

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



**Molekulární charakteristika transformantů *L. esculentum* po
vnesení genu pro manóza-6-fosfátizomerázu**

Magisterská práce

2007

Pavla Přikrylová

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

Magisterská diplomová práce v nezkrácené podobě

Příkrylová Pavla (2007): Molekulární charakteristika transformantů *L. esculentum* po vnesení genu pro manóza-6-fosfátizomerázu; The molecular analysis of transgenic *Lycopersicon esculentum* plants harbouring incorporated *pmi* gene for phosphomannose isomerase, Mg Thesis, in Czech, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation

The aim of this study was to analyze number of incorporated T-DNA harbouring *pmi* and *nptII* transgenes and expression of the *pmi* gene in tomato transformants using Southern blot and Northern blot methods. The presence of a functional PMI protein was assessed using PMI-assay with Chlorophenol red dye. Mannose selection of tomato seeds was established and segregation patterns in T1 progeny were studied.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. J. Břízovi za vedení této práce a H. Niedermeierové a V. Tetoutové za cenné rady k laboratorním technikám. Dále bych chtěla poděkovat rodičům a přátelům za jejich podporu.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, 10. května 2007.....

Obsah

1. ÚVOD...1

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED...2

- 2.1 V současnosti používané selektovatelné transgeny a selekční systémy...2-3
- 2.2 Transgeny použité pro transformaci rajčat odrůdy MoneyMaker...4-5
- 2.3 Faktory ovlivňující selekci na manóze...5
- 2.4 Rostlinné druhy selektované pomocí *pmi*...6-10
- 2.5 Transgeny vnesené do genomu *Lycopersicon esculentum* (Mill.)...10
- 2.6 Test s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň (CPR) – PMI assay...11

3. MATERIÁL A METODY...12

3.1 Materiál...12

3.1 Rostlinný materiál...12-13

3.1.2. Plazmidový konstrukt...13

3.2 Metody...13

3.2.1 Detekce přítomnosti transgenu...13

3.2.1.1 PCR...13

3.2.1.1.1 Použité primery...13

3.2.1.1.2 Příprava vzorků pro „tissue“ PCR...14

3.2.1.1.3 Vlastní PCR...14

3.2.1.1.4 Elektroforéza v agarózovém gelu...14-15

3.2.1.2 Southernova hybridizace...15

3.2.1.2.1 Izolace DNA...15-16

3.2.1.2.2 Přečištění izolované DNA...16

3.2.1.2.3 Štěpení restrikční endonukleázou *Bam*HI...17

3.2.1.2.4 Elektroforéza restrikčních fragmentů DNA...17-18

3.2.1.2.5 Kapilární přenos DNA na membránu...18

3.2.1.2.6 Příprava a následné značení DNA sond...18-19

3.2.1.2.7 Hybridizace...19-20

3.2.1.3 Northernová hybridizace...20

3.2.1.3.1 Izolace RNA...20

3.2.1.3.2 Elektroforéza a kapilární přenos RNA na membránu...21

3.2.1.3.2.1 Příprava vzorků RNA na elektroforézu...21

3.2.1.3.2.2 Příprava markeru pro elektroforézu...22

3.2.1.3.2.3 Příprava a značení hybridizační sondy...22

3.2.1.3.2.4 Hybridizace...23

3.2.2 Test s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň (PMI-assay)...23

3.2.2.1 Média použitá pro PMI-assay...23-24

3.2.3 Selekcce semenáčků T1 generace a zhodnocení dědičnosti transgenu pomocí fenotypových štěpných poměrů...24

3.2.3.1 Zisk semenného potomstva transformantů...24

3.2.3.2 Složení selekčních médií...24-25

3.2.3.3 Sterilizace semen T1 generace a následná selekce na médiu s manózou nebo kanamycinem...25-26

3.2.3.4 Ověření shody pozorovaných a očekávaných fenotypových štěpných poměrů v T1 generaci pomocí Chí-kvadrát testu...26

4. VÝSLEDKY...27

4.1 Molekulární charakteristika transformantů...27

4.1.1 Southernova hybridizace...27-29

4.1.2 Northernová hybridizace...29

4.2	Test s acidobazickým indikátorem CPR (PMI-assay)...	30-32
4.3	Štěpné poměry v T1 generaci...	33
4.3.1	Zjišťování selekční koncentrace manózy vhodné pro selekci T1 transformantů...	33-35
4.3.2	Selekce T1 potomstva transformantů a ověření štěpných poměrů pomocí chí-kvadrát testu a PCR...	35-39
5.	DISKUZE ...	40-44
6.	ZÁVĚR ...	45-46
7.	POUŽITÁ LITERATURA ...	47-53
8.	PŘÍLOHY ...	54-55

1. ÚVOD

Transformace umožňuje vnášet do rostlin cizí geny, a tím ovlivňovat funkci jaderných genů a získat rostliny s žádoucími vlastnostmi. Transgenozí lze vytvořit kultivary plodin odolnější vůči stresu nebo patogenům, s nižším obsahem nežádoucích látek (např. alkaloidů), s lepšími nutričními a zemědělskými charakteristikami nebo třeba rostliny produkující virové proteiny, jež lze použít pro vakcinaci. Odrůdy transgenních zemědělských plodin se již běžně pěstují a používají pro krmení hospodářských zvířat nebo produkci potravin.

Účinnost transformace se obvykle pohybuje maximálně v desítkách procent a je proto nutné transformovat vysoké počty explantátů a po transformaci odlišit transformované rostliny od netransformovaných. Proto se společně s genem, který chceme do rostliny přenést, vnáší současně i selektovatelný gen. Ten umožní úspěšně transformované rostlinné buňce exprimující vnesené geny přežít a regenerovat v podmínkách, které totéž netransformované buňce neumožní.

Nejčastěji se pro selekci používají geny pro rezistenci k antibiotikům nebo herbicidům (selekce s využitím těchto genů bývá označována jako negativní selekce) a různé alternativní selektovatelné geny, většinou umožňující transformované rostlině využívat jako zdroj energie nějaký cukr, například xylózu nebo manózu. Všechny selekční systémy ale nelze použít u všech rostlin a existence více různých selekčních systémů je výhodná i kvůli opakované transformaci jednoho organismu, a proto jsou hledány nové selekční postupy.

Během své bakalářské práce jsem otestovala možnost použít u rajčat odrůdy MoneyMaker selekci s manózou jako selekčním agens a genem *pmi* jako selektovatelným transgenem a srovnala jsem ji s rutinně používanou selekcí na kanamycinu. Ve třech transformačních pokusech jsem získala při selekci na manóze nebo na kanamycinu celkem 35 transgenních rostlin.

Cíle této práce byly:

Provést molekulární charakteristiku transformantů rajčete, které jsem získala během bakalářské práce, určit počet kopií vnesené T-DNA a posoudit úroveň exprese genu *pmi*.

Posoudit přítomnost funkčního proteinu manóza-6-fosfátizomerázy v transgenních rostlinách pomocí testu s acidobazickým indikátorem.

Zavést selekci semenného potomstva transformantů v T1 generaci na manóze a určit Mendelovské fenotypové štěpné poměry v tomto potomstvu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

V současné době jsou pro rychlejší rozlišení transformovaných rostlinných pletiv a tkání od netransformovaných používány různé selekční systémy. Podle principu, na kterém jsou založeny, je můžeme rozdělit do dvou skupin – systémy negativní a pozitivní selekce.

Většina dosud používaných systémů využívá geny pro rezistenci k antibiotikům či herbicidům (Joersbo, 2001). Je ovšem nežádoucí, aby tyto geny působily v cílovém organismu i po ukončení selekce, a výzkum se proto zaměřuje na selekční systémy, které využívají geny, jejichž produkty jsou považovány za neškodné. Nové selekční systémy jsou vyvíjeny i kvůli potřebě opakované transformace a selekce u daného organismu (opakovaná selekce musí být prováděna na odlišných selekčních agens). V neposlední řadě nové selekční systémy založené na principu pozitivní selekce umožňují v mnoha případech lepší regeneraci transformantů a tím i dosažení vyšší transformační účinnosti než klasické systémy selekce na antibiotikách či herbicidech (Penna et al., 2002).

Přítomnost nežádoucích selektovatelných genů v transgenní rostlině se dá vyloučit použitím systémů umožňujících excisi selektovatelného transgenu (Sugita et al., 1999; Ebinuma et al., 1997). Tyto metody jsou však velice pracné a z tohoto důvodu se příliš nepoužívají.

2.1 V současnosti používané selektovatelné transgeny a selekční systémy

Pro selekci rostlin na selekčních médiích jsou využívány upravené geny nejčastěji z bakterií, jejichž původní regulační sekvence byly odstraněny a nahrazeny regulačními sekvencemi vhodnými pro řízení exprese genu v rostlinách. Tyto promotorové a terminátorové sekvence pochází nejčastěji z rostlinných virů. Části výsledného selektovatelného transgenu jsou tedy různého původu, transgen je chimérický.

Systémy **negativní selekce** využívají transgeny umožňující dané rostlině přežít na médiu s toxickým selekčním agens, nejčastěji antibiotikem nebo herbicidem. V některých případech dochází vlivem látek vypouštěných z nekrotických tkání netransformovaných rostlin hynoucích na selekčním médiu k horší regeneraci úspěšně transformovaných rostlin. V současné době jsou k negativní selekci využívány tyto transgeny: *nptII* pro neomycin fosfotransferázu (Fraley et al., 1983), gen *ppo* pro rezistenci k butafenacilu (Li et al., 2003),

gen *hph* (synonyma *hpt*, *hyg*) pro rezistenci k hygromycinu (Waldron et al., 1985), chimérické transgeny pro rezistenci k antibiotikům streptomycinu (Jones et al., 1987), gentamycinu (Hayford et al., 1988), bleomycinu a metotrexátu (Barrell et al. 2002), geny pro EPSP a GOX pro rezistenci ke glyfozátu (Shah et al., 1986), geny *pat* a *bar* pro rezistenci k fosfinitricinu (De Block et al., 1987), transgeny pro rezistenci k chlorsulfuronu (Mazur et al. 1987), transgen pro rezistenci k imidazolinonovým herbicidům (Andersson et al. 2003; Subramanian et al., 1990), transgen *tdc* pro rezistenci k metyltryptofanu (Goddijn et al. 1993), transgen *ilvA* pro treonindeaminázu necitlivou ke zpětnovazebné inhibici isoleucinem (Ebmeier et al. 2004) a transgen *pflp* pro rezistenci k bakterii *Erwinia carotovora* (You et al. 2003). Dále je třeba zmínit další selekční systémy založené na rezistenci vůči bromoxynilu (Stalker et al., 1988), chloramfenikolu (De Block et al., 1984; Charest et al., 1989), 2,4-dichlorofenoxyoctové kyselině (Streber a Willmitzer, 1989; Lyon et al., 1989) a vůči méně obvyklým selekčním agens, jakými jsou například: galaktóza (Joersbo et al. 2003) a aminokyselina D-serin (Erikson et al. 2005).

Při **pozitivní selekci** poskytne vnesený selektovatelný chimérický transgen transformovaným rostlinám metabolickou výhodu ve srovnání s rostlinami netransformovanými. Selekční agens není samo o sobě jedovaté, takže nezpůsobí úhyn netransformovaných rostlin rostoucích na médiu s tímto agens, ale netransformované rostliny obvykle strádají a projevuje se u nich inhibice růstu. Obvykle nedochází k tak rozsáhlým nekrotickým jako při negativní selekci (viz přehledné články Penna et al., 2002; Joersbo, 2001). Pro pozitivní selekci jsou využívány tyto transgeny: transgen *xylA* kódující enzym xylózoizomerázu umožňující metabolizovat xylózu (Wong et al., 1991; Lee et al., 1990), *gusA* z *Escherichie coli* kódující enzym β -glukuronidázu, který hydrolyzuje neaktivní glukuronidové deriváty cytokininů na aktivní cytokininy (Joersbo a Okkels, 1996), transgen *dao1* kódující enzym oxidázu D-aminokyselin, který se dá využít pro pozitivní i negativní selekci v závislosti na tom, zda D-aminokyselinu přidanou do média metabolizuje na toxický nebo netoxický produkt (Erikson et al. 2004) a konečně transgen *pmi* kódující enzym manóza-6-fosfátizomerázu umožňující rostlinám přežít na médiu s manózou (Miles a Guest, 1984).

2.2 Transgeny použité pro transformaci rajčat odrůdy MoneyMaker

Během své bakalářské práce jsem provedla transformaci rostlin rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.), odrůdy MoneyMaker kmenem LBA 4404 bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, který nesl plazmidový konstrukt pCB3160 s geny *nptII* pro rezistenci ke kanamycinu a *pmi* pro rezistenci k manóze.

Gen *nptII* pro rezistenci k aminoglykosidickým antibiotikům (Fraley et al., 1983). Chimérický selektovatelný transgen *nptII* kódující neomycin fosfotransferázu II je původně součástí transpozonu *Tn5* z *E. coli*. Kódující sekvence se nalézá na jeho fragmentu ohraničeném restrikcími místy pro enzymy *BglIII-BamHI*, který má velikost 1,1 kb. Regulační sekvence řídící expresi *nptII* jsou rostlinné (Ondřej a Drobník, 2002). Gen způsobuje rezistenci vůči aminoglykosidickým antibiotikům kanamycinu, neomycinu a geneticinu. Selekcce na kanamycinu je dnes jednou z nejpoužívanějších metod při transformaci rostlinných pletiv a buněk. Má však i svá omezení, protože rostliny z čeledí *Fabaceae* a *Poaceae* projevují relativně vysokou míru přirozené rezistence. Pro transformaci *Solanaceae* je tento selekční systém funkční. Běžně se používá u brambor, rajčat i petúnií. Účinnost transformace rajčete, odrůdy MoneyMaker, genem pro neomycinfosfotransferázu dosáhla 11,1 % a 7,7 % v závislosti na použitém kmeni agrobakteria (Žaludová, 2002) a 12,5 % (při jednodenní kokultivaci děložních lístků s agrobakteriem), 10 % (při dvoudenní kokultivaci s agrobakteriem) a 9 % (při běžně používané třídenní kokultivaci s agrobakteriem) (Přikrylová 2004).

Gen *pmi* kódující manóza-6-fosfátizomerázu pro rezistenci k manóze. Tento gen pochází z bakterie *Escherichia coli* (*manA*) (Miles a Guest, 1984) a byl připojen za rostlinný promotor. Analogické geny pro M6P se přirozeně nachází v lidském genomu i v genomu mnoha jiných organismů, u rostlin však nebyla s výjimkou sóji a několika dalších luštěnin jejich přítomnost prokázána. Enzym manóza-6-fosfátizomeráza provádí reverzibilní přeměnu manóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát, který je prekurzorem glykolýzy a je rostlinou dále metabolizován. Rostliny nesoucí gen *pmi* mohou tedy využívat manózu jako zdroj energie. Hlavními výhodami selekčního systému využívajícího chimérický transgen *pmi* jsou bezpečnost pro konzumenta (analog genu *pmi* byl nalezen v savčím i v lidském genomu, nachází se i v genomu kvasinek a střevních bakterií, takže obavy z případného horizontálního

přenosu jsou irelevantní, produkt genu je rychle a snadno degradován proteázami) a nízká cena a snadná dostupnost selekčního agens.

Fytotoxický účinek manózy byl poprvé popsán u pšenice a rajčete (Stenlid, 1954; Morgan a Street, 1959), u nichž manóza inhibovala dýchání a růst kořenů. Protože manóza sama o sobě není pro rostliny jedovatá, přisuzuje se tento účinek manóza-6-fosfátu (M6P), který vzniká z manózy v rostlinné buňce po fosforylaci vnitřní hexokinázou. M6P se v rostlinné buňce hromadí a inhibuje fosfoglukóza izomerázu, enzym účastnící se glykolýzy. Dále dochází k vyčerpání vnitrobuněčných zásob pyrofosfátu potřebného pro produkci ATP (Goldsworthy a Street, 1965) a k transkripční represi genů spojených s fotosyntézou a glyoxylátovým cyklem (Jang a Sheen, 1994). U kukuřice může M6P dokonce vyvolávat apoptózu (Stein a Hansen, 1999).

Transformanti nesoucí gen *pmi* exprimují ve svých tkáních manóza-6-fosfátizomerázu, která jim konverzí manóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát umožní žít na médiu s manózou a využívat ji jako doplňkový zdroj energie. Je-li v médiu nedostatek jiného zdroje energie, jsou transformované buňky a pletiva oproti netransformovaným ve výhodě.

2.3 Faktory ovlivňující selekci na manóze

Přídavek jiných cukrů do média s manózou značně ovlivňuje selekci. Většina rostlin nemůže růst na médiu pouze s manózou a vyžaduje doplňkový zdroj uhlovodíků. Nejčastěji se do selekčního média přidává sacharóza, která značně zmírňuje fyto toxické účinky manózy (Joersbo et al., 1998). Joersbo et al. (1999) zkoumali míru interakce glukózy, sacharózy, fruktózy a maltózy s manózou a vliv přídavku fosfátů na transformační frekvenci. Glukóza přidaná do média v desetinásobném množství než manóza zcela eliminovala účinek manózy. Ostatní cukry také zeslabovaly toxický účinek manózy, ale podstatně méně než glukóza (sacharóza 4x méně, maltóza 5x a fruktóza 7x). Naopak nejvyšších transformačních frekvencí bylo dosaženo se sacharózou jako doplňkovým zdrojem energie. Maltóza přidaná do selekčního média zcela zamezila výskytu falešně pozitivních nálezů (escapů). Přídavek fosfátů do selekčního média velice příznivě ovlivnil dosaženou transformační frekvenci, což potvrzuje, že M6P způsobuje v buňkách nedostatek fosfátů.

Síla promotoru a transformační frekvence nevykazují jednoduchou závislost. Nejvyšších transformačních frekvencí překvapivě nebylo dosaženo se silnými promotory, ale s promotory exprimujícími gen *pmi* na střední úrovni (Joersbo et al., 2000; Joersbo, 2001).

