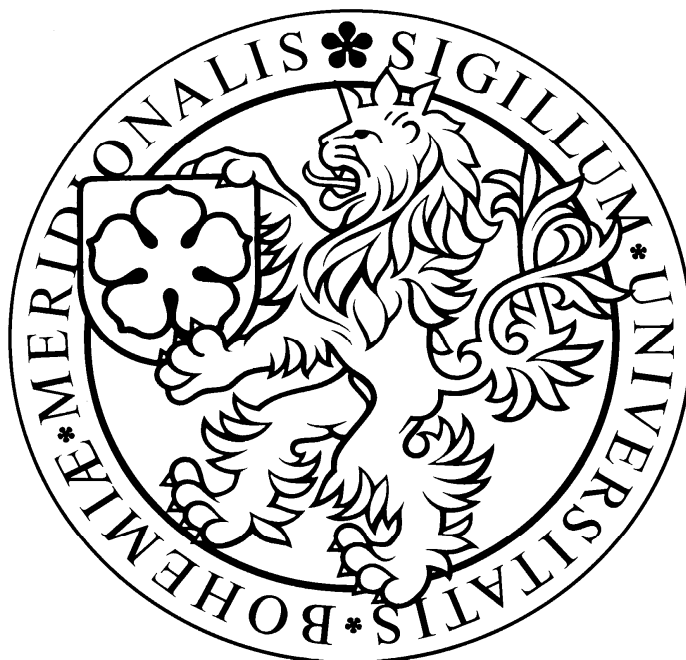


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Katedra genetiky**



**Vliv vybraných exogenních a endogenních  
faktorů na účinnost transformačního procesu**

Bakalářská práce

**Tomáš Skalický**

**Školitel: RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.**

České Budějovice 2009

Bakalářská diplomová práce v nezkrácené podobě

Skalický T., 2009: Vliv vybraných exogenních a endogenních faktorů na účinnost transformačního procesu [Effect of selected exogenous and endogenous factors on transformation efficiency. Bc. Thesis, in Czech. ], Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Annotation

The main goal of this bachelor thesis was to explore the possibility to use an ultrasound sonication as a way to increase the transformation efficiency of flax. Another part of this thesis is devoted to the searching for the seed sterilization method and finding an optimal concentration of kanamycin antibiotic useful for the selection of transformed plants.

Tato bakalářská práce byla financována z projektů MŠMT 1P05ME800 a MŠMT 1M06030, jejichž řešitelem byl RNDr. Slavomír Rakouský, CSc. (JU ZSF České Budějovice).

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

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

V Českých Budějovicích, dne 6. 1. 2009

.....  
Tomáš Skalický

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěl poděkovat mému školiteli, RNDr. Slavomíru Rakouskému, CSc. za jeho podporu, cenné rady, pomoc při řešení této práce a hlavně za jeho nesmírnou trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat kolegům z laboratoře, jmenovitě Martině Beranové, Františkovi Bezunkovi a Vaškovi Kútovi, za jejich pomoc, rady a vytvoření příjemného prostředí pro práci. Obrovské poděkování patří Renatě Kubíčkové za její vyčerpávající podporu a trpělivost a mým rodičům za to, že mě v mém studiu vždy podporovali.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
1.1	ÚVOD DO PROBLEMATIKY TRANSGENÓZE LNU	1
1.2	CÍLE PRÁCE	1
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>2</b>
2.1	LEN SETÝ	2
2.2	TRANSFORMACE ROSTLINNÝCH BUNĚK BAKTERIEMI RODU <i>AGROBACTERIUM</i>	3
2.2.1	<i>Charakteristika Agrobacterium tumefaciens</i>	3
2.2.2	<i>Ti-plazmid Agrobacterium tumefaciens</i>	4
2.2.3	<i>Vektory pro transformaci bakteriemi Agrobacterium</i>	4
2.2.4	<i>Typy transgenů</i>	5
2.2.4.1	<i>Selektovatelné transgeny</i>	5
2.2.4.2	<i>Reportérové transgeny</i>	6
2.3	TRANSGEN PRO ZELENĚ FLUORESKUJÍCÍ PROTEIN (GFP)	6
2.3.1	<i>Struktura GFP</i>	7
2.3.2	<i>Metody detekce GFP</i>	8
2.3.3	<i>Možnosti použití GFP</i>	9
2.4	ULTRAZVUKOVÁ SONIKACE	9
2.4.1	<i>Ultrazvuk</i>	9
2.4.2	<i>Sonikace</i>	11
2.4.3	<i>Aparatura na sonikaci</i>	12
2.4.4	<i>Využití sonikace při transformaci</i>	13
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>14</b>
3.1	MATERIÁL	14
3.1.1	<i>Fúzní konstrukt SPI2:GFP</i>	14
3.2	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ	15
3.3	METODIKY POKUSŮ	16
3.3.1	<i>Optimalizace sterilizace semen lnu</i>	16
3.3.1.1	<i>Výběr semen</i>	17
3.3.1.2	<i>Povrchová sterilizace semen</i>	17
3.3.1.3	<i>Výsev semen</i>	18
3.3.2	<i>Testy rezistence hypokotylů a děložních lístků lnu ke kanamycinu</i>	18
3.3.2.1	<i>Metodika a provedení testů na rezistence</i>	19
3.3.3	<i>Vliv ultrazvukové sonikace na transformaci lnu prováděnou kokultivací s bakteriemi rodu Agrobacterium</i>	20
3.3.3.1	<i>Sterilizace semen</i>	20
3.3.3.2	<i>Výsev semen</i>	21
3.3.3.3	<i>Sonikace</i>	21
3.3.3.4	<i>Příprava bakteriální kultury</i>	22
3.3.3.5	<i>Kokultivace explantátů a bakterií</i>	23
3.3.3.6	<i>Kokultivace na agarovém C médiu</i>	24
3.3.3.7	<i>Debakterizace a kalogeneze</i>	24
3.3.3.8	<i>Selekce transformantů, indukce organogeneze a klonování regenerantů</i>	25
3.4	VIZUÁLNÍ DETEKCE TRANSFORMACE (GFP DETEKCE)	25
3.5	MOLEKULÁRNÍ DETEKCE TRANSFORMACE	26
3.5.1	<i>Izolace DNA</i>	26
3.5.2	<i>PCR (polymerázová řetězová reakce)</i>	27
3.5.3	<i>Použité primery</i>	28

3.5.4	Elektroforéza .....	29
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>29</b>
4.1	OPTIMALIZACE STERILIZACE LNU.....	29
4.2	TESTY REZISTENCE HYPOKOTYLŮ A DĚLOŽNÍCH LÍSTKŮ LNU KE KANAMYCINU .	32
4.3	VLIV ULTRAZVUKOVÉ SONIKACE NA TRANSFORMACI LNU PROVÁDĚNOU KOKULTIVACÍ S BAKTERIEMI RODU <i>AGROBACTERIUM</i> .....	34
4.3.1	<i>Sonikace</i> .....	34
4.3.2	<i>Kalogeneze a vizuální detekce GFP</i> .....	37
4.3.3	<i>Molekulární detekce</i> .....	38
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>50</b>
8.1	PŘÍLOHA Č. 1 – AMINOKYSELINOVÁ SEKVENCE GFP .....	50
8.2	PŘÍLOHA Č. 2 – MAPA FÚZNÍHO GENU <i>SPI2:GFP</i> .....	51
8.3	PŘÍLOHA Č. 3 – SEKVENCE NUKLEOTIDŮ GENOVÉ FÚZE <i>SPI:GFP</i> .....	52
8.4	PŘÍLOHA Č. 4 – POUŽITÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	53
8.5	PŘÍLOHA Č. 5 – SUMARIZACE MNOŽSTVÍ OPRACOVANÝCH EXPLANTÁTŮ V SONIKAČNÍCH POKUSECH .....	56
8.6	PŘÍLOHA Č. 6 – POROVNÁNÍ KLÍČIVOSTI SEMEN A MÍRY POŠKOZENÍ U ROSTLINEK PŘI RŮZNÝCH ZPŮSOBECH POVRCHOVÉ STERILIZACE SEMEN LNU .....	57
8.7	PŘÍLOHA Č. 7 – POROVNÁNÍ REGENERACE PUPENŮ A VÝHONŮ Z HYPOKOTYLOVÝCH EXPLANTÁTŮ LNU PĚSTOVANÝCH <i>IN VITRO</i> PŘI RŮZNÝCH DÁVKÁCH ANTIBIOTIKA KANAMYCINU .....	59
8.8	PŘÍLOHA Č. 8 – OBRÁZKY ZE SEM A UKÁZKA Vlivu SONIKACE NA OBJEM EXPLANTÁTŮ.....	60
8.9	PŘÍLOHA Č. 9 – SROVNÁNÍ PŘEŽÍVÁNÍ EXPLANTÁTŮ LNU <i>IN VITRO</i> PO OŠETŘENÍ ULTRAZVUKEM.....	61
8.10	PŘÍLOHA Č. 10 – VIZUÁLNĚ GFP POZITIVNÍ EXPLANTÁTY .....	62
8.11	PŘÍLOHA Č. 11 – VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ POZOROVÁNÍ GFP POZITIVNÍCH EXPLANTÁTŮ LNU NA ZÁKLADĚ JEJICH FLUORESCENCE V ZÁVISLOSTI NA POUŽITÉ METODĚ APLIKACE ULTRAZVUKU KE ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI TRANSFORMACE.....	64
8.12	PŘÍLOHA Č. 12 – POROVNÁNÍ ÚČINNOSTI TRANSFORMAČNÍCH A REGENERAČNÍCH TECHNIK NA ZÁKLADĚ NÁSLEDNÝCH PCR ANALÝZ ROSTLINNÝCH REGENERANTŮ .....	65
8.13	PŘÍLOHA Č. 13 – VÝSLEDKY MOLEKULÁRNÍ DETEKCE FÚZNÍHO TRANSGENU <i>SPI2:GFP</i> V ROSTLINÁCH LNU A VIZUALIZACE POUŽITÉHO STANDARTU MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI.....	66

# 1 Úvod

## 1.1 Úvod do problematiky transgenóze lnu

## 1.2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo dále zdokonalovat metodiku transformačního procesu u lnu setého, jehož účinnost je odvislá od řady faktorů. Práce je obsahově členěna do tří tématických okruhů.

### I. tématický okruh – optimalizace sterilizace semen lnu

Cíl: Optimalizovat proces sterilizace semen lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) za použití různých kombinací sterilizačních činidel.

### II. tématický okruh – testy rezistence hypokotylových segmentů a děložních lístků lnu ke kanamycinu.

Cíl: Stanovit optimální koncentraci antibiotika kanamycinu v agarových médiích a dosáhnout tak vhodných selekčních podmínek pro transformované explantáty.

### III. tématický okruh – vliv ultrazvukové sonikace na transformaci lnu prováděnou kokultivací s bakteriemi rodu *Agrobacterium*

Cíl: Ověřit využitelnost metody ultrazvukové sonikace k ovlivnění transformace zprostředkované bakteriemi rodu *Agrobacterium tumefaciens* u vybraných odrůd lnu setého (*L. usitatissimum*).

## 2 Literární přehled

### 2.1 Len setý

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) je dvouděložná bylina, patřící do řádu kakostokvětých (*Geraniales*), čeledi Inovitých (*Linaceae*). Zástupci této čeledi jsou především tropické rostliny, omezený počet zástupců se vyskytuje i v mírném pásmu. Len setý je jednoletá rostlina dorůstající výšky až jeden metr, s přímými, hustě listnatými lodyhami. Listy jsou čárkovitě kopinaté, špičaté a celokrajné s délkou 2–3 cm a šířkou 3–4 mm. Květ lnu je oboupohlavný, pětičetný, složený z květních obalů tvořených pěti lístky kališními a pěti lístky korunními. Barva květů se pohybuje od bílé, přes růžovou a modrou až po fialovou. Plod lnu je pětipouzdrá tobolka obsahující až deset hnědých, porcelánově lesklých semen. Jde o technickou plodinu, která byla pěstována již v Mezopotámii, a to především pro olejnatá semena, později i pro jemná, dlouhá vlákna (Štaud a kol., 1997).

Len dělíme do tří skupin, a to na len přadný, len olejný a len olejnopřadný. Jemná, dlouhá vlákna ze stonku se využívají v textilním průmyslu, olej získaný ze semen má široké použití v potravinářském průmyslu a farmakologii a to díky vysokému obsahu kyseliny  $\gamma$ -linoleové (převzato z Kobelková, 2002). V dnešní době se při šlechtění lnu, vedle klasických hybridizačních metod, začínají využívat metody cíleného přenosu genu (transgenóze), zejména pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. První úspěšná transformace po infekci pletiv bakteriemi byla provedena v roce 1983 (přehled Rakouský a Tejklová, 1999). Tyto pokusy vedly ke zjištění nízké účinnosti transformace u lnu setého. Z počátku byly přenášeny celé úseky T-DNA, později už jen hospodářsky významné geny. Doposud byla uvolněna do oběhu pouze jediná transgenní odrůda lnu (cv. CDC Triffid), vyznačující se zvýšenou tolerancí k reziduům herbicidů typu sulfonylmočoviny v půdě (McHughen et al., 1997).

## 2.2 Transformace rostlinných buněk bakteriemi rodu *Agrobacterium*

### 2.2.1 Charakteristika *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* je gramnegativní bakterie, která infikuje dvouděložné rostliny a je schopna indukce morfogenetických změn (tvorba nádoru) v rostlinných pletivech. Tato bakterie je schopna přenosu řady genů, z nichž nejdůležitější jsou geny pro produkci rostlinných hormonů, které vedou ke vzniku nádoru. Mezi další přenášené geny patří i geny pro produkci zvláštního typu aminokyselin, tzv. opinů. Opiny jsou významným zdrojem uhlíku, dusíku a energie pro bakteriální metabolismus. Rod *Agrobacterium* společně s rody *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas* a *Corynebacterium* patří do čeledě *Rhizobiaceae*. Bakterie rodů *Rhizobium*, *Azorhizobium* a *Bradyrhizobium* se přeměněné v tzv. bakteroidy stávají trvalými složkami pletiv kořenových hlízek některých rostlin. Bakterie rodu *Pseudomonas* a *Corynebacterium* způsobují morfogenetické změny jen tak dlouho, dokud jsou bakterie přítomny v pletivech. Pouze u rodu *Agrobacterium* bylo prokázáno, že vnáší některé své specifické geny do rostlinného genomu a transformovaná pletiva následně rostou jako nediferencované nádory (Ondřej a Drobník, 2002).

Pro *Agrobacterium* hraje velmi důležitou roli při vyhledání rostlinných buněk chemotaxe. Poraněné rostlinné pletivo produkuje fenolické látky typu acetosyringonu, na jejichž rozpoznávání má na svém povrchu bakteriální buňka receptory. Zároveň přítomnost těchto látek aktivuje přenos bakteriální DNA do rostlinných buněk (Hiei et al., 1992). Prvním krokem předcházejícím přenosu bakteriální DNA je navázání buněk *A. tumefaciens* na rostlinné buňky. Tyto specifické receptory, zodpovědné za interakci, jsou pravděpodobně proteiny podobné živočišným vitronektinům. Geny pro tyto proteiny jsou lokalizovány na bakteriálním chromozomu. Prvotní volné spojení bakteriální a rostlinné buňky je zpevněno celulózními fibrilami vytvářenými bakterií (Gheysen et al., 1998).



### **2.2.2 Ti-plazmid *Agrobacterium tumefaciens***

Bakterie rodu *Agrobacterium* vnáší cizorodé geny, lokalizované v plazmidu Ti (tumor-inducing), případně Ri (root-inducing), jež způsobují indukci trvalých morfogenetických změn. Ti a Ri plazmidy nesou konstantní část, tzv. T-DNA (transferred DNA). Ti plazmid má velikost 150-200 kb a T-DNA má velikost 15-45 kb, v závislosti na kmenu bakterie. Rozeznáváme dva typy Ti plazmidů a to typ oktopinový a nopalínový. T-DNA nopalínového typu je kompaktní, zatímco T-DNA oktopinového typu je rozdělena na dva úseky – levý (T<sub>L</sub>) a pravý (T<sub>R</sub>) – a mezi nimi je úsek neobsahující žádné geny účastnící se přenosu DNA. Ti plazmid má dva úseky nepostradatelné k indukci nádorů:

- T-DNA, vstupující do rostlinných buněk, ale sama nemá žádné geny pro vlastní integraci.
- Úsek virulence (vir-region), obsahující geny nutné pro přenos T-DNA do rostlinných buněk a jejich integraci v rostlinném genomu.

T-DNA vnáší do rostlinného genomu dva druhy genů. Geny pro syntézu opinů a geny pro nové cesty biosyntézy rostlinných hormonů, auxinů a cytokininů, sloužících k maximalizaci produkce již zmiňovaných opinů (Ondřej *et al.*, 1999).

### **2.2.3 Vektory pro transformaci bakteriemi *Agrobacterium***

Pokud chceme využít bakterie *Agrobacterium* jako vektorů při přenosu genů, je nejprve třeba T-DNA předem upravit. Musíme odstranit původní geny při zachování hraničních sekvencí, mezi něž se budou vkládat nové, námi požadované geny. Základem je využití restričních štěpení a ligace. V dnešní době se pro transformace hlavně používá systém binárních vektorů. Tato metoda spočívá v umělém rozdělení původního Ti plazmidu na dva plazmidy: první plazmid neobsahuje úsek T-DNA, ale obsahuje úsek virulence. Druhý plazmid obsahuje T-DNA nesenou jiným typem plazmidu (Ondřej *et al.*, 1999).

## 2.2.4 Typy transgenů

Do rostlinného genomu se procesem transgenóze nejčastěji začleňují především cizí geny, jež po expresi dodávají rostlině nějaké pozitivní vlastnosti. Nejčastěji se jedná o zvýšení odolnosti rostlin k nepříznivým podmínkám okolí nebo odolnosti k herbicidům. Díky těmto genetickým úpravám lze pěstovat rostliny například v zamořených půdách, nebo používat totální herbicidy, které by za normálních okolností veškeré rostliny včetně samotné plodiny zahubily. Tyto metody tedy umožňují ulehčit životnímu prostředí snížením jeho celkové zátěže a zároveň ušetřit náklady spojené s používáním několika herbicidů specifických na určité druhy plevelů. Velké množství těchto výhodných genů je získáváno z rezistentních bakterií, nebo dalších vhodných organismů. Proto je nutné, aby přenášené transgeny byly opatřeny rostlinnými regulačními sekvencemi, tzv. promotorem (zaváděcí sekvencí) a terminátorem (terminační sekvencí). Transgeny vzniklé kombinací úseků DNA pocházejících z různých druhů se nazývají chimérické transgeny. Protože není možno zajistit transformaci všech buněk v pletivu vystaveném působení bakterií rodu *Agrobacterium*, je nutné zajistit rozlišení transformovaných a netransformovaných buněk. K tomuto účelu se využívají transgeny selektovací (selektovatelné) a reportérové (signální).

### 2.2.4.1 Selektovatelné transgeny

Selektovatelné transgeny jsou obvykle transgeny pro rezistenci k nějaké toxické látce, nebo jinak zvýhodňující geny, umožňující přežití a dělení transgenních buněk na médiu obsahujícím toxickou látku, či neobsahujícím důležité živiny. K využití se nabízí několik různých selekčních systémů. Zřejmě nejběžněji používaný je transgen pro rezistenci k antibiotiku kanamycinu (*nptII*), který kóduje enzym neomycinfosfotransferázu II. Tento enzym v transformovaných rostlinných buňkách inaktivuje daný typ antibiotik. Následné použití kanamycinu jako selekčního činidla je velice jednoduché. Stačí ho přidat do živné půdy, na které budou rostlinné explantáty pěstovány. Tímto způsobem lze využít i transgen pro rezistenci k hygromycinu, kódujícím gen pro hygromycinfosfotransferázu. Hygromycin je antibiotikum blokující proteosyntézu u prokaryot i eukaryot a je silně toxický i pro člověka (Ondřej a Drobník, 2002). Nevýhodou těchto selekčních systémů je uvolňování toxických látek do okolí

umírajícími buňkami, což působí inhibičně na regeneraci transformovaných rostlinných pletiv (Penna *et al.*, 2002). V současnosti je proto využívána i řada jiných selekčních systémů (Miki a McHugh, 2004).

#### 2.2.4.2 Reportérové transgeny

Reportérové (signální) transgeny jsou transgeny, jejichž expresi lze jednoduše vizuálně detekovat a kvantitativně stanovovat. Jedná se vždy o chimérické transgeny s rostlinnou regulační sekvencí.

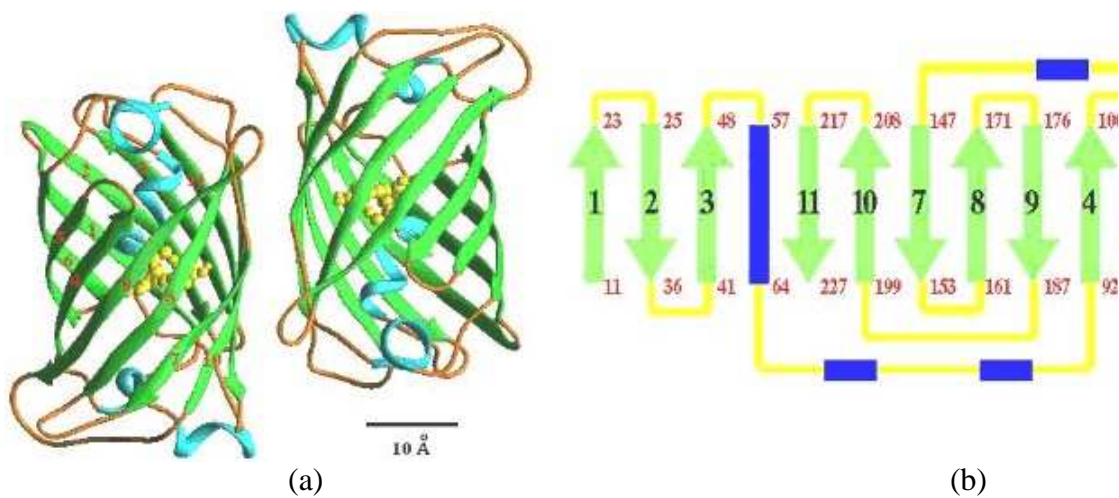
V současnosti se využívá několika signálních genů. Historicky první byl bakteriální gen pro chloramfenikolacetyltransferázu, způsobující acetylaci chloramfenikolu. Tato metoda je založena na podání chloramfenikolu značeného izotopem  $^{14}\text{C}$  a jeho autoradiografické detekci po acetylaci. Tento systém se pro svoji náročnost v současnosti již nepoužívá. Hojně používaný je transgen pro  $\beta$ -glukuronidázu (GUS), což je gen *gusA* (*uidA*) z bakterie *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Tento gen kóduje enzym  $\beta$ -glukuronidázu, což je kyselá hydroláza měnící substráty na bázi glukuronidů na modře zbarvené či fluoreskující látky. Nevýhodou u tohoto systému je určitá nespecifická aktivita některých rostlinných pletiv. V dnešní době je patrně nejvyužívanější a zřejmě nejperspektivnější transgen pro zeleně fluoreskující protein.

