein Research Products: Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. Thermo Fischer Scientific, 2007, 10, str. 39
57. Kamaté, K., Rodriguez-Llorente, I. D., Sholte, M., Durand, P., Ratet, P., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Trknu, T. H.: Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.*, 2000, 19, str. 647 – 653
58. Tamura, M., Togami, J., Ishiguro, K., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Suzuki, K., Kusumi, K., Tanaka, Y.: Regeneration of verbena (*Verbena x hybrida*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 2003, 21, str. 459 – 466
59. Zhou, X., Chandrasekharan, M. B., Hall, T. C.: High rooting frequency and fuctional analysis of GUS and GFP expression in transgenic *Medicago truncatula* A17. *New Phytol.*, 2004, 162, str. 813 – 822
60. Eady, C. C., Weld, R. J., Lister, C. E., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep.*, 2000, 19, 376 – 381
61. Mercuri, A., Sacchetti, A., De Benedetti, L., Schiva, T., Alberti, S.: Green fluorescent flowers. *Plant Sci.*, 2001, 161, str. 961 – 968
62. Han, J., Wang, H., Ye, H., Liu, Y., Li, Z., Zhang, Y., Yan, F., Li, G.: High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure. *Plant Sci.*, 2005, 168, str. 73 – 80

63. Billinton, N., Knight, A. W.: Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.*, 2001, 291, str. 175 – 97.
64. Johansen, W., Stenseth, E.-B., S., Wilson, R. C.: A Rapid and Sensitive Fluorimetric Protocol for the Quantification of Green Fluorescent Protein in Soluble Protein Extracts from Transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2007, 25, str. 45 – 54
65. Mitshuara, I., Shirasawa-Seo, N., Iwai, T., Nakamura, S., Honkura, R., Ohashi, Y.: Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: Possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics*, 2002, 160, str. 343 – 352
66. Tepfer, M., Friscina, A., Morroni, M., Turturo, C., Chiapetta, L., Thompson, J., Jacquemond, M.: Evaluation of the risks that recombination in transgenic plants expressing a viral coat protein gene would lead to the emergence of novel viruses. In: *Symposium Handbook, Biosafety Research of GMOS: Past Achievements and Future Challenges*. 10th Int. Symp. Biosafety of Genetically Modified Organisms, Wellington, New Zealand, 16-21 November 2008, str. 46
67. Turturo, C., Friscina, A., Gaubert, S., Jacquemond, M., Thompson, J. R., Tepfer, M.: Evaluation of the potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing viral sequences. *J. Gen. Virol.*, 2008, 89, str. 327 – 335
68. Barrett, A. J., Salvesen, G.: *Proteinase Inhibitors*. Elsevier, 1986, str. 661
69. Nirmala, X., Kodrík, D., Žurovec, M., Sehnal, F.: Insect silk contains a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, str. 2064 – 2073
70. Nirmala, X., Mita, K., Vanisree, V., Žurovec, M., Sehnal, F.: Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 2001, 10, str. 437 – 445

9. Přílohy



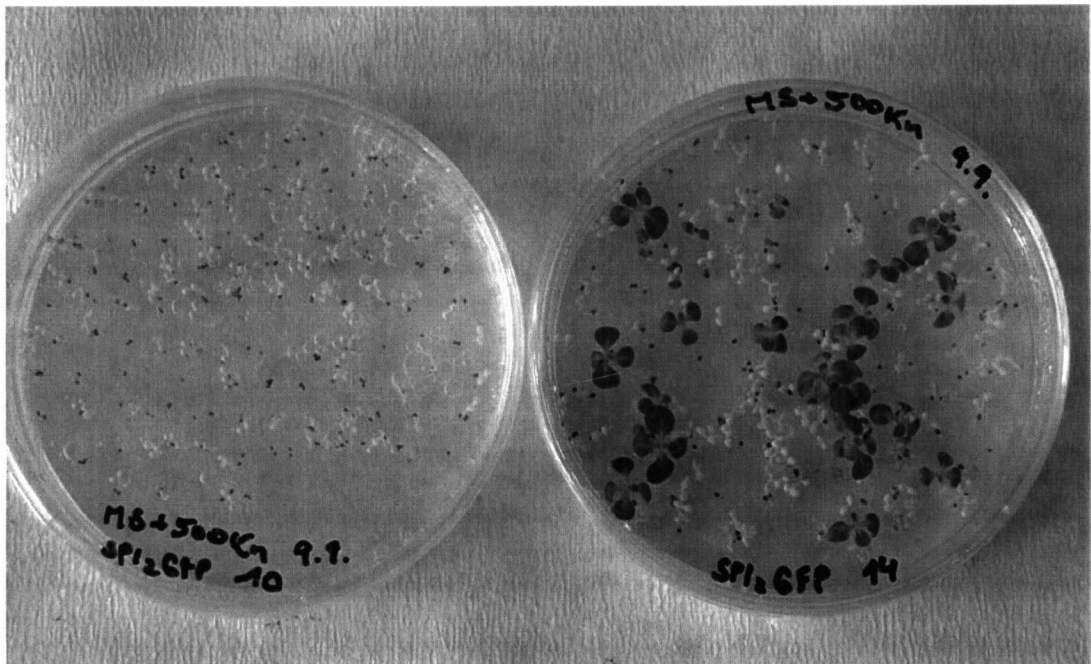
Obr. 7. Mozaikovitá fluorescence listu tabáku genotypu 6, zvětšení 10 ×1,6.



Obr. 8 Autofluorescence trichomů pozorovaná u listů netransgenního tabáku, zvětšení 4 ×1,6.



Obr. 9 GFP fluorescence u tabáku T_1 generace transformovaných alternativním konstruktem se samotným mGFP5-ER, zvětšení $3 \times 1,6$.



Obr. 10 Semenáčky tabáku genotypů č.10 a 14 T_0 generace na selekčním médiu s kanamycinem.,