2.4 Rostlinné druhy selektované pomocí *pmi*

Doposud byl selekční systém založený na vnesení genu *pmi* jako selektovatelného genu a přidání manózy do média jakožto selekčního agens úspěšně vyzkoušen u těchto druhů: **Cukrová řepa (*Beta vulgaris* L.)** (Joersbo et al., 1998, 1999, 2000). Pro transformaci pomocí *A. tumefaciens* byly použity dělohy. Koncentrace manózy v médiu byla zvyšována stupňovitě a jako zdroj energie byla do média přidávána sacharóza. Síla exprese genu *pmi* nezávisela na selekčním tlaku a již nízká hladina exprese postačovala pro přežití na selekčním médiu. Transformační frekvence dosažené při selekci na manóze byly zhruba 10x vyšší než při selekci na kanamycinu (0,94 % ve srovnání s 0,091 %), vyskytlo se méně falešně pozitivních rostlin a transformanti lépe kořenili.

Maniok (*Manihot esculenta* Crantz) (Zhang et al., 2000). Embryogenní suspenze byly transformovány pomocí *A. tumefaciens*. Koncentrace manózy v médiu nebyla v průběhu pokusu měněna. Dosažená transformační frekvence byla srovnatelná s transformační frekvencí při selekci na hygromycinu. Při transformaci embryogenní suspenze mikroprojektily (Zhang a Puonti-Kaerlas, 2000) a stupňovitým zvyšování koncentrace manózy v selekčním médiu dosáhla transformační frekvence při selekci na manóze pouze polovičních hodnot TF dosažené při selekci na hygromycinu.

Salát (*Lactuca sativa* L.) (Růžičková 2006). Děložní lístky salátu byly transformovány diskovou metodou transformace a posléze kultivovány na selekčních médiích s různou koncentrací manózy a sacharózy. Průměrná TF na médiu s 2 % koncentrací manózy i sacharózy byla srovnatelná s běžně dosahovanou TF při selekci na kanamycinu (15 % ve srovnání se 17,5 %). Nejvyšší dosažená TF na tomto médiu byla dokonce 25 %.

Okurka (*Cucumis sativus* L.) (He et al. 2006). Na médiu s 1 % manózy a 1 % sacharózy byly selektovány explantáty z děložních lístků a z hypokotylů. Nejvyšší dosažená TF činila 23%.

Čínské zelí (*Brassica rapa* L.) (Min et al. 2006). Hypokotylové explantáty byly transformovány pomocí agrobakteria geny *pmi* a geny *GLO* (pro L-guluno- γ -lakton oxidázu) a *JMT* (pro jasmono-metyltransferázu). Selekcce probíhala na médiu s 0,7 % koncentrací manózy a 2 % koncentrací sacharózy. Dosažené TF byly 1,4% pro GLO a 3,0% pro JMT.

Cibule (*Allium cepa* L.) (Aswath et al. 2006). Embryogenní kalusy odvozené z kořínků cibule byly transformovány pomocí agrobakteria a mikroprojektily, přičemž transformační frekvence činila 23 % pro přímou transformaci a 27 % pro transformaci pomocí agrobakteria.

Brambor (*Solanum tuberosum* L.) (Gazdová 2004, 2007). Internodia bramboru kultivaru Bintje byla transformována pomocí agrobakteria a poté selektována na médiích s různou koncentrací manózy a sacharózy. Nejvyšší dosažená TF při selekci na manóze byla 36,4 %, tedy více než dvakrát vyšší než nejvyšší publikovaná TF při selekci bramboru na kanamycinu (18 %) (Newell et al. 1991).

Rajče (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Přikrylová 2004). Transformovala jsem děložní lístky rajčete odrůdy MoneyMaker diskovou metodou transformace a poté jsem explantáty selektovala na médiích s různou koncentrací manózy (0,125 – 1 g/l) a sacharózou a na médiu s kanamycinem. Nejvyšší transformační účinnosti jsem dosáhla na médiu s 0,5 % koncentrací manózy a to 4,16 %, přičemž nejvyšší dosažená TF při selekci na kanamycinu byla 12,5 %.

V témže roce vyšla publikace (Sigareva et al. 2004), v níž byla popsána tři variet rajčat na selekčních médiích s manózou a glukózou. Od každé variety byly transformovány děložní lístky, hypokotyly a listové segmenty. Průměrná transformační frekvence se pohybovala od 2% do 15,5% v závislosti na vektorovém konstruktu, genotypu a typu transformované tkáně.

Jabloň domácí (*Malus domestica* Borkh) (Degenhardt et al. 2006). Listové segmenty jabloně byly transformovány geny *pmi* a *gus* pomocí agrobakteria. a poté selektovány na médiích s různou koncentrací manózy a sorbitolu, přičemž koncentrace manózy v médiu byla během selekce postupně zvyšována. Dosažená TF byla pokládána za dostatečnou.

Pomerančovník (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Boscariol et al., 2003). Pro transformaci agrobakteriem byly použity epikotylové segmenty. Selekční médium obsahovalo sacharózu a manózu. Dosažená TF se pohybovala v rozmezí 3 – 23 % v závislosti na kultivaru. Při selekci *C. sinensis* na kanamycinu je běžně dosahovaná TF 7,6 – 15 % a taktéž závisí na kultivaru.

Vinná réva (*Vitis berlandieri* Planch., *Vitis riparia* Michx.) (Reustle et al. 2003). Při selekci vinné révy na manóze bylo dosaženo mnohonásobně nižších TF než při selekci na kanamycinu.

Mandloň (*Prunus dulcis* Mill.) (Ramesh et al. 2006). Transformační účinnost dosažená při selekci listových segmentů mandloně na médiu s 0,25 % koncentrací manózy byla prakticky stejná jako TF při selekci na kanamycinu, tedy 6,8 % ve srovnání s 5,6 %.

Kukuřice (*Zea mays* L.) (Negrotto et al., 2000). Po transformaci embryí pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* následovala pre-selekční fáze (na médiu bez manózy) dlouhá 10 až 14 dní (pro úspěšnou regeneraci explantátů) a po ní selekce na manóze. TF značně kolísala u jednotlivých nezávislých pokusů, hodnoty se lišily až o řád (0,7 – 32 %). Wright et al. (2001) transformovali embryogenní kalusy mikroprojektily. Selektce transformantů probíhala na médiu s manózou jako jediným zdrojem energie, médium pro následnou regeneraci bylo doplněno o sacharózu. Průměrná TF dosažená v tomto pokusu činila 45 % a byla téměř 4x vyšší než TF při selekci na herbicidu Basta (účinná složka fosfintricin, selektovatelný gen *pat*). Reed et al. (2001) dosáhli průměrné TF okolo 45 % při transformaci embryí mikroprojektily a 35 % při transformaci prostřednictvím *A. tumefaciens*. Selektční i regenerační médium obsahovalo manózu i sacharózu, koncentrace a vzájemný poměr obou cukrů byly upravovány během pokusu.

Dochan, „černošské proso“ (*Pennisetum glaucum* L.) (O’Kennedy et al., 2004). Embrya byla transformována pomocí mikroprojektilů. Růst kalusů byl indukován na médiu bez manózy. Selektce probíhala na několika variantách médií se sacharózou, glukózou či maltózou jako zdrojem energie a s různými koncentracemi manózy, které byly po celou dobu pokusu konstantní nebo byly v průběhu pokusu stupňovitě zvyšovány. Nejvyšší TF (0,19 - 0,72 %) bylo dosaženo při selekci na postupně se zvyšující koncentraci manózy. TF při selekci s využitím genu *bar* je více než o řád nižší, běžně činí asi 0,02 %.

Čirok (*Sorghum vulgare* Pers.) (Gao et al. 2005). Nezralá embrya dvou odrůd čiroku byla transformována pomocí agrobakteria vektorem nesoucím jednak gen *pmi* a dále reportérový gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Dosažená TF činila 3,3 % a 2,88 %, což je zatím nejvyšší TF dosažená při transformaci čiroku.

Pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Wright et al., 2001). Embryogenní kalusy byly transformovány pomocí ostřelování mikroprojektily. Regenerační a selekční média obsahovala manózu i sacharózu. Průměrná TF pro selekci na manóze činila 20 % ve srovnání

s 12 % pro selekci na Basta (gen *bar*). Reed et al. (2001) dosáhli při transformaci pšenice mikroprojektily obdobných výsledků.

Tvrdá pšenice (*Triticum turgidum subsp. durum* L.) (Gadaleta et al. 2006). Neobvykle vysoké TF při selekci na manóze (90,1 %) bylo dosaženo u tvrdé pšenice. Nezralá embrya pšenice byla transformována pomocí mikroprojektilů. Běžně užívaná selekce s využitím transgenu *bar* pro rezistenci k fosfotricinovým herbicidům dosahovala pouze 26,4 %.

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) (Launis, nepublikováno, citováno podle Reed et al., 2001) Embrya ječmene byla transformována mikroprojektily. Během selekce byla u tohoto druhu zjištěna tolerance i k relativně vysokým koncentracím manózy. Průměrná TF se pohybovala okolo 3 %, což je srovnatelné se selekcí na herbicidech Basta.

Rýže (*Oryza sativa* L.) (He et al. 2004). Prostřednictvím agrobakteria byly transformovány embryogenní kalusy odvozené z nezralých semen, která byla dále selektována na médiu s 2,5 % manózy a 0,5 % sacharózy. Nejvyšší dosažená TF byla relativně nízká (6 %) ve srovnání s již dříve publikovanou prací zabývající se selekcí rýže na manóze (Lucca et al. 2001), kde autoři uvádí TF až sedmkrát vyšší (41 %).

Psineček výběžkatý (*Agrostis stolonifera* L.) (Fu et al. 2005). Kalusy odvozené ze semen byly transformovány pomocí agrobakteria a selektovány na médiu s 1,5 % manózy. Společně s genem *pmi* byl do psinečku vnesen i gen pro zelený fluorescenční protein, přičemž kalusy se zaznamenanou aktivitou GFP úspěšně přežívaly na selekčním médiu.

Konopí seté (*Canabis sativa* L.) (Feeney a Punja 2003). Pro transformaci pomocí agrobakteria byly použity suspenzní kalusové kultury odvozené z listových a stonkových segmentů. Selekcí médium obsahovalo 1 -2 % manózy a průměrná TF činila více než 30 %.

Huseníček (*Arabidopsis thaliana* L.) (Todd a Tague, 2001). Pro transformaci pomocí *A. tumefaciens* byly použity květní pupeny. Regenerace transformantů probíhala na médiu zcela bez manózy, na manóze byla selektována semena získaná z těchto transformovaných rostlin, a to dvěma způsoby, buď byla semena sterilně vyseta na agarové médium s manózou, nebo nesterilně do půdy a poté podrobena postřiku roztokem manózy. Dosažená hodnota TF 2,5 %

při selekci ve sterilních podmínkách je srovnatelná s hodnotou TF pro selekci *A. thaliana* na kanamycinu.

Uvádí se, že selekce na manóze s využitím genu *pmi* byla vyzkoušena i u řepky olejky, vodního melounu, tykve, kapusty a slunečnice, dosud však nebyly tyto výsledky publikovány.

2.5 Transgeny vnesené do genomu *Lycopersicon esculentum* (Mill.)

V roce 1986 byl do genomu rajčete pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* poprvé vnesen cizí gen (Chyi et al., 1986). Před deseti lety již byla na trh uvedena první transgenní odrůda rajčete – FlavrSavr – nesoucí v antisense orientaci transgen pro polygalakturonázu. Díky tomu je blokována činnost tohoto enzymu, což má za následek prodloužení životnosti sklizených plodů (Smith et al., 1988; Sheety et al., 1988).

Dnes existují transgenní rostliny rajčete nesoucí mimo jiné geny pro rezistenci k hád'átkům *Globodera rostrichoides* a *Meloidogyne incognita* (Jung et al., 1998), gen pro δ -endotoxin z bakterie *Bacillus thuringiensis* způsobující rezistenci k hmyzím škůdcům (Rhim et al., 1995), gen pro rezistenci k plísni *Phytophthora infestans* (Thomzik et al., 1997) či gen pro rezistenci k viru tabákové mozaiky (TMV) (Witham et al., 1996), viru mozaiky okurky (Tomassoli et al., 1999), k viru TSWV, který způsobuje žloutnutí a vadnutí rostlin rajčat (Haan et al., 1996).

Nedávno byl do genomu rajčete vnesen gen *cbf1* z *Arabidopsis thaliana*, který u transformovaných rostlin zvýšil toleranci k mrazu, nedostatku vody a vyššímu obsahu solí v půdě (Lee et al., 2003; Hsieh et al., 2002).

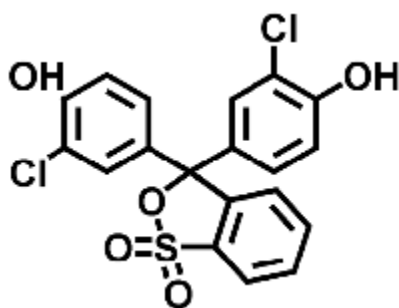
Genetické modifikace rajčete mají za cíl i zlepšení nutričních a chuťových vlastností plodů; transgenozí se podařilo v plodech zvýšit obsah lykopenu a β -karotenu (viz Ondřej a Drobník, 2002).

. Jsou pěstovány odrůdy rajčat s prodlouženou životností plodů nesoucí v antisense orientaci geny pro expanziny (ty způsobují měknutí plodů) inhibující jejich činnost (Brumell et al., 1999) nebo geny narušující syntézu ethylenu a zpomalující zrání plodů (Picton et al., 1993). Za účelem vývoje „potravinové vakcíny“ byl do rajčete vnesen například chimérický gen *LIE7* z lidského papillomaviru (tento virus způsobuje rakovinu děložního čípku) (Bříza et al., 2007; Žaludová, 2002), gen pro kapsidový protein viru Norwalk (způsobuje epidemický výskyt průjmu) (Zhang et al., 2006).

2.6 Test s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň (CPR) – PMI assay

Acidobazický indikátor chlorfenolová červeň se v biologii využívá díky několika příznivým vlastnostem. Viditelný barevný přechod způsobený změnou pH je u tohoto acidobazického indikátoru v oblasti blízké pH fyziologických roztoků, zhruba mezi 5,2 až 6 a ke změně barvy dochází v úzkém rozmezí hodnot pH. Indikátor je chemicky stabilní a v běžně používaných koncentracích není toxický. Pro pH 4,8 se uvádí žlutá barva indikátoru, při vyšším se barva mění k červené a při hodnotách pH vyšších než 6,4 přechází barva CPR až k fialové. Chemický název CPR je 3',3'-dichlorofenolsulfonaftalein. Vzorec molekuly CPR je na Obr. č. 1.

Princip PMI assaye je takový, že rostlina metabolizující cukr způsobí vypouštěním metabolitů okyselení média s CPR a tím změnu jeho barvy. To umožňuje snadné a rychlé testování většího množství rostlin na přítomnost například funkčního proteinu manóza-6-fosfátizomerázy, i když se jedná o test nepřímý. PMI assay pro otestování přítomnosti funkčního produktu genu *pmi* byl použit například v publikacích Fu at al., (2005); Gao et al., (2005); Degenhardt et al., (2006) nebo Feeney a Punja, (2003).



Obr. 1 Struktura molekuly indikátoru Chlorfenolová červeň.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro molekulární charakteristiku jsem použila 35 transgenních rostlin rajčete (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), odrůdy MoneyMaker, transformovaných diskovou metodou (Horsch et al., 1985) pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (kmen LBA 4404), jeden falešný pozitiv (rostlina kořenila a prospívala na médiu s vysokou koncentrací manózy – 0,75 %, ale pomocí PCR u ní nebyl prokázán ani jeden z obou vnesených transgenů) a jednu negativní kontrolu. Tyto rostliny nesoucí alespoň jeden z transgenů *pmi* a *nptII* (kromě falešného pozitivu a negativní kontroly) jsem získala během své bakalářské práce selekcí na médiích s různou koncentrací manózy nebo selekcí na médiu s kanamycinem a pomocí PCR jsem u nich ověřila přítomnost amplifikovatelného fragmentu genů *pmi* a *nptII*. Rostliny odvozené z jednoho původního explantátu jsem předběžně považovala za klon, což jsem zohlednila i při výpočtu dosažené transformační frekvence na daném selekčním médiu.

selekční regenerační médium (označení rostliny)	koncentrace manózy [%]	koncentrace kanamycinu [mg.l ⁻¹]	počet nasazených explantátů	počet <i>nptII</i> / <i>pmi</i> pozitivních nezávislých linií	dosažená TF [%]
RM1+T (M3/4-)	0,75	0	260	1	0,38
RM3+2xT (M1/2-)	0,5	0	120	5	4,16
RM5+T (M1/8-)	0,125	0	124	4	3,2
+T+K (1 d)* (K85/)	0	100	40	5	12,5
+T+K (2 d)** (K85/)	0	100	40	4	10
+T+K (3 d)*** (K85/)	0	100	200	18	9

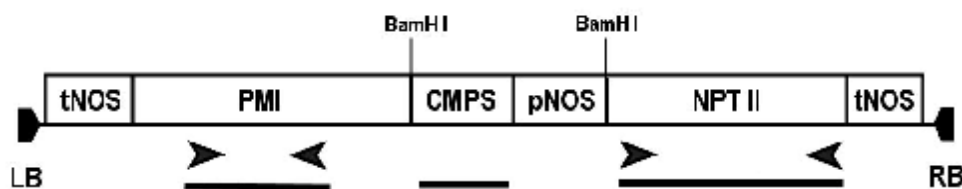
Tab. 1: Dosažená transformační frekvence na různých selekčních médiích a počet získaných nezávislých pozitivních linií. Šedě jsou vyznačeny nejvyšší dosažené TF při selekci na manóze a na kanamycinu; * jednodenní kokultivace s agrobakteriem; ** dvoudenní kokultivace s agrobakteriem; *** třídenní kokultivace s agrobakteriem; kurzívou v prvním sloupci je uvedeno označení rostliny v této práci (číslo, které následuje za tím odkazuje na původní explantát); 2 rostliny získané během bakalářské práce při selekci na kanamycinu uhynuly během následných pasáží ještě před odběrem vzorků tkáně pro molekulární testy.

U získaných transgenních rostlin jsem pomocí PCR zjišťovala přítomnost amplifikovatelného fragmentu vnesených transgenů. Rostliny: K85/8A, 8C, 11A, 15B, 17A,

17C a 22A se podle výsledků PCR jevíly negativní pro přítomnost genu *pml* a naopak rostliny: M3/4-6B a M1/8-44A, 44B postrádaly amplifikovatelný fragment genu *nptII*. Rostlina M3/4-3B prosperovala na médiu s 0,75 % koncentrací manózy, ale z výsledků PCR vyplynulo, že se jedná o falešně pozitivní netransgenní rostlinu.