### 2.3 Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)

Gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP – green fluorescent protein) byl spolu s proteinem aequorinem získán z medúzy *Aequoria victoria*, vyskytující se v oblastech severovýchodního Pacifiku (Prasher *et al.*, 1992). Protein aequorin za přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$  vydává modré světlo (440-480 nm) a protein GFP ho přeměňuje na světlo zelené. GFP má schopnost emitovat zelené světlo i při ozáření UV zářením (360–400 nm) a zachovává si fluorescenci i po fúzi s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i N- konci. Dalšími příznivými vlastnostmi jsou i stabilita v rozsáhlém rozmezí hodnot pH, termostabilita (do 65 °C) a netoxičita. Je to zatím jediný protein, který funguje bez dodání kofaktorů nebo substrátů (Ondřej a Drobník, 2002, Hraška *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Struktura GFP

Nemodifikovaný GFP, tzv. „wild-type“ GFP, je protein o molekulové hmotnosti 27 kDa a skládá se z 238 aminokyselin (viz příloha č. 1). Samotná molekulární struktura je dimer složený ze dvou protomerů, vytvářející strukturu připomínající sud, tzv. beta-barrel. Tento speciální tvar má zásadní vliv na excitační spektra GFP. Průměr struktury je zhruba 30 Å, délka je 40 Å a tvoří ji 11 β-vláken utvářejících stěny a centrální šroubovici α-helix, jež obsahuje vlastní fluorescenční centrum. Části α-helixu vytváří strukturu čepičky a zároveň ukončují strukturu „sudu“ (viz obr.1).



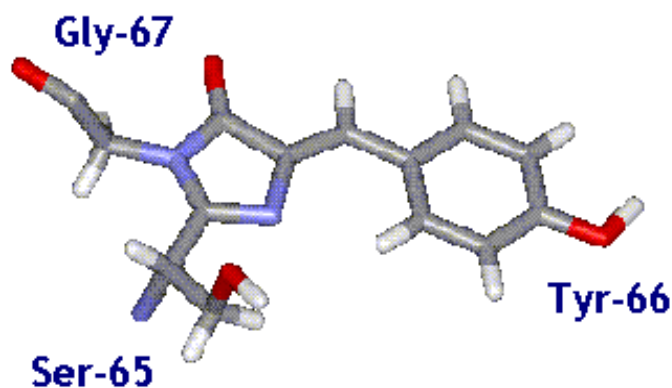
**Obr. 1.** Modely struktury proteinu GFP

a) Trojrozměrné zobrazení proteinu GFP - beta barrel s chromoforem uprostřed.

b) Topologický diagram GFP. Beta vlákna znázorněny zeleně, alfa-helixy modře a spojovací smyčky žlutě.

(převzato z <http://www.bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/gfpbio.html> )

Tato struktura zajišťuje vysokou stabilitu a odolnost k denaturaci, vyžadující působení 6M guanidinhydrochloridu při 90 °C nebo pH mimo rozsah hodnot 4–12. Částečná či téměř úplná renaturace nastává během několika minut po navození příhodných podmínek (Yang *et al.*, 1996). Základem struktury fluoroforu je sekvence Ser65-Tyr66-Gly67, která je posttranslačně modifikována na 4-(*p*-hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on (viz obr. č. 2) (Cody *et al.*, 1993). Studium exprese rekombinantního GFP v *E. coli* bylo zjištěno, že celý mechanismus tvorby GFP je zahájen rychlou cyklizací mezi Ser65 a Gly67, za tvorby imidazolin-5-onu. Následuje mnohem pomalejší (v řádu hodin) oxidace postranního řetězce Tyr66 pomocí O<sub>2</sub> (Heim *et al.*, 1994).



**Obr. 2.** Model struktury tripeptidu Ser65-Tyr66-Gly67 fluorescenčního centra GFP (převzato z Hraška, 2003).

Zeleně fluoreskující protein z mořské medúzy *Aequoria victoria* tzv. wtGFP (wild-type GFP) má dva excitační vrcholy. Hlavní excitační maximum je na vlnové délce 395 nm (UV oblast) a vedlejší na 475 nm (modrá oblast). Emisní maximum se nachází na 509 nm (zelená oblast). Tyto hodnoty emisních spekter ovšem nevyhovují používaným optickým filtrům, takže bylo nutné upravit emisní spektra GFP. Byly vytvořeny různé mutace GFP, pozměňující fluorofor a ovlivňující excitační i emisní spektra, které již umožňují pohodlné pozorování pomocí standardních optických filtrů. Dnes známí mutanti GFP mohou být rozděleni do sedmi tříd, lišících se různými komponentami v chromoforu. Třídy 1-4 jsou odvozeny z polypeptidů s tyrosinem na pozici 66, zatímco třídy 5-7 mají na této pozici Trp, His nebo Phe (citováno z Kůta, 2007).

### 2.3.2 Metody detekce GFP

Nejjednodušší metodou detekce je vizuální pozorování. K jeho provedení stačí pouze excitační zdroj světla s vlnovou délkou 395 nm z běžného zdroje, nebo 480 nm z xenonové výbojky a hraniční filtr nebo monochromátor. Pro vizuální detekci GFP fluorescence postačuje UV lampa nebo zdroj modrého světla. Při použití UV lampy je z důvodu zdravotních rizik nutné použít ochranné filtry blokující toto záření. Při použití modrého světla je dobré použít žlutých nebo oranžových ochranných filtrů. Ke sledování postačí klasické mikroskopy nebo binolupy (binokulární lupy) (Elliot et al., 1999). Pro detailnější pozorování je ale již nutné použít například konfokální mikroskopy. Další možností je využití digitálního zobrazení a digitální analýzy obrazu za pomoci počítače a speciálního softwaru (Hraška, 2003). Díky této metodě lze

dosáhnout mnohem citlivějších a přesnějších výsledků než při pozorování pouhým okem. Navíc je možné intenzitu emitovaného světla kvantifikovat a tak usuzovat na případnou úroveň exprese transgenů, s nímž je gen pro GFP v těsné vazbě nebo fúzován (Hraška et al., 2005, 2006).

### **2.3.3 Možnosti použití GFP**

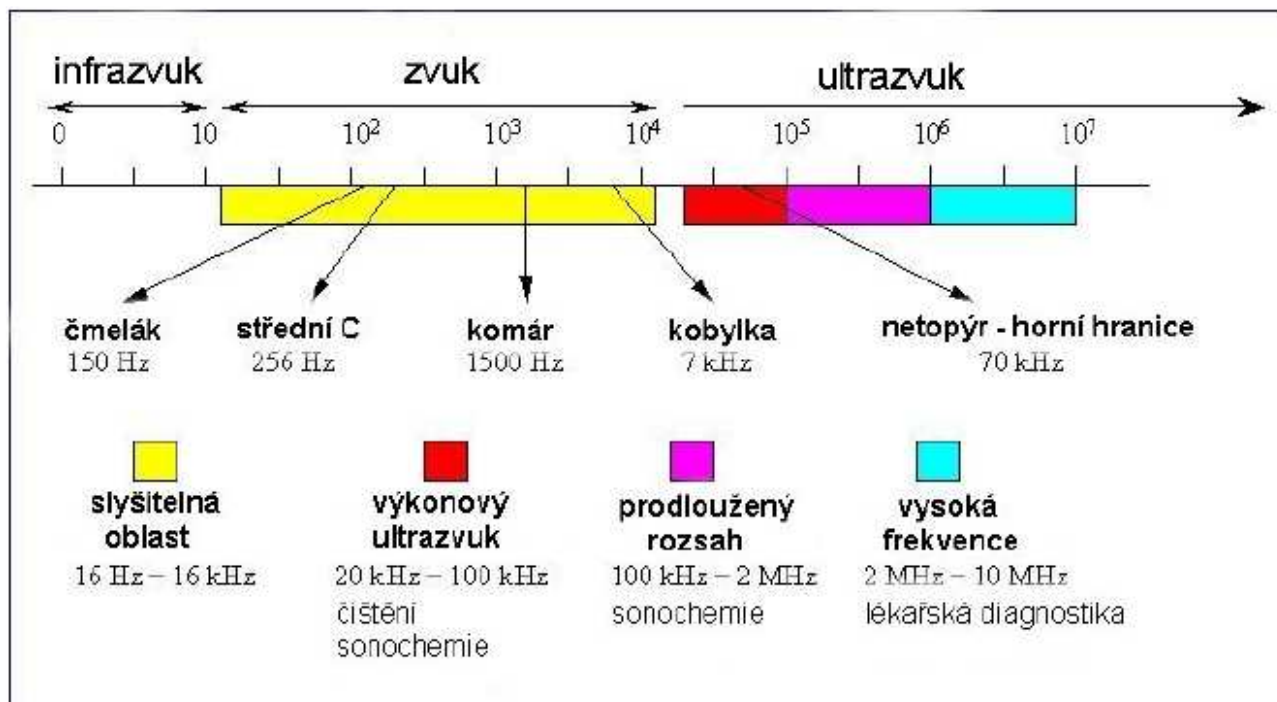
Díky tomu, že detekce a exprese GFP je nedestruktivní, může být fluorescence pozorována v živých buňkách. Recentní studie navíc ukazují, že GFP není nebezpečný i pro vyšší organismy ani fyto toxický (Richards et al., 2003). Z těchto důvodů se začaly konstrukty s tímto markerovým genem hojně využívat. Možnosti aplikace GFP se stále rozšiřují a v dnešní době se používá při výzkumu bakterií, kvasinek, členovců, rostlin, ryb, savců a dokonce i u lidských buněk (převzato z Hraška, 2003). Díky možnosti fúzovat GFP s různými proteiny lze například lokalizovat v buňkách proteiny nebo orgány nebo pozorovat aktivitu a pohyby mitotického aparátu či cytoskeletu v reálném čase, s možností pořízení fotodokumentace. Hlavní využití GFP je při sledování exprese určitého genu. Fúzí tohoto genu s genem pro GFP a zajištěním exprese jediným promotorem lze jednoduše pomocí fluorescence pozorovat úroveň a místo exprese. Funkčnost GFP i po sfúzování je zcela zásadní vlastnost a často lze takto nahradit ostatní metody využívající produkty signálních genů jako je  $\beta$ -glukuronidáza nebo luciferáza (Hraška et al., 2006).

## **2.4 Ultrazvuková sonikace**

### **2.4.1 Ultrazvuk**

Ultrazvuk je mechanické vlnění s kmitočtem vyšším než 20 kHz (viz obr. 3). Což je oblast pro lidské ucho neslyšitelná, protože lidské ucho je schopno vnímat zvuky přibližně od 16 Hz do 18 kHz (liší se člověk od člověka). Ultrazvuk se začal používat již na začátku 20. století a to k mapování dna moří. V dnešní době je jeho využití velmi rozsáhlé. Od zjišťování skrytých vad materiálu (zjišťování mikrotrhlin), čištění vzduchu (odstranění exhalací), sterilizaci vody, mléka a jiných roztoků, promíchání galvanické lázně a čištění předmětů, až po využití v lékařské diagnostice, chemii a biologii. Rozlišujeme dva druhy ultrazvuku tzv. pasivní ultrazvuk a aktivní ultrazvuk. U

pasivního ultrazvuku mají kmity nízkou intenzitu a nedochází k fyzikálním nebo chemickým změnám v prostředí, kterým prochází. U aktivního ultrazvuku je intenzita kmitů vysoká, čehož se využívá třeba při čištění materiálů, nebo k iniciaci chemických reakcí (Reichlová, 2006).



Obr. 3. Zvukové spektrum (převzato z Reichlová, 2006)

## 2.4.2 Sonikace

Sonikace je metoda založená na použití aktivní ultrazvukové energie. Tato metoda je využívána k různým účelům kde je třeba urychlit rozpouštění, rozrušovat povrchy, inaktivovat látky, rozrušit intramolekulární vazby, odvzdušnit kapaliny nebo urychlit některé chemické reakce. Při použití sonikace musí být přítomna kapalina s vhodnými fyzikálními vlastnostmi. V laboratořích se používají tzv. ultrazvukové lázně nebo ultrazvukové sondy tzv. sonikátory (viz obr. 4). Ultrazvuková sonda je vlastně vlnodod, který je ponořen do kapaliny a slouží k přenosu zvukové vlny. Při sonikaci periodicky se opakující tlakové vlny prochází kapalinou, v níž dochází k lokálnímu poklesu a zvýšení tlaku. V biologii se sonikace často využívá k rozrušení nebo deaktivaci biologického materiálu, např. k rozrušení buněčných stěn.

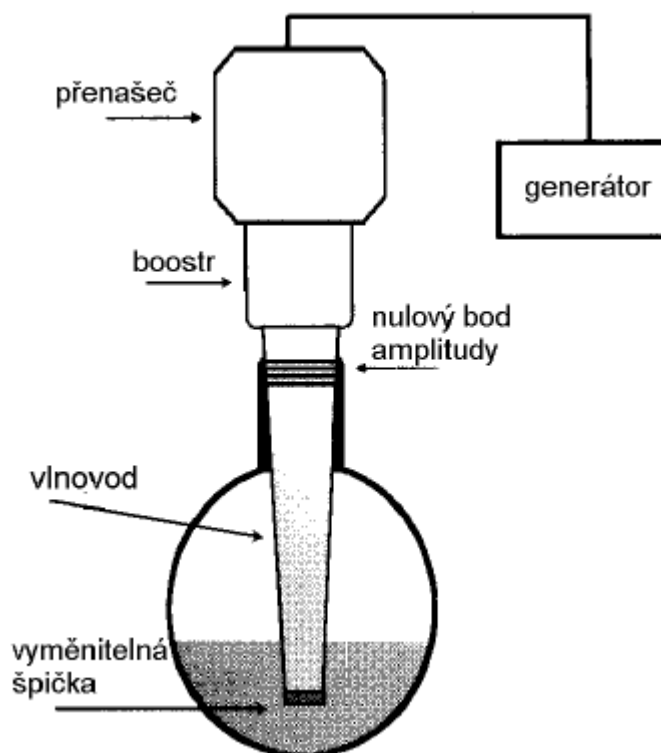


**Obr. 4.** Příklady sonikačních zařízení  
a) sonikační lázeň typ Sonorex RK52 (Bandelin, Německo)  
b) sondový sonikátor typ UP50H (Dr. Hielscher, Německo)



### 2.4.3 Aparatura na sonikaci

Základními částmi aparatury na provádění sonikace (obr. 5) jsou generátor ultrazvuku, přenašeč, booster (zesilovač) a vlnovod. Zdrojem elektrického napětí o frekvenci 30 kHz je elektrický generátor s obvyklým výkonem 50 W. Z generátoru se přivádí elektrické napětí na přenašeč, kde se elektrická energie mění na mechanickou. Přeměna je založena na piezoelektrickém jevu, kdy se na křemenný krystal přivede střídavé elektrické napětí, způsobující posunutí iontů v krystalové mřížce, jenž reverzibilně deformuje krystal. Tím se převádí elektrická energie na mechanické kmity. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Piezoelectricity>). Z přenašeče prochází mechanické kmity do boosteru, což je místo největší výchylky. Poté kmity prochází nulovým bodem amplitudy (v tomto místě se upevňuje oddělitelný vlnovod) do oddělitelného vlnovodu, jenž vede kmity do místa aplikace. Na hrotu tohoto vlnovodu mají kmity opět maximální amplitudu (Reichlová, 2006).



**Obr. 5.** Schéma sonikační aparatury  
(převzato z Reichlová, 2006)

#### 2.4.4 Využití sonikace při transformaci

Při transformaci využívající bakterií rodu *Agrobacterium* je velkou nevýhodou druhová specifická bakterie na některé rostlinné druhy (Holford et al., 1992; Fullner et al., 1996). Vinou tohoto bylo u některých druhů, včetně lnu (*Linum usitatissimum* L.), dosaženo transformačními metodami pouze omezenému pokroku, vedoucímu většinou pouze k malé frekvenci transformace. První úspěšná transformace lnu pomocí vektoru na bázi *A. tumefaciens* byla provedena již v roce 1988 (Jordan a McHughen, 1988). Od té doby bylo provedeno mnoho pokusů o vylepšení metod transformace pro len (Dong a McHughen, 1993; Mlynářová et al., 1994; Rakouský et al., 1999). Bylo vyzkoušena řada různých postupů, včetně metod nastřelování cizí DNA do jader rostlinných buněk, tzv. particle gun (Wijayanto a McHughen, 1999). Žádná z těchto metod ovšem neposkytla uspokojivé výsledky, a proto se začaly hledat i neobvyklé metody. Jednou z těchto metod se stala i sonikace. Jejím využitím se podařilo zvýšit transientní expresi a stabilní transformaci několika obtížně transformovatelných rostlinných druhů jako je sója (Trick and Finer, 2000), trnovník akát (Zaragozá et al., 2004), nebo *Chenopodium rubrum* (Flores Solís et al., 2007). Těchto pozitivních výsledků bylo dosaženo buď přímým přenosem DNA do protoplastů za pomoci sonikace (Joersbo M., Brunstedt J., 1990), nebo pomocí metody SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation) (Trick a Finer, 1997).

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Materiál

Veškerý mnou používaný rostlinný materiál byl získán ze sterilně napěstovaných semenáčků lnu. K pokusům jsem využíval několik odrůd lnu. Konkrétně se jednalo o odrůdy (a linie) Bilstar (olejná forma, vyšlechtěná firmou Van de Bilt Zaden, Holandsko), Venica (přadná forma, vyšlechtěná firmou Agritec, s.r.o., Šumperk, ČR), Recital (olejná forma, Labout Semences, Airaines, Francie) a šlechtitelskou linii AGT 514/03 (vyšlechtěná a poskytnutá, stejně jako předchozí odrůdy, firmou Agritec, s.r.o., Šumperk, ČR). Odrůdy Bilstar a Venica jsem využíval pouze částečně, mnou hlavně používanými odrůdami byly Recital a linie AGT 514/03.

K transformaci byly použity bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (kmen EH105) nesoucí plazmidový fúzní konstrukt GFP:SPI2 (poskytnut dr. O. Navrátilem, ÚEB AV ČR, Praha). Tento konstrukt nese geny *nptII*, *SPI2* a *gfp*. Gen *nptII* kóduje neomycinfosfotransferázu, umožňující selekci transformantů na základě rezistence pro antibiotikum kanamycin. Geny *SPI2* (inhibitory proteáz serinového typu) a signální gen *gfp* jsou fúzovány a jejich exprese řízena jediným promotorem (Příloha 1–3).

#### 3.1.1 Fúzní konstrukt SPI2:GFP

Tento fúzní konstrukt byl vyvinut v laboratoři RNDr. Oldřicha Navrátila, CSc. (Ústav experimentální botaniky, v.v.i. Akademie věd České republiky, Praha) (viz příloha č. 3), na základě spolupráce a výzkumu prováděném na Entomologickém ústavu, v.v.i. AV ČR Biologického centra v Českých Budějovicích. Jednalo se o projekt výzkumu nových inhibitorů proteáz využitelných proti patogenům lidí a zvířat v ochraně rostlin (projekt IBS5007316, 2003–2005). Tento výzkum se týkal objevu neobvyklého, malého a velmi aktivního inhibitoru proteáz GmDP12, zjištěného v hedvábí zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Bylo zjištěno, že tento inhibitor proteáz serinového typu je vysoce aktivní především proti bakteriálním a houbovým proteázám (subtilisinu a proteinase K), a zároveň zůstává aktivní i po prodloužení karboxylového konce a glykozylní (Kludkiewicz et al., 2005). Tyto výhodné vlastnosti ho předurčily k využití

v transgenozí rostlin a navození vyšší odolnosti k houbovým chorobám a škůdcům. Kvůli snazší detekci exprese a selekci byl vytvořen konstrukt, kde je fúzován gen *gfp* a *SPI2* pod jediný promotor viru žilkovitosti květáku CaMV 35S a *nos* (nopalinsyntáza) terminátorem. Selektovatelný gen je *nptII* pod *nos* promotorem i terminátorem (viz příloha č. 2).

### 3.2 Příprava kultivačních médií

K pokusům jsem využíval několik druhů kultivačních médií. Pro kultivaci a namnožení vektorových bakterií jsem používal tuhé agarové LB médium a tekuté LK médium (Langley a Kado. 1972). Pro kalogenezi a kokultivaci bakterií s rostlinnými segmenty jsem připravoval agarové C médium, pro regeneraci výhonů z explantátů agarové R médium a pro klonování vzniklých výhonů agarové K médium, podle Tejklové (1992). Oproti původnímu autorčinu označení médií (LC, LR a LK) je v této práci užito pouze druhého písmene, aby nedocházelo k nesprávným výkladům, zejména možné záměně s médiem pro kultivaci bakterií LK.

LB médium (složení viz příloha č. 4) pro dlouhodobé množení bakterií a jejich uchovávání v růstové fázi jsem připravoval pouze v malém množství z důvodu malé spotřeby média. Do 250ml kádinky s trochou destilované vody jsem postupně přidával jednotlivé potřebné chemikálie. Po smíchání všech potřebných chemikálií jsem doplnil kádinku na plný objem, následně jsem změřil a upravil pH na 5,5, přelil obsah do Erlenmayerovy baňky a zklávoval při 121 °C po dobu 35 minut. Po zchladnutí média pod cca 50 °C jsem ve sterilním flow-boxu přilil předem autosterilizované antibiotikum kanamycin (rozpuštění atb. v 1 ml sterilní destilované vody) o koncentraci 50 mg·l<sup>-1</sup>. Médium jsem dostatečně promíchal a rozlil do Petriho misek (Ø8 cm).

Tekuté LK médium (složení viz příloha č. 4) pro množení bakterií jsem připravoval v 500 ml kádince s destilovanou vodou, kam jsem přidával chemikálie. Po přidání chemikálií jsem doplnil kádinku do plného obsahu a změřil a upravil pH na 6,5. Následně jsem médium vysterilizoval v autoklávovacím zařízení při 121 °C po dobu 35 minut. Po zklávování jsem médium rozlil po 20 ml do 100ml Erlenmayerových baněk. Erlenmayerovy baňky jsem uzavřel alobalovou fólií a uchovával v chladničce při 4 °C. Antibiotikum kanamycin pro selekci bakterií jsem vzhledem k jeho labilitě přidával až

těsně před naočkováním bakterií do média. Kanamycin (Kn) byl autosterilizován v 1 ml sterilní destilované vody po dobu jedné hodiny a následně byl naředěn sterilní destilovanou vodou na koncentraci 10 mg Kn/ 10 ml vody. Přičemž na každých 20 ml LK média připadl 1 ml tohoto zásobního roztoku.