3.1.2 Plazmidový konstrukt

Použité rostliny byly transformovány plazmidem pCB3160 vytvořeným Dr. J. Vlasákem z Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR. Plazmidový konstrukt vznikl včleněním genu *nptII* pro neomycin fosfotransferázu s promotorem NOS a terminátorem tNOS do oblasti polylinkeru plazmidu pNOV2819 (od firmy Syngenta). Tento plazmid dále nese gen *pml* (upravený gen *manA* z *Escherichie coli*) kódující manóza-6-fosfát izomerázu řízený CMPS promotorem (krátká verze promotoru z Cestrum Yellow Leaf Curling Virus), který vykazuje v rajčeti dobrou úroveň exprese, a tNOS terminátorem. Struktura T-DNA plazmidu je na Obr. 2.



Obr. 2 T-DNA plazmidu pCB3160 použitého pro transformaci

LB – levá hraniční sekvence, RB – pravá hraniční sekvence, šipky reprezentují primery použité při PCR, černě jsou vyznačeny sondy pro Southernovu a northernovou hybridizaci, zobrazena je pozice dvou štěpných míst pro restriční endonukleázu *Bam*HI, která se nachází uvnitř T-DNA

3.2 Metody

3.2.1 Detekce přítomnosti transgenu

3.2.1.1 PCR

3.2.1.1.1 Použité primery

Pro zjištění přítomnosti genu *pml* kódujícího manóza-6-fosfátizomerázu jsem použila primery PMI1 (5'-ACA GCC ACT CTC CAT TCA-3') a PMI2 (5'-GTT TGC CAT CAC

TTC CAG-3), jejichž sekvence byla součástí dokumentace k plazmidu pNOV2819 od firmy Syngenta. Výsledný fragment byl dlouhý 514 bp.

3.2.1.1.2 Příprava vzorků pro „tissue“ PCR

Do mikrozkušavky jsem ustříhla malý kousek rostlinné tkáně (maximálně 4x4 mm) a připipetovala 40 µl 0,25 M NaOH. Zkušavku s tkání jsem ponořila na 30 vteřin do vodní lázně o teplotě 100°C a poté zchladila na ledu. K ochlazené směsi jsem přidala 40 µl 0,25 M HCl a 20 µl roztoku 0,5 M Tris (pH = 8,0), který navíc obsahoval 0,25 % neiontového detergentu Nonidet 40, promíchala a povařila 2 minuty ve vodní lázni. Vzorky jsem opět zchladila na ledu a buď použila ihned k PCR nebo zamrazila při -20°C pro pozdější využití.

3.2.1.1.3 Vlastní PCR

Pro PCR jsem použila čerstvé vzorky nebo zamražené, které musely být před použitím znovu 2 minuty inkubovány ve vodní lázni při 100°C. Polymerázová řetězová reakce probíhala v reakční směsi o objemu 25 µl v 0,5 ml mikrozkušavkách. Do reakční směsi byla přidána rostlinná tkáň o velikosti zhruba 1 mm². Složení amplifikační reakční směsi pro jednoduchou PCR bylo následující:

- 10 % (v/v) 10x koncentrovaného PCR pufru*
 - 10 % (v/v) 10x koncentrovaných 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) (1,5 units)
 - 76,8 % sterilní destilované vody
- *100 mM Tris-HCl (pH = 8,3); 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0,5 % Nonidet P-40

Polymerázová řetězová reakce probíhala na cykleru T3 Thermocycler (Biometra), a to v 35 cyklech. Každý cyklus měl následující teplotní průběh:

denaturace	94°C.....45 s
annealing	55°C.....30 s
extenze	72°C.....2 min

3.2.1.1.4 Elektroforéza v agarózovém gelu

Amplifikované fragmenty DNA po PCR reakci jsem analyzovala elektroforézou. K té jsem používala 1,5 % agarózový gel (agaróza Serva) v TBE pufru* s přidavkem 10 µl

zásobního roztoku ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) ethidium bromidu na 100 ml gelu. Na gel jsem nanášela 20 μl každého vzorku smíchané s 3,5 μl nanášecího pufru (Takara). Jako velikostní standard jsem používala 5 μl (0,25 μg) 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). Elektroforéza probíhala asi 60 minut při napětí 80 – 100 V. Výsledné elektroforetogramy byly získány pomocí UV transluminátoru a zobrazovacího systému ImageStore 5000 firmy UVP.

***TBE pufr**

složení v $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

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

3.2.1.2 Southernova hybridizace

3.2.1.2.1 Izolace DNA

DNA jsem izolovala z transgenních rostlin rajčete a jednoho escapu získaných při selekci na kanamycinu a na manóze v průběhu bakalářské práce. Reakce probíhala podle upravené metody autorů Tai a Tanksley (1991).

V tekutém dusíku jsem rozdrtila 1 – 2 g listové hmoty a drť přenesla vychlazenou kovovou špachtlí do centrifugační kyvety. Ke vzorku jsem přidala 15 ml čerstvě namíchaného extračního pufru*, protřepala a umístila na ledu. Když byly nadrceny všechny vzorky, přenesla jsem je do vodní lázně a zde 15 minut inkubovala při 65°C a několikrát je protřepala. Poté jsem ke každému vzorku přidala 4,65 ml octanu draselného, promíchala jej a přenesla na led. Po zhruba 20 minutách jsem vzorky stočila na chlazené centrifuze (4°C) při 4000 ot/min po dobu 10 minut. Supernatant jsem přefiltrovala přes filtr Miracloth do nové kyvety, přidala 14 ml isopropanolu a pomalým otáčením promíchávala, dokud nebyla v roztoku patrná světlá sraženina s DNA, a nechala asi 10 minut při pokojové teplotě odstát. Poté jsem vzorky centrifugovala 10 minut při 4°C a 4000 ot/min. Supernatant jsem slila, pelet 2x opláchla 70 % etanolem a nechala osušit na filtračním papíru. Poté jsem jej sterilní špičkou přenesla do mikrozkušavky a resuspendovala v 0,84 ml T5E pufru**, přidala 0,36 ml 1 M octanu amonného a nechala 5 min. na ledu. Vzorky jsem opět stočila (1350 ot/min, 5 minut) a supernatant rozdělila do 2 mikrozkušavek, do každé přidala 0,5 ml isopropanolu a nechala při pokojové teplotě 5 minut vysrážet. Sraženinu s DNA jsem natočila na zahnutou skleněnou

tyčinku a opláchla v 70 % etanolu, stočila 5 min při 1350 ot/min a sediment znovu opláchla 70 % etanolem. Etanol jsem odsála a DNA nechala v mikrozkuhavce oschnout. Poté jsem ji rozpustila ve 100 μ l sterilní destilované H₂O. Pro odstranění RNA jsem ke vzorku přidala 5 μ l RNázy (c = 0,1 μ g/ μ l) a inkubovala 15 min. při 37°C.

Koncentraci DNA ve 100 μ l vzorku jsem zjišťovala proměřením absorbance při λ = 260 nm na spektrofotometru Gene Quant II (Pharmacia Biotech) a elektroforetickým porovnáním koncentrační řady standardu λ DNA s koncentrační řadou daného vzorku. Před dalším použitím byly vzorky uchovávány při -20°C.

***Extrakční pufr**

100 ml

1 M Tris-HCl, (pH = 8,0)	10 ml
0,5 M EDTA, (pH = 8,0)	10 ml
5 M NaCl	10 ml
10 % SDS	12,5 ml
2 N NaOH	416 μ l
sterilní destilovaná H ₂ O	57 ml
Na-bisulfit	0,38 g
Na-diethyldithiokarbamát	0,38 g

****T5E pufr**

100 ml

1 M Tris, (pH = 8,0)	5 ml
0,2 M EDTA, (pH = 8,0)	2 ml
sterilní destilovaná H ₂ O	93 ml

3.2.1.2.2 Přečištění izolované DNA

Pro přečištění jsem z každého vzorku odebrala objem zhruba odpovídající 25 μ g DNA, doplnila sterilní destilovanou H₂O na objem 200 μ l, přidala 20 μ l 3 M octanu sodného, zvortexovala a nechala několik minut odstát v ledničce. Poté jsem ke vzorku připipetovala 200 μ l fenolu, vzorek zvortexovala a stočila 5 min. při 1350 ot/min. Pipetou jsem opatrně odsála svrchní vodnou fázi, přenesla ji do nové mikrozkuhavky, přidala 200 μ l chloroformu, zvortexovala a opět centrifugovala 5 min. při 1350 ot/min. Znovu jsem opatrně odsála svrchní vodnou fázi, přenesla ji do nové mikrozkuhavky a přidala 30 μ l 10 M octanu amonného a 600 μ l 100 % etanolu. Vzorek jsem poté uchovávala při -20°C.

3.2.1.2.3 Štěpení restrikční endonukleázou *Bam*HI

Izolovanou DNA jsem štěpila restriktázou *Bam*HI (štěpná místa uvnitř T-DNA viz Obr. 2) Reakční směs (pro jeden vzorek) o objemu 200 μ l sestávala z 100 μ l vzorku DNA, 75,3 μ l sterilní destilované H₂O, 20 μ l pufru K (Takara), 2 μ l acetylovaných BSA (c =1 %) a 2,7 μ l *Bam*HI (40 jednotek). DNA jsem nechala štěpit dvě hodiny, do směsi přidala dalších 40 jednotek restrikční endonukleázy, opět nechala štěpit dvě hodiny a přidala dalších 40 jednotek enzymu a poté nechala přes noc při 30°C. Kontrolu účinnosti enzymu jsem provedla na 0,8 % agarózovém gelu elektroforézou 5 μ l reakční směsi s *Bam*HI.

3.2.1.2.4. Elektroforéza restrikčních fragmentů DNA

DNA jsem srážela přidávkem 40 μ l octanu amonného (20 % objemu) a 600 μ l 96 % etanolu (300 % objemu) k 200 μ l vzorku, protřepala a inkubovala 45 minut při -70°C. Směs jsem centrifugovala 7 minut při 1350 ot/min, supernatant slila a sediment 10 minut oplachovala přidávkem 1 ml 70 % etanolu. Vzorky jsem opět stočila (4 min., 1350 ot/min), slila etanol, sediment krátce osušila v mikrozkuhavce a poté jej resuspendovala v 30 μ l sterilní destilované H₂O, přidala 9 μ l vkladacího pufru* a nanasla vzorky na 1 % agarózový gel. Jako standard jsem použila 1 kb DNA ladder (Gibco BRL). Elektroforéza probíhala přes noc při napětí 90 V. Po skončení elektroforézy jsem gel 25 min. barvila v TBE pufru** s ethidium bromidem (c = 1 mg/l TBE) a pak jej vyfotila na UV transluminátoru a odřízla nepotřebné části (start a část gelu s fragmenty DNA kratšími než byla očekávaná délka nejkratšího fragmentu hybridizujícího s připravenými sondami).

*Vkladací pufr pro DNA

15ml

glycerin	5 ml
10x TBE pufr	1 ml
sterilní destilovaná H ₂ O	4 ml
Bromphenol Blue	5 mg

**TBE pufr

1000 ml

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

Před přenosem DNA na membránu byl gel ještě chemicky ošetřen třemi roztoky:

1. Inkubace gelu 15 min. za mírného protřepávání v roztoku 0,25 M HCl kvůli naštěpení DNA na kratší fragmenty a její kyselá depurinaci.
2. Alkalická denaturace DNA po dobu 30 minut omýváním gelu na třepačce roztokem 0,4 M NaOH s 1,5 M NaCl.
3. Inkubace gelu 30 minut v neutralizačním roztoku 0,5 M Tris-HCl + 1,5 M NaCl za mírného protřepávání.

3.2.1.2.5 Kapilární přenos DNA na membránu

Zásobní roztok 20x koncentrovaného SSC (75 g 3 M NaCl, 88,2 g 0,3 M citrát sodný, doplněno H₂O na 1000 ml, pH = 7,0) jsem zředila na 10x SSC, který jsem nalila do plastové vany. Přes ni jsem položila skleněnou desku. a na ni pruh papíru 3MM Whatman, jehož konce jsem podvinula pod desku tak, aby byly ponořeny do roztoku SSC. Zhruba doprostřed papíru jsem položila gel a na něj nylonovou membránu stejných rozměrů (Quiabrane Nylon Plus od firmy QIAGEN), kterou jsem převrstvila dvěma papíry 3MM Whatman namočenými v 10x SSC, a sterilní skleněnou pipetou vytlačila případné bubliny. Navrch jsem umístila zhruba 15 cm silnou vrstvu buničité vaty stejných rozměrů, aby přenos DNA na membránu proběhl rovnoměrně, a vše zatížila závažím o hmotnosti asi 1 kg. Kapilární přenos DNA probíhal přes noc. Druhý den jsem membránu obarvila v roztoku ethidium bromidu a na UV transluminátoru ověřila, zda přenos proběhl. Poté jsem ji omyla v 2x SSC, 10 minut sušila při 80°C mezi dvěma papíry 3MM Whatman, ozářila ji (120 mJ/cm²) v crosslinkeru UVC 500 (Hoefler) a nakonec ji opět zapekla při 80°C po dobu 30 minut.

3.2.1.2.6 Příprava a následné značení DNA sond

DNA sondy pro hybridizaci s geny *pml* a *nptII* a s promotorem CMPS byly připraveny pomocí PCR s využitím primerů PMI1 a PMI2 (sekvence viz kapitola 3.2.1.1.1, Syngenta) amplifikující fragment genu *pml* o délce 514 bp, NPT1 (5'-ACG CAG GTT CTC CGG CCG CTT G-3') a NPT2 (5'-GAA GCG GTC AGC CCA TTC GCC G-3') amplifikující 699 bp dlouhý fragment genu *nptII* a CMPS-1 (5'-CAG ACA AAG TGG CAG ACA TAC-3') a CMPS-2 (5'-ACT TCT AGG CTA CTT GCT CTC-3') amplifikující fragment promotoru CMPS o délce 395 bp. Primery pro amplifikaci fragmentu genu *nptII* a fragmentu promotoru

CMPS navrhl Doc. J. Bříza. Pozici jednotlivých sond na sekvenci použitého vektoru pCB3160 ukazuje Obr. 2

Po ukončení PCR proběhla elektroforéza na 1 % agarózovém gelu a fragmenty DNA o příslušné délce byly žiletkou vyříznuty z gelu. Kousek gelu se sondou byl s 0,5 ml TBE pufru vložen do dialyzační membrány, ve které proběhla elektroeluce. Roztok TBE pufru s DNA jsem přenesla do mikrozkušavky a přidávkem 50 μ l 3 M octanu sodného a 500 μ l chloroformu jsem vysrážela DNA. Po centrifugaci jsem odsála chloroformovou fází, přidala 90 μ l octanu amonného a 1360 μ l 96 % etanolu a sondu inkubovala při -70°C po dobu nejméně 40 minut. Poté jsem roztok s DNA sondou opět stočila, odsála etanol a pelet 5 minut oplachovala v 70 % etanolu. Vzorek jsem znovu stočila, slila etanol, sediment nechala 5 – 10 minut oschnout a pak jej rozpustila v 30 μ l sterilní destilované H_2O .

Sondy jsem značila radioaktivním fosforem pomocí značící soupravy Rediprime™ II (random prime labelling system od firmy Amersham Pharmacia Biotech) podle přiloženého návodu. K 1 μ l roztoku s DNA sondou jsem přidala 44 μ l TE pufru, směs 5 minut povařila a poté prudce zchladila na ledu. Po 5 minutách jsem ji přidala do mikrozkušavky se značící soupravou. V laboratoři pro práci s izotopy jsem v digestoři do každé mikrozkušavky přidala 5 μ l izotopu [α - ^{32}P]dCTP (110 Bq/mmol), promíchala směs pipetou a inkubovala 15 minut při 37°C . Poté jsem k ní připipetovala 200 μ l TE pufru a 0,2 μ l obdobně značeného standardu (1 kb DNA ladder Gibco BRL), směs 5 minut povařila a prudce zchladila na ledu (5 minut). Směs byla poté přidána do hybridizačního roztoku.

3.2.1.2.7 Hybridizace

Membránu jsem napřed 30 minut prehybridizovala v 50 ml hybridizačního roztoku* při 65°C . Po přidávku denaturované sondy jsem nechala membránu hybridizovat při 65°C v hybridizační peci přes noc. Druhý den jsem hybridizační pufr slila a membránu jsem 3x promyla (30 minut, 65°C) předeřhřátým fosfátovým pufrém**. Membránu zatavenou v mikrotenové fólii jsem nechala 5 hodin exponovat ve speciální kazetě (storage phosphor screen). Radioaktivní signál byl detekován pomocí detekčního systému Typhoon system (Amersham Pharmacia Biotech). Po detekci byla sonda odmyta 0,1 % roztokem SDS, aby mohla být membrána použita pro další hybridizaci.

***Hybridizační roztok**

50 ml

sterilní destilovaná H ₂ O	20 ml
1 M NaPO ₄ , (pH = 7,2)	20 ml
EDTA	100 µl
BSA (bovine serum albumin, Sigma)	0,5 g
SDS (sodium dodecyl sulfát)	3,5 g
do objemu 50 ml dolít sterilní destilovanou H ₂ O	

****Fosfátový pufr**

500 ml

sterilní destilovaná H ₂ O	400 ml
10 % SDS	50 ml
1 M NaPO ₄ , (pH = 7,2)	50 ml
0,5 M EDTA, (pH = 8,0)	1 ml

3.2.1.3. Northernová hybridizace

Skleněné nádoby použité při northernové hybridizaci bylo předem 5 hodin sterilizováno sušením při 190°C. pH elektroda byla pro eliminaci RNáz napřed 30 sekund inkubována v 70 % etanolu a poté 5 minut v 1 M NaOH. Nakonec byla opláchnuta RNase-free vodou a v ní ponechána asi půl hodiny, přičemž byla RNase-free voda několikrát vyměněna. RNase-free voda (H₂O_{RNA}) byla připravena tak, že k přístroji Millipore na výrobu ultračisté vody byla připojena filtrační kolona PyrogardTM D a získaná RNase-free voda byla jímána do teplem sterilizovaných dvoulitrových Erlenmeyerových baněk.

3.2.1.3.1 Izolace RNA

Izolaci jsem prováděla pomocí Kitu (QIAGEN): RNeasy Plant Mini Kit (50), Cat. No. 74904. RNA jsem izolovala z 0,1 g listové hmoty nejemno nadrcené v tekutém dusíku. Dále jsem postupovala dle návodu přiloženého ke kitu.