Agarová C, R a K média (složení viz příloha č. 4) jsem připravoval v 1000ml kádince s destilovanou vodou, do které jsem postupně přidával složky příslušného média a rostlinné růstové látky. Následně jsem dolil destilovanou vodu do objemu kádinky, poté změril pH a pomocí 0,1 M KOH, případně HCl jsem ho upravil na hodnotu 5,5. Obsah kádinky jsem přelil minimálně do 3litrové Erlenmayerovy baňky (aby při varu nedošlo k vyvření obsahu ven z baňky), uzavřel ji dvojitou vrstvou hliníkové fólie a nechal sterilizovat při 121 °C po dobu 35 minut. Během klávkování médií jsem si připravil roztoky antibiotik (pokud se do média přidávaly). Tyto roztoky se připravovaly v malé kádince, zalitím antibiotik co nejmenším množstvím sterilní destilované vody, uzavřením hliníkovou fólií a umístěním na třepačku na dobu alespoň jedné hodiny. Tím se zajistila autosterilizace antibiotik. Po ukončení klávkování agarových médií jsem je zchladil přibližně na 50 °C, tento krok bylo nutné provést před přidáním antibiotik do médií, kvůli jejich termolabilitě. Po důkladném promíchání jsem hotová média rozlil do sterilních Petriho misek (Ø8 cm), nebo do plastických zkumavek se šroubovacím víčkem (K médium pro klonování výhonů).

Agarová C, R a K média jsou v podstatě modifikovaná MS média (Murashige a Skoog, 1962). Přehled složení jednotlivých médií je uveden v příloze č. 4.

### **3.3 Metodiky pokusů**

Metodiky pokusů jsou rozčleněny do tří samostatných částí, podle jednotlivých tématických okruhů.

#### **3.3.1 Optimalizace sterilizace semen lnu**

Z důvodu zavádění nových odrůd lnu do transformačních pokusů bylo nutno pro jednotlivé kultivary určit optimální podmínky pro sterilizaci semen tak, aby klíčící rostlinky byly napěstovány sterilně a na jejich osemení nezůstaly spóry plísní a další nežádoucí mikroorganismy. Jak totiž bylo zjištěno, semena sebraná z polních pokusů

jsou většinou silně promořena spórami plísní (Kůta, 2007) a je proto nutné vhodně stanovit metody povrchové sterilizace. Z toho vyplývá i specifické nakládání s veškerým materiálem. Je totiž nezbytné zajistit, aby se veškerá manipulace s rostlinným i bakteriálním materiálem prováděla v naprosto sterilním prostředí a tato manipulace byla prováděna sterilními nástroji. Sterilní prostředí lze zajistit manipulací v prostředí boxu s laminárním prouděním vzduchu (tzv. flow-boxu). Nástroje lze vysterilizovat např. ponořením do ethanolu a opálením nad plamenem kahanu nebo v autoklávu (při 121 °C na 35 min), veškeré pro práci používané nádoby je nutné vysterilizovat v autoklávu. Neméně důležité je, aby všechny nástroje a nádoby, jenž přišly do styku s vektorovými bakteriemi nebo transgenními explantáty, byly vysterilizovány a to nejlépe výše zmíněným opálením nad kahanem nebo v autoklávu. V této minoritní sekci se budu zabývat problematikou vlastní povrchové sterilizace semen lnu tak, aby se zbavila nežádoucích plísňových spór a dalších mikrobiálních zárodků, a zároveň nedošlo k poškození zárodku rostlin v semeni.

#### **3.3.1.1 Výběr semen**

Používaná semena odrůd Recital a linie AGT 514/03 byla poskytnuta firmou Agritec, s.r.o., Šumperk. Semena pocházela z polních pokusů firmy a na našem pracovišti byla trvale uskladněna v lednici při teplotě 4 °C. Samotný výběr semen je velice důležitý, protože je nutné semena ručně probrat a odstranit poškozená, nebo nápadně nekvalitní semena. Je také nutné odstranit semena plevelu a jiné organické zbytky, protože by na nich, nebo v nich přítomné spóry, mohly přežít proces sterilizace a kontaminovat celý výsev.

#### **3.3.1.2 Povrchová sterilizace semen**

Sterilizace byla prováděna několika různými postupy, aby se určil ten nejvhodnější pro dané odrůdy. Z jednotlivých odrůd jsem vybral zhruba 100 nepoškozených semen, které jsem rozdělil do tří sterilních 25ml kádinek pro každou odrůdu a uzavřel je hliníkovou fólií. Semena v jednotlivých kádinkách byla určena k jinému způsobu sterilizace a to následovně:

- varianta č. 1 – ethanol, Savo ředěné s vodou 1:7 a Jar jako smáčedlo
- varianta č. 2 – ethanol, Savo ředěné s vodou 1:5 a Jar jako smáčedlo
- varianta č. 3 – sterilium, Savo ředěné s vodou 1:5 a Jar jako smáčedlo

Postup byl následující. Semena v kádinkách byla proplachována po 5 minut 70% ethanolom nebo steriliem (desinfekční prostředek, výrobce BODE Chemie, GmbH, Německo). Následně byl ethanol nebo sterilium slit a nahrazeno savem (desinfekční prostředek Savo, výrobce Bochemie, Bohumín, ČR) ředěným vodou v poměru 1:5 nebo 1:7 (podle varianty). K tomuto roztoku sava byla přidána kapka jaru sloužícího jako smáčedlo, kádinky zakryty hliníkovou fólií a umístěny na třepačku, kde byly ponechány po dobu 60 minut. Po této době byl roztok odsát pipetou se sterilní špičkou a nahrazen sterilní destilovanou vodou, ve které byla semena ponechána za občasného promíchání po dobu 5 minut. Tento krok byl opakován alespoň 3× za účelem důkladného odstranění jaru a roztoku sava.

### 3.3.1.3 Výsev semen

Den před aseptickým výsevem semen jsem si vysterilizoval v autoklávu 36 ks (18 ks na odrůdu) 125 ml přesnídávkových lahviček s navlhčenou buničitou vatou (á 20 ml destilované vody) uzavřených speciálním umělohmotným víčkem s filtrem pro výměnu plynů. Do těchto vysterilizovaných lahviček jsem rovnoměrně přenesl semena, většinou po deseti až patnácti semenech na lahvičku. Prováděl jsem zároveň pokusy u obou použitých odrůd, každou rozdělenou na výše zmíněné tři varianty. Semena jsem poté nechal klíčit v kultivační místnosti při konstantní teplotě  $22\pm 2$  °C a 16hodinové fotoperiodě s zářivostí  $60-90 \mu\text{mol}(\text{PAR})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.3.2 Testy rezistence hypokotylů a děložních lístků lnu ke kanamycinu

Kromě stanovení optimální metody povrchové sterilizace semen, bylo třeba stanovit mezní hranici přežití netransformovaných explantátů lnu. To proto, abychom co nejvíce selektovali úspěšně transformované explantáty a netransformované nám zbytečně

nepřežívaly. Tímto způsobem jsme si mohli značně zredukovat množství vzorků, u kterých bylo nutné provést ověření úspěšné transformace. Tyto pokusy navazovaly na pokusy s optimalizací sterilizace.

### 3.3.2.1 Metodika a provedení testů na rezistenci

Jako výchozí materiál byla použita semena odrůd lnu Recital (sklizeň 2005) a linie AGT 514/03 (sklizeň 2004) poskytnutá firmou Agritec, s.r.o., Šumperk. Povrchová sterilizace semen byla prováděna proplachováním 70% ethanolem v kádince po dobu 5 minut, poté byl ethanol slit a nahrazen roztokem destilované vody a Savo v poměru 1:5 s přídavkem jaru jako smáčedla. Kádinky uzavřené alobalovou fólií byla umístěna na třepačku a za konstantního třepání ponechána po dobu 60 minut. Z každé odrůdy bylo vyseto cca. 75 ks semen do předem vysterilizovaných 125ml přesnídávkových skleniček (10–15 ks semen na skleničku), obsahujících buničitou vatu a 20 ml destilované vody. Skleničky se semeny, uzavřené speciálním umělohmotným víčkem s filtrem pro výměnu plynů, jsem poté nechal klíčit v kultivační místnosti, při konstantní teplotě  $22\pm 2$  °C a 16hodinové fotoperiodě s zářivostí  $60\text{--}90 \mu\text{mol}(\text{PAR})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , po dobu 7–10 dnů. Semena klíčila na světle bez zakrytí, protože při předpěstování ve tmě se výrazně snížila regenerační schopnost získaných explantátů o 70–90% (Kobelková, 2002). V době kdy semena klíčila, jsem si připravil 750 ml agarového C média pro kalogenezi (složení viz. příloha č. 4), rozčleněných do pěti variant (á 150 ml média). Všechny varianty, včetně kontrolní, obsahovaly antibiotika Timentin a Claforan v konstantní koncentraci (Timentin  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a Claforan  $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a selekční antibiotikum kanamycin s různými koncentracemi v každé variantě a to následovně:

varianta č. 1 – bez kanamycinu (kontrola)

varianta č. 2 –  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kanamycinu

varianta č. 3 –  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kanamycinu

varianta č. 4 –  $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kanamycinu

varianta č. 5 –  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kanamycinu



Všechna antibiotika byla před přidáním do média autosterilizována po dobu jedné hodiny v 1ml sterilní destilované vody.

Po sedmi až deseti dnech od vysetí byly klíčící rostlinky asepticky rozstříhány na hypokotylové segmenty o velikost cca. 8 mm a děložní lístky s odstraněným růstovým vrcholem. Tyto čerstvě získané explantáty byly přeneseny na Petriho misky s agarovým médiem. Petriho misky byly uzavřeny dvojitou vrstvou PE fólie, přeneseny do kultivační místnosti a ponechány v klidu při konstantní teplotě  $22\pm 2$  °C a 16hodinové fotoperiodě s zářivostí  $60\text{--}90 \mu\text{mol}(\text{PAR})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Po uplynutí doby 21 dnů bylo provedeno vyhodnocení a v každé variantě byly hodnoceno následující: celkový počet explantátů, regenerující explantáty, živé neregenerující explantáty a mrtvé explantáty. U regenerujících explantátů bylo hodnoceno množství vytvářených výhonů a pupenů. Množství výhonů a pupenů bylo hodnoceno pomocí binolupy zn. Technival (Zeiss, Německo).

### **3.3.3 Vliv ultrazvukové sonikace na transformaci lnu prováděnou kokultivací s bakteriemi rodu *Agrobacterium***

Vzhledem k tomu, že len je i přes různé snahy obtížně transformovatelná rostlina, bylo hlavním cílem mé práce vyzkoušet metody, které by mohly pozitivně ovlivnit míru transformace. Na základě výsledků výzkumů několika autorů, jimž se podařilo dosáhnout vyšší míry transformace za použití ultrazvukové sonikace i u obtížně transformovatelných druhů, jako sója (Trick and Finer, 2000), trnovník akát (Zaragozá et al., 2004), nebo *Chenopodium rubrum* (Flores Solís et al., 2007), jsme se rozhodli využít metody tzv. SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation) (Trick a Finer, 1997). Tato metoda spočívá v transformaci využívající bakterie *A. tumefaciens* podpořenou ultrazvukovou sonikací.

#### **3.3.3.1 Sterilizace semen**

K pokusům na transformaci za využití sonikace jsem používal odrůdy Recital (sklizeň 2005) a linie AGT 514/03 (sklizeň 2004). Od každé odrůdy jsem vybral cca 200 nepoškozených semen. Ty jsem postupně vysterilizoval promýváním v 70% ethanolu po

dobu pěti minut, následně byly zality roztokem sava a destilované vody v poměru 1:5 s přídatkem jaru jako smáčedla a ponechány na třepačce 60 minut. Poté jsem odsál roztok sava a semena jsem minimálně 3× promyl destilovanou vodou, abych odstranil sterilizační roztok.

### 3.3.3.2 Výsev semen

Před aseptickým výsevem jsem si v autoklávu (121 °C, 35 min) vysterilizoval 34 ks 125ml přesnádávkových skleniček, obsahujících buničitou vatu a 20 ml destilované vody a uzavřených speciálním umělohmotným víčkem s filtrem pro výměnu plynů. Do vysterilizovaných skleniček jsem umístil sterilní semena, většinou po deseti až patnácti kusech na skleničku. Do poloviny skleniček jsem umístil semena odrůdy Recital a do druhé poloviny semena linie AGT 514/03. Semena jsem nechal klíčit 7–10 dnů v kultivační místnosti při 22±2 °C a 16 hod. fotoperiodě.

### 3.3.3.3 Sonikace

Rostlinky staré 7–10 dnů jsem ve sterilním boxu nastříhal na hypokotylové části velké 8 mm a děložní lístky s odstraněným růstovým vrcholem. Děložní lístky jsem záměrně stříhal tak, aby vznikaly větší střížné plochy. Takto vzniklé rostlinné segmenty jsem umístil do plastových zkumavek (á 20 ml) se šroubovacím uzávěrem, obsahujících každá 10 ml 10mM roztoku MgSO<sub>4</sub>. Při stříhání rostlinek jsem musel postupovat rychle, aby nedošlo k zaschnutí střížných ploch. Rostlinné segmenty jsem umisťoval do zkumavek s roztokem po každé zpracované skleničce, tj. po zpracování 10–15 ks rostlinek. Pro následující sonikaci jsem používal dva druhy sonikátorů, a to sonikační lázeň model Sonorex RK52 (Bandelin, Německo) s celkovým výkonem 240 W a pracovní frekvencí 35 kHz a sondový sonikátor typ UP50H (Dr. Hielscher, Německo) s výkonem 50 W a pracovní frekvencí 30 kHz. Pro každý sonikátor jsem měl několik porovnávacích variant. Pro sonikační lázeň jsem používal delší doby sonikace, protože tento sonikátor obsahoval několik slabších zdrojů umístěných pode dnem vaničky na vzorky a sonikace probíhala se zkumavkami ponořenými ve vodě. Tento sonikátor neměl nastavitelný výkon, naproti tomu sondový sonikátor měl nastavitelnou amplitudu (20–100 %) i intervaly pulzů (0–100 %). Pro pokusy jsem používal 20% amplitudu

(výkon) a 80% intervaly pulzů, čímž jsem zajistil, aby segmenty rostlin nebyly vystaveny příliš velké dávce ultrazvuku. Díky tomu nedocházelo k lokálnímu přehřívání segmentů, což by mělo za následek jejich úmrtí. Při sonikaci zařízením Sonorex RK52 jsem naplnil vaničku sonikátoru destilovanou vodou, umístil do ní uzavřené zkumavky obsahující rostlinné segmenty a roztok  $MgSO_4$ . Poté následovalo spuštění přístroje a po době 50–150 sekund jsem zkumavky postupně vytahoval ze sonikační lázně. Práce se sondovým sonikátorem probíhala odlišně. Před započítím sonikace bylo nutné sondový nástavec pečlivě vysterilizovat ethanolem, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Po nastavení amplitudy a intervalu pulzů, jsem ponořil sondový nástavec do zkumavky pod hladinu roztoku  $MgSO_4$  obsahujícím segmenty rostlin a provedl vlastní aplikaci ultrazvuku. Použité varianty pro sonikaci byly následující:

1) Varianty pro sonikační lázeň model Sonorex RK52 (pro obě použité odrůdy stejné)

- a) K–50S; kontrola, sonikace po dobu 50 sekund, netransformováno
- b) 0S; bez sonikace, transformováno
- c) 50S; sonikace po dobu 50 sekund
- d) 100S; sonikace po dobu 100 sekund
- e) 150S; sonikace po dobu 150 sekund

2) Varianty pro sondový sonikátor typ UP50H, 20% amplituda a 80% intervaly pulzů

- a) K–10S; kontrola, sonikace po dobu 10 sekund, netransformováno
- b) 0S; bez sonikace, transformováno
- c) 5S; sonikace po dobu 5 sekund
- d) 10S; sonikace po dobu 10 sekund
- e) 15S; sonikace po dobu 15 sekund

#### 3.3.3.4 **P íprava bakteriální kultury**

Používané vektorové bakterie (*A. tumefaciens*, kmen EH105 s fúzním vektorem *SPI2:GFP*) byly uchovány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  v glycerinu, takto konzervované bakterie sloužily jako dlouhodobá zásobárna. Dva týdny před započítím pokusů jsem si připravil

do několika plastových Petriho misek ( $\varnothing$  8 cm) agarové LB médium určené pro namnožení bakterií. Na jednu Petriho misku jsem vysel bakterie odebrané ze zásoby uchovávané v glycerinu. Petriho misku jsem neprodyšně uzavřel PE fólií, nechal 2 dny při pokojové teplotě a následně uskladnil do chladničky při 4 °C. Tyto bakterie uchovávané v růstové fázi mi sloužily pro namnožení na transformační pokusy. Jeden den před transformací jsem si část bakterií přeočkoval z Petriho misek s LB médiem do dvou 100ml Erlenmayerových baněk, obsahujících každá 20 ml tekutého LK média (Langley a Kado, 1972) s přídávkem 1 ml roztoku antibiotika kanamycinu o koncentraci  $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bakterie jsem nechal růst do druhého dne do rána ve tmě na temperované třepačce při 28 °C. LK média s namnoženými bakteriemi jsem přelil do 10ml plastových zkumavek a nechal je centrifugovat 10 minut při 4000 otáčkách za minutu. Následně jsem slil supernatant a pelet důkladně resuspendoval přidáním 5ml 10mM roztoku  $\text{MgSO}_4$  do každé zkumavky. Obsahy zkumavek jsem následně slil do sterilní kádinky a odebral část do 1 cm kyvety z křemičitého skla. Pomocí spektrofotometru (model Boeco S-30, Boeckel + Co. GmbH, Německo) jsem si změřil optickou densitu při 600 nm s kalibrací na 10mM roztok  $\text{MgSO}_4$ .

### 3.3.3.5 Kokultivace explantátů a bakterií

Po provedení sonikace, přípravě bakteriální kultury a změření její optické denzity jsem přistoupil ke kokultivaci rostlinných segmentů a bakterií *A. tumefaciens*. Jako inkubační roztok jsem používal 10mM roztok  $\text{MgSO}_4$ . Bakteriální kulturu jsem přidával pomocí pipety se sterilní špičkou přímo do zkumavek obsahujících segmenty a 10ml 10mM roztoku  $\text{MgSO}_4$ . Aplikoval jsem takové množství bakteriální suspenze, aby po naředění s roztokem síranu hořečnatého ve zkumavce byla výsledná optická denzita  $\text{O.D.}_{600}$  0,4–0,5. Díky tomu, že bakteriální kultura byla připravována tak, aby v době pokusu byly bakterie v exponenciální fázi růstu (tudíž jejich optická denzita byla vysoká), stačilo do jednotlivých zkumavek napipetovat 2,5–3 ml bakteriální suspenze. Bakterie jsem samozřejmě nepřidával do kontrolní varianty, kterou jsem nechal po aplikaci ultrazvuku stát v uzavřené zkumavce. Poté jsem zkumavky uzavřel a mírně protřepal, aby do styku se suspenzí přišly všechny rostlinné segmenty. Uzavřené zkumavky jsem nechal 3 hodiny kokultivovat na rozptýleném světle ve flow-boxu při laboratorní teplotě.

### 3.3.3.6 Kokultivace na agarovém C médiu

Po uplynutí doby pro kokultivaci v roztoku, jsem pipetou se sterilní špičkou odsál roztok  $\text{MgSO}_4$  nebo bakteriální suspenzi a rostlinné segmenty umístil na sterilní filtrační papír, abych je osušil. Následně jsem hypokotyly i děložní lístky opatrně přenášel do plastových Petriho misek ( $\varnothing 6$  cm) s agarovým C médiem pro kokultivaci a kalogenezi (složení viz příloha č.4) bez antibiotik. Základem C média bylo MS médium podle Murashige a Skooga (1962). Misky jsem následně uzavřel dvojitou vrstvou PE fólie a nechal kokultivovat po dobu tří dnů za šera (misky jsem uzavřel do lepenkové krabice).

### 3.3.3.7 Debakterizace a kalogeneze

Po uplynutí tří dnů od započetí kokultivace jsem potenciaálně transformované, zdravé a živé (ne hnědé) hypokotyly a dělohy přenesl do kádinky, kde jsem je prvně promyl sterilní destilovanou vodou a následně roztokem anitibiotika Claforanu (nebo Augmentinu) o koncentraci 10 mg na 10 ml vody. Poté jsem explantáty osušil na sterilním filtračním papíře a přenesl je do Petriho misek s agarovým C médiem pro kalogenezi. V tomto médiu již ovšem byla přítomna antibiotika Timentin ( $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Claforan nebo Augmentin ( $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kanamycinu ( $125 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tato antibiotika zde byla přítomna pro eliminaci vektorových bakterií a selekci transformovaných explantátů. Zároveň toto médium obsahovalo rostlinné růstové látky pro indukci kalogeneze. Pro zhodnocení účinnosti některých růstových látek jsem u několika pokusů použil vedle běžného syntetického auxinu – kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové (NAA) i silnější auxin – kyselinu 2,4-dichlórfenoxyoctovou (2,4-D) a cytokinin 6-benzylaminopurin (BAP). Vytvořil jsem proto navíc ještě tři varianty pokusů a to následující:

Varianta č. 1 – C médium,  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BAP,  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  NAA

Varianta č. 2 – C médium,  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BAP,  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D

Varianta č. 3 – C médium,  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BAP,  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D

Explantáty jsem na C médiu ponechal po dobu dvou týdnů v kultivační místnosti při teplotě  $22(2 \text{ }^\circ\text{C})$  a 16hodinové fotoperiodě s zářivostí  $60\text{--}90 \mu\text{mol (PAR)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.3.3.8 **Selekce transformantů, indukce organogeneze a klonování regenerantů**

Po uplynutí dané doby jsem živé explantáty přenesl na regenerační R médium (složení viz příloha č. 4), určené k nastartování organogeneze, tvorbě pupenů a následně i výhonů. Explantáty byly každé tři až čtyři týdny přesazovány na čerstvé R médium s koncentrací antibiotika kanamycinu na úrovni  $125 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , ale v každé pasáži se snižující se koncentrací antibiotika Timentinu a to v rozmezí 350 až  $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Uvedená nejnižší koncentrace Timentinu měla i v dalších pasážích zajistit, aby nedošlo ke zotavení příležitostně přežívajících bakterií a jejich opětovnému nárůstu.

Výhony (alespoň 1 cm dlouhé) vzniklé z regenerujících kalusů, jsem postupně odděloval od primárních explantátů a přenášel je do umělohmotných zkumavek na agarové K médium (složení viz. příloha č. 4) s antibiotiky Timentin (jehož koncentrace záležela na koncentraci Timentinu v R médiu, ze kterého byly výhony odebrány tj.  $350\text{--}150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kanamycin ( $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a rovněž růstovými látkami ( $0,05 \mu\text{M}$  BAP,  $0,005 \mu\text{M}$  NAA ). Rostoucí výhony byly pravidelně po třech až čtyřech týdnech přesazeny na nové K médium, z důvodu hromadění na růst inhibičně působících metabolitů. Koncentrace kanamycinu zůstala stejná, ale koncentrace Timentinu postupně klesala až na hodnotu  $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V této době byly zároveň odebírány vzorky na vyhodnocení úspěšnosti transformace.

## **3.4 Vizuální detekce transformace (GFP detekce)**

Díky použití konstruktů obsahujícím gen pro GFP, bylo možné sledovat transformaci a expresi vnesených genů vizuální cestou. Toto jsem prováděl za aseptických podmínek pomocí binokulárního mikroskopu Leica MZ12 s okulárem zvětšujícím  $10\times$ , objektivem  $0,63\times$  a adaptérem pro GFP. Používal jsem zoom v rozmezí zvětšení  $6,3\text{--}10\times$ . Zdrojem excitačního světla ( $395 \text{ nm}$ ) byla rtuťová výbojka a pomocí sady optických filtrů bylo dosaženo oddělení excitačního světla od světla emitovaného ( $525 \text{ nm}$ ) (Hraška et al., 2005). Fotodokumentace byla prováděna pomocí fotoaparátu Olympus C-5050 s aplikovaným ultrazoomem, upevněného na speciálním nástavci binokulárního mikroskopu.

### 3.5 Molekulární detekce transformace

U transformačních pokusů bylo nutné potvrdit úspěšnost transformací alespoň dvěmi metodami. Proto byla kromě vizuální detekce exprese transgenu *gfp* prováděna i molekulární detekce pomocí izolace DNA, polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a následnou elektroforézou produktů.

#### 3.5.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna pomocí modifikovaného protokolu Fér (2006), jenž vychází z CTAB metody (Doyle a Doyle, 1990). Jako zdroj DNA jsem použil svrchní části regenerovaných výhonů, dlouhých zhruba 2 cm (potřeba mít alespoň 30 mg výhonu). Tyto části výhonů jsem přenesl do mikrozkušavek Eppendorf o velikosti 1,5 ml, uzavřené zkumavky jsem vhodil do tekutého dusíku, abych rostlinky zmrazil a daly se lépe homogenizovat nebo pokud se jednalo o již dříve zmražené vzorky, tak jsem provedl rovnou homogenizaci. K důkladně rozdrcenému materiálu jsem přidal 700  $\mu$ l roztoku CTAB (hexadecyltrimethylamoniumbromid) s přísadkou 14  $\mu$ l  $\beta$ -merkapt ethanolu. Obsah uzavřené zkumavky jsem poté promíchal na stolním vortex mixeru a nechal 30 minut inkubovat při 60 °C za občasného promíchání (převrácení mikrozkušavek). Během prvních minut inkubace jsem přidal cca. 10 mg PVP (polyvinylpyrolidon K30). Po inkubaci jsem provedl centrifugaci při 13600 otáčkách za minutu (rpm) po dobu čtyř minut a následně jsem přenesl supernatant do nových mikrozkušavek. K supernatantu jsem přidal 500  $\mu$ l směsi chloroform-isoamylalkohol (v poměru 24:1), mikrozkušavky uzavřel a 2–3 $\times$  převrátil. Následně jsem provedl centrifugaci při 14000 rpm po dobu šesti minut. Následovalo velmi opatrné přepipetování svrchní fáze do nových mikrozkušavek. Celý proces pokračoval přidáním 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu (–20 °C), převrácením uzavřených mikrozkušavek (2 $\times$ ) a umístěním do mrazáku (–20 °C) na dobu 30 minut. V tomto bodě se vzorky mohly nechat v mrazáku až do druhého dne. Po vyjmutí z mrazáku jsem provedl centrifugaci při 14000 rpm po dobu tří minut. Poté jsem vylil supernatant pouhým převrácením mikrozkušavky a osušením okraje mikrozkušavky na filtračním papíře (žádná kapka nesměla stéci zpět do mikrozkušavky). Následovalo přidání 300  $\mu$ l vychlazeného 96% ethanolu (–20 °C) a inkubace po dobu 15 min při 37 °C

v termomixeru při mírném třepání. Dále jsem provedl další centrifugaci při 14000 rpm po dobu tří minut a opatrné vylití supernatantu. Poté jsem přidal 200  $\mu$ l vychlazeného 70% ethanolu ( $-20$  °C) a nechal stát po dobu pěti minut při pokojové teplotě. Po této době byla provedena další centrifugace při 14000 rpm po dobu tří minut. Pak už stačilo pouze vylít supernatant, osušit mikrozkuhavku na filtračním papíře a nechat pelet oschnout v otevřených mikrozkuhavkách (asi 1 hodinu). V závěru se vysušený pelet rozpustil v 50  $\mu$ l redestilované vody v chladničce (při 4 °C) do druhého dne. Pokud jsem se vzorky rovnou nepracoval, byly uchovávány v mrazícím boxu při  $-20$  °C.

### 3.5.2 PCR (polymerázová řetězová reakce)

Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce byla prováděna v gradientovém termocycleru TC-XP s blokem Xp-C (dodavatel KRD, ČR). Reakce byla prováděna v reakční směsi o objemu 20  $\mu$ l. Složení reakční směsi bylo následující:

- 10  $\mu$ l PPP Master Mix (TopBio, Praha, ČR)
- 0,5  $\mu$ l primer Spi-2a-F (2  $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l primer SPI-2a-R (2  $\mu$ M)
- 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 1  $\mu$ l DNA

Reakční směs jsem připravoval tak, že jsem si spočítal a namíchal směs bez DNA na počet zamýšlených vzorků, plus rezerva na chyby (2 reakce navíc). Vzniklou směs jsem si rozpipetoval do popsaných mikrozkuhovek po 19  $\mu$ l směsi a 1  $\mu$ l DNA. DNA jsem přidával až úplně naposledy. Všechna manipulace s DNA, primery a master-mixy byla prováděna za neustálého chlazení, kvůli termolabilitě kyselin a pro snížení rizika nespecifického nasednutí primerů. Mnou používaný PPP Master Mix obsahoval DNA polymerázu pro tzv. hot start PCR. Tato DNA polymeráza je modifikována vazbou s blokační molekulou inhibitoru, která brání enzymu v jeho činnosti. Tento inhibitor se od DNA polymerázy oddělí až po působení zvýšené teploty po určitý časový úsek. Díky této modifikaci lze dosáhnout vyšší specifity celé reakce.



Pro reakce jsem používal následující teplotní program:

	teplota	délka	akce	opakování
1.	94 °C	5 minut	počáteční denaturace	1×
2.	94 °C	1 minuta	denaturace	35×
3.	60 °C	1 minuta	nasednutí „annealing“ primerů	35×
4.	72 °C	1 minuta	extenze primerů	35×
5.	72 °C	10 minut	závěrečná extenze	1×
6.	4 °C	∞	chlazení	

### 3.5.3 Použité primery

Pro PCR reakce jsem používal dva druhy primerů:

- Kontrolní primery pro detekci specifických sekvencí pro len (FAD3A) (Smýkal, nepublikováno)
- Pro detekci fúzního genu SPI2-GFP jsem používal primery Spi-2a-F(R) (Hraška *et al.*, 2008)

Primery pro detekci specifických sekvencí pro *Agrobacterium* – vir oblast úseku Ti plazmidu jsem nepoužíval, protože bylo zjištěno, že bakterie přežívají v kultuře po mnoho týdnů a jsou přítomny téměř ve všech vzorcích, pouze pokud se nedodrží postupy jejich eliminace (Kůta, 2007). Ve svých pokusech jsem tudíž přísně prováděl několikanásobnou eliminaci bakterií při přesazování. Primery FAD3A jsem používal pro kontrolu přítomnosti DNA z rostliny a to jak transformované či nikoliv.

Název primeru	Sekvence (nahore dopředné „forward“, dole zpětné „reward“)	Teplota pro annealing	Velikost amplifikovaného fragmentu [bp]
Spi-2aF(R)	5'-CTGAGTGGGACCCTGTTTGT-3' 5'-GTTGGCCATGGAACAGGTAG-3'	60 °C	277
FAD3A-F(R)	5'-CAGTGACCTGTTTCGCACCG-3' (19-mer) 5'-CCCGGCTAGGGTGATCAT-3' (18-mer)	60 °C	650

**Tab. 1** Použité primery a jejich základní údaje

### **3.5.4 Elektroforéza**

Produkty PCR jsem ihned vyhodnotil pomocí elektroforézy. Jako elektroforetický gel jsem používal 1,5% agarózový gel. Na přípravu 100 ml koloidního roztoku pro elektroforetický gel bylo používáno 1,5 g agarózy elektroforetické kvality (Invitrogen, dodavatel KRD, ČR), dále 20 ml 5× koncentrovaného TBE pufru a 80 ml destilované vody.

10× koncentrovaný TBE pufr jsem připravoval následovně: 108 g Tris base, 55 g kyseliny borité, 20 ml 0,5M EDTA (kys. ethylendiamintetraoctová) jsem smíchal a doplnil destilovanou vodou do objemu 1 litr. 5× koncentrovaný TBE pufr a 1× koncentrovaný, jenž se používá jako náplň elektroforetické vany, se připraví jednoduchým naředěním.

Elektroforetický gel jsem připravil smícháním příslušných chemikálií a destilované vody v 250ml Erlenmayerově baňce, rozvařením v mikrovlnce, následované přidáním 2 µl roztoku ethidumbromidu, zamícháním a vlitím do elektroforetické vany se zasazenými hřebeny, kde jsem gel nechal tuhnout zhruba 30 minut. Do každé jamky vzniklé po hřebenu jsem nanášel veškerý obsah mikrozkuvek po provedení PCR. Jako marker molekulových hmotností pro určení velikosti fragmentů DNA jsem používal Mass Ruler Low range DNA ladder (Fermentas, Litva) o velikosti fragmentů 80–1031 bp. Vlastní elektroforéza probíhala kolem jedné hodiny při napětí 90 V. Gel byl vizualizován na transluminátoru (Viber Lourmat, Francie) pomocí CCD kamery a výsledky detekce fragmentů byly vyfotografovány.

## **4 Výsledky**

### **4.1 Optimalizace sterilizace lnu**

Po 10–12 dnech od výsevu 30 skleniček (pro každou odrůdu 15 ks, z toho pro každou variantu 5 ks) v každém opakování pokusu, jsem vyhodnotil fyziologický stav klíčících semenáčků a míru kontaminace skleniček ponejvíce plísní z povrchově nedostatečně sterilizovaných semen. Zaměřil jsem se hlavně na míru poškození děložních lístků a klíčků způsobenou agresivním sterilizačním činidlem, které v průběhu sterilizace mohlo

projít přes osemení, nebo ho zcela rozrušit. Jako poškození klíčící rostlinky jsem bral absenci kořínku, poškozený vzrostný vrchol, zřetelné skvrny a deformace děložních lístků, zřejmě způsobených popálením Savem.

Počty všech vyšetřených semen v jednotlivých variantách, které byly v této části mé práce použity, jsou uvedeny v Tab. 2. Celkem jsem provedl tři nezávislá opakování pokusu. Každá hodnota v tabulce je součtem počtu semen ze dvou nezávislých opakování (jedno opakování nemohlo být do výsledků zařazeno z důvodu chyby při provádění sterilizace a kontaminaci všech skleniček plísní). V případě, že sklenička obsahovala plíseň, nebyla započítána do hodnocení klíčivosti a míry poškození klíčících rostlinek. Plíseň se v uzavřeném prostoru šíří velice rychle, nebylo tudíž možné zjistit, ze kterého semene plíseň pochází a přesně spočítat počet nedostatečně povrchově sterilizovaných a nebo zda plíseň byla zanesena neopatrnou manipulací. Proto v grafu 3 (Příloha 6) uvádím pouze počet skleniček s plísní a v absolutních číslech, aby bylo možné alespoň orientačně posoudit účinnost povrchové sterilizace. Bylo pozorováno, že různé postupy sterilizace mají výraznější vliv na klíčivost semen pouze v případě kombinace odrůdy Recital a roztoku Sava ředěného s vodou v poměru 1:5 a za použití sterilia místo ethanolu. Zde byl rozdíl výrazný a klíčivost klesla o více než polovinu (Příloha 6, graf 1). Důvodů proč tomu tak bylo, mohlo být více, ale zřejmě hlavním důvodem mohlo být silnější, ale zřejmě k působení sterilia více náchylné osemení u této odrůdy. Kdy sterilium kompletně nerozrušilo obal semene, ale narušilo ho natolik, že vzniklou trhlinou nebo mikroskopickou dírou umožnilo následné vniknutí roztoku Sava pod obal, v důsledku čehož došlo k nenapravitelnému popálení zárodku. Tomu by odpovídalo i procento poškozených klíčících rostlinek u obou odrůd ve variantě Savo 1:5 + sterilium (Příloha 6, graf 2), kde bylo pozorováno výrazné zvýšení výskytu rostlinek bez kořínků, vzrostných vrcholů a přítomnost silně popálených či deformovaných děložních lístků. Po vyklíčení byla jako první známka poškození pozorována absence kořínku, následované poškozením vzrostného vrcholu, což by mohlo vypovídat o ztenčení obalu semene v tomto místě. Pokud tomu tak skutečně bylo, je logické předpokládat, že sterilizační činidlo pronikalo do semene nejčastěji právě přes oblast zárodku kořene. Tomuto by napovídalo, jak už jsem zmínil výše, že právě jako prvotní znak poškození klíčících rostlinek byla absence kořene. Z výsledků bylo také možno usoudit, že obal semene u linie AGT 514/03 byl tenčí než u odrůdy Recital. Této hypotéze nahrával i

fakt, že po skončení sterilizace měla semena odrůdy Recital stále hnědé, neprůhledné osemení, zatímco linie AGT 514/03 měla osemení bílé až průhledné. V grafu 2 (příloha č. 6) lze vidět více než dvojnásobný nárůst množství poškozených klíčnicích rostlin u obou kultivarů, při použití varianty se Steriliem, oproti variantě savo 1:5 s ethanolom. Výsledky zjištění počtu skleniček, v nichž byla přítomna plíseň (graf 3, příloha č. 6) se současným porovnáním míry poškození semen (graf 2, příloha č. 6), nasvědčují tomu, že patrně nejlepším způsobem sterilizace by mělo být použití roztoku Sava ředěného v poměru 1:5 a 70% ethanolu po dobu maximálně 60 minut. Bohužel kvůli nízkému počtu opakování pokusu nebylo možné data statisticky vyhodnotit a výsledky jednoznačně potvrdit. Díky mé chybě v provedení sterilizace u jednoho opakování jsem zjistil, že pro dokonalou a účinnou povrchovou sterilizaci je u lnu nezbytně nutné, aby společně s roztokem Sava byl přítomen i jar, sloužící jako smáčedlo. Bez jeho dodání do sterilizačního roztoku nedošlo k dostatečné sterilizaci obalů semen a všechny skleničky s rostlinkami byly napadeny plísní. Výsevy byly hodnoceny podle následujících dvou kritérií: a) celková klíčivost semen b) poškození klíčnicích rostlin sterilizačním činidlem.

odrůda/ linie	AGT 514/03			Recital		
	Savo 1:7	Savo 1:5	Savo 1:5 + St	Savo 1:7	Savo 1:5	Savo 1:5 + St
Celkový počet započítaných semen z výsevu [ks] <sup>a</sup>	114 (150)	94 (116)	102 (102)	92 (134)	90 (122)	105 (118)
vyklíčilo semen [ks] (%) <sup>b</sup>	96 (84,2)	85 (90,4)	91 (89,2)	76 (82,6)	72 (80,0)	51 (48,6)
nevyklíčilo [ks]	18	9	11	16	18	54
poškozeno rostlin z vyklíčených [ks] <sup>b</sup>	27 (23,7)	28 (29,8)	80 (78,4)	2 (2,2)	8 (8,9)	18 (17,1)
kontaminováno skleniček [ks]	3	1	0	4	3	1

**Tab. 2** Vliv použité techniky sterilizace semen lnu na jejich klíčivost a fyziologický stav semenáčků.

Celkový počet semen započítaných do vyhodnocení, jsou zde započítána všechna vyklíčená a nevyklíčená semena, tj. i poškozená sterilizací, která nebyla kontaminována. <sup>a</sup> V závorkách daného řádku jsou uvedeny hodnoty všech původně vysetých semen v jednotlivých variantách sterilizačních postupů. <sup>b</sup> Relativní klíčivost a podíl poškozených semenáčků (%) jsou vztaženy k celkovému počtu započítaných semen.

## 4.2 Testy rezistence hypokotylů a děložních lístků lnu ke kanamycinu

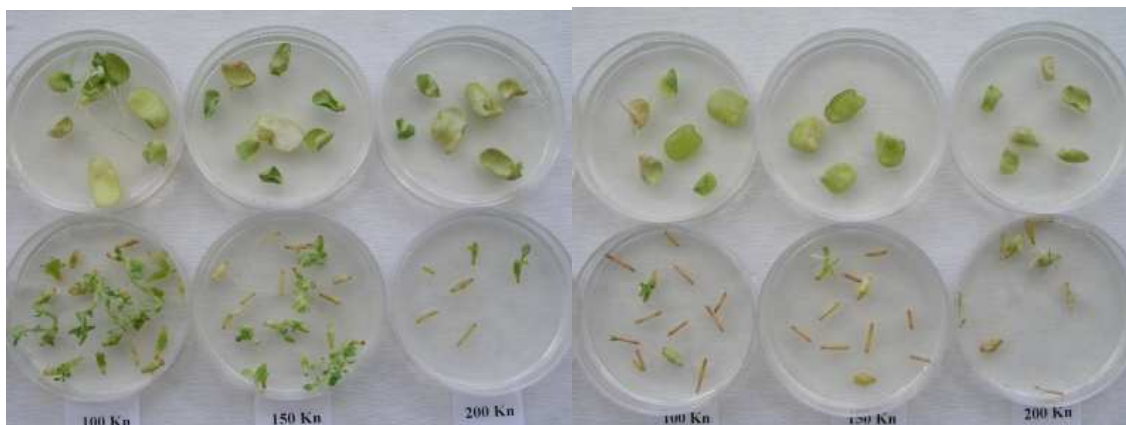
Kromě ověření vhodného postupu sterilizace semen bylo nutné také vyhodnotit rezistenci netransformovaných hypokotylových segmentů a děložních lístků ke kanamycinu, abychom se po transformaci kultivací na selektivních médiích zbavili co největšího počtu (pokud ne všech) netransformovaných explantátů. Hodnocení explantátů jsem prováděl po 21 dnech od nasazení hypokotylových segmentů a děložních lístků na agarová média. V jednotlivých variantách jsem hodnotil celkový počet explantátů, počet regenerujících explantátů, počet živých neregenerujících a počet zjevně neživotaschopných (mrtvých) explantátů. U regenerujících explantátů byl navíc hodnocen počet vytvořených pupenů a výhonů. Výsledky ve všech dále uvedených tabulkách a grafech ukazují pouze vyhodnocení hypokotylových segmentů, protože explantáty z děložních lístků ani v jediném případě neregenerovaly a nevytvářely pupeny nebo výhony. Explantáty z děložních lístků tvořily pouze orgány připomínající zelené vzdušné kořeny. Celkový počet hodnocených hypokotylových explantátů je uveden v Tab 3. Na tuto část mé práce nebyl kladen zvláštní důraz, tudíž bylo provedeno pouze jediné opakování pro každou z mnou používaných odrůd. Také musím zmínit, že po vyšetření sterilizovaných semínek musela být cca. ¼ skleniček vyřazena pro kontaminaci plísní, protože na sterilizaci byla použita starší metoda Savo 1:7 se 70% ethanolem, která se ukázala, jak vyplynulo z výsledků předchozí sekce, jako naprosto neefektivní. Navíc došlo ke značným ztrátám explantátů v agarových kulturách, z důvodu kontaminace pokusu zřejmě kvasinkovou nákazou. Jak vyplývá z grafu 4 (příloha č. 7), porovnávajícího regenerace hypokotylů u jednotlivých odrůd, ideálním množstvím selektivně působícího antibiotika kanamycinu v agarových kulturách by měla být koncentrace v rozmezí 100–150 mg·l<sup>-1</sup>. Na této koncentraci už nedocházelo k masivnímu přežívání netransformovaných explantátů. Vyšší koncentrace než 150 mg·l<sup>-1</sup> jsou dle mého názoru už zbytečně vysoké, naopak mohlo by docházet k úhynu či zastavení tvorby výhonů i u transformovaných explantátů, jež by se i přes vnesenou rezistenci nemusely být schopny s antibiotikem vypořádat. Z grafu 4 (příloha 7) je i patrné, že odrůda Recital je v tomto směru méně odolnější, než linie AGT 514/03. Moji

domněnku o vhodnosti dávky kanamycinu 100–150 mg·l<sup>-1</sup> potvrzují i výsledky porovnání tvorby pupenů a výhonů z grafu 5 (příloha 7). Z výsledků je patrné, že na médiu s koncentrací už 100 mg·l<sup>-1</sup> docházelo k rapidnímu úbytku tvorby pupenů a výhonů u linie AGT 514/03. U odrůdy Recital dochází k výraznému úbytku tvorby pupenů a výhonů již u koncentrace 50 mg·l<sup>-1</sup>. V případě linie AGT 514/03 naopak u této koncentrace dochází k vyšší tvorbě pupenů a výhonů, než na médiu bez kanamycinu. Tento jev byl zajímavý a je možné, že díky vyšší odolnosti tohoto kultivarum, takto nízká koncentrace kanamycinu působí spíše povzbudivě, než inhibičně. Na koncentraci 150–200 mg·l<sup>-1</sup> docházelo častému výskytu pupenů bez chlorofylu, jenž po krátké době odumíraly. Chlorofyl ztrácely i celé hypokotylové explantáty (viz obr. 6).

odrůda/ linie	koncentr. Kn (mg/l)	počet explantátů celkem	regeneruje explantátů [ks] (%)	celkem výhonů [ks]/ expl <sup>a</sup>	celkem pupenů [ks]/ expl <sup>a</sup>	výhonů/ pupenů na reg. expl.
<b>AGT 514/03</b>	0	91	72 (79,1)	40/ 0,44	74/ 0,81	0,56/ 1,03
	50	88	70 (79,5)	216/ 2,45	233/ 2,65	3,09/ 3,33
	100	86	6 (7,0)	2/ 0,02	9/ 0,10	0,33/ 1,50
	150	92	2 (2,2)	4/ 0,04	5/ 0,05	2,00/ 2,50
	200	96	2 (2,1)	1/ 0,01	2/ 0,02	0,50/ 1,00
<b>Recital</b>	0	47	18 (38,3)	85/ 1,81	77/ 1,64	1,03/ 4,28
	50	36	10 (27,8)	9/ 0,25	12/ 0,33	3,33/ 1,20
	100	34	2 (5,9)	2/ 0,06	4/ 0,12	1,50/ 2,00
	150	36	9 (25,0)	1/ 0,03	45/ 1,25	2,50/ 5,00
	200	44	3 (6,8)	5/ 0,11	18/ 0,41	1,00/ 6,00

**Tab 3** Celkový počet nasazených hypokotylových explantátů, regenerujících explantátů, výhonů a pupenů v pokusu zaměřeném na zjištění selektivně působících dávek kanamycinu k odlišení potenciálních transformantů a nemodifikovaných pletiv. . Poslední sloupec uvádí počet výhonů (pupenů) na jeden regenerující explantát, tato hodnota vložena pro informaci o tom, kolik výhonů a pupenů v průměru se tvořilo jeden regenerující explantát.