Koncentraci izolované RNA jsem zjišťovala proměřením absorbance při $\lambda = 260$ nm na spektrofotometru Gene Quant II (Pharmacia Biotech).

3.2.1.3.2 Elektroforéza a kapilární přenos RNA na membránu

Elektroforéza proběhla podle protokolu z internetu:

<http://grimwade.biochem.unimelb.edu.au/bowtell/molbiol/sect4.htm>

Vana a hřebeny pro elektroforézu a plastová vana a skleněná deska pro přenos byly před použitím omyty detergentem a destilovanou vodou, 10 minut sterilizovány v 3 % H₂O₂ a důkladně opláchnuty RNase-free vodou. Elektroforéza a sestavení blotu probíhaly obdobně jako u Southernovy hybridizace.

3.2.1.3.2.1 Příprava vzorků RNA na elektroforézu

Objem roztoku s RNA odpovídající 25 µg RNA jsem přesrážela přidáním 10 % objemu RNase-free 3 M octanu sodného (Sigma) a 100 % objemu RNase-free 100 % etanolu (Sigma). Poté jsem vzorky 1 hodinu inkubovala při -70°C, 10 minut centrifugovala při 13500 ot/min, slila supernatant, krátce stočila a odsála zbytek supernatantu. Osušený sediment jsem resuspendovala ve 12 µl sample buffer_{RNA}* a po rozpuštění jsem vzorky 5 minut inkubovala při 65°C, přidala ke každému 3 µl vkládacího pufru** a nanasla je na gel.

***Sample buffer_{RNA}**

500 µl

10x running buffer	50 µl
RNase-free deionisovaný formamid (Sigma)	250 µl
RNase-free formaldehyd (Sigma)	90 µl
H ₂ O _{RNA}	108 µl
ethidium bromid (10 mg/ml)	2 µl

****Vkládací pufr**

10 ml

RNase-free Ficoll (400) (Sigma)	2 g
H ₂ O _{RNA}	5 ml
RNase-free Bromphenol Blue (Sigma)	25 mg
H ₂ O _{RNA} doplnit objem na 10 ml	

3.2.1.3.2.2 Příprava markeru pro elektroforézu

Směs 3 μ l RNase-free RNA Marker 2,0-10 kb (Sigma), 2 μ l H₂O_{RNA} a 3 μ l sample buffer_{RNA} jsem zahřívala na 65°C po dobu 5 minut a poté jsem ke směsi přidala 2 μ l vkladacího pufru.

1 % agarózový gel

350 ml

agaróza (Sigma)	3,5 g
10x running buffer*	35 ml
H ₂ O _{RNA}	297 ml
po rozvaření agarózy a zchlazení na 60°C přidat 16,8 ml 37 % formaldehydu (Sigma)	

***10x running buffer**

500 ml

MOPS _{RNA} (Sigma)	23,12 g
H ₂ O _{RNA}	400 ml
0,5 M EDTA _{RNA} , (pH = 8,0), (Sigma)	10 ml
ledová kyselina octová	3,3 ml
doladit pH na 7,0	
na objem 500 ml doplnit H ₂ O _{RNA}	

Gel jsem 3x 5 minut promývala RNase-free vodou a poté jej inkubovala v 20x SSC (75 g RNase-free 3 M NaCl, 88,2 g RNase-free 0,3 M citrát sodný, doplnit H₂O_{RNA} na 1000 ml, pH = 7,0). Membránu jsem inkubovala v 10x SSC.

3.2.1.3.2.3 Příprava a značení hybridizační sondy

PMI sondu pro hybridizaci jsem připravovala stejným způsobem a se stejnými primery jako PMI sondu pro Southernovu hybridizace, ale postup probíhal za podmínek eliminujících možnost kontaminace sondy RNázami. Všechny použité chemikálie byly deklarovány jako RNase-free. Vana a hřebeny byly před použitím omyty detergentem, opláchnuty destilovanou vodou a 10 minut sterilizovány v 3 % roztoku H₂O₂. Nakonec byly opláchnuty RNase-free vodou. Ke značení hybridizační sondy jsem opět použila značící soupravu Rediprime™ II (random prime labelling system, Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.1.3.2.4 Hybridizace

Postupovala jsem stejně jako u Southernovy hybridizace, ale hybridizační skleněné tuby jsem před hybridizací omyla detergentem, 3x opláchla RNase-free vodou a 20 minut nechala sterilizovat v hybridizační peci pomocí 3 % H₂O₂. Pro pipetování tekutých chemikálií jsem použila špičky s filtrem. Radioaktivní signál byl opět detekován pomocí detekčního systému Typhoon system (Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.2 Test s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň (PMI-assay)

Část transformované rostliny (list, internodium o délce asi 10 mm) jsem sterilně odebrala ve flowboxu a umístila do jamky ELISA destičky (destička s 24 jamkami) s 800 µl média s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň (CPR). Po umístění všech testovaných rostlin jsem destičku přiklopila víčkem a víčko přichytila parafilmem. Rostliny jsem kultivovala 7-8 dní při 25°C ve tmě a poté jsem vizuálně zhodnotila barvu média.

3.2.2.1 Média použitá pro PMI-assay

Regenerační média s CPR pro otestování reakce listů CPR00 – CPR60

složení v g.l⁻¹

MS bez vitaminů (Duchefa)	4,4 g
myo-inositol	0,1 g
microagar	1,0 g
CPR	0,05 g
pH	6,0

poté přidány sacharóza a manóza podle toho, o jakou variantu se jednalo:

médium	sacharóza	manóza
CPR00	0 g	0 g
CPR10	5 g	0 g
CPR20	10 g	0 g
CPR30	15 g	0 g
CPR40	0 g	5 g
CPR50	0 g	10 g
CPR60	0 g	15 g

Zakořeňovací média s CPR pro otestování reakce internodií CPR0 – CPR6

složení v g.l⁻¹

MS s vitaminy (Duchefa)	2,2 g
microagar	1,0 g
CPR	0,05 g
pH	6,0

poté přidány sacharóza a manóza podle toho, o jakou variantu se jednalo:

médium	sacharóza	manóza
CPR0	0 g	0 g
CPR1	5 g	0 g
CPR2	10 g	0 g
CPR3	15 g	0 g
CPR4	0 g	5 g
CPR5	0 g	10 g
CPR6	0 g	15 g

3.2.3 *Selekce semenáčků T1 generace a zhodnocení dědičnosti transgenů pomocí fenotypových štěpných poměrů*

3.2.3.1 *Získ semenného potomstva transformantů*

Transformované rostliny byly převedeny do půdy. Kořenicí rostliny byly vyňaty ze skleničky se zakořeňovacím médiem, omytím kořínků ve vodě zbaveny zbytků agarového média a zasazeny do uzavřených těsnících plastových paňičků. Takto byly kultivovány zhruba tři dny (při 25°C) a poté byly v paňičkách pootevřeny větrací otvory, aby klesla vzdušná vlhkost v nádobě a rostliny si postupně vytvořily kutikulu. Přibližně po 10 dnech byly rostliny zcela zbaveny zákrytu a dále kultivovány při 25°C ve skleníku. Kultivace probíhala přes léto. Každý květ byl opylen vlastním pylem. Zralé plody jsem sesbírala. Každý plod jsem rozřízla a pomocí špachtle vyklepla na Petriho misku semena se slizovým obalem a šťávou a nechala do druhého dne natrávit. Následující den jsem semena proprala na sítu pod tekoucí vodou a zbavila je zbytků slizových obalů, usušila je na filtračním papíře a pro další použití jsem je skladovala v papírových sáčcích při teplotě 8°C.

3.2.3.2 *Složení selekčních médií*

Všechna použitá média byla odvozena od základního MS média (Murashige a Skoog, 1962).

Média pro zjištění selekční koncentrace manózy pro selekci rajčat v T1 generaci

složení v g.l⁻¹

MS s vitaminy (Duchefa)	4,4 g
myo-inositol	0,1 g
agar (Serva)	8,0 g
pH	5,8

dále přidána manóza a glukóza podle toho, o kterou variantu se jednalo:

médium	glukóza	manóza
G0/M0	0 g	0 g
G0/M0,5	0 g	0,5 g
G0/M1	0 g	1 g
G1/M0	1 g	0 g
G1/M0,5	1 g	0,5 g
G1/M1	1 g	1 g

Médium pro selekci potomstva v T1 generaci s kanamycinem (Kan. 100)

složení v g.l⁻¹

MS s vitaminy (Duchefa)	4,4 g
myo-inositol	0,1 g
agar (Serva)	8,0 g
pH	5,8

po zklávkování přidán:

kanamycin 100 mg

Médium pro selekci potomstva v T1 generaci s manózou (Man. 1 %)

složení v g.l⁻¹

MS s vitaminy (Duchefa)	4,4 g
myo-inositol	0,1 g
manóza	10 g
agar (Serva)	8,0 g
pH	5,8

3.2.3.3 Sterilizace semen T1 generace a následná selekce na médiu s manózou nebo kanamycinem

Do zkumavky jsem odpočítala 100 semen, zalila je 70 % etanolem a nechala přibližně 2 minuty působit. Po vylití etanolu jsem do zkumavky přidala 10 ml 10 % roztoku Domestosu (účinná látka chlornan sodný) a 30 minut nechala působit (každých 10 minut jsem zkumavky

protřepala). Po uplynutí této doby jsem zkumavky přenesla do flowboxu, zde jsem slila roztok s Domestosem a semena jsem čtyřikrát promyla sterilní destilovanou vodou.

Takto sterilizovaná semena jsem opatrně vyklepla do plastové dózy Sigma s 50 ml selekčního média s kanamycinem nebo manózou a sterilní pinzetou je pokud možno pravidelně rozmístila po povrchu. Semenáčky jsem kultivovala při 25°C a fotoperiodě 16 hodin 2 – 3 týdny, tj. dokud se u rezistentních semenáčků nevyvinuly první pravé listy.

Po uplynutí této doby jsem spočítala semenáčky s rezistentním a typickým senzitivním fenotypem a případně z nich odebrala vzorky pro „tissue PCR“.

3.2.3.4 *Ověření shody pozorovaných a očekávaných fenotypových štěpných poměrů v T1 generaci pomocí Chí-kvadrát testu*

Hodnota chí-kvadrát testu byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$C^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(f_i - \hat{f}_i)^2}{\hat{f}_i} = \sum_{i=1}^k \frac{(O - E)^2}{E}$$

O – zjištěná frekvence výskytu rezistentního nebo senzitivního fenotypu

E – očekávaná frekvence výskytu rezistentního nebo senzitivního fenotypu

DF (počet stupňů volnosti) = 1

kritická hodnota pro $\alpha = 0.05$ při DF = 1 je 3,84

Pro ověření shody pozorovaného a očekávaného fenotypového štěpného poměru jsem si napřed stanovila nulovou hypotézu H₀ a poté jsem testovala, zda se pozorovaný štěpný poměr významně liší od očekávaného (hodnota chí-kvadrát testu je pro $\alpha = 0.05$ vyšší než 3,84). Pro potomstvo netransformované kontroly bez selektovatelných transgenů jsem předpokládala fenotypový štěpný poměr 0:1 (rezistentní:senzitivní), pro potomstvo transformanta nesoucího jednu kopii T-DNA 3:1, pro potomstvo transformanta s dvěma kopiemi T-DNA 15:1 atd. V případě, že štěpný poměr neodpovídal očekávanému, ale mohl být vysvětlen jinak, jsem stanovila alternativní nulovou hypotézu. Přítomnost transgenů u semenáčku s rezistentním nebo senzitivním fenotypem byla případně ověřena pomocí PCR.

4 VÝSLEDKY

4.1 Molekulární charakteristika transformantů

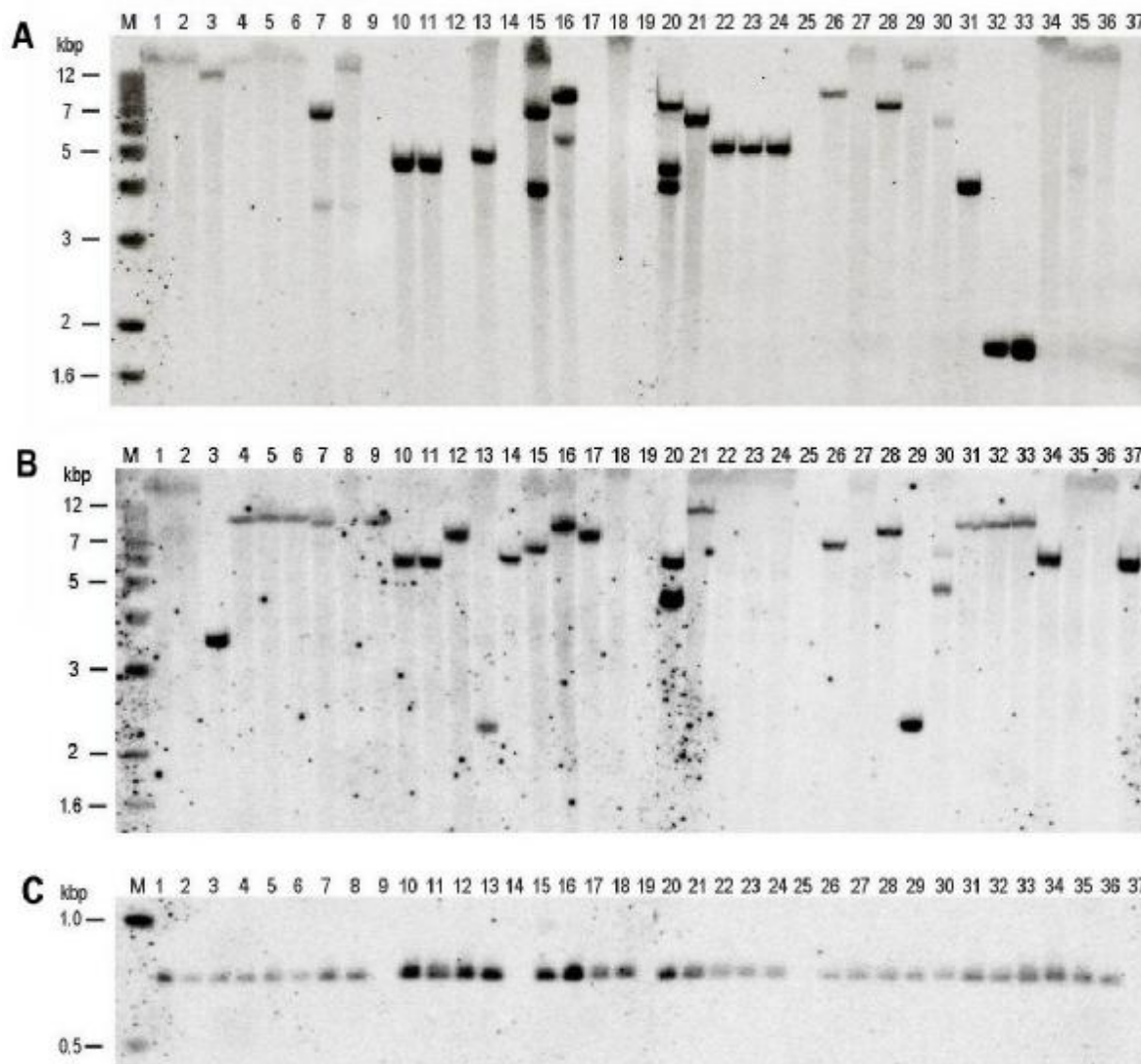
Charakterizovala jsem 35 transformantů rajčete získaných během bakalářské práce a jeden netransgenní „únik“ (escape) a pro srovnání netransgenní rostlinu (NK).

4.1.1 Southernova hybridizace

Pomocí Southernovy hybridizace jsem u 37 vybraných rostlin (35 transformantů, 1 negativní kontrola a 1 escape) zjišťovala přítomnost genů *pmi*, *nptII* a úseku T-DNA s promotorem CMPS hybridizací s příslušnými sondami. DNA izolovaná z příslušných rostlin byla štěpena restriční endonukleázou *Bam*HI, která má uvnitř T-DNA dvě štěpná místa. Po elektroforetickém rozdělení na 1 % agarózovém gelu byla naštěpená DNA přenesena na nylonovou membránu. Předpokládané minimální délky fragmentů genomové DNA hybridizujících s danou sondou byly 1,6 kb pro sondu *pmi*, 2,25 kb pro sondu *nptII* a 0,7 kb pro sondu CMPS. Sondy byly značeny [α -³²P]dCTP pomocí značící soupravy Rediprime™ II (random prime labelling system) a po hybridizaci byla daná sonda (*pmi* a *nptII*) z membrány odmyta.

Většina transformovaných rostlin nesla jednu kopii T-DNA. Rostliny v drahách 15 a 20 nesly 3 kopie T-DNA (při hybridizaci se sondou *pmi*), přičemž u první byly při následné hybridizaci se sondou *nptII* vidět pouze 2 proužky (1 výrazný a jeden velmi slabý). Rostlina v dráze šestnáct nese dvě kopie T-DNA; opět při hybridizaci se sondou *nptII* je jeden proužek velmi nezřetelný. Slabé náznaky proužků v drahách 7, 8 a 30 naznačují, že do příslušných rostlin se T-DNA včlenila dvakrát. Rostliny v drahách 9, 14 a 37 (poslední dvě jsou pravděpodobně klon) se jeví pozitivní pouze pro gen *nptII* a pravděpodobně tedy došlo k inzerci pouze pravé části T-DNA. Rostliny v drahách 12 a 17 postrádají pouze gen *pmi* a v drahách 22 – 24 gen *nptII*. Rostlina v dráze 8 se jeví negativní pro přítomnost sekvence genu *nptII*, což není v souladu s výsledky PCR a také v T1 generaci lze pozorovat potomstvo s rezistentním fenotypem ke kanamycinu. Analýza PCR provedená během bakalářské práce se s výsledky Southernovy hybridizace neshoduje u rostlin v drahách 4 a 6, které jsou zjevně klonálního původu společně s rostlinou v dráze 5. Klon v drahách 32 a 33 se jevil při PCR negativní pro gen *nptII* a nepřežíval na selekčním médiu s kanamycinem, ale Southernovou

hybridizací u něj byl amplifikovaný fragment genu *nptII* prokázán. Escape a negativní kontrola byly dle očekávání negativní pro všechny tři hybridizace.



Obr. 3 Southernova hybridizace DNA izolované z rostlin rajčete nesoucích alespoň jeden z genů *pmi* nebo *nptII* (vyjma negativní kontroly a escapu).

A - hybridizace se sondou *pmi* dlouhou 514 bp, nejmenší očekávaná délka fragmentu štěpené DNA byla 1,6 kb

B - hybridizace se sondou *nptII* dlouhou 699 bp, nejmenší očekávaná délka fragmentu štěpené DNA byla 2,25 kb

C - hybridizace se sondou k CMPS promotoru dlouhou 395 bp, nejmenší očekávaná délka fragmentu štěpené DNA byla 0,7 kb

Dráhy: M - velikostní marker (1kb ladder, Gibco BRL)

1–18, 20, 21 a 37 – rostliny selektované na médiu s kanamycinem

19 – negativní kontrola

22 – 24 – rostliny selektované na médiu s manózou o koncentraci 0,75 %

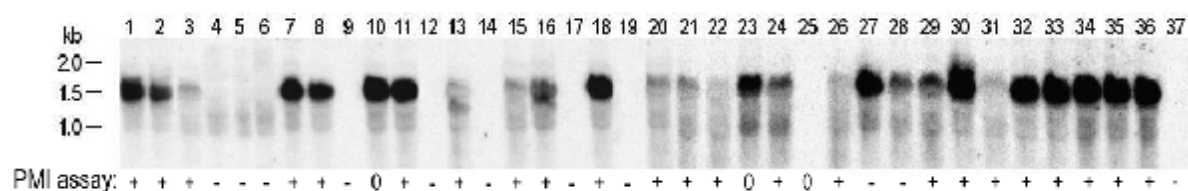
25 – escape selektovaný na médiu s manózou o koncentraci 0,75 %

26 – 30 - rostliny selektované na médiu s manózou o koncentraci 0,5 %

31 – 36 - rostliny selektované na médiu s manózou o koncentraci 0,125 %

Transformanti v drahách 1 a 2; 4, 5 a 6; 10 a 11; 14 a 37; 22, 23 a 24; 32 a 33; 35 a 36 jsou odvozeny z jednoho transformovaného explantátu a výsledky Southernovy hybridizace u nich byl potvrzen klonální původ, došlo tedy k 26 nezávislým transformacím. U všech rostlin odvozených z jednoho transformovaného explantátu jsem pomocí Southernovy hybridizace zjistila klonální původ, což je v souladu s výsledky selekce T1 generace a s výsledky PMI-assaye. Tím byly potvrzeny transformační frekvence dosažené při selekci na médiích s manózou nebo kanamycinem během mé bakalářské práce (jednotlivé rostliny pocházející z jednoho transformovaného explantátu jsem předběžně hodnotila jako klony). Výsledky společně s výsledky northernové hybridizace a PMI-assaye shrnuje Tab. 3.

4.1.2 Northernová hybridizace



Obr.4 Výsledky northernové hybridizace a srovnání s výsledky testu s acidobazickým indikátorem CPR (PMI-assay) u testovaných rostlin rajčete. Očekávaná velikost mRNA byla 1,5 kb. PMI-assay: + pozitivní výsledek, - negativní výsledek, 0 netestováno. Pořadí rostlin v jednotlivých drahách stejné jako u Southernovy hybridizace, tedy:

- 1 –18, 20, 21 a 37 – rostliny selektované na médiu s kanamycinem
- 19 – negativní kontrola
- 22 – 24 – rostliny selektované na médiu s manózou o koncentraci 0,75 %
- 25 – escape selektovaný na médiu s manózou o koncentraci 0,75 %
- 26 – 30 - rostliny selektované na médiu s manózou o koncentraci 0,5 %
- 31 – 36 - rostliny selektované na médiu s manózou o koncentraci 0,125 %

Ze všech rostlin analyzovaných Southernovou hybridizací byla pomocí RNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN) izolována RNA. Z každého vzorku bylo použito 25 μ g RNA, která byla napřed elektroforeticky rozdělena na 1 % agarózovém gelu a poté přenesena na nylonovou membránu a hybridizována se sondou *pmi*. Sonda byla připravena amplifikací 514 bp dlouhého fragmentu genu *pmi* v PCR reakci a značena [α -³²P] dCTP pomocí značící soupravy Rediprime™ II (random prime labelling system).

V souladu s výsledky Southernovy hybridizace nebyla prokázána přítomnost transkripčního produktu genu *pmi* u rostlin v drahách 9, 12, 14, 17, a 37 a stejně tak u negativní kontroly (19) a escapu (25). Rostliny klonálního původu jeví prakticky stejnou úroveň exprese, pouze u klonu v drahách 22 – 24 bylo množství zjištěné mRNA genu *pmi* mezi jednotlivými jedinci dosti odlišné.

4.2 Test s acidobazickým indikátorem CPR (PMI-assay)

Kromě rostlin K85/13A (dráha 10), M3/4-6B (23) a M3/4-3B (25), které během pasáže uhynuly, byly všechny rostliny testovány pomocí testu s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň (CPR, Chlorophenol red dye). Při metabolizaci manózy v médiu s tímto acidobazickým indikátorem by mělo dojít k okyselení média produkty metabolismu cukru a tím ke změně barvy média. PMI-assay jsem použila jako nepřímý důkaz přítomnosti funkčního proteinu manóza-6-fosfátizomerázy (PMI) v dané transgenní rostlině.

Změnu barvy média vlivem metabolizace cukru rostlinou jsem napřed ověřila se sacharózou. Negativními kontrolami v testu byly médium s CPR a manózou bez rostliny a médium s CPR, manózou a s netransformovanou rostlinou (NK). U negativních kontrol nedošlo ani v jednom případě ke změně barvy média směrem k oranžové nebo žluté. U netransformovaných rostlin a pravděpodobně odumírajících rostlin bylo pozorováno karmínové zbarvení média. Testovala jsem listy a internodia transformantů a nejhodnější pro test se nakonec ukázala internodia blíže kořenům. U rostlin docházelo někdy k odumírání, a proto jsem jako pozitivní výsledek hodnotila změnu barvy média z červené na žlutou alespoň v jedné jamce ELISA destičky s testovanou rostlinou.

Výsledky optimalizace PMI-assaye shrnuje tabulka č. 2:

označení média	testováno rostlin	koncentrace v %		změna barvy média		
		sacharóza	manóza	původní až tmavší	oranžová	žlutá až průhledná
CPR0	2	0	0	2	0	0
CPR1	3	0,5	0	0	1	2
CPR2	3	1	0	0	0	3
CPR3	3	1,5	0	2 odumřelé	1	0
CPR4	3	0	0,5	3	0	0
CPR5	3	0	1	3	0	0
CPR6	3	0	1,5	3	0	0
CPR00	2	0	0	2	0	0
CPR10	3	0,5	0	0	2	1
CPR20	3	1	0	0	1	2
CPR30	3	1,5	0	0	0	3
CPR40	3	0	0,5	3	0	0
CPR50	3	0	1	3	0	0
CPR60	3	0	0,5	3	0	0

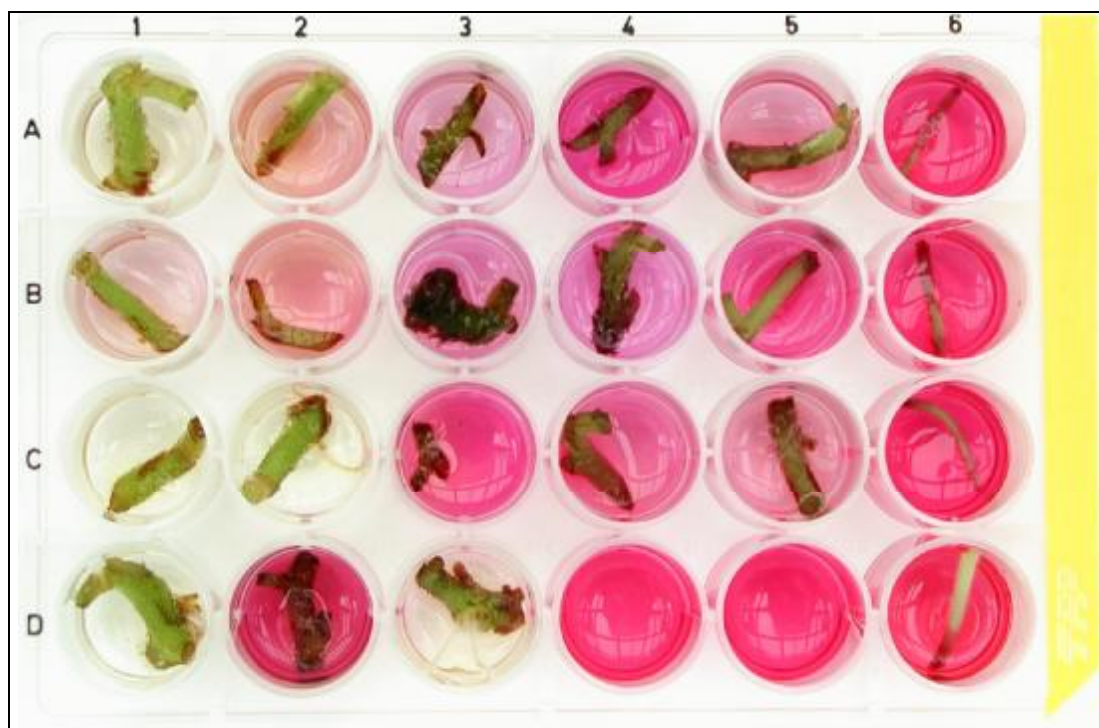
Tab. 2 Výsledky optimalizace PMI-assaye

Média CPR0-6 jsou odvozena od zakořeňovacího média - testována internodia, média CPR00-60 - odvozena od regeneračního média - testovány listy.

Na základě těchto výsledků jsem se rozhodla použít médium CPR5 s koncentrací manózy 1 %. Jednotlivá internodia byla kultivována v 800 μ l zakořeňovacího média CPR5 v jamce ELISA destičky (destička se 24 jamkami) ve tmě při 25°C po dobu 7 – 8 dní a poté byla vizuálně zhodnocena barva média.

Výsledky PMI-assaye společně s výsledky PCR (které jsem získala během bakalářské práce) a Southernovy a northernové hybridizace shrnuje tabulka č. 3:

Výsledky testu s acidobazickým indikátorem CPR jsou v korelaci s výsledky northernové hybridizace (viz Obr. 4.), kromě rostlin v drahách 27 a 28, kde byla zjištěna střední až vyšší exprese genu *pmi*, přičemž v testu s CPR se rostliny jevíly negativní. I nižší exprese genu *pmi* je dostatečná pro metabolizaci manózy a přežití rostliny na selekčním médiu, což je patrné například u rostlin v drahách 3, 13, 15, 26 a 31.



Obr. 5 Ukázka ELISA destičky s internodii po sedmi dnech kultivace v médiu s CPR.

Transformované rostliny jsou ve sloupcích 1 až 5, konkrétně: 1A-D K85/2A; 2A-D K85/2C; 3A-D K85/7A; 4A-C K85/8A; 5A-C K85/8B; jamky 4D a 5D obsahují prázdné médium s CPR, 6A-D je negativní kontrola.

dráha	rostlina	PCR	Southern			Northern	PMI-assay N/pozitivní
			<i>pmi</i>	<i>nptII</i>	CMPS	<i>pmi</i>	
1	K85/2A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/+++
2	K85/2C	pmi/nptII	+	+	+	+	4/+
3	K85/7A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/+
4	K85/8A	0/nptII	+?	+	+	+	6/-
5	K85/8B	pmi/nptII	+?	+	+	+	6/-
6	K85/8C	0/nptII	+?	+	+	+	6/-
7	K85/9A	pmi/nptII	+	+	+	+	3/+
8	K85/10B	pmi/nptII	+	-	+	+	3/++
9	K85/11A	0/nptII	-	+	-	-	7/-
10	K85/13A	pmi/nptII	+	+	+	+	netestováno
11	K85/13C	pmi/nptII	+	+	+	+	4/++
12	K85/15B	0/nptII	-	+	+	-	5/-
13	K85/16A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/+
14	K85/17A	0/nptII	-	+	-	-	3/-
15	K85/20A	pmi/nptII	+	+	+	+	3/++
16	K85/21A	pmi/nptII	+	+	+	+	6/+++
17	K85/22A	0/nptII	-	+	+	-	4/-
18	K85/23A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/++
19	NK	0/0	-	-	-	-	N > 20/-
20	K85/25A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/+
21	K85/27A	pmi/nptII	+	+	+	+	7/++
22	M3/4-6A	pmi/nptII	+	-	+	+	4/+
23	M3/4-6B	pmi/0	+	-	+	+	netestováno
24	M3/4-6D	pmi/nptII	+	-	+	+	2/+
25	M3/4-3B	0/0	-	-	-	-	netestováno
26	M1/2-13A	pmi/nptII	+	+	+	+	2/+
27	M1/2-15A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/-
28	M1/2-22A	pmi/nptII	+	+	+	+	2/-
29	M1/2-56A	pmi/nptII	+	+	+	+	2/++
30	M1/2-61A	pmi/nptII	+	+	+	+	2/++
31	M1/8-29C	pmi/nptII	+	+	+	+	3/+
32	M1/8-44A	pmi/0	+	+	+	+	4/+
33	M1/8-44B	pmi/0	+	+	+	+	3/++
34	M1/8-57A	pmi/nptII	+	+	+	+	3/+++
35	M1/8-64A	pmi/nptII	+	+	+	+	4/++++
36	M1/8-64B	pmi/nptII	+	+	+	+	3/+++
37	K85/17C	0/nptII	-	+	-	-	7/-

Tab. 3: Srovnání výsledků Southernovy a Northernovy hybridizace, PCR a PMI-assaye u testovaných rostlin.

Rostliny jsou v pořadí podle drah na membránách pro Southern a Northern, šedě jsou označeny rostliny klonálního původu, kromě rostlin K85/17A a K85/17C vždy v sousedních řádcích; PMI-assay – N je počet opakování/z toho pozitivních

4.3 Štěpné poměry v T1 generaci

4.3.1 Zjišťování selekční koncentrace manózy vhodné pro selekci T1 transformantů

Cílem bylo stanovit množství manózy v médiu vhodné pro selekci potomstva vzniklého po samosprášení T0 transformantů. Pro tento účel jsem otestovala 4 varianty selekčních médií s různou koncentrací manózy a glukózy a pro srovnání dvě média neselekční (G0/M0 a G1/M0). Neselekční médium G1/M0 se rutinně používá pro výsev semen rajčete a získá aseptických semenáčků například pro transformaci děložních lístků diskovou metodou transformace. Klíčení semen na médiu G0/M0 jsem zjišťovala proto, abych ověřila, zda je glukóza pro klíčení semenáčků nezbytná, nebo její přídavek do média není nutný. Semena T1 transformantů jsem sterilizovala a selektovala postupem popsáním v kapitole 3.2.5.3. Na každé médium jsem vysela 50 semen z potomstva netransgenní kontrolní rostliny a 15 – 20 semen z potomstva transformované rostliny, u níž byla molekulárními metodami potvrzena přítomnost genu *pmi*. Výsledky shrnuje tabulka č. 5.

Při hodnocení fenotypových štěpných poměrů v potomstvu testovaných transformantů není průkazný rozdíl mezi očekávanou (3:1) a pozorovanou frekvencí výskytu obou fenotypů. U potomstva netransformované rostliny je patrný značný podíl semenáčků s rezistentním fenotypem na médiích s manózou, když je přítomna glukóza, což je potvrzeno i výsledky chí-kvadrát testu (na pětiprocentní i jednoprocenní hladině významnosti lze H0 zamítnout).

Klíčivost a přežívání semenáčků na neselekčním médiu bez glukózy bylo dostatečné a glukóza tedy nebyla pro klíčení nezbytná.

Fenotyp semenáčků senzitivních k fyto toxickým účinkům manózy byl stejný jako při selekci na kanamycinu a dokonce o trochu výraznější, viz Obr. 7. Senzitivní rostliny měly tmavě zelené děložní lístky a nikdy neutvořily pravé listy, stonek byl většinou zbarvený do fialova a kořen byl asi 2 – 4 mm dlouhý, křivý a nevětvený. Senzitivní semenáčky nikdy netvořily rozvětvené kořeny v médiu. Na základě získaných výsledků jsem se rozhodla pro další selekci používat médium s 1 % manózy a bez glukózy.

Ze všech semenáčků T1 generace rostliny K85/21A jsem odebrala vzorky pro PCR a ověřila, že fenotyp odpovídá přítomnosti nebo nepřítomnosti genu *pmi*.

médium	koncentrace v %		rostlina	N semen	fenotyp		štěp.♦ poměr	χ^2 test - hodnota
	glukóza	manóza			normální	senzitivní /nevyklíč.		
G0/M0	0	0	NK	50	44	0/6	1:0	0
			K85/27A	15	15	0/0	1:0	0
G0/M0,5	0	0,5	NK	50	0	49/1	0:1	0
			K85/2C	20	17	3/0	3:1	1,6
G0/M1	0	1	NK	50	0	47/3	0:1	0
			K85/21A	15	9	4/2	3:1	0,23
G1/M0	1	0	NK	50	24	0/1+25K*	1:0	0
			K85/10B	15	15	0/0	1:0	0
G1/M0,5	1	0,5	NK	50	42	3/5	0:1	39,2▼
			K85/10B	15	15	0/0	3:1	1,25
G1/M1	1	1	NK	50	31	5/14	0:1	26,69▼
			K85/10B	15	8	1/6	3:1	2,26

Tab. 4: Stanovení selekční koncentrace manózy.

K*-kontaminace, H0 pro NK na manóze - 0:1, H0 pro transformanty na manóze - 3:1, ▼ – hodnoty chí-kvadrát testu významně překračující kritickou hodnotu 3,84 (DF = 1, $\alpha = 0,05$) a H0 tedy zamítám, ♦ - pozorovaný fenotypový štěpný poměr



Obr. 6 Celkový pohled na semenáčky vyšetě na selekční médium s manózou.