<sup>a</sup> počet výhonů nebo pupenů v přepočtu na nasazený explantát.



**Obr. 6** Porovnání tvorby pupenů a výhonů hypokotylových segmentů odrůdy Recital a linie AGT 514/03. Na obrázku vlevo je linie AGT 514/03 (zřetelně lépe regeneruje) a vpravo odrůda Recital

### **4.3 Vliv ultrazvukové sonikace na transformaci lnu prováděnou kokultivací s bakteriemi rodu *Agrobacterium***

Hlavní částí mé práce bylo vyzkoušení metody ultrazvukové sonikace a zhodnocení jejího vlivu na transformaci lnu využívající pro přenos genů bakterie *A. tumefaciens*. Celý transformační proces měl tyto stěžejní fáze: sonikace hypokotylů a děložních lístků; vlastní transformace rostlinných segmentů pomocí *A. tumefaciens*; kalogeneze a vizuální detekce exprese *gfp* u kalusů; regenerace a klonování výhonů; izolace DNA a molekulární detekce fúzního genu *SPI2:GFP* u regenerantů. Veškeré pokusy samozřejmě musely probíhat v aseptickém prostředí, z důvodu silné citlivosti explantátů na kontaminace plísní či kvasinek. Kontaminovaný materiál musel být ihned zlikvidován za pomoci klávování, aby se předešlo roznášení spór v laboratoři, či kultivační místnosti.

#### **4.3.1 Sonikace**

Sonikaci jsem prováděl na rostlinkách starých 7–10 dnů, rozstříhaných na jednotlivé děložní lístky a hypokotylové segmenty o velikosti cca. 8 mm. Ty jsem následně sonikoval v plastických zkumavkách podle postupu uvedeného v sekci Materiál a metody. Na sonikovaných segmentech bylo patrné jejich usazování u dna, tento jev jsem

přisuzoval rozrušování pletiva (tvorba tzv. mikroděr), vniknutí roztoku  $MgSO_4$  do pletiva a vypuzení vzduchu z pletiv (Obr. 7). Tento jev byl velice zajímavý a byl důkazem rozrušení povrchových struktur u explantátů. Na levé části obrázku 7, kde jsou ve zkumavkách děložní lístky, lze u poslední zkumavky (která byla vystavena nejvyšší dávce ultrazvuku) vidět zeleně zakalený roztok. To je zřejmě způsobeno silným rozrušením pletiva a buněk u rostlinných segmentů a uvolněním chlorofylu. K odhalení mikroděr a stupně poškození jsme proto provedli zobrazení segmentů pod skanovacím elektronovým mikroskopem (SEM) (model JOEL 6300). Vzniklé snímky (Příloha 8, obr 8) potvrdily vznik mikroděr a rozrušení pletiv, což v zásadě umožňuje proniknutí vektorových bakterií, rostlinných hormonů, výživných látek a vody pod kutikulu. Tento jev umožnil lepší regeneraci a zásobení i podpovrchových buněk. Lepší regenerace a zásobení pletiv výživnými látkami bylo pozorováno jako výrazné zvýšení objemu u explantátů na R médiu (Příloha 8, obr. 9), způsobené zřejmě masivním množением buněk v celém explantátů. Na snímcích z elektronového mikroskopu lze pozorovat i míru poškození povrchových struktur, u pravého snímku, který zobrazuje povrch hypokotylového segmentu vystaveného velké dávce ultrazvuku, jsou patrné známky silného poškození epidermis. Toto masivní poškození pletiv má zřejmě na svědomí i druhou a zápornou stránku sonikace – vyšší úhyn explantátů. Vyhodnocením přežívání explantátů vystavených ultrazvuku jsem zjistil, že sonikace zřejmě silně stresuje rostlinné segmenty a zvyšuje míru jejich úmrtnosti (graf 5 a 6, příloha 9). Proto bylo velice důležité, aby před aplikací ultrazvuku byly rostlinky v dobré kondici a se segmenty z nich odvozenými bylo nakládáno šetrně. Proto jsem pracoval tak, abych při stříhání rostlinek postupoval rychle a do zkumavek s roztokem  $MgSO_4$  jsem umisťoval rostlinné segmenty co nejdříve, aby na nich zbytečně nedocházelo k zasychání ran a jejich vysušování, což by jinak mohlo mít samo o sobě fatální důsledky. Celkové počty hypokotylových segmentů a děložních lístků zpracovaných během všech opakování pokusů, z obou typů použitých sonikátorů je uveden v příloze č. 5. V grafech č. 6 a 7 (příloha 9) uvádím porovnání procentuálního přežívání kontrolních (nesonikovaných), sonikovaných a netransformovaných a sonikovaných i transformovaných explantátů. Z těchto výsledků vyplývá, že množství přežívajících explantátů, jež byly pouze sonikovány (a nebyly kokultivovány s bakteriemi) je vyšší, než počet explantátů nesonikovaných a transformovaných, či sonikovaných i transformovaných. To znamená,



že na životaschopnost explantátů působí následná kokultivace s bakteriemi výrazně méně příznivě než samotná sonikace. Dále byla zjištěna nutnost použít pouze mírné dávky ultrazvuku, při dlouhých dobách sonikace, nebo příliš velké intenzitě ultrazvuku docházelo k nenapravitelnému poškození explantátů, které posléze na tento přílišný stres odumíraly. Při mírných dávkách (u sonikátoru Sonorex RK52 50–100 sekund; u sonikátoru Dr. Hielscher UP50H 5–10 sekund při 20% amplitudě) odumírání explantátů nebylo příliš markantní. Poškozování dlouhou dobou expozice bylo prokázáno hlavně u sonikátoru Sonorex RK52. U hrotového sonikátoru Dr. Hielscher UP50H s nastavitelným výkonem i intenzitou pulzů, jsem musel přístroj používat pouze na 20% amplitudy (výkonu) s 80% intenzitou pulzů, protože vyšší nastavení mělo velmi negativní účinky na explantáty a jejich přežívání. Podrobnější vyhodnocení je v grafech 6 a 7 (příloha 9). Roli na silném odumírání při vyšších nastaveních zřejmě sehrálo i místní přehřívání explantátů, které se dostaly do těsné blízkosti hrotu, ze kterého vycházel ultrazvuk. Po aplikaci ultrazvuku byly přidány k explantátům vektorové bakterie a ponechány v šeru při pokojové teplotě po dobu tří hodin. I po opracování téměř 10 000 explantátů (podrobněji v tab. 4, příloha č. 5) jsem z důvodu existující značné variability v odezvě explantátů při opakování pokusů, v důsledku určitých rozdílů ve fyziologickém stavu předpěstovaných klíčnicích rostlin (přestože byly získávány standardním postupem), nebyl schopen provést statistická hodnocení, jež by průkazně potvrdila mé závěry.



**Obr. 7** Vlevo sonikované děložní lístky a vpravo segmenty hypokotylů lnu. Zřetelné je klesání segmentů ke dnu v důsledku rozrušení pletiv a vypuzení vzduchu.

### 4.3.2 Kalogeneze a vizuální detekce GFP

Po provedení sonikace byly explantáty osušeny a přeneseny na agarové C médium bez antibiotik, určené pro nastartování procesu kalogeneze. Na tomto médiu byly explantáty ponechány tři dny společně s bakteriemi. Po této době jsem provedl eliminaci bakterií promytím v roztoku antibiotik a explantáty jsem umístil na C médium s antibiotiky. Při tomto přesazování jsem provedl vyhodnocení přežívání explantátů, o jehož výsledcích jsem se zmínil v minulé kapitole. Po přesazení explantátů jsem prováděl jejich pravidelné pozorování pod binokulárním mikroskopem s nástavcem pro vizualizaci GFP. Již den po přesazení (tj. 4 dny od kokultivace) bylo možné pozorovat začínající fluorescenci u některých explantátů. Tato fluorescence ovšem byla s největší pravděpodobností z velké části způsobena pouze transientní expresí T-DNA nezačleněné do rostlinného genomu. Během kultivace explantátů na C médiu s antibiotiky jsem uskutečnil toto pozorování 2× a u vhodných explantátů jsem provedl fotodokumentaci a označení pozice těchto explantátů pro další pozorování. Je důležité si uvědomit, že vizuální určení, zda explantát fluoreskuje dostatečně či nikoliv, je velmi subjektivní a i když jsem se snažil vybírat pouze silně fluoreskující explantáty, nebylo možné na základě pouhé fluorescence prohlásit daný explantát za GFP pozitivní či transformovaný. U téměř všech explantátů navíc fluoreskovaly pouze malé okrsky a u malého procenta bylo těžké rozlišit, zda se nejedná třeba o autofluorescenci, což je jev při kterém dosud blížeji neidentifikované patrně fenolické látky či polysacharidy emitovaly záření s podobnou vlnovou délkou jako GFP. Z tohoto důvodu jsem ve svých pokusech vůbec nepoužíval odrůdu lnu cv. Venica, u které byl tento jev prokázán v takové míře, že téměř znemožňoval pozorování aktivity GFP (Kůta, 2007). Pro lepší rozlišení, zda jde o autofluorescenci nebo projev GFP, bylo nutné souběžné pozorování s kontrolní (netransformovanou) skupinou explantátů téže odrůdy. Rozpoznat skutečně GFP pozitivní rostlinu si žádalo delší praxi. U pozitivních explantátů se daly pozorovat při zvětšení 50× nebo 63× zřetelně ohraničená a silně zářící ložiska. U děložních lístků bez použití sonikace bylo možné pozorovat takováto fluoreskující ložiska pouze na místě řezné plochy (obr. 11, příloha č. 10), zatímco při použití sonikace byla ložiska rozsáhlejší (obr. 12 a 13, příloha č. 10). To bylo zřejmě způsobeno rozrušením pletiv ultrazvukem a možností vniknutí bakterií *A. tumefaciens* do těchto rozrušených míst. Když se začaly na kalusech tvořit výhony, tak už byla vizuální detekce velmi ztížena. Ze

všech mnou provedených pokusů jsem udělal sumarizaci vizuálně GFP pozitivních explantátů (příloha 11, grafy 8 a 9). Z porovnání výsledků grafů bylo vidět, že sonikace zřejmě měla pozitivní efekt na počet vizuálně detekovatelných „GFP transformovaných“ explantátů. Oproti kontrolní variantě „0“, u které byla transformace provedena bez aplikace ultrazvuku, došlo po sonikaci v některých případech až ke zdvojnásobení počtu fluoreskujících explantátů. Velmi patrné to bylo u explantátů odvozených z děloh. Problém ovšem byl, že explantáty z děloh naprosto vůbec netvořily pupeny či výhony, vytvářely pouze výrůstky podobné zeleným vzdušným kořenům, takže materiál z děložních lístků byl pro další práci nepoužitelný.

U pokusů, ve kterých jsem se rozhodl vyzkoušet místo standardně používaného syntetického auxinu – kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové (NAA) silnější auxin – kyselinu 2,4-dichlórfenoxyoctovou (2,4-D) a cytokinin 6-benzylaminopurin (BAP), jsem došel k zajímavým výsledkům. U varianty č.3 (0,5 mg·l<sup>-1</sup> BAP, 5 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D) docházelo téměř ke stoprocentnímu úhynu explantátů během necelých dvou týdnů od přesazení toto agarové C médium. Domnívám se, že to bylo způsobeno příliš vysokou koncentrací auxinu 2,4-D a šokem, který explantáty nebyly schopny tolerovat. Naproti tomu u varianty č. 2 (0,5 mg·l<sup>-1</sup> BAP, 2 mg·l<sup>-1</sup> auxin 2,4-D) došlo po přesazení na toto médium k obrovskému nárůstu v tvorbě nových výhonů z hypokotylových segmentů (deset a více výhonů na explantát) bez tvorby výraznějších kalusů. Tak rychlá tvorba výhonů byla naprosto nečekaná a díky tomu jsem nebyl schopen provést vizuální detekci GFP explantátů, a proto jsem provedl jsem uskutečnil až molekulární detekci pomocí metody PCR u všech výhonů, jež jsem odebral.

### **4.3.3 Molekulární detekce**

Po přesazení explantátů na regenerační médium, začalo docházet k tvorbě pupenů a výhonů, jež jsem po dosáhnutí délky alespoň 1 cm odděloval a přesazoval na klonovací médium. Explantáty na regeneračním médiu bylo nutné každé tři týdny přesadit na nové médium, patrně z důvodu akumulace zplodin metabolismu explantátů v médiu. Tyto zplodiny metabolismu měly inhibiční vliv na růst nových výhonů. Jak jsem se již zmínil v minulé kapitole, vizuální detekce GFP byla velmi subjektivní metoda a na potvrzení

transformace sama o sobě nestačila. Proto bylo nutné provést potvrzení transformace molekulární metodou. K tomu jsem využil polymerázové řetězové reakce (PCR). Výhony odebrané z vizuálně pozitivních GFP explantátů jsem si přednostně označil, abych mohl zpětně dohledat jejich zdroj. Když tyto výhony začaly na klonovacím médiu zdárně růst, odebral jsem zhruba 30 mg hmoty z vrcholové části výhonu a provedl izolaci DNA. U pokusu s použitím auxinu 2,4-D jsem z explantátů odebíral pouze 2–3 výhony, ze kterých jsem následně odebíral hmotu pro izolaci, aby nedocházelo ke zbytečné redundanci při vyhodnocování (zdálo se mi totiž, že výhony většinou vyrůstaly ze stejného místa ve shlucích). Celkově jsem provedl 8 transformačních pokusů, ze kterých se mi podařilo odebrat výhony, provést izolaci DNA a následně PCR. Zde musím poznamenat, že izolace DNA a PCR byla provedena pouze u explantátů ošetřených ultrazvukem z hrotového sonikátoru UP50H. Izolovanou DNA jsem uchovával v mrazícím boxu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v pečlivě popsanych mikrozkuřavkách. Provedl jsem 13 skupinových PCR analýz a celkem jsem otestoval 161 výhonů. U každé sady zpracovávaných vzorků jsem kromě primerů Spi-2a-F(R) používal i primery FAD3A pro ověření přítomnosti DNA z rostliny. Ukázky výsledků jedné sady vzorků jsou zobrazeny na obr. 15 a 16 (příloha 13). Jako standard molekulární hmotnosti jsem používal Low range ladder MassRuler od firmy Fermentas, který má rozsah 80–1031 bp (obr. 14, příloha 13). Po zpracování všech odebraných výhonů a vyhodnocení výsledků (graf 10, příloha 12) jsem mohl dojít k závěru, že sonikace zvyšuje míru PCR pozitivních výhonů o více než 10 %, což je zcela určitě u obtížně transformovatelné rostliny jako je len, dobrý výsledek. Naproti tomu bylo zjištěno, že použití silnějšího auxinu 2,4-D v regeneračním protokolu je v tomto ohledu zcela nevhodné. Dostali jsme sice obrovské množství použitelných výhonů z regenerujících explantátů, ale dle výsledků bylo PCR pozitivních pouze 8 %. Z tohoto výsledku vyplývá, že tento silnější auxin nějakým způsobem nabudí tvorbu výhonů, ale výhony se tvoří především z netransformovaných částí explantátů, které vydrží i selekční tlak ze strany kanamycinu.

## 5 Diskuze

Při studiu literatury o transgenózi rostlin jsem zjistil, že každá laboratoř má svoje vlastní postupy pro předpěstování výchozího materiálu i pro vlastní provedení transformace a také, že každý rostlinný druh či odrůda má svoje vlastní specifika, která musejí být respektována. Proto se moje práce skládala ze tří okruhů. Byly to optimalizace povrchové sterilizace semen, určení optimálního množství antibiotik pro selekci potenciálních transformantů a pokusy zaměřené na zvýšení úspěšnosti transformace. První dva okruhy jsou minoritní a pouze okrajové, avšak pro vypracování spolehlivé metodiky transformace nezbytné. Hlavní částí mé práce bylo zhodnocení vlivu a možnosti použití ultrazvukové sonikace na zvýšení úspěšnosti transformace.

U části pojednávající o povrchové sterilizaci semen výsledky zjevně naznačovaly, že její optimální provedení je velmi důležitým krokem pro získání asepticky napěstovaných rostlinek pro další práci. Zřejmě ale u lnu nelze použít příliš agresivních metod pro povrchovou sterilizaci, protože poté zcela evidentně dochází poškození zárodků uvnitř semen, v extrémním případě až k jejich naprostému zničení. Důležitou složkou je zřejmě i smáčedlo (jar), které zřejmě zprostředkuje lepší kontakt mezi sterilizačním roztokem a povrchem semene, na kterém jsou přítomny spóry plísní. Zároveň roli zřejmě hrál i vliv jednotlivé odrůdy a jejich osemení. Vzhledem ke značnému rozsahu práce zde nebyl studován vliv rozdílných šarží (ročníků sklizně), které podle zkušeností školící laboratoře jsou u lnu velmi významné.

V druhé části mé práce, jež pojednává o určení optimálního množství selekčního antibiotika kanamycin, jsem z důvodu právě špatné sterilizace přicházel o velká množství potencionálně dobře zhodnotitelných explantátů a tudíž i o výsledky, které by se daly dobře statisticky vyhodnotit. Bylo ovšem alespoň možné odhadnout, že ideální hranice pro eliminaci přežívání netransformovaných rostlinných segmentů byla někde mezi koncentrací 100–150 mg·l<sup>-1</sup> kanamycinu. Vyšší hodnoty již zřejmě nemají výrazný vliv na selekci, pouze docházelo ke zmenšení počtu pupenů a výhonů. Navíc při větších hladinách by mohlo docházet k inhibici růstu i u transformovaných explantátů, které by se nebyly schopny s přílišnou koncentrací antibiotika vyrovnat.

Nejdůležitější a nejrozsáhlejší částí mé práce bylo zhodnocení vhodnosti použití

sonikace jako procesu zvyšujícího efektivitu transformace u lnu setého, poměrně obtížného objektu biotechnologických studií a aplikací (Millam *et al.*, 2005). Po určité době se podpoření transformace za pomoci sonikace používalo jen velmi okrajově. Později se však přišlo na to, že tato metoda může zvýšit jak transientní expresi, tak zvýšit množství trvale transformovaných explantátů u obtížně transformovatelných druhů jako jsou sója (Trick a Finer, 2000), trnovník akát (Zaragozá *et al.*, 2004), nebo *Chenopodium rubrum* (Flores Solís *et al.*, 2007). Sonikace také může stimulovat masivní růst explantátů a jejich regeneraci u druhů špatně prosperujících v kulturách jako je tykev (Ananthakrishnan *et al.*, 2007). Mnou provedené experimenty naznačují, že hypokotylové explantáty lnu ošetřené nízkou dávkou ultrazvuku mají vyšší míru tvorby kalusů a podpořeno následnou regeneraci transformovaných výhonů. Při podrobnějším studiu byly tyto výsledky v naší laboratoři katedry genetiky PřF JU skutečně potvrzeny a prokázán pozitivní vliv sonikace na zvýšení účinnosti transformačního procesu u lnu (Beranová *et al.*, 2008). Také bylo pozorováno, že u některých explantátů docházelo k hyperhydrataci regenerujících explantátů, ale u některých docházelo k větší míře odumírání. To naznačuje nutnost přesně stanovit dobu a intenzitu používaného ultrazvuku, optimalizovanou pro jednotlivé odrůdy. Také se spekuluje, že mikrodíry, jejichž přítomnost jsme potvrdili, mohou rozrušit pokožkovou bariéru zabraňující regeneraci pletiva umístěného hlouběji pod povrchem (Ananthakrishnan *et al.*, 2007). Moje testy při srovnávání účinnosti, „vaničkového“ typu sonikátoru (Sonorex RK52, 240 W, 35 kHz) a „hrotového“ typu (Dr. Hielscher UP50H, 50 W, 30kHz) ukázaly, že i když má první typ celkový výkon několikanásobně vyšší, tak díky přítomnosti několika slabších zdrojů ultrazvuku a jejich umístění pode dnem nádržky pro sonikační lázeň, jeho účinnost byla daleko nižší a k dosažení podobných výsledků, jako u druhého typu bylo zapotřebí vystavit rostlinné segmenty několikanásobně vyššímu času (50–150 s oproti 5–15 s). Tento jev zřejmě souvisí s tím, že u prvního typu není ultrazvuk směřovaný, zatímco u druhého typu vychází směřovaný z jednoho hrotu, který přenáší ultrazvuk přímo ke vzorkům. Nabízí se i možnost vlivu rozdílných pracovních frekvencí u obou typů, je možné že nižší pracovní frekvence u druhého typu působila rozsáhlejší poškození pletiv. Tomuto by napovídala i fakt, že jsem musel, právě kvůli vysokému stupni poškození rostlinných segmentů způsobených ultrazvukem u sonikátoru Hielscher, použít nižší amplitudu a intenzitu

ultrazvukových pulzů (20 % amplitudy 80 % intenzity). Moje výsledky také ukázaly, že intervaly okolo 50–100 sekund respektive 5–10 sekund u druhého typu sonikátoru, mohou mít pozitivní vliv na množství transformovaných explantátů a tím i účinnost transformačního postupu. Velmi nepříjemné bylo zjištění, že výhony se tvořily pouze u explantátů z hypokotylových segmentů a z děložních lístků neregeneroval ani jediný. Dle mého názoru by bylo velice užitečné, kdyby se v některé z případných návazných prací podařilo explantáty odvozené z děložních lístků přimět k regeneraci a získávat z nich výhony. Ve mnou prováděných pokusech totiž explantáty z děložních lístků tvořily nezanedbatelné procento (přes 45 %) a výhony z nich potencionálně vzniklé, by zcela určitě přispěly k vyššímu počtu transformovaných jedinců. (podrobnější sumarizace počtů opracovaných explantátů v tab. 4, příloha č. 5). Optimalizace postupů pro získání výhonů z explantátů vzniklých z děložních lístků ale nebyla součástí mé práce.

K transformaci explantátů jsem používal fúzní gen *SPI2:GFP*. K ověření transformace jsem používal metodu PCR a vizuální detekci fluorescence jako projevu exprese genu *gfp*. Tuto vizuální detekci jsem prováděl pomocí binokulárního mikroskopu vybaveného speciálním filtrem a zdrojem UV záření. Tuto detekci ovšem nelze brát jako zcela průkaznou u vzorků pozorovaných po krátké době od provedení kokultivace s bakteriemi. Během prvních několika dnů po kokultivaci se totiž s největší pravděpodobností nejednalo o fluorescenci produktu genu *gfp* integrovaného do rostlinného genomu, ale o fluorescenci v důsledku nezačleněné T-DNA čili jevu zvanému transientní exprese (Elliot et al., 1999). Tento jev je běžný i při projevu jiných markerových genů, jako například *uidA* (GUS) (Rakouský et al., 1997). Proto jsem vizuální pozorování prováděl nejdříve týden po důkladné eliminaci vektorových bakterií. Ovšem i pozorování fluorescence binokulárním mikroskopem je nutno brát s rezervou, vzhledem k možnosti omylu a následnému vzniku velké chyby při vyhodnocování (Hraška, 2003). Nadřadou stranu lze díky této fluorescenci usuzovat na teoretickou možnost transformace a využít tak tuto vizualizaci pro prvotní selekci získaného materiálu. V tomto ohledu je tato metoda velice příhodná, neboť se v další práci můžeme soustředit hlavně na vybraný rostlinný materiál a zbytečně se nezatěžovat ověřováním účinnosti transformace u vzorků, jejichž kvalita a životaschopnost není ideální. U starších explantátů, ze kterých už rostly výhony už fluorescence nebyla

pozorována. Příčinou tohoto je zřejmě „umlčení“ integrované T-DNA (gene silencing) nebo zvyšující se obsah chlorofylu přítomného hlavně v listech. Chlorofyl totiž vykazuje silnou červenou autofluorescenci, která interferuje se zelenou fluorescencí GFP a zastiňuje ji (Cho et al., 2000). Výhony odebrané z vizuálně „GFP pozitivních“ explantátů, jsem podrobil molekulární detekci transgenů pomocí metody PCR. Celkem jsem provedl detekci u 161 vzorků DNA izolovaných z regenerovaných výhonů, přičemž část pocházela z pokusů s auxinem 2,4-D, u kterých jsem nebyl schopen vizuálně pozorovat GFP. Jak ukázaly výsledky analýz produktů PCR, u většiny těchto vzorků z regenerantů získaných modifikovaným regeneračním postupem využívajícím jako mezistupeň časově omezenou kultivaci explantátů s 2,4-D, nebyla potvrzena transformace (pouhých 8 % bylo pozitivních). Daný regenerační protokol i přes svoji značnou podporu procesu regenerace rostlin z hypokotylových explantátů lnu není tedy vhodný ke zvýšení účinnosti stávající metodiky transformace. U vzorků s potvrzenou vizuální detekcí GFP bylo metodou PCR potvrzeno 52 % vzorků jako transformovaných, což jasně vypovídá o vhodnosti použití vizuální detekce fluorescence GFP pro selekci potenciálně transformovaných rostlin v raných fázích pokusů.



## 6 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium vlivu vybraných faktorů na účinnost transformačního procesu u lnu setého. V úvodní části práce jsem sledoval vliv různých sterilizačních činidel na povrchovou sterilizaci semen a rezistenci netransformovaných hypokotylových částí a děložních lístků k antibiotiku kanamycinu. Hlavním směrem mé práce bylo zhodnocení vlivu ultrazvukové sonikace na transformaci a posouzení, zda pomocí této metody lze dosáhnout zvýšení četnosti transformovaných rostlin lnu setého. Jako rostlinný materiál jsem používal odrůdu Recital a linii AGT 514/03. K transformacím jsem využíval konstrukt s fúzním genem *SPI2:GFP* nesený bakterií *Agrobacterium tumefaciens* kmene EH105.

Prokázal jsem, že ideální pro povrchovou sterilizaci semen lnu u mnou používaných odrůd je kombinace máčení semen v 70% ethanolu po dobu pěti minut, následované třepáním v roztoku Sava a destilované vody v poměru 1:5 s přísadkou jaru jako smáčedla a to po dobu maximálně 60 minut. Také jsem zjistil, že jar sloužící jako smáčedlo je velmi důležitou složkou, bez které by nedocházelo k dobrému kontaktu sterilizačního roztoku s povrchem semen a nedosáhlo by se požadované asepse. Z výsledků bylo jasné, že každá odrůda vyžaduje optimalizaci procesu sterilizace tak, aby došlo hlavně ke zničení spór plísní a přitom nedošlo k poškození zárodku uvnitř semene.

Testy na rezistence netransformovaných hypokotylových segmentů a děložních lístků obou studovaných genotypů lnu k antibiotiku kanamycinu ukázaly, že ideální koncentrace látky v médiu leží v rozmezí mezi 100–150 mg·l<sup>-1</sup>. I zde však bude sehrávat roli odrůdově specifická odolnost, proto bych doporučil uskutečnit pokusy k rezistenci i u jiných používaných odrůd a provést několikero opakování pokusů z důvodů existence značné variability ve zdatnosti rostlin předpěstovaných standardním postupem.

Stěžejní částí mojí práce bylo zhodnocení vlivu ultrazvukové sonikace na transformační proces u lnu a dosáhnout její pomocí zvýšení množství transformovaných rostlin. Z výsledků pokusů jasně vyplývá, že u nízké dávky ultrazvuku vhodným způsobem působí na rozrušení kutikuly a povrchových částí rostlinných segmentů a tím umožní lepší přístup podpovrchových pletiv jak pro vektorové bakterie, tak pro dodávané

rostlinné hormony, výživné látky a vodu. Tyto faktory přispívaly k vyššímu nárůstu objemu explantátů na kalogenním médiu a jejich lepší regenerační schopnosti. Zjistil jsem také, že míru sonikace je nutno pečlivě určit pro každou odrůdu, aby nedocházelo k přílišnému poškození tkání a následnému vysokému úhynu explantátů. Sonikace je zásah, který stresuje explantáty a měla by se provádět se zdravými a dobře narostlými rostlinkami. Odrůda Recital velmi špatně snáší poškození způsobené ultrazvukem a její transformace touto metodou není, díky vysoké úmrtnosti explantátů, příliš účinná. Naopak můžu doporučit linii AGT 514/03, protože snáší sonikaci velice dobře a úmrtnost explantátů, vystavených mírné dávce ultrazvuku, není vysoké. Při vizuální detekci fluorescence GFP jsem zjistil, že u explantátů které byly sonikovány, dochází k fluorescenci na větší ploše explantátu, než bylo u nesonikovaných. To je zřejmě následek rozrušení povrchových vrstev explantátů a lepší dosažitelnost podpovrchových částí pro vektorové bakterie. Provedením molekulární detekce transgenu metodou PCR a porovnáním počtu transformovaných výhonů získaných ze sonikovaných a nesonikovaných explantátů jsem zjistil, že mírná aplikace ultrazvuku může zvýšit procento úspěšně transformovaných regenerantů o více než 12 %.

Část výsledků této práce byla použita v článku, který vyšel v časopise *Plant Cell Tissue Culture* v lednu minulého roku (Beranová et al., 2008).

## 7 Seznam použité literatury

**Anonym:** Piezoelectricity

<http://en.wikipedia.org/wiki/Piezoelectricity>

**Beranová M., Rakouský S., Vávrová Z., Skalický T.** (2008): Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 94: 253-259. doi 10.1007/s11240-007-9335-z

**Cody C.W., Prasher D.C., Westler W.M., Prendergast F.G., Ward W.W.** (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218.

**Dong J.Z., McHughen A.** (1993): An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 88: 61-71. doi:10.1016/0168-9452(93)90110-L

**Elliott A. R., Campbell J. A., Dugdale B., Brettell R., Grof C. P.** (1999): Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Rep.* 18: 707-714.

**Flores Solís J.I., Mlejnek P., Studená K., Procházka S.** (2007): Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. *Plant Soil Environ* 49: 225-260.

**Fullner K.J., Cano L.J., Nester E.W.** (1996): Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273: 1107-1109. doi:10.1126/science.273.5278.1107

**Gheysen G., Angenon G., Van Montagu M.:** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. In: Lindsley, K. (ed.): *Transgenic Plant Research*. Harwood Acad. Publ. 1998, str.1-133.

**Heim R., Prasher D.C. and Tsien R.Y.** (1994): Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12501-12504.

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

**Holford P., Hernandez N., Newbury H.J.** (1992): Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during cocultivation of *Antirrhium majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 11: 196-199.

**Hraška M.** (2003): Tvorba a detekce GFP transformantů rostlin. Diplomová práce JU ZF, České Budějovice, 67 s.

**Hraška M., Rakouský S., Čurn V.** (2006): Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86: 303-318.

**Hraška M., Rakouský S., Kocábek T.** (2005): Use of a simple semiquantitative method for appraisal of green fluorescent protein gene expression in transgenic tobacco plants. *Biol. Plant.* 49: 313-316.

**Hraška M., Rakouský S., Čurn V.** (2008): Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 94: 239–251. doi:10.1007/s11240-007-9312-6.

**Cho M.J., Ha C.D., Lemaux P.G.** (2000): Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep.* 19: 1084-89.

**Jefferson R., Burgess S., Hirsch D.** (1986):  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8447-8451.

**Jordan M.C., McHughen A.** (1988): Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 7: 281-284.

**Kludkiewicz B., Kodrík D., Grzelak K., Nirmala X., Sehnal F.** (2005): Structurally unique recombinant Kazal-type proteinase inhibitor retains activity when terminally extended and glycosylated. *Protein Expr. Purif.* 43: 94-102.  
doi:10.1016/j.pep.2005.06.011

**Kobelková A.** (2002): Optimalizace transformačního procesu u lnu setého (*Linum usitatissimum* L.). Bakalářská práce JU PŘF, České Budějovice, 45 stran.

**Kůta V.** (2007): Možnosti využití signálního genu pro zeleně fluoreskující protein k identifikaci a selekci transformantů lnu. Bakalářská práce JU PŘF, České Budějovice, 54 stran.

**Langley R.A., Kado C.I.** (1972): Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoguanidine and relationship of *A. tumefaciens* mutants to crown gall induction. *Mut. Res.* 14: 277-286.

**McHughen A., Rowland G., Holm F., Bhatti S. Kenaschuk E.** (1997): CDC Triffid transgenic flax. *Can. J. Plant Sci.* 77: 641-643.

**Miki B., McHugh S.** (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 107: 193–232.  
doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.011

**Millam S., Obert B., Pret'ová A.** (2005): Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum*- a review. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82: 93-103.

**Mlynářová L., Bauer M., Nap J.P., Pret'ová A.** (1994): High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax. *Plant Cell Rep.* 13: 282-285.  
doi:10.1007/BF00233320

**Murashige T., Skoog F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

**Ondřej M., Drobník, J.** (2002): *Transgenozie rostlin*. Academia, Praha. 316 stran.

**Ondřej M., Kocábek T., Rakouský S., Wiesnerová D.** (1999): Segregation of T-DNA inserts in the offspring of *Arabidopsis thaliana* after *Agrobacterium* transformation. *Biol. Plant.* 42: 185-195.

**Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J.** (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229–233.

**Rakouský S., Kocábek T., Vincenciová R., Ondřej M.** (1997/98): Transient  $\beta$ -glucuronidase activity after infiltration of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biol. Plant.* 40: 33-41.

**Rakouský S., Tejklová E., Wiesner I., Wiesnerová D., Kocábek T., Ondřej M.** (1999): Hygromycin B – an alternative in flax transformant selection. *Biol. Plant.* 42: 361-369. doi:10.1023/A:1002457000944

**Reichlová V.**, (2006): *Sonochemická příprava oxidických materiálů*. Diplomová práce MU PŘF, Brno. 74 stran.

**Richards H.A., Han C.T., Hopkins R.G., Failla M.L., Ward W.W., Stewart C.N.** (2003): Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to weaned rats. *J. Nutr.* 133: 1909–1912.

**Štaud J., Vašák J. a kol.** (1997): *Základy pěstování přadného a olejného lnu*. Praha, Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. 64 stran.

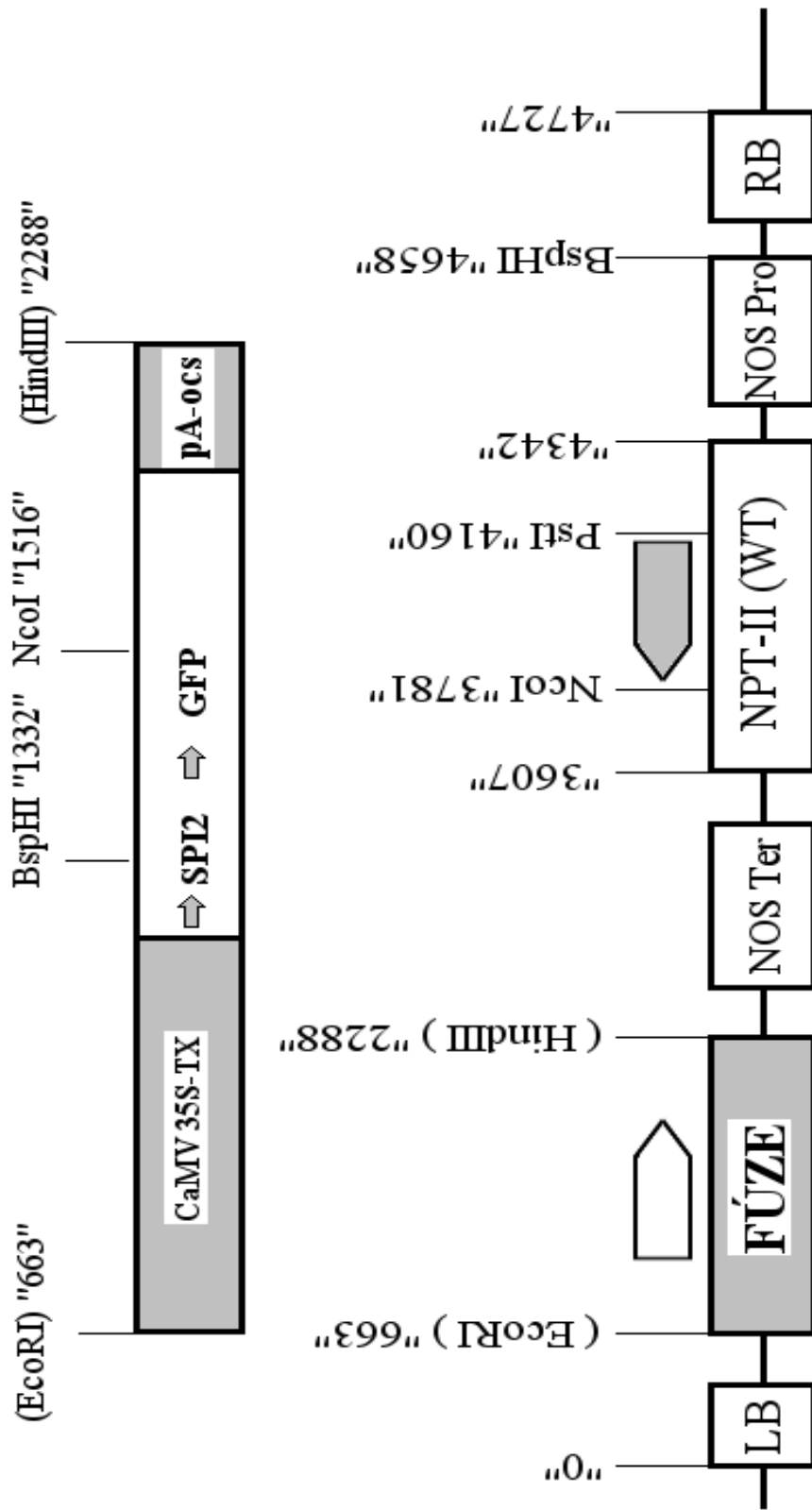
**Trick H.N., Finer J.J.** (1997): SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res.* 6: 329-336. doi:10.1023/A:1018470930944

## **8 Přílohy**

### **8.1 Příloha č. 1 – Aminokyselinová sekvence GFP**

MSKGEELFTGVVPVLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICTTGKLP  
VPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYK  
TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIMGDKPKNGI  
KVNFKIRHNIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKR  
DHMILLEFVTAARITHGMDELYK

## 8.2 Příloha č. 2 – Mapa fúzního genu *SPI2:GFP*



(Enzyme)=deleted by Klenow

## plazmid pRD400-FÚZE 15



### 8.3 Příloha č. 3 – Sekvence nukleotidů genové fúze *SPI:GFP*

ATGGTTTGCA	CAGCTGAGTG	GGACCCTGTT	TGTGGTAAAG
ATGGAAAGAC	TTACAGCAAT	CTTTGCTGGT	TGAACGAGGC
TGGTGTTGGA	TTGGATCATG	AAGGTGAATG	TCAATTCAGT
AAAGGAGAAG	AACTTTTCAC	TGGAGTTGTC	CCAATTCTTG
TTGAATTAGA	TGGTGATGTT	AATGGGCACA	AATTTTCTGT
CAGTGGAGAG	GGTGAAGGTG	ATGCAACATA	CGGAAAACCT
ACCCTTAAAT	TTATTTGCAC	TACTGGAAAA	CTACCTGTTC
CATGGCCAAC	ACTTGTCACT	ACTTTCTCTT	ATGGTGTTCA
ATGCTTTTCA	AGATACCCAG	ATCATATGAA	GCGGCACGAC
TTCTTCAAGA	GCGCCATGCC	TGAGGGATAC	GTGCAGGAGA
GGACCATCTT	CTTCAAGGAC	GACGGGAACT	ACAAGACACG
TGCTGAAGTC	AAGTTTGAGG	GAGACACCCT	CGTCAACAGG
ATCGAGCTTA	AGGGAATCGA	TTTCAAGGAG	GACGGAAACA
TCCTCGGCCA	CAAGTTGGAA	TACAACCTACA	ACTCCCACAA
CGTATACATC	ATGGCCGACA	AGCAAAAGAA	CGGCATCAAA
GCCAACTTCA	AGACCCGCCA	CAACATCGAA	GACGGCGGGC
TGCAACTCGC	TGATCATTAT	CAACAAAATA	CTCCAATTGG
CGATGGCCCT	GTCCTTTTAC	CAGACAACCA	TTACCTGTCC
ACACAATCTG	CCCTTTCGAA	AGATCCCAAC	

## 8.4 Příloha č. 4 – Použitá kultivační média

**Tekuté LK médium** (Langley a Kado 1972) pro kultivaci bakterií *A. tumefaciens*

<b><u>Složka</u></b>	<b><u>Množství</u> (g·l<sup>-1</sup>)</b>
Sacharóza	10
Kasein hydrolyzát	0,8
Kvasničný extrakt	4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
Úprava pH média po přidání chemikálií na 6,5	

### **Agarové LB médium pro růst bakterií**

<b><u>Složka</u></b>	<b><u>Množství</u> (g·l<sup>-1</sup>)</b>
Baktotryptofan	10
Kvasničný extrakt	5
NaCl	10
Agar (Plant agar, Duchefa, Holandsko)	8
Úprava pH média po přidání chemikálií na 7,0	

### **C médium** pro kalogenezi

<b><u>Složka</u></b>	<b><u>Množství</u> (mg l<sup>-1</sup>)</b>
sacharóza	30 000
Myo-inositol	100
MS soli s vit. B5	4 410
BAP	1,5
NAA	0,02
Agar	8 000
Úprava pH média po přidání chemikálií na 5,5	

**R médium** (regenerační médium)

<b><u>Složka</u></b>	<b><u>Množství</u></b> (mg l <sup>-1</sup> )
Sacharóza	30 000
Myo-inositol	100
MS soli s vit. B5	4 410
BAP	0,0226
NAA	0,0012
Agar	8 000
Úprava pH média po přidání chemikálií na 5,5	

**K médium** (klonovací médium)

<b><u>Složka</u></b>	<b><u>Množství</u></b> (mg l <sup>-1</sup> )
Sacharóza	30 000
Myo-inositol	100
MS soli s vit. B5	4 410
BAP	0,00228
NAA	0,00092
Agar	8 000
Úprava pH média po přidání chemikálií na 5,5	

**MS médium s vitamíny B5** (základ pro agarová média C, R, K)

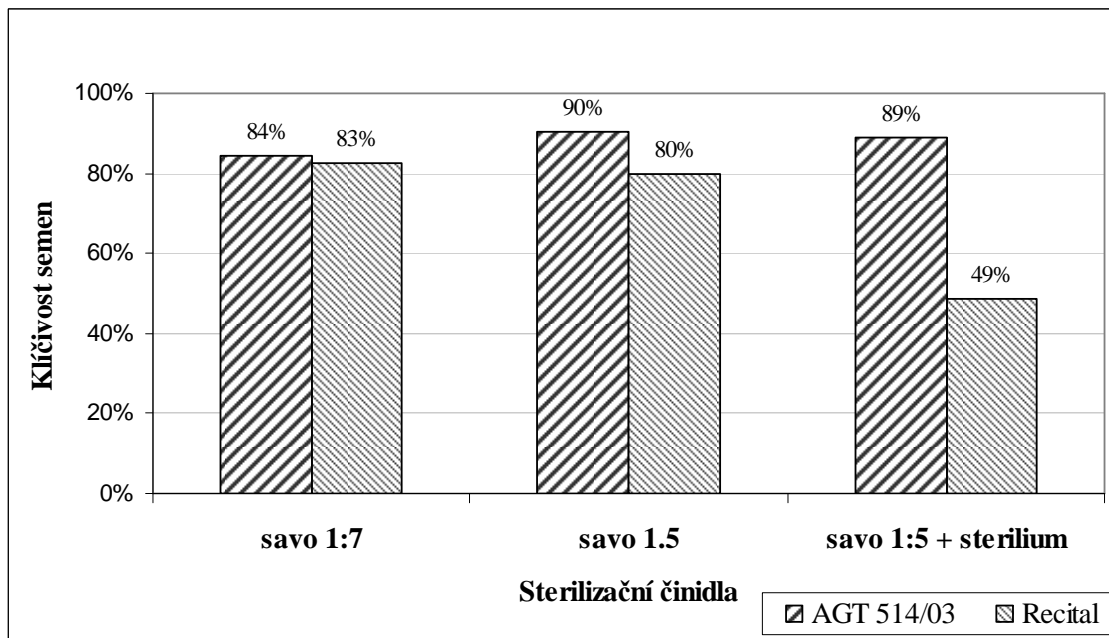
<b><u>Složka</u></b>	<b><u>Množství</u> (mg.l<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
kyselina nikotinová	1,0
pyridoxin HCl	1,0
thiamin HCl	10,0