A – potomstvo rostliny, která nenesla gen *pmi* je k fyto toxickým účinkům manózy senzitivní

B – potomstvo rostliny nesoucí gen *pmi* štěpící zhruba v poměru 3:1 ve prospěch rezistentních semenáčků



Obr. 7 Rozdílný fenotyp semenáčků rezistentních a senzitivních k oběma selekčním agens.
A – rostliny senzitivní k manóze (horní řada) respektive ke kanamycinu (spodní řada)
B – rostliny rezistentní k manóze (první tři) a ke kanamycinu (zbylé dvě)
C – srovnání vzhledu rezistentního a senzitivního semenáčku

4.3.2 Selekce T1 potomstva transformantů a ověření štěpných poměrů pomocí chí-kvadrát testu a PCR

Na základě předchozích výsledků jsem všechna semínka získaná od jednotlivých transformantů selektovala na médiu s 1 % manózy. Pro selekci na kanamycinu jsem použila rutinně používanou koncentraci kanamycinu 100 mg na 1 litr média. Na oba typy selekčních médií jsem od každého transformanta vysela po 100 semínech T1 generace a po 2-4 týdnech zhodnotila vzhled semenáčků a zjistila příslušný fenotypový štěpný poměr. Ten jsem potom porovnávala s očekávaným fenotypovým štěpným poměrem pomocí chí-kvadrát testu. Od rostlin M3/4-6B a M1/2-61A jsem získala malý počet semen, a proto jsem je selektovala pouze na médiu s manózou.

rostlina (H0 pro c2 test)	selekční médium	počet	fenotyp semenáčku			fenotypový štěpný poměr (NF:senzitivní)	c2 test - hodnota
			rezistent. k sel. agens	senzitiv. k sel. agens	nevyklíčil		
NK (H0=0:1)	Man. 1 %	100	0	100	0	0:1	0
	Kan. 100	101	0	101	0	0:1	0
K85/2A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	70	25	5	2,8:1	0,09
	Kan. 100	100	74	19	7	3,9:1	1,04
K85/2C (H0=3:1)	Man. 1 %	105	76	29	0	2,6:1	0,38
	Kan. 100	100	80	19	1	4,2:1	1,78
K85/7A (H0=2:1)	Man. 1 %	100	46	24	30	1,9:1	0
	Kan. 100	100	46	33	21	1,4:1	2,03
K85/8A (H0=0:1) (H0=3:1)	Man. 1 %	103	0	103	0	0:1	0
	Kan. 100	100	79	20	1	4:1	1,22
K85/8B (H0=0:1) (H0=3:1)	Man. 1 %	102	0	102	0	0:1	0
	Kan. 100	100	73	25	2	2,9:1	0,01
K85/8C (H0=0:1) (H0=3:1)	Man. 1 %	100	0	98	2	0:1	0
	Kan. 100	100	81	18	1	4,5:1	2,45
K85/9A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	77	20	3	3,9:1	0,99
	Kan. 100	100	76	22	2	3,5:1	0,34
K85/10B (H0=3:1)	Man. 1 %	103	74	29	0	2,6:1	0,55
	Kan. 100	100	66	24	10	2,8:1	0,13
K85/11A (H0=0:1) (H0=3:1)	Man. 1 %	100	0	94	6	0:1	0
	Kan. 100	101	74	27	0	2,7:1	0,16
K85/13A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	66	21	13	3,1:1	0,59
	Kan. 100	100	68	25	7	2,7:1	0,18
K85/13C (H0=3:1)	Man. 1 %	100	67	29	4	2,3:1	1,39
	Kan. 100	100	72	26	2	2,8:1	0,12
K85/15B (H0=0:1) (H0=1:1)	Man. 1 %	100	0	91	9	0:1	0
	Kan. 100	100	38	54	8	1:1,4	2,78
K85/16A (H0=3:1)	Man. 1 %	104	86	18	0	4,8:1	3,28
	Kan. 100	100	81	19	0	4,3:1	1,92
K85/17A (H0=0:1) (H0=3:1)	Man. 1 %	100	0	94	6	0:1	0
	Kan. 100	101	71	30	0	2,4:1	1,21
K85/17C (H0=0:1) (H0=3:1)	Man. 1 %	100	0	84	16	0:1	0
	Kan. 100	109	77	32	0	2,4:1	1,1
K85/20A (H0=1:1)	Man. 1 %	100	47	42	11	1,1:1	0,28
	Kan. 100	100	42	43	15	1:1	0
K85/21A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	70	25	5	2,8:1	0,09
	Kan. 100	101	72	29	0	2,5:1	0,74

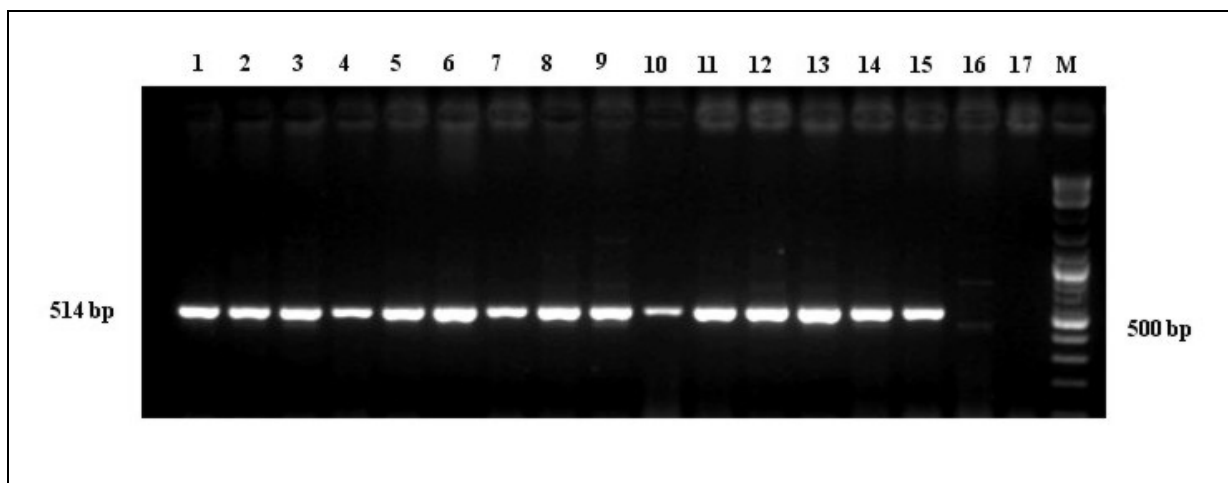
rostlina (H0 pro c2 test)	selekční médium	počet	fenotyp semenáčku			fenotypový štěpný poměr (NF:senzitivní)	c2 test - hodnota
			rezistent. k sel. agens	senzitiv. k sel. agens	nevyklíčil		
K85/22A (H0=0:1) (H0=1:1)	Man. 1 %	100	0	92	8	0:1	0
	Kan. 100	102	42	60	0	1:1,4	3,18
K85/23A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	73	15	12	4,9:1	2,97
	Kan. 100	100	71	26	3	2,7:1	0,17
K85/25A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	78	20	2	3,9:1	1,10
	Kan. 100	100	73	24	3	3:1	0,005
K85/27A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	67	28	5	2,4:1	1,01
	Kan. 100	100	65	31	4	2,1:1	2,72
M3/4-6A (H0=0:1)	Man. 1 %	100	6	87	7	1:14,5	0,39
	Kan. 100	103	0	94	9	0:1	0
M3/4-6B (H0=0:1)	Man. 1 %	93	0	20	73	0:1	0
	Kan. 100	Netestováno					
M3/4-6D (H0=0:1)	Man. 1 %	100	9	87	4	1:9,7	0,84
	Kan. 100	100	0	100	0	0:1	0
M3/4-3B (H0=0:1)	Man. 1 %	100	0	95	5	0:1	0
	Kan. 100	101	0	101	0	0:1	0
M1/2-13A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	65	21	14	3,1:1	0,02
	Kan. 100	100	69	23	8	3:1	0
M1/2-15A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	59	27	14	2,2:1	1,88
	Kan. 100	102	74	28	0	2,6:1	0,33
M1/2-22A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	68	22	10	3,1:1	0,01
	Kan. 100	100	77	22	1	3,5:1	0,41
M1/2-56A (H0=3:1)	Man. 1 %	100	71	26	3	2,7:1	0,17
	Kan. 100	101	76	25	0	3:1	0
M1/2-61A (H0=3:1)	Man. 1 %	51	32	13	6	2,5:1	0,37
	Kan. 100	netestováno					
M1/8-29C (H0=3:1)	Man. 1 %	100	56	19	25	2,9:1	0,004
	Kan. 100	100	68	32	0	2,1:1	2,61
M1/8-44A (H0=3:1) (H0=0:1)	Man. 1 %	100	20	4	76	5:1	0,89
	Kan. 100	100	0	76	24	0:1	0
M1/8-44B (H0=3:1) (H0=0:1)	Man. 1 %	100	43	19	38	2,3:1	1,05
	Kan. 100	100	0	98	2	0:1	0
M1/8-57A (H0=3:1)	Man. 1 %	101	79	22	0	3,6:1	0,56
	Kan. 100	100	73	27	0	2,7:1	0,21
M1/8-64A (H0=0:1)	Man. 1 %	100	0	85	15	0:1	0
	Kan. 100	100	0	94	6	0:1	0
M1/8-64B (H0=0:1)	Man. 1 %	101	1	91	9	1:91	0,01
	Kan. 100	100	0	95	5	0:1	0

Tab. 5: Výsledky selekce T1 generace jednotlivých transformantů na selekčním médiu s manózou nebo kanamycinem a mendelovské fenotypové štěpné poměry v potomstvu. Výsledná hodnota chí-kvadrát testu se vztahuje k pravděpodobnosti shody pozorovaných fenotypových frekvencí s očekávanými fenotypovými frekvencemi., NF – normální fenotyp zdravého semenáčku, rezistentní

V T1 potomstvu 15 nezávisle transformovaných rostlin odpovídala dědičnost transgenů typickému Mendelovskému poměru pro potomstvo vzniklé samosprášením heterozygota. V potomstvu negativní kontroly a escapu M3/4-3B se neobjevil žádný semenáček s rezistentním fenotypem. Štěpný poměr v potomstvu rostliny K85/7A byl průkazně odlišný od očekávaného poměru 3:1, ale nebyl nalezen průkazný rozdíl od poměru 2:1 (ten byl posléze stanoven jako H_0 pro tento případ). U rostlin M1/2-61A, K85/9A, K85/10B, K85/21A a K85/25A bylo pomocí Southernovy hybridizace zjištěno více inkorporací T-DNA než 1, ale T1 potomstvo těchto rostlin štěpilo v poměru 3:1, a proto byl tento štěpný poměr stanoven jako H_0 pro chí-kvadrát test. V potomstvu klonu M3/4-6A, B a D byl zjištěn štěpný poměr výrazně odlišný od očekávaného 3:1, takže jsem pro něj stanovila alternativní $H_0 = 0:1$. V tomto případě se pozorované fenotypové frekvence od očekávaných významně neliší. V T1 potomstvu rostlin M1/8-64A a M1/8-64B byl zaznamenán pouze jeden semenáček s rezistentním fenotypem, a proto byla stanovena $H_0 = 0:1$, která byla potvrzena vypočtenou hodnotou chí-kvadrát testu. V semenném potomstvu rostlin K85/15B, K85/20A a K85/22A se zjištěný fenotypový štěpný poměr průkazně lišil od očekávaného a byla proto testována nulová hypotéza $H_0 = 1:1$, která byla výsledkem chí-kvadrát testu potvrzena.

Při selekci semen T1 generace na manóze nebo na kanamycinu jsem u rostlin testovaných PCR nezjistila žádný netransgenní únik.

Pomocí PCR byla ověřena přítomnost amplifikovatelného fragmentu genu *pmi* u 1 semenáčku s rezistentním fenotypem k manóze v potomstvu rostliny M1/8-64B, u 6 rezistentních semenáčků z potomstva rostliny M3/4-6A, 9 rezistentních semenáčků z potomstva rostliny M3/4-6D a u všech rezistentních semenáčků z potomstva rostlin M1/2-56A a M1/8-44B. Všechny semenáčky byly selektovány na médiu s manózou. U semenáčků senzitivních k manóze (všechny z potomstva rostlin M1/2-56A a M1/8-44B) testovaných pomocí PCR nebyl prokázán amplifikovatelný fragment genu *pmi*.



Obr. 8 Příklad elektroforetogramu PCR reakce amplifikující 514 bp dlouhý fragment genu *pml*. Vzorky pocházely z semenáčků T1-generace s rezistentním fenotypem selektovaných na selekčním médiu s 1 % koncentrací manózy. Každá reakce probíhala v objemu 25 μ l reakční směsi, z čehož jsem 20 μ l spolu s 3,5 μ l nanášecího pufru nanasla do jamky v 1,5 % agarózovém gelu. Dráhy: 1 - M1/8-64B, 2-7 - M3/4-6A, 8-14 - M1/2-56A, 15 – pozitivní kontrola, 16 – NK, 17-enzymová směs, M-velikostní standard (100 bp ladder).

5. DISKUZE

Pomocí Southernovy hybridizace se sondami hybridizujícími s geny *pmi*, *nptII* a promotorem CMPS jsem u 35 vybraných transgenních rostlin rajčete a jednoho pravděpodobně falešně pozitivního jedince, které jsem získala během své bakalářské práce, zjišťovala počet kopií vnesené T-DNA. Z 26 nezávislých transgenních linií jsem pouze u šesti rostlin prokázala více než jednu inkorporaci T-DNA. Vícenásobné inkorporace T-DNA do genomu transgenní rostliny jsou nežádoucí zejména kvůli větší pravděpodobnosti umlčení transgenů a proto jsou hledány transformační postupy, které zajistí vysoký podíl transformantů s jednou vnesenou kopií. Sigareva et al. (2004) ve své práci rozdělili získané transgenní rostliny tří variet rajčat získané transformací pomocí *Agrobacteria* podle výsledků Southernovy hybridizace na skupinu s nízkým počtem kopií (1 – 3) a s vysokým počtem kopií vnesené T-DNA. Z tohoto pohledu se jeví transformace děložních lístků odrůdy MoneyMaker pomocí agrobakteria velice efektivní, protože počet inzercí T-DNA na jednoho transformanta dosáhl nejvýše tří a to jen u dvou rostlin. Celkem 76,9 % získaných transformantů rajčete neslo pouze jednu kopii T-DNA. Takřka polovina všech získaných transformantů – 46 % - vychází pozitivní ve všech testovaných charakteristikách včetně typické Mendelovské dědičnosti vnesených transgenů, jak lze usuzovat z fenotypových štěpných poměrů v T1 generaci, které se průkazně neliší od očekávaných. Dai et al. (2001) srovnali u rýže účinnost transformace pomocí *Agrobacteria* a bombardováním mikročásticemi, přičemž dosáhli průměrného počtu inkorporací T-DNA u získaných transgenních rostlin při transformaci *Agrobacteriem* 1,8, což považovali za výborný výsledek. Luo et al. (2004) uvádí při transformaci psinečku pomocí agrobakteria, že vysoký podíl transgenních rostlin (60 – 65 %) neslo pouze 1 kopii T-DNA. Průměrný počet vnesené T-DNA u mnou získaných transgenních rostlin rajčete MoneyMaker činil 1,3, což je ve srovnání se získanými výsledky jiných autorů (Dai et al., 2001; Sigareva et al., 2004; Luo et al. 2004) nízký počet. Raj et al. (2005) získali při transformaci rajčete odrůdy Pusa Ruby pomocí agrobakteria transgenní rostliny pouze s jednou inzercí T-DNA, což může být dáno nízkým počtem získaných transformantů (celkem 7). Obecně je transformace pomocí *Agrobacteria* považována za účinnou metodu pro získání transgenních rostlin s nízkým počtem kopií vnesené T-DNA (Smith a Hood 1995).

Hybridizací se třemi sondami jsem testovala, zda se do dané rostliny začlenila celá T-DNA nebo jen její část. U většiny rostlin se výsledky PCR a Southernovy hybridizace shodovaly. U rostliny K85/10B nebyl při Southernově hybridizaci vidět proužek indikující přítomnost transgenů *nptII*, ale při analýze PCR byl přítomen amplifikovatelný fragment genu

nptII a také v T1 potomstvu rostliny nalezený fenotypový štěpný poměr (3:1) odpovídá přítomnosti nejen genu *nptII*, ale i jeho funkčního proteinu. I signál indikující přítomnost genu *pmi* je u této rostliny při Southernově hybridizaci velmi slabý, takže tento výsledek může být zapříčiněn špatnou kvalitou izolované DNA. U klonů K85/8A, B a C byla při analýze PCR prokázána přítomnost fragmentu genu *pmi* pouze u rostliny K85/8B, ale Southernovou hybridizací byla potvrzena přítomnost fragmentu genu *pmi* u všech těchto rostlin a vzhledem ke stejným velikostem proužků indikujících přítomnost transgenů *pmi* a *nptII* jsou tyto rostliny zcela jistě geneticky identické. Nejednoznačný výsledek může být dán například tím, že gen *pmi* nebyl vnesen celý nebo došlo k nějaké změně v jeho sekvenci (mutace, přestavba) a proto nebyl pomocí primerů fragment amplifikován. Tuto teorii podporuje i výsledek PMI-assaye, který vyšel u testovaných rostlin negativně, a fenotypový štěpný poměr v T1 generaci, kdy poměr *nptII* rezistentních semenáčků odpovídal očekávanému (3:1), zatímco *pmi* rezistentní semenáčky nebyly vůbec přítomny. U rostlin M1/8-44A a B, které jsou podle výsledků Southernovy hybridizace klony, byl gen *nptII* Southernovou hybridizací prokázán narozdíl od analýzy PCR a testované rostliny nepřežívaly na médiu s kanamycinem. Pravděpodobně tedy nedošlo k přenosu celého genu *nptII*, což se projevilo při PCR tím, že fragment nebyl amplifikován (primer pravděpodobně nepřisedl na DNA), zatímco při hybridizaci se sondou, kde dochází k hybridizaci na dlouhém úseku, byl fragment genu prokázán, ačkoliv gen nemusel být přítomen celý. U rostlin M3/4-6A, B a D nebyl prokázán gen *nptII*, což je v souladu s tím, že rostliny nepřežívaly na selekčním médiu s kanamycinem a v jejich potomstvu se neobjevil semenáček rezistentní ke kanamycinu. Pozitivní výsledek pro gen *nptII* při PCR analýze u rostlin M3/4-6A a D je pravděpodobně dán kontaminací rostlinné tkáně odebrané pro analýzu *Agrobacteriem*.