## 8.5 Příloha č. 5 – Sumarizace množství opracovaných explantátů v sonikačních pokusech

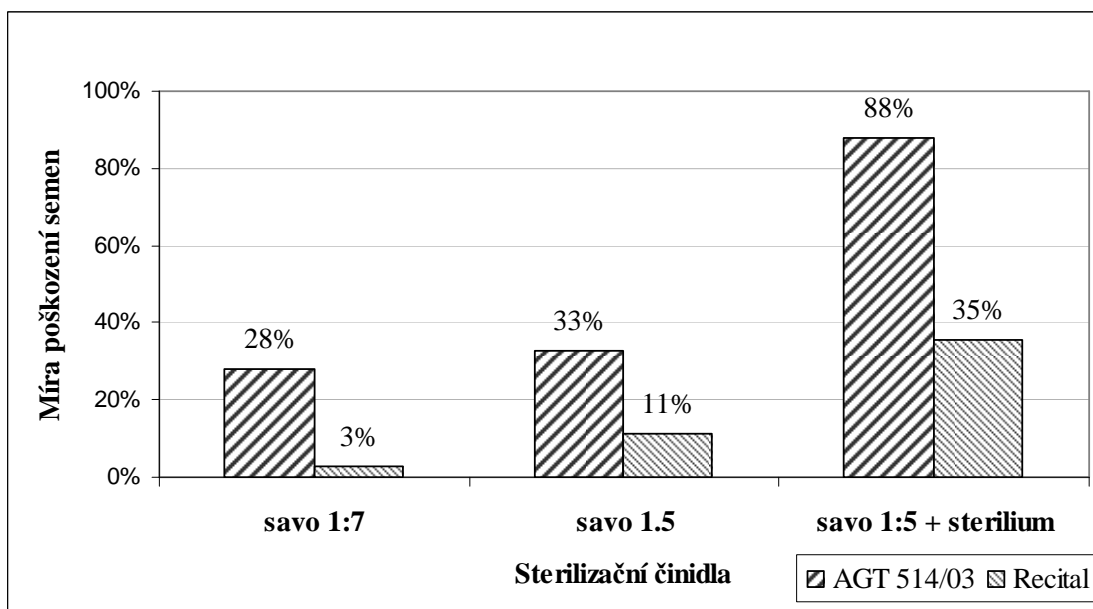
Odrůda	Typ sonikátoru	Aplikace ultrazvuku [s]	Hypokotyly [ks]	Děložní lístky [ks]	
AGT 514/03	Sonorex RK52	K-50	447	367	
		0	355	323	
		50	449	269	
		100	438	389	
		150	380	310	
		celkem	2069	1658	
		UP50H	K-10	251	119
	0		318	188	
	5		263	160	
	10		267	191	
	15		258	207	
	celkem		1357	865	
	Recital		Sonorex RK52	K-50	142
		0		130	159
50		100		153	
100		87		71	
150		89		70	
celkem		548		559	
UP50H		K-10		243	296
		0	246	288	
		5	300	335	
		10	270	287	
		15	244	264	
		celkem	1303	1470	

**Tab. 4** Sumarizace množství zpracovaných explantátů v sonikačních experimentech se lnem. Ve variantách K-10 a K-50 nebyla po deseti, respektive padesátisekundové sonikaci explantátů bez přítomnosti vektorových bakterií prováděna následná kokultivace s *A. tumefaciens*.

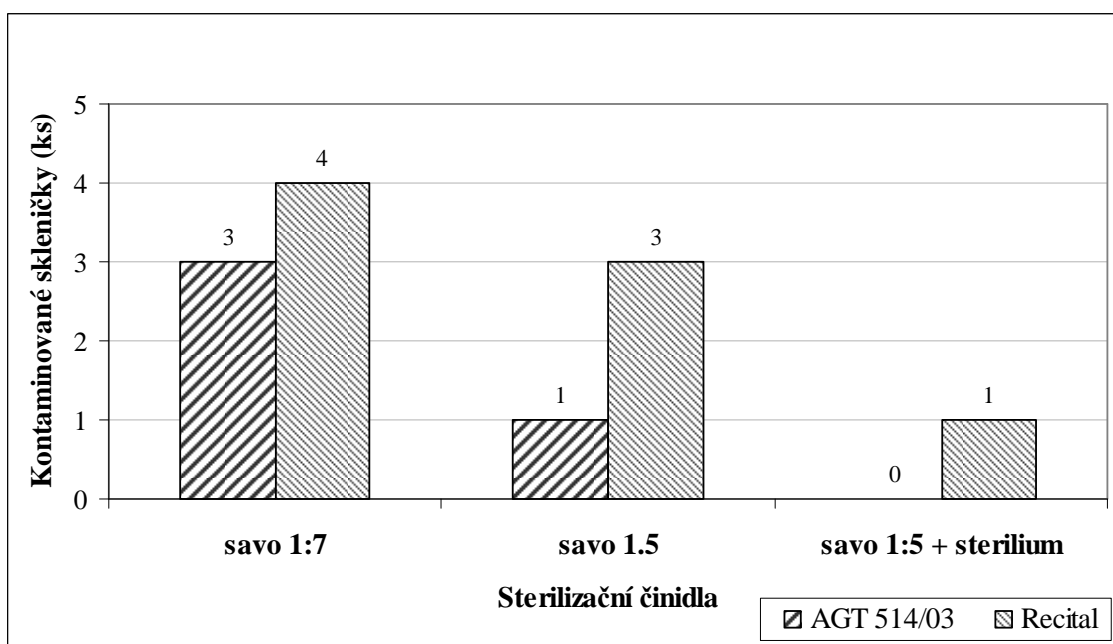
## 8.6 Příloha č. 6 – Porovnání klíčivosti semen a míry poškození u rostlinek při různých způsobech povrchové sterilizace semen Inu



**Graf 1.** Porovnání agresivity různých postupů povrchové sterilizace semen na základě následného vzházení aseptických semen u odrůdy Recital a linie AGT 541/03. Zřetelný úbytek klíčivosti u varianty savo 1:5 + sterilium, zřejmě v důsledku proniknutí sterilizačního roztoku pod obal semene a zničení zárodku.

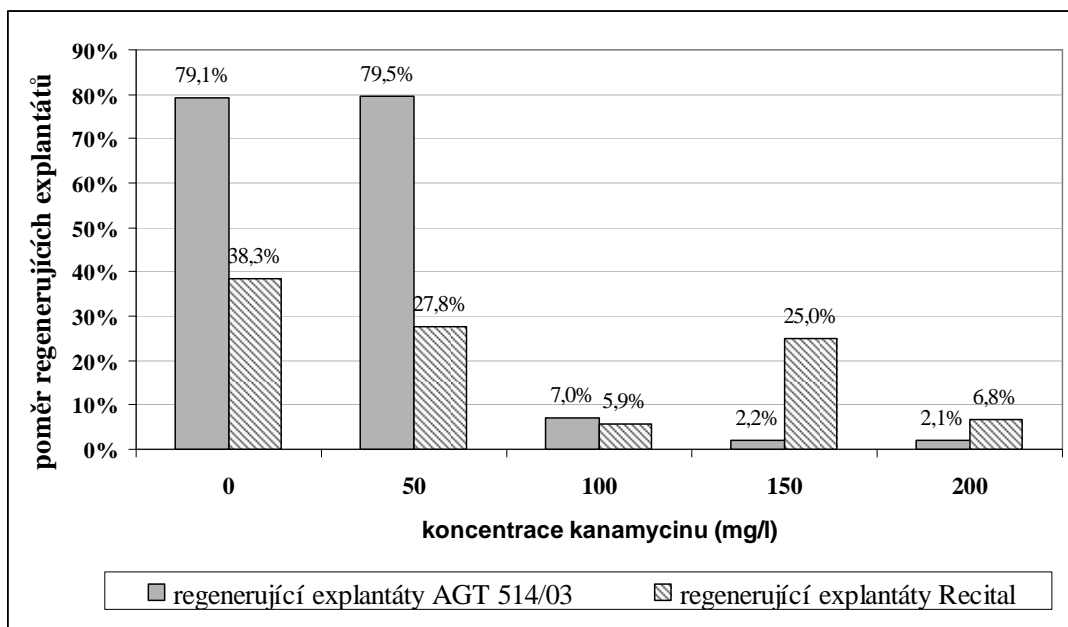


**Graf 2.** Porovnání míry poškození klíčících rostlinek odrůdy Recital a linie AGT 514/03 po různém ošetření sterilizačními činidly. Jako poškozená byla hodnocena vzešlá semena bez kořenové části, s absencí vzrostného vrcholu nebo s poškozeným vrcholem, s popálenými a deformovanými dělohami nebo se silně zredukovaným růstem.

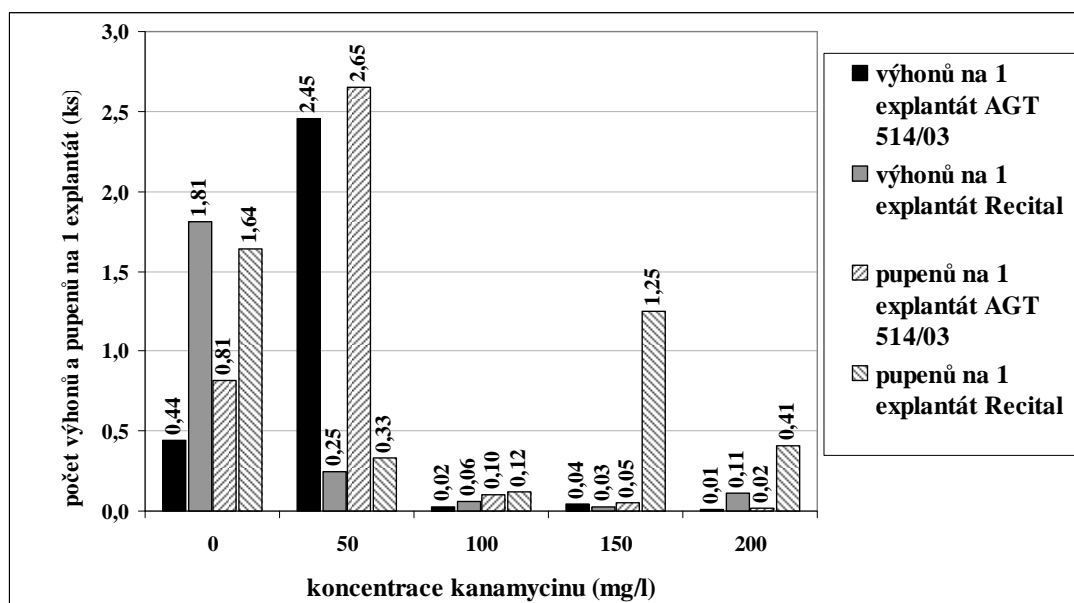


**Graf 3.** Porovnání počtu skleniček, u nichž se objevila plíseň z celkového počtu 10 ks na variantu sterilizace.

## 8.7 Příloha č. 7 – Porovnání regenerace pupenů a výhonů z hypokotylových explantátů lnu pěstovaných *in vitro* při různých dávkách antibiotika kanamycinu



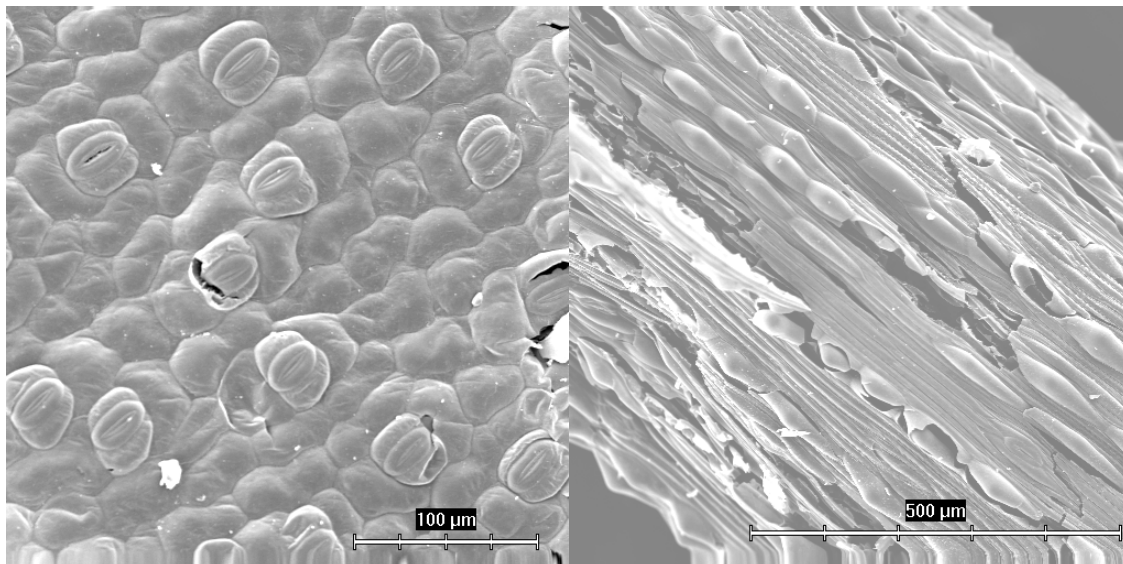
**Graf 4.** Porovnání procentuálního zastoupení regenerujících explantátů (tvůřících pupeny a výhony) jednotlivých odrůd lnu za přítomnosti různých dávek (0–200 mg·l<sup>-1</sup>) kanamycinu. Vztaženo na všechny explantáty přítomné při založení pokusu.



**Graf 5** Porovnání absolutních počtů regenerovaných pupenů a výhonů tvořených hypokotylovými explantáty u jednotlivých odrůd lnu za přítomnosti různých dávek (0–200 mg·l<sup>-1</sup>) kanamycinu vztažených na jeden explantát (míněno na sumu všech hypokotylových explantátů ve variantě při založení pokusu).



## 8.8 Příloha č. 8 – Obrázky ze SEM a ukázka vlivu sonikace na objem explantátů

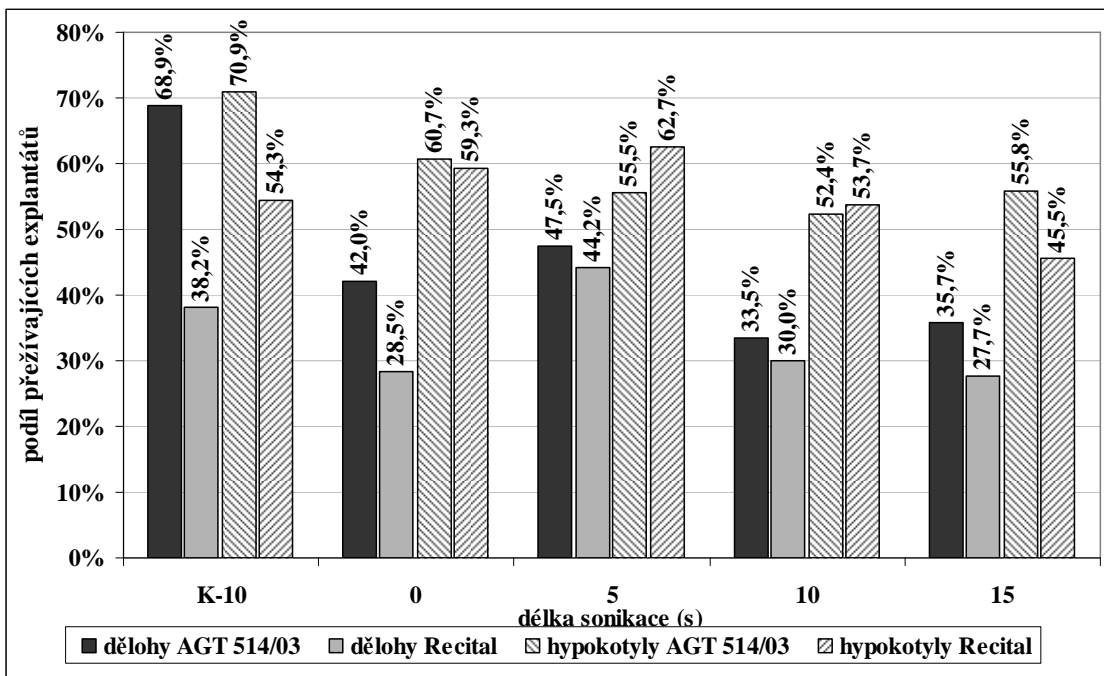


**Obr. 8** Obrázky ze skanovacího elektronového mikroskopu (SEM). Vlevo lze pozorovat mírné rozrušení kutikuly a vpravo silné rozrušení kutikuly způsobené aplikací ultrazvuku (přejato ze společné publikace Beranová et al., 2008).

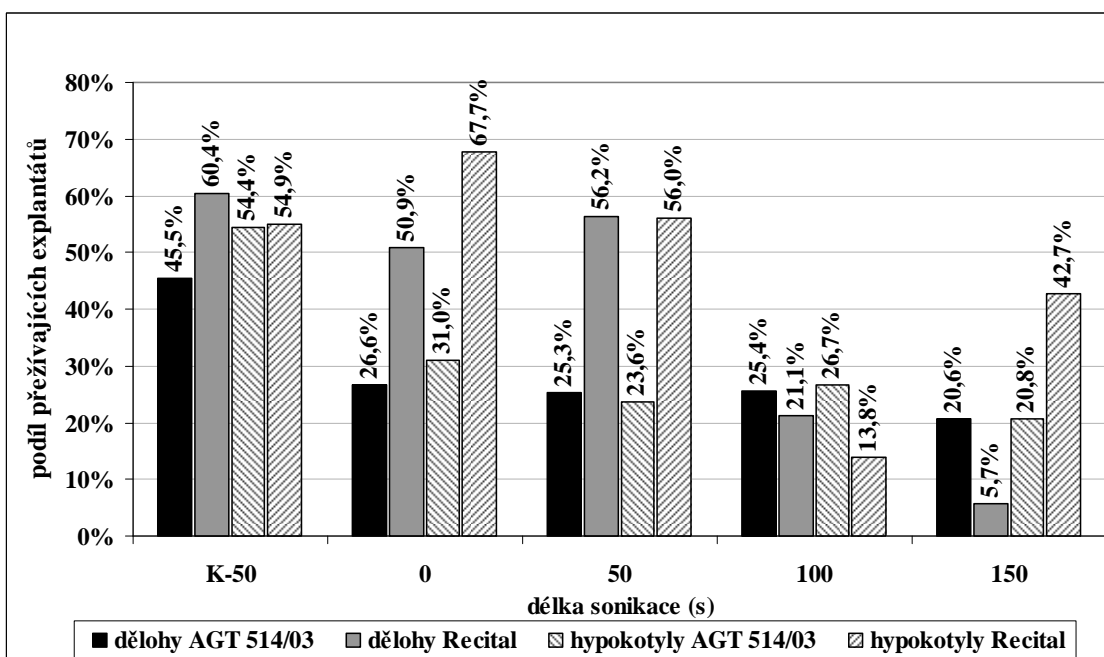


**Obr. 9** Ukázka nabytí na objemu hypokotylových explantátů lnu při následné kultivaci na R médiu po aplikaci ultrazvuku. Vlevo segmenty bez sonikace vpravo po aplikaci sonikace (15 sekund, hrotový sonikátor UP50H). Hodnoceno 24 dnů po sonikaci.

## 8.9 Příloha č. 9 – Srovnání přežívání explantátů lnu *in vitro* po ošetření ultrazvukem

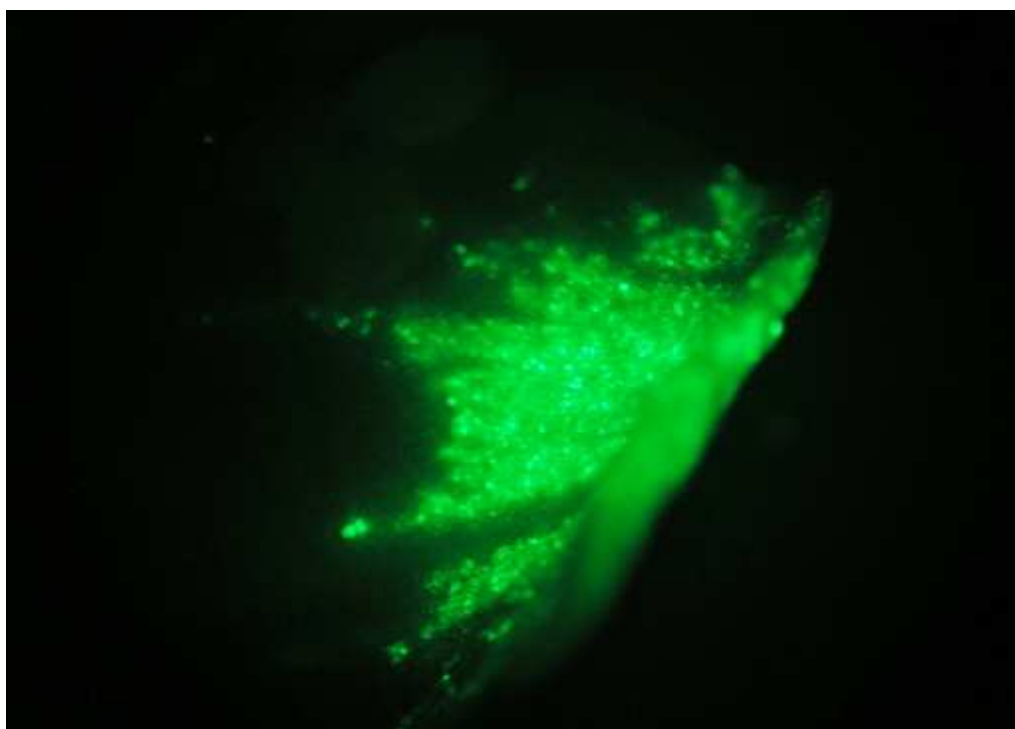


Graf 6 Srovnání přežívání hypokotylových segmentů a děložních lístků po aplikaci ultrazvuku „hrotovým“ sonikátorem Hilschier UP50H. Hodnoceno po 3 dnech od ošetření.