Expresi genu *pmi* jsem ověřila pomocí northernové hybridizace. Při northernové hybridizaci byl produkt genu *pmi* prokázán u všech rostlin, které při Southernové hybridizaci daly pozitivní signál pro přítomnost genu *pmi*. I slabá exprese postačovala pro přežívání rostlin na médiu s manózou. Rostliny klonálního původu jevíly obdobnou úroveň exprese genu *pmi* s výjimkou klonu M3/4-6A, B a D. Dva ze tří klonů testované PMI-assayem daly pozitivní signál a lze tedy předpokládat existenci funkčního proteinu PMI, což bylo i podpořeno výsledky selekce potomstva T1 generace, kde se objevily rostliny s rezistentním fenotypem a PCR u nich byl prokázán fragment genu *pmi*.

Přítomnost funkčního proteinu translatovaného z nalezené mRNA jsem zjišťovala pomocí testu s acidobazickým indikátorem chlorfenolová červeň, který byl použit pro ověření přítomnosti funkčního proteinu PMI například u konopí (Feeney a Punja, 2003), psinečku (Fu

et al., 2005), jabloně (Degenhardt et al., 2006) nebo u čiroku (Gao et al., 2005). Test jsem optimalizovala pro použití u rajčat. Test je potřeba přizpůsobit danému rostlinnému druhu a použité části rostliny, což se potvrdilo například při pokusu použít tento test u internodií bramboru kultivaru Bintje, kde se test nepodařilo optimalizovat kvůli tomu, že netransformované rostliny z neznámých důvodů při testování okyselily médium a změnily tak jeho barvu na žluto, čímž byly setřeny rozdíly mezi transgenními a netransgenními rostlinami a test s CPR tím ztratil vypovídací hodnotu (Gazdová, nepublikované výsledky). Výsledky testu s acidobazickým indikátorem CPR jsou v pozitivní korelaci s výsledky northernové hybridizace. Pouze u rostlin M1/2-15A a M1/2-22A nevyšel test pozitivně, což je pravděpodobně dáno malým počtem opakování, protože jinak tyto rostliny bez problémů přežívaly na médiu s manózou a také nalezený fenotypový štěpný poměr v jejich T1 generaci je typicky mendelovský.

Pro selekci T1 potomstva transgenních rostlin na manóze jsem úspěšně optimalizovala selekční postup a srovnala jej s rutinně prováděnou selekcí na kanamycinu. Pro selekci jsem použila semena rajčat vzniklá po samosprášení transformantů T0. Semena jsem selektovala na médiu s běžně používanou koncentrací kanamycinu 100 mg/l pro selekci semen rajčat (Hamza a Chupeau, 1993; Hackett et al., 2000), ačkoliv u variety MoneyMaker se ukázala za použitelnou i koncentrace kanamycinu pouze 50 mg/l média (Riggs et al., 2001). Pro selekci na manóze se ukázala jako nejvhodnější 1 % koncentrace manózy v médiu bez přídavku glukózy. Glukóza v médiu značně zmírňovala fyto toxické účinky manózy a to do té míry, že na médiu s 1 % glukózou a 0,5 % manózou přežilo 93 % netransformovaných rostlin, takže glukóza takřka zcela potlačila účinek manózy, a na médiu s 1 % glukózou a 1 % manózou celých 86 % rostlin negativní kontroly bylo vůči účinku manózy rezistentní. Tento nežádoucí vliv glukózy při selekci na manóze zjistili již Joersbo et al. (1998, 1999). Sigareva et al. (2004) překvapivě použili při selekci rajčat na manóze jako doplňkový zdroj energie pro selektované rostliny glukózu. Pozorovali ovšem výskyt falešně pozitivních rostlin a pro jejich eliminaci museli jako poslední krok při selekci použít selekci na médiu pouze s manózou.

Fenotyp senzitivních semenáčků rajčete při selekci na manóze je takřka stejný jako popisovaný fenotyp senzitivních semenáčků při selekci na kanamycinu (Hamza a Chupeau, 1993), což je pro rutinní selekci velmi praktické. Při selekci byl fenotyp rezistentních a senzitivních rostlin velmi lehce rozeznatelný bez existence přechodových typů a to jak pro selekci na kanamycinu, tak pro selekci na manóze, přičemž senzitivní fenotyp semenáčků selektovaných na manóze byl dokonce ještě o něco výraznější (výrazně kratší vzrůst, vždy karmínový stonek, temně zelené malé děložní lístky). Při PCR analýze vybraných semenáčků

nebyl nalezen jediný falešný pozitiv. Nebyly testovány všechny semenáčky, ale i přesto výsledky naznačují, že případný výskyt falešně pozitivních rostlin (escapů) by byl velmi nízký. Selektce T1 semenného potomstva transformantů rajčete na manóze se tedy prokázala jako rychlá, snadná a levná metoda, jak efektivně vyselektovat transgenní rostliny z potomstva T0 transformantů a je plně srovnatelná s běžně používanou selekcí na kanamycinu.

Získané štěpné poměry jsem ověřila s očekávanými pomocí chí-kvadrát testu, jehož použití se ukázalo jako mnohem užitečnější než prostý procentický výpočet, protože tento test je mnohem robustnější při malém počtu opakování. Například rostlina M1/8-44A při selekci na manóze jevila fenotypový štěpný poměr 5:1 při celkovém počtu 24 vyklíčivších semenáčků, protože 20 semenáčků bylo rezistentních a 4 senzitivní (tedy 80 % a 20 %). Při ověření shody s nulovou hypotézou H_0 , že se pozorovaný štěpný poměr neliší od očekávaného 3:1, vyšla hodnota chí-kvadrát testu nižší než kritická hodnota, při které bychom nulovou hypotézu zamítli a to na 1 % i 5 % hladině významnosti. Při takto malém počtu semenáčků ovlivní každý jeden celkový štěpný poměr při jednoduchém procentickém výpočtu významněji. Například 21 rezistentních ku 3 senzitivním dá poměr 7:1, naopak 19 rezistentních ku 5 senzitivním dá poměr 4:1, při stejném počtu všech vyklíčivších semenáčků jako u zmíněné rostliny M1/8-44A.

Ze všech testovaných rostlin jsem u 57,7 % pozorovala typické mendelovské fenotypové štěpné poměry pro oba vnesené transgeny. Dalších 19,2 % transformantů vykazovalo fenotypový štěpný poměr 3:1, ačkoliv podle výsledků Southernovy hybridizace u nich došlo k dvěma nebo třem inkorporacím T-DNA, což lze vysvětlit pravděpodobně tandemovou inkorporací kopií, kdy jsou kopie na chromozomu tak blízko sebe, že nedochází nebo jen minimálně k rekombinaci a rostliny tedy v potomstvu neštěpí očekávaným způsobem, ale stejně jako při vnesení pouze jedné kopie T-DNA. Tento fenotypový štěpný poměr byl pozorován u rostlin K85/25A, M1/2-61A, K85/21A, K85/9A a K85/10B, kde jsem tedy při testování odlišnosti pozorovaného a očekávaného štěpného poměru chí-kvadrát testem stanovila alternativní nulovou hypotézu H_0 , že se pozorovaný štěpný poměr neliší od očekávaného 3:1, a u všech rostlin byla tato H_0 potvrzena (respektive nemohla být vyvrácena na 5 % ani na 1 % hladině významnosti). U rostlin M1/2-61A, K85/9A a K85/10B jsou ovšem proužky indikující vícenásobnou inkorporaci při Southernově analýze velmi slabé a nezřetelné a mohlo by se jednat o přítomnost nízkého počtu nedostatečně našťípaných fragmentů vytvářejících slabý falešně pozitivní signál. Z celkového počtu transformantů tedy 76,9 % štěpí v T1 generaci v poměru odpovídajícím typickému mendelovskému štěpnému

oměru pro potomstvo vzniklé samosprášením heterozygota pro jeden lokus. U zbylých 23,1 % transformantů byly nalezeny štěpné poměry odlišné od očekávaných. U těchto rostlin jsem rovněž stanovila alternativní nulové hypotézy a ověřila je pomocí chí-kvadrát testu. Konkrétní pozorované štěpné poměry a stanovené alternativní nulové hypotézy byly tyto: 1,9:1 pro *pml* a 1,4:1 pro *nptII* místo očekávaného poměru 3:1 u rostliny K85/7A ($H_0 = 2:1$), 1:1,4 pro *nptII* místo očekávaného 3:1 u rostlin K85/22A a K85/15B ($H_0 = 1:1$), 1,1:1 pro *pml* a 1:1 pro *nptII* místo očekávaného 15:1 u rostliny K85/20A ($H_0 = 1:1$), 1:14,5, respektive 0:1 a 1:9,7 místo očekávaných 3:1 u rostlin M3/4-6A respektive M3/4-6B a M3/4-6D (klon, $H_0 = 0:1$) a 0:1 respektive 1:91 místo očekávaných 3:1 u rostlin M1/8-64A a B (klon). Žádná z testovaných H_0 nemohla být na základě výsledné hodnoty chí-kvadrát testu zamítnuta na 5 % ani na 1 % hladině významnosti. Fenotypový štěpný poměr 2:1 v T1 potomstvu rostliny K85/7A by mohl být způsoben například letalitou potomstva s homozygotně dominantní konstitucí pro vnesenou T-DNA pravděpodobně kvůli jejímu včlenění do nějakého lokusu nutného pro přežití rostliny již v semeníku. Fenotypový štěpný poměr 0:1 v potomstvu rostlin M3/4-6A, B a D a M1/8-64A a B může indikovat umlčení transgenů v potomstvu nebo takřka úplnou letalitu potomků s vnesenou T-DNA (již při tvorbě semen), což by bylo potřeba dále ověřit pomocí PCR. Pokud by u semenáčků se senzitivním fenotypem byl zjištěn podíl transgenních rostlin, jednalo by se o silencing, v případě, že by přítomnost transgenů u senzitivních semenáčků nebyla vůbec prokázáno, jednalo by se o sníženou vitalitu až letalitu potomstva s transgenem, což jsem neověřovala, protože to již bylo mimo cíle mé práce. Fenotypový štěpný poměr blízký 1:1 bude nejspíš způsoben sníženou vitalitou potomstva nesoucího transgen (při tvorbě semen). Poměr 1:1 by také mohl být způsoben letalitou heterozygotů pro T-DNA, například při jejím včlenění do lokusu, kdy by současná přítomnost translačního produktu nemutovaného a mutovaného genu na daném lokusu byla letální. Všechny neočekávané štěpné poměry jsou nejspíš způsobeny pozičním efektem inkorporace T-DNA.

6. ZÁVĚR

Ve své práci jsem provedla molekulární analýzu 35 transgenních rostlin získaných v průběhu bakalářské práce a jedné rostliny falešně pozitivní.

Southernovou hybridizací jsem prokázala, že došlo k 26 nezávislým transformačním událostem. Všechny rostliny odvozené z jednoho explantátu jsou dle výsledků Southernovy hybridizace klony, což se týkalo sedmi explantátů, z nichž byly získány 2-3 transgenní rostliny. Celkem 76,9 % transformantů neslo 1 kopii T-DNA. Takřka polovina všech získaných transformantů – 46 % - vychází pozitivní ve všech testovaných charakteristikách včetně typické Mendelovské dědičnosti vnesených transgenů.

Pomocí northernové hybridizace jsem u všech rostlin nesoucích gen *pmi* prokázala přítomnost příslušné mRNA.

Optimalizovala jsem test s acidobazickým indikátorem CPR pro posouzení přítomnosti funkčního proteinu PMI v transformovaných rostlinách rajčete odrůdy MoneMaker. U většiny rostlin nesoucích gen *pmi* a tvořících příslušnou mRNA přinesl tento test pozitivní výsledek a jeví se tedy jako efektivní pomocná metoda pro určení přítomnosti funkčního enzymu manóza-6-fosfátizomerázy v dané transgenní rostlině.

Úspěšně jsem vyzkoušela zavedení selekce semenného potomstva T0 transformantů u rajčete na manóze. Jako nejvhodnější pro selekci se ukázala 1 % koncentrace manózy v médiu pro výsev semen. Glukóza přidaná do média značně inhibovala až zcela potlačila fyto toxický účinek manózy v závislosti na koncentraci manózy a proto jsem ji do selekčních médií nepřidávala. Nepřítomnost glukózy v médiu neměla patrný negativní vliv na klíčivost a přežívání semenáčků. Fenotyp senzitivních semenáčků rajčete je stejný jako při běžně používané selekci na kanamycinu. Rezistentní netransgenní rostliny nebyly zjištěny. Selekcce semen rajčete na médiu s manózou je tedy jednoduchá a efektivní metoda.

V potomstvu T1 generace jsem sledovala fenotypové štěpné poměry a nakolik se shodují s očekávanými, což jsem testovala pomocí chí-kvadrát testu.

Výsledky této práce byly součástí těchto příspěvků a publikace:

Bříza, J., Pavingerová, D., Přikrylová, P., Gazdová, J., Vlasák, J., Niederemeierová, H.: Use of phosphomannose isomerase-based (PMI) selection system for Agrobacterium-mediated

transformation of tomato and potato and a comparison with neomycin phosphotransferase II selection system. Submitted for publication in Journal of Plant Biology.

Pavingerová, D., Bříza, J., Vlasák, J., Niedermeierová, H., Přikrylová, P., Gazdová, J., Růžičková, N., Dusbábková, J.: The use of mannose selection system "Positech" of Syngenta for the production of transgenic potato, tomato and lettuce. - In: Bříza J., Pavingerová D., Špak J. (eds): Book of Abstracts of "6th Int. Symp. Ser. Recent Advances in Plant Biotechnology: From Laboratory to Business", České Budějovice, Czech Rep., September 12-16, 2005, p. 56, Attavena České Budějovice, 2005.

Bříza, J., Pavingerová, D., Vlasák, J., Niedermeierová, H., Dusbábková, J., Přikrylová, P., Gazdová, J., Růžičková, N.: Mannose-based selection for transformation of lettuce, tomato and potato. - In: Programme and Abstracts of International Conference "Plant Transformation Technologies", Vienna, Austria, 4-7 February, 2007, p. 77, Vienna University, Vienna, Austria, 2007.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Andersson M., Trifonova A., Andersson A. B., Johansson M., Bulow L., Hofvander P., (2003) A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Reports* 22: 261-267

Aswath Ch. R., Mo S. Y., Kim D. H., Park S. W., (2006) *Agrobacterium* and biolistic transformation of onion using non-antibiotic selection marker phosphomannose isomerase. *Plant Cell Reports* 25: 92-99

Barrell P. J., Shang Y., Cooper P. A., Conner A. J., (2002) Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 70: 61-68

Boscariol, R. L., Almeida, W. A. B., Derbyshire, M. T. V. C., Mourao Filho, F. A. A., Mendes, B. M. J. (2003) Genetic transformation and hybridization. *Plant Cell Reports* 22: 122-128

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

Bříza, J., Pavingerová, D., Vlasák, J., Ludvíková, V., Niedermaierová, H. (2007) Production of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein fused with β -glucuronidase in transgenic tomato and potato plants. *Biologia Plantarum* 51: 268-276

Charest, P. J., Iyer, V. N., Miki, B. L. (1989) Factors affecting the use of chloramphenicol acetyltransferase as a marker for *Brassica* genetic transformation. *Plant Cell Reports* 7: 628-631

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

Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy, R. N., Fauquet, C. (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* 7: 25-33

De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J., Zambryski, P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* 3: 1681-1689

De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Docky, J., Toen, C., Gossele, V., Movva, N. R., Thompson, C., van Montagu, M., Leemans, J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518

Degenhardt J., Poppe A., Montag J., Szankowski I., (2006) The use of phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports* ONLINE

- Ebinuma, H., Matsunaga, E., Yamakodo, M. (1997)** Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2117-2121
- Ebmeier A., Allison L., Cerutti H., Clemente T., (2004)** Evaluation of the *Escherichia coli* threonine deaminase gene as a selectable marker for plant transformation. *Planta* 218: 751-758
- Erikson O., Hertzberg M., Nasholm T., (2004)** A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nature Biotechnology* 22: 455-458
- Erikson O., Hertzberg M., Nasholm T., (2005)** The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 57: 425-433
- Feeney M., Punja Z. K., (2003)** Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Canabis sativa* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39(6): 578-585
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Fick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, Y. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L., Woo, S. C. (1983)** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807
- Fu D., Xiao Y., Muthukrishnan S., Liang G. H., (2005)** In vivo performance of a dual genetic marker, *manA-gfp*, in transgenic bentgrass. *Genome* 48: 722-730
- Gadaleta A., Giancaspro A., Blechl, Blanco A., (2006)** Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation. *Journal of Cereal Science* 43: 31-37
- Gao Z., Xie X., Ling Y., Mathukrishnan S., Liang G. H., (2005)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotechnology Journal* 3: 591-599
- Gazdová J., (2004)** Ověření možnosti využití nového selektovatelného transgenu při transformaci bramboru (*Solanum tuberosum*). Bakalářská diplomová práce BF JU.
- Gazdová, J., (2007):** Molekulární analýza transgenních rostlin *Solanum tuberosum* získaných po vnesení genu pro manózo-6-fosfátizomerázu. Magisterská diplomová práce BF JU.
- Goddijn O. J. M., Schouten P. M. D., Schilperoort R. A., Hoge H. C., (1993)** A chimaeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology* 22: 907-912
- Goldsworthy, A., Street, H. E. (1965)** The carbohydrate nutrition of tomato roots VIII. The mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots. *Annals of Botany* 29: 45-58
- Haan, P., Ultzen, T., Prins, M., Gielen, J., Goldbach, R., Grinsven, M. (1996)** Transgenic tomato hybrids resistant to tomato spotted wilt virus infection. *Acta Horticulturae* 431: 417-426

- Hackett, R. M., Ho, C-W., Lin, Z., Foote, H. C. C., Fray, R. G., Grierson, D. (2000)** Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to the tomato *Never-ripe* mutant, consistent with the Ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiology* 124: 1079-1086
- Hamza, S., Chupeau, Y. (1993)** Reevaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Experimental Botany* 44: 1837-1845
- Hayford, M. B., Medford, J. I., Hoffman, N. L., Rogers, S. G., Klee, H. J. (1988)** Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamycin acetyltransferases. *Plant Physiology* 86: 1216-1222
- He Z., Fu Y., Si H., Hu G., Zhang S., Yu Y., Sun Z., (2004)** Phosphomannose-isomerase gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Science* 166: 17-22
- He Z., Duan Z. Z., Liang W., Chen F., Yao W., Liang H., Yue Ch., Sun Z., Chen F., Dai J., (2006)** Mannose selection system used for cucumber transformation. *Plant Cell Reports* 25: 953-958
- 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
- Hsieh, T.-H., Lee, J.-T., Charng, Y.-Y., Chan, M.-T. (2002)** Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology* 130: 618-626
- Jang, J. C., Sheen, J. (1994)** Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665-1679
- Joersbo, M., Okkels, F. T. (1996)** A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports* 16: 219-221
- Joersbo, M., Donaldson, I., Kreiberg, J., Petersen, S. G., Brunstedt, J., Okkels, F. T. (1998)** Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular breeding* 4: 111-117
- Joersbo, M., Petersen, S. G., Okkels, F. T. (1999)** Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiologia Plantarum* 105: 109-115
- Joersbo, M., Mikkelsen, J. D., Brunstedt, J. (2000)** Relationship between promoter strength and transformation frequencies using mannose selection for the production of transgenic sugar beet. *Molecular Breeding* 6: 207-213
- Joersbo M. (2001)** Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes. *Physiologia Plantarum* 111: 269-272

- Joersbo M., Jorgensen K., Brunstedt J., (2003)** A selection system for transgenic plants based on galactose as selective agent and UDP-glucose:galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene as selective gene. *Molecular Breeding* 11: 315-323
- Jones, J. D. G., Svab, Z., Harper, E. C., Hurwitz, C. D., Maliga, P. (1987)** A dominant nuclear streptomycin resistance marker for plant cell transformation. *Molecular and General Genetics* 210: 86-91
- Jung, C., Cai, D. G., Kleine, M. (1998)** Engineering nematode resistance in crop species. *Trends Plant Sci.* 32: 266-270
- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M., Zeikus, J. G. (1990)** Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*: characterization of the structural gene and function of active site histidine. *J. Biol. Chem.* 265: 19082-19090
- 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 and Environment* 26: 1181-1190
- Li, X., Volrath, S. L., Nicholl, D. B. G., Chilcott, C. E., Johnson, M. A., Ward, E. R., Law, M. D. (2003)** Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of maize. *Plant Physiology* 133: 736-747
- Lucca P., Ye X., Potrykus I., (2001)** Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breeding* 7: 43-49
- Luo, H., Hu, Q., Nelson, K., Longo, C., Kausch, A. P., Chandler, J. M., Wipff, J K., Fricker, C. R. (2004)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinotricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Reports* 22: 645-652
- Lyon B. R., Llewellyn D. J., Huppatz J. L., Dennis E. S., Peacock W. J., (1989)** Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Molecular Biology* 13: 533-540
- Mazur B. J., Chui C. F., Smith J. K., (1987)** Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase as target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiology* 85: 1110-1117
- Miles, J. S., Guest, J. R. (1984)** Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene* 32: 41-48
- Min B. W., Cho Y. N., Song M. J., Noh T. K., Kim B. K., Chae W. K., Park Y. S., Choi Y. D., Harn Ch. H., (2006)** Successful genetic transformation of Chinese cabbage using phosphomannose isomerase as a selection marker. *Plant Cell Reports ONLINE*

- Morgan, D. R., Street, H. E. (1959)** The carbohydrate nutrition of tomato roots. VII. Sugars, sugar phosphates and sugar alcohols as respiratory substrates for excised roots. *Ann. Bot.* 23: 89-105
- Murashige, T., Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A. R., Hansen, G. (2000)** The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* 19: 798-803
- Newel C. A., Rozman R., Hinchee M. A., Lawson E. C., Haley L., Sanders P., Kaniewski W., Tumer N. E., Horsch R. B., Fraley R. T., (1991)** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank. *Plant Cell Reports* 10: 30-34
- O'Kennedy, M. M., Burger, J. T., Botha, F.C. (2004)** Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase. *Plant Cell Reports* 22: 684-690
- Ondřej M., Drobník J. (2002)** Transgenozé rostlin. Academia, Praha
- Penna S., László S., Swennen R. (2002)** Positive selectable marker gene for routine plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 125-128
- 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
- Příkrylová P., (2004)** Použití genu pro manózo-6-fosfátizomerázu jako alternativního selektovatelného genu při transformaci rajčete. Bakalářská diplomová práce BF JU
- Raj, S. K., Singh, R., Pandey, S. K., Singh, B. P. (2005)** *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. *Current Science* 88: 1674-1679
- Ramesh S. A., Kaiser B. N., Franks T., Collins G., Sedgley M., (2006)** Improved method in *Agrobacterium*-mediated transformation of almond using positive (mannose/*pmi*) or negative (kanamycin resistance) selection-based protocols. *Plant Cell Reports* 25: 821-828
- Reed, J., Privalle, L., Powell, M. L., Meghji, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Wenck, A., Launis, K., Kramer, C., Chang Y.-F., Hansen, G., Wright, M. (2001)** Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 127-132
- Reustle G. M., Wallbraun M., Zwiebel M., Wolf R., Manthey T., Burkhardt C., Lerm T., Viver M., Krczal G., (2003)** Selectable marker systems for genetic engineering of grapevine. *Acta Horticulturae* 603: 485-490

- 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*. *Molecular Breeding* 1: 229-236
- Riggs, C. D., Zeman, K., DeGuzman, R., Rzepczyk, A., Taylor, A. A. (2001)** Antisense inhibition of a tomato meiotic proteinase suggests functional redundancy of proteinases during microsporogenesis. *Genome* 44: 644-650
- Růžičková N., (2006)** Použití genu *pmi* jako selektovatelného genu při transformaci lociky seté (*Lactuca sativa*). Bakalářská diplomová práce BF JU
- Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, R. B., Kishore, G. M., Winter, J. A., Tumer, N. E., Hironaka, C. M., Sanders, P. R., Gasser, C. S., Aykent, S., Siegel, N. R., Rogers, S. G., Fraley, R. T. (1986)** Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481
- Sheetty, R. E., Kramer, M., Hiatt, W. R. (1988)** Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8805-8809
- Sigareva M., Spivey R., Willits M. G., Kramer C. M., Chang Y. F., (2004)** An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 23: 236-245
- 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, R. H., Hood, E. H., (1995)** *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Science* 35: 301-309
- Stalker, D. M., McBride, K. F., Malyj, M. D. (1988)** Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242: 419-423
- Stein, J. C., Hansen, G. (1999)** Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant physiology* 121: 71-79
- Stenlid, G. (1954)** Toxic effects of D-mannose, 2-deoxy-D-glucose, and D-glucosamine upon respiration and ion absorption in wheat roots. *Physiologia Plantarum* 7: 173-181
- Streber, W. R., Willmitzer, L. (1989)** Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology* 7: 811-816
- Subramanian, M. V., Hung, H. Y., Dias, J. M., Miner, V. W., Butler, J. H., Jachetta, J. J. (1990)** Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. *Plant Physiology* 94: 239-244
- Sugita, K., Matsunaga, F., Ebinuma, H. (1999)** Effective selection system for generating marker free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Reports* 18: 941-947

Tai T., Tanksley S., (1991) a rapid and inexpensive method for isolation of DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 297-303

Thomzik, J. E., Stenzel, K., Stocker, R., Scgreier, P. H., Hain, R., Stahl, J. D. (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51: 265-278

Todd, R., Tague, B. W. (2001) Phosphomannose isomerase: A versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 307-319

Tomassoli, L., Ilardi, V., Barba, M., Kaniewski, W. (1999) Resistance of transgenic tomato to cucumber mosaic cucumovirus under field conditions. *Molecular Breeding* 5: 121-130

Waldron, C., Murphy, E. B., Roberts, J. L., Gustafson, G. D., Armour, S. L., Malcolm, S. K. (1985) Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation. *Plant. Mol. Biol.* 5: 103-108

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

Wong, H. C., Ting, Y., Lin, H.-C., Reichert, F., Myambo, K., Watt, K., Toy, P. L., Drummond, R. J. (1991) Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J. Bacteriol.* 173: 6849-6858

Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., Novitzky, R., Wang, H., Artim-Moore, L. (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Report* 20: 429-436

You, S. J., Liau, C. H., Huang, H. E., Feng, T. Y., Prasad, V., Hsiao, H. H., Lu, J. C., Chan, M. T. (2003) Sweet pepper ferredoxin-like protein (*pflp*) gene as a novel selection marker for orchid transformation. *Planta* 217: 60-65

Zhang, P., Potrykus, I., Puonti-Caerlas, J. (2000) Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. *Transgenic Research* 9: 405-415

Zhang, P., Puonti-Kaerlas, J. (2000) PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Rep.* 19: 1041-1048

Zhang, X., Buehner, N. A., Hutson A. M., Estes M. K., Mason, H. S. (2006) Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnology Journal* 4: 419-432

Žaludová, J. (2002) Transformace rajčete pomocí *Agrobacterium tumefaciens* s různými expresními kazetami nesoucími hybridní gen z lidského papillomaviru. Magisterská diplomová práce ZF JU

MANNOSE-BASED SELECTION FOR TRANSFORMATION OF LETTUCE, TOMATO AND POTATO

Jindřich Bríza^{1,2}, Daniela Pavingerová¹, Josef Vlasák¹, Hana Niedermeyerová¹, Jana Dusbábková¹, Pavla Píkrilová¹, Jana Gazdová¹, Nina Růžičková¹

¹Biology Centre of the ASCR, Institute of Plant Molecular Biology, Braníšovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic (e-mail: briza@umbr.cas.cz), ²University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, Braníšovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic



CONCLUSIONS

The experiments demonstrated that mannose can be used as selection agent for all plant species studied. However, for lettuce and especially for tomato the transformation efficiency is lower compared to kanamycin-based selection protocol.

INTRODUCTION

Traditional and frequently used plant selectable marker systems include genes granting resistance to the antibiotics or to the herbicides. Unfortunately, antibiotic resistance markers are not appropriate for all plant species and they are not favourably accepted by public even if the safety of these markers has been thoroughly tested and proven over several years. Similarly, the use of markers based on herbicide resistance is usually a major public concern. In addition, the selective agent may adversely affect transformed plant cells by giving either a decrease in their regeneration capacity due to accumulation of toxic compounds from the herbicide, non-transformed cells (Blair and Wright, 1999).

To date, the number of marker genes were explored for development of alternative selection methods without use of either antibiotics or herbicides. The transposon insertion (nos) gene was first used as a selectable marker by Ambré et al. (1998) for transformation of sugar beet. In the following years, PMI was shown to be a useful marker in the transformation of a number of plant species like cotton, maize, Arabidopsis, wheat, durum wheat, rice, sweet orange, lettuce, pearl millet, lentegrass, papaya, sorghum, bread wheat, cucumber, Chinese cabbage as well as tomato.

OBJECTIVES

To establish a mannose based selection system for *Nicotiana glauca* L., var. *Bratja*, *Lycopersicon esculentum* Mill, var. *Money-maker* and *Lactuca sativa* L., var. *Achille*.

MATERIALS AND METHODS

TRANSFORMATION VECTOR

The binary vector pCB100 was used for transformation. It was constructed by inserting the *spdII* gene driven by the *nos* promoter into a *pmi* backbone using *spdII* primer of pM11 construct obtained from Genematrix (Gene-MC, Basel, Switzerland). The transformation vector harboured *kanamycin* *nos* gene under the control of *caudex*, yellow leaf rolling virus short version (YLRV) promoter. The pCB100 vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA104.

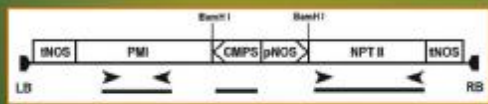


Figure 1. Structure of the T-DNA of pCB100. SPDII coding region, leaf rolling virus promoter, Nos promoter, PMI, phytochrome-interacting protein gene (PMI), multiple cloning sites (MCS), NPT II coding region, *caudex* promoter, RB, right border (RB), LB, left border. The constructs are sequenced primers and the PCR analysis for the detection of transgene in the transformants.

potato

Agrobacterium mediated transformation of tuber nodules from a tuber explant (plasm) (Pavingerová et al., 2011) was used for transformation of *Solanum tuberosum* L., cv. *Bratja*. Selection was performed on MS medium with different concentration of mannose. The mannose concentration was increased in a stepwise manner during selection. Regenerated shoots were selected on MS medium with 1% mannose or 100 mg l⁻¹ kanamycin.

lettuce

Modified cocultivation leaves method (Filičová et al., 1987) was used for transformation of *Lactuca sativa* L., var. *Bratja*. Selection of the transgene-regenerated shoots carried out on BM medium containing MS basal salts, Nitsch's vitamins (100 mg l⁻¹ myo-inositol, 1.5% myo-inositol, 5.2 mg l⁻¹ ethanol, 1 mg l⁻¹ acetyl riboside (ZB), 0.1 mg l⁻¹ indole-3-acetic acid (IAA), 20000 AU mg l⁻¹ thiamin and mannose (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 or 0.0625% w/v for 100 mg l⁻¹ kanamycin).

REFERENCES

Filičová, J. J., Křesl, J., Ross, R., Čížek, L. (1987) Efficient transfer of a glycolate tolerance gene into tomato using a binary Agrobacterium transformation vector. *Biotechnology* 5: 716-720.
Hansen G., Wright, W.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci* 4: 128-130.
Ambré, M., Bonalantoni, L., Kirchberg, J., Fritzen, S. G., Braunstein, I., Okubo, S. T. (1998) Analysis of marker selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Biotechnol.* 4: 111-117.
Michalovec, R., Maresk, E., Nedyk, S., Landry, R. (1995) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Rep.* 14: 429-432.
Pavingerová, D., Bratja, J., Niedermejerová, H. (2011) Timing of transposition of Ac mobile element in potato. *Biol. Plantarum* 46: 387-392.

The authors wish to thank the program Soutěž AG, Switzerland, for supplying pNO12019. This work was funded by grant No. G-1521/MS/2002 from the Czech Science Foundation and by G-2: AV1920/10/013.

RESULTS

potato

From Figure 2D it shows that the highest transformation efficiency was 55.3% when mannose concentration in the medium MS was 5 g l⁻¹. During the first 3 weeks after transformation and 10 g l⁻¹ afterwards, the longer cultivation time of explants on medium MS was applied the higher transformation efficiency was achieved. Efficacy of transformation with kanamycin as selection agent was slightly lower (up 33.5%, data not shown).

Selected transgenic plants from experiment 2E. For testing T-DNA of pCB100 were analyzed by Southern hybridization (Fig. 3), using *kanamycin* genomic DNA or by Northern hybridization (Fig. 4) with different probes. It is apparent that set of 8 transgenic plants from experiment 2E arose through independent transformation events. Five plants, two, revealed transgenic products of *pmi* transgene.

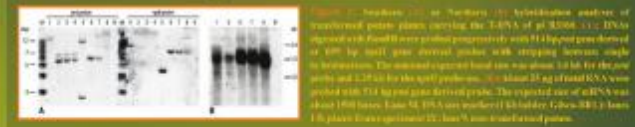
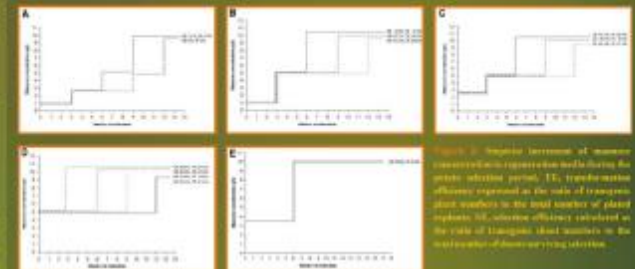


Figure 3. Southern hybridization analysis of transformed potato plants carrying the T-DNA of pCB100. (A) - DNA digested with *Kpn*I and *Hind*III were hybridized sequentially with P14 probe gene derived at 100 by *pmi* gene control probe with stripping between single hybridization. The maximal expected band size was about 3.1 kb for the gene probe and 3.2 kb for the control probe. (B-G) about 10 µg of total DNA were hybridized with P14 by gene derived probe. The expected size of DNA was about 1000 base. Lane M, DNA was hybridized by ladder (Epicentre) 1 kb size. 10 plants from experiment 2E, lane 5, one transgenic plant.

tomato

Table 1 shows summary of 3 independent transformation experiments. It is evident that the mannose based selection method works with tomato explants but its efficiency reaches only about 45% of the kanamycin selection system; the highest transformation frequency was 42% for mannose selection compared with 9% for selection on kanamycin. Since transformation frequency for mannose system is still lower compared with kanamycin selection further optimization of the protocol is in progress.



Figure 4. Northern hybridization analysis of transformed tomato plants carrying the T-DNA of pCB100. About 20 µg of total RNA were hybridized with P14 by gene derived probe. The expected size of RNA was about 1000 b. Lanes and the same as in Fig. 3.

Table 1. Transformation efficiency with mannose and kanamycin selection from explant before explants of tomato.

Medium	Seed explants	No. of explants with shoot regeneration	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ mannose)	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ kanamycin)	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ mannose)	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ kanamycin)
S20-M20	200	11	6	5	1	1
S20-M25	200	8	4	4	0	0
S20-M30	200	10	4	6	1	4
S20-M35	200	14	6	8	0	0
S20-M40	200	18	8	10	0	0
S20-M45	200	13	7	6	0	0

Note: During selection, 100 mg l⁻¹ kanamycin efficiency is the ratio of transgenic plant numbers to the total number of plant explants.

Table 2. Representation of transformation efficiency with mannose and kanamycin selection from explants of tomato.

Medium	Seed explants	No. of explants with shoot regeneration	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ mannose)	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ kanamycin)	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ mannose)	No. of explants with shoot (mg l ⁻¹ kanamycin)
S20-M20	200	11	6	5	1	1
S20-M25	200	8	4	4	0	0
S20-M30	200	10	4	6	1	4
S20-M35	200	14	6	8	0	0
S20-M40	200	18	8	10	0	0
S20-M45	200	13	7	6	0	0

lettuce

Although no Southern and Northern analysis were carried out so far we can conclude that the mannose based selection system works in lettuce var. *Achille*. TE reached up to 35% on the medium S20-M20. Control cocultivation explants on the same medium regenerated shoots poorly (Pavingerová (in press)) and none of them was able to root.

Table 3. Representation of transformation efficiency with mannose and kanamycin selection from explants of lettuce.

Note: During selection, 100 mg l⁻¹ kanamycin efficiency is the ratio of transgenic plant numbers to the total number of plant explants.