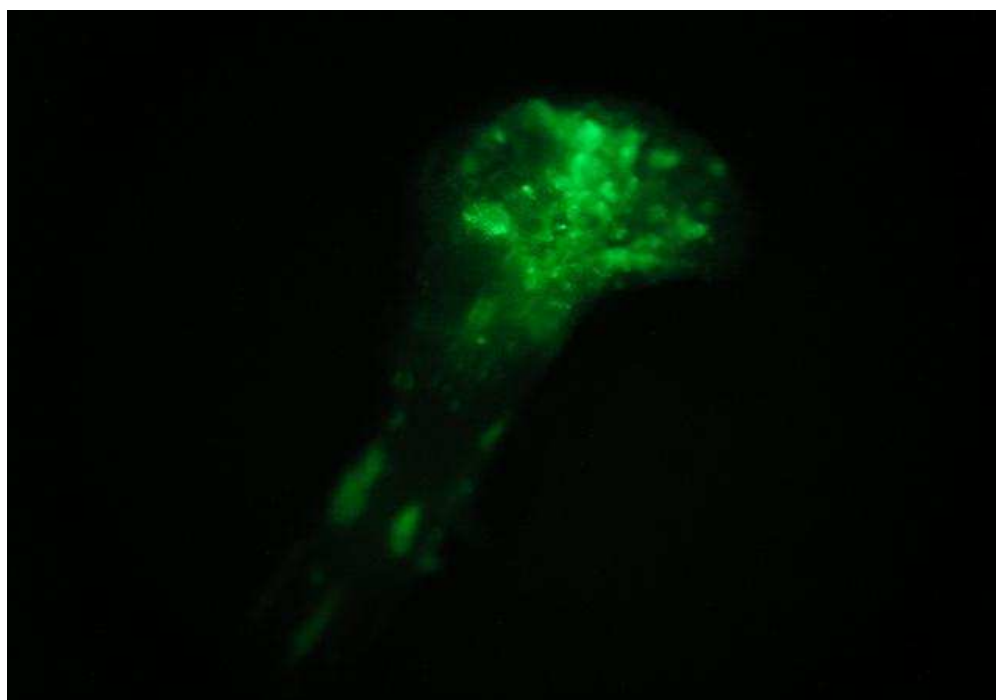


Graf 7 Srovnání přežívajících hypokotylových segmentů a děložních lístků po aplikaci ultrazvuku ve „vaničkovém“ sonikátoru Sonorex RK 52.

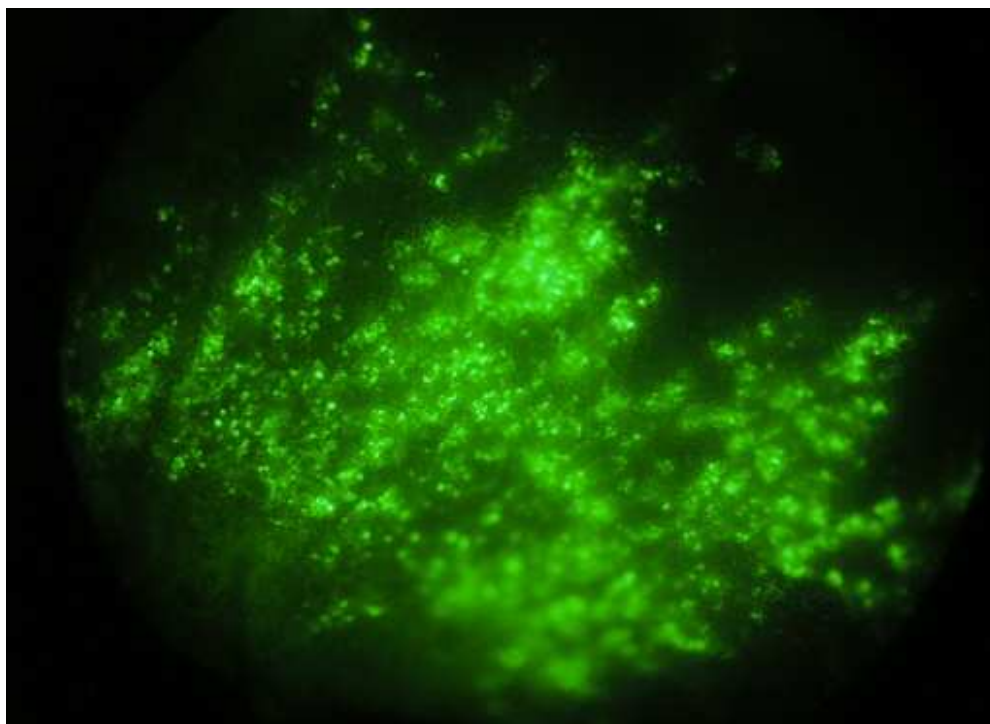
## 8.10 Příloha č. 10 – Vizuálně GFP pozitivní explantáty



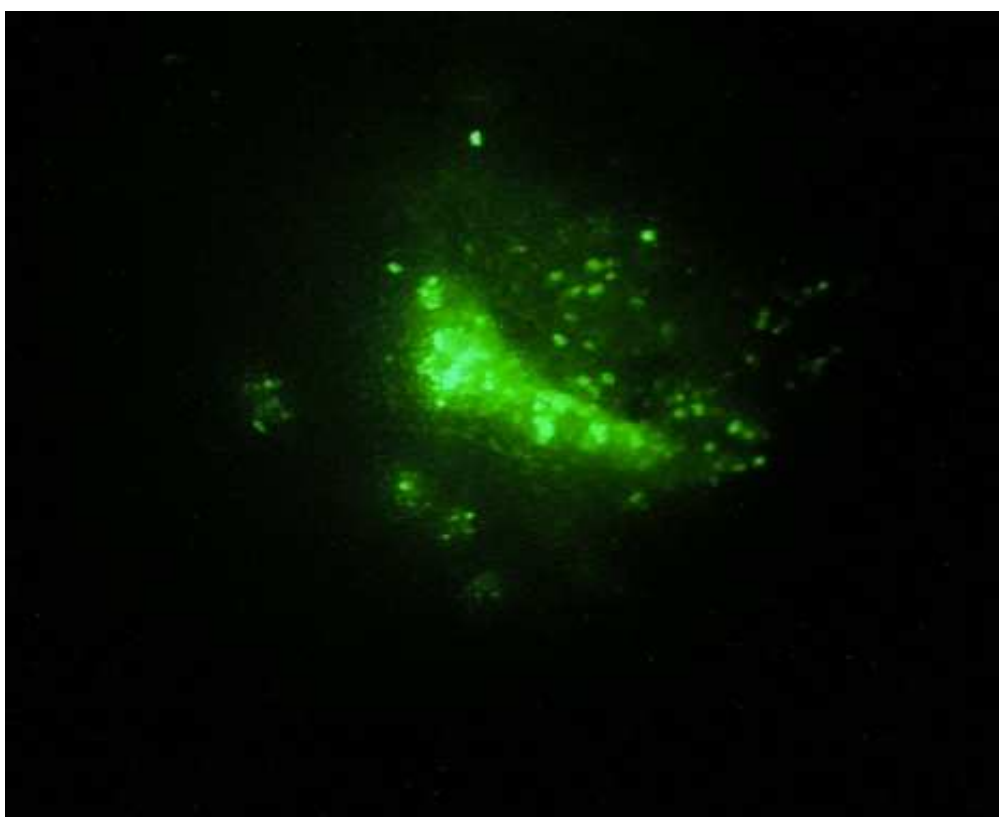
**Obr. 10** Detail svítícího konce děložního lístku lnu při zvětšení 50×. Je možné pozorovat rozšíření fluorescence i do okolí od řezu. Pozorování provedeno 10 dní po kokultivaci bez použití ultrazvuku.



**Obr. 11** Fotografie hypokotylového explantátu při zvětšení 50×. Zřetelně fluoreskující ložiska jsou patrna zejména na horním konci explantátu. Pozorováno 10 dní po kokultivaci bez použití ultrazvuku.

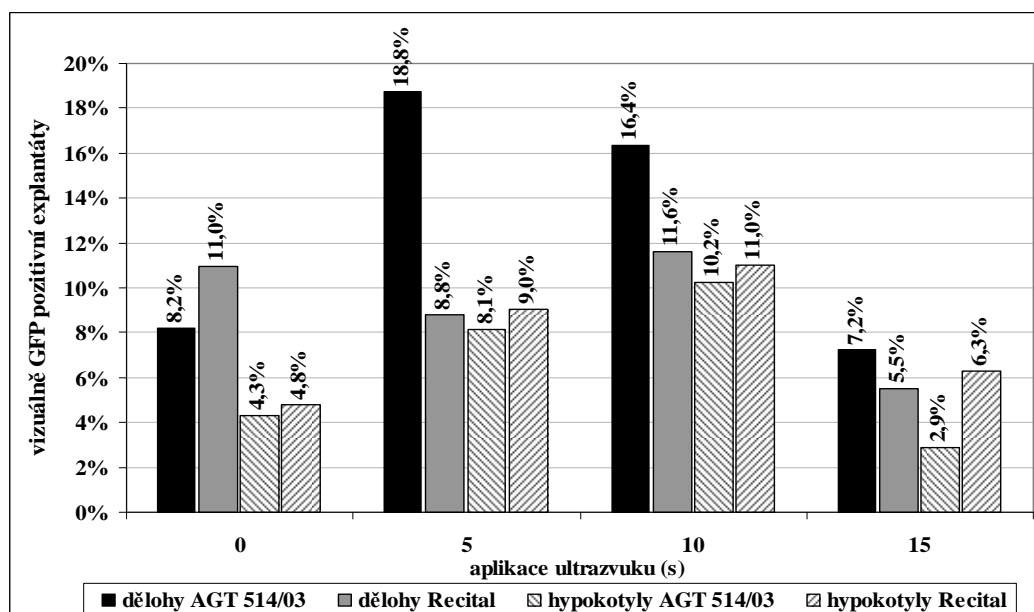


**Obr. 12** Detail fluoreskujícího děložního lístku (zvětšení 63×) svítícího ve velké části své plochy. Pozorováno 9 dní po provedení sonikace (10 sekund, sonikátor UP50H) a následné kokultivaci.

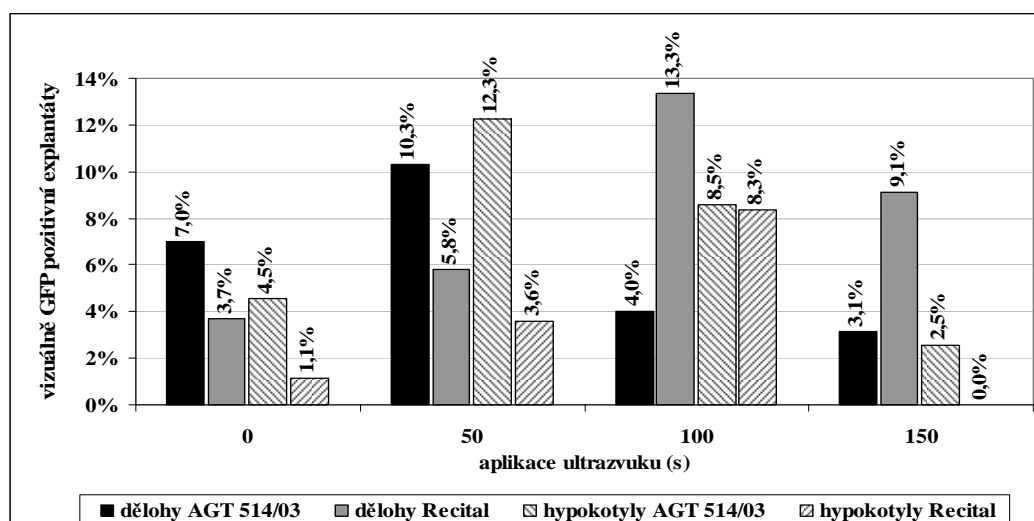


**Obr. 13** Pohled na střed zlomeného děložního lístku (zvětšeno 50×). Sledováno 12 dní po aplikaci ultrazvuku (5 sekund, sonikátor Hielscher UP50H) a následné kokultivaci.

## 8.11 Příloha č. 11 – Vyhodnocení výsledků pozorování GFP pozitivních explantátů lnu na základě jejich fluorescence v závislosti na použité metodě aplikace ultrazvuku ke zvýšení účinnosti transformace

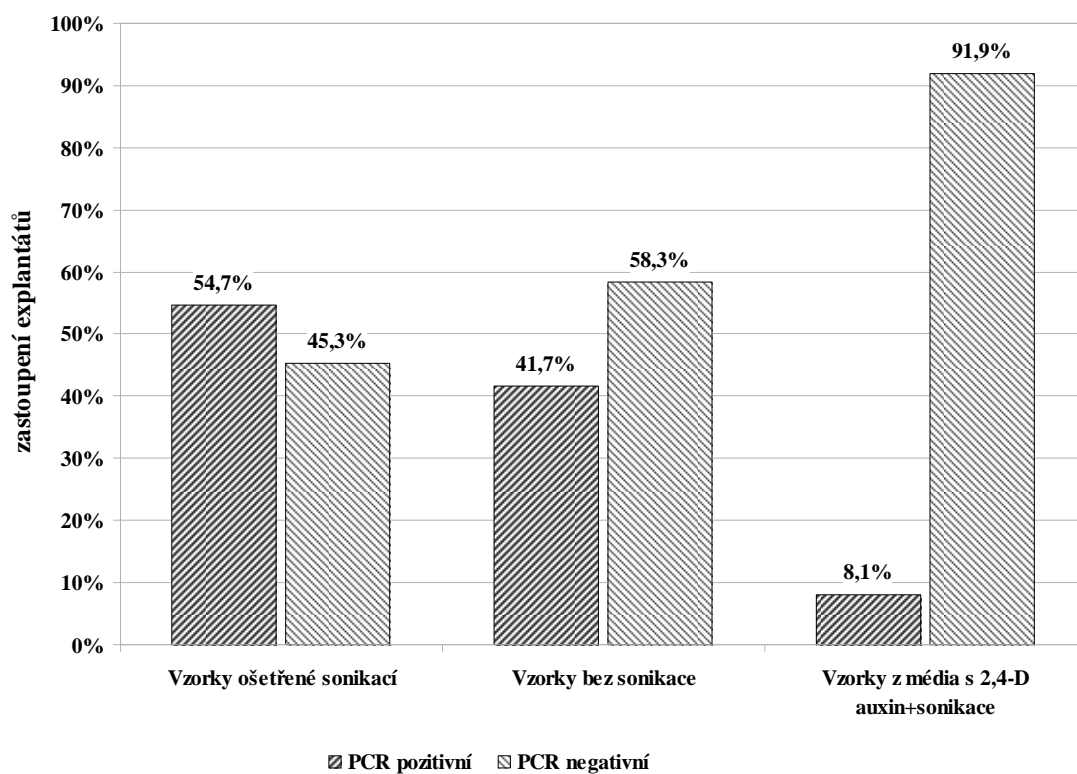


**Graf 8** Porovnání vizuálně GFP pozitivních explantátů vystavených ultrazvuku pomocí hrotového sonikátoru UP50H (kromě kontrolní varianty 0) v přítomnosti vektorových bakterií *A. tumefaciens*. Hodnocení bylo prováděno po 10 dnech od aplikace na základě fluorescence pletiv pod binokulární lupou Leica MZ12 s fluorescenčním adaptérem.



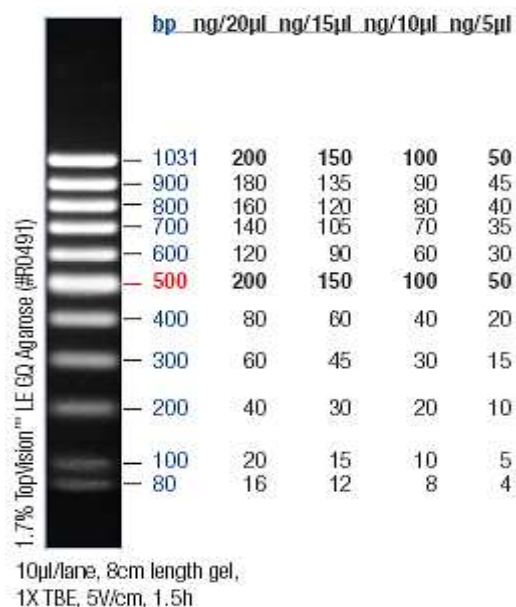
**Graf 9** Porovnání vizuálně GFP pozitivních explantátů vystavených ultrazvuku pomocí sonikátoru Sonorex RK52 (kromě kontrolní varianty 0) v přítomnosti vektorových bakterií *A. tumefaciens*. Hodnocení bylo prováděno po 8 dnech od aplikace na základě fluorescence pletiv obdobně jako v případě sonikátoru Hieischer UP50H.

## 8.12 Příloha č. 12 – Porovnání účinnosti transformačních a regeneračních technik na základě následných PCR analýz rostlinných regenerantů

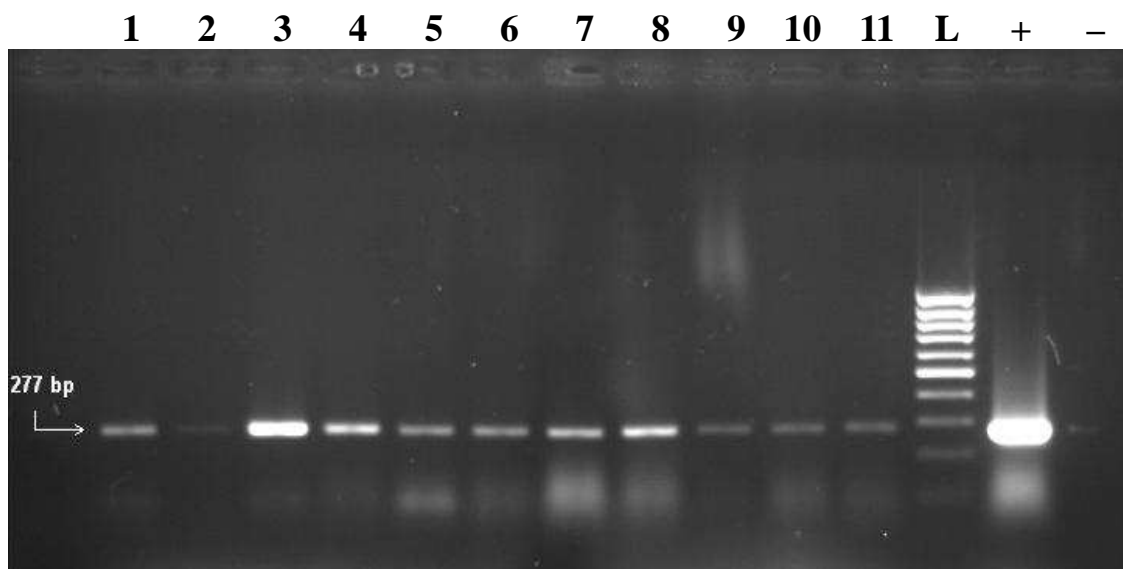


**Graf 10.** Porovnání vzorků s provedenou PCR rozdělených do skupin podle způsobu ošetření. PCR byla celkově provedena ze 161 vzorků izolované DNA.

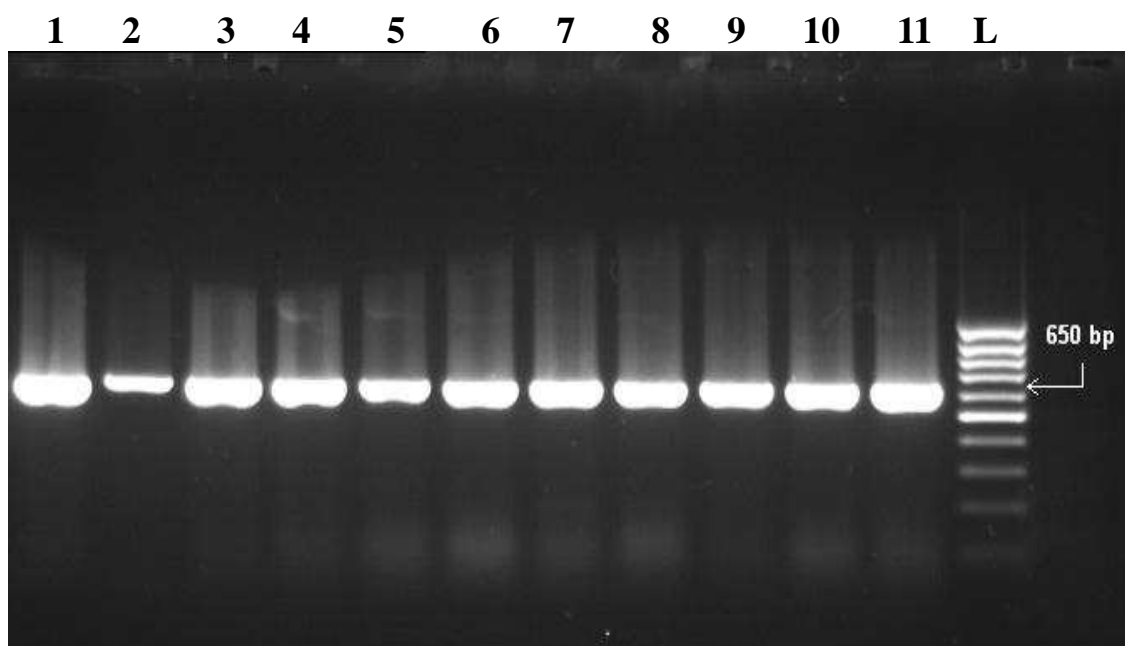
### 8.13 Příloha č. 13 – Výsledky molekulární detekce fúzního transgenu *SPI2:GFP* v rostlinách lnu a vizualizace použitého standartu molekulové hmotnosti



**Obr. 14** Používaný standart molekulové hmotnosti Low Range Ladder MassRuler (Fermentas) o rozsahu 80–1031 bp.



**Obr. 15** Ukázka výsledků molekulární detekce fúzního transgenu *SPI2:GFP*. Byly použity primery Spi-2a-F(R). 1–11: vzorky DNA z pletiv regenerovaných výhonů odvozených v transformačních pokusech; L: low range ladder MassRuler (Fermentas) jako standard molekulové hmotnosti; +: pozitivní kontrola (plazmid); – : negativní kontrola (Master mix bez DNA). Při PCR vzorku DNA č. 2 se nevytvářel produkt očekávané m.h. 277 bp (šipka) a tudíž příslušný výhon nebyl nejspíše transformován (viz také výsledek detekce vnitřní kontroly – genu *FAD3* na obr. 16).



**Obr. 16** Ukázka výsledků molekulární detekce přítomnosti DNA z rostlin vztahující se k předchozímu obrázku. Byly použity primery FAD3A. Očekávané produkty měly m.h. 650 bp (šipka). 1–11: vzorky z izolace DNA z pletiv regenerovaných výhonů odvozených v transformačních pokusech; L: range ladder MassRuler (Fermentas) jako standard molekulové hmotnosti.