

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky



**Ověření metody transformace listových
disků rododendronů**

Bakalářská práce 2009

Vypracovala: Petra Skotnicová
Vedoucí práce: Mgr. Daniela Pavingerová, CSc.

Skotnicová, P., 2009: Ověření metody transformace listových disků rododendronů [Verification of transformation of rhododendron leaf segments. Bc. Thesis, in Czech.] – 36 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

Anotace:

The selection procedure on kanamycin for rhododendron leaf segments of two species after transformation by *Agrobacterium tumefaciens* was examined in this thesis. GUS activity and presence of gene *gus* by polymerase chain reaction (PCR) was determined with plants regenerated on concentration of kanamycin 100 mg/l.

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

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

V Českých Budějovicích 23.4.2009 Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Daniele Pavingerové, CSc. za vedení a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat laborantce Jitce Maškové za všestrannou pomoc v laboratoři, RNDr. Haně Niedermeierové za pomoc při izolaci DNA a PCR a doc. Břízovi za pomoc při fotografování. Velký dík patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu.

1. Úvod	1
1.1. ŠLECHTITELSTVÍ	1
1.2. ŠLECHTĚNÍ RODODENDRONŮ	1
1.3. CÍL PRÁCE	2
2. Literární přehled	3
2.1. ROD <i>RHODODENDRON</i>	3
2.2. REGENERACE <i>IN VITRO</i> U RODODENDRONŮ	4
2.2.1. RŮSTOVÉ LÁTKY	4
2.2.2. MIKROPROPAGACE.....	5
2.2.3. REGENERACE Z LISTOVÝCH DISKŮ	6
2.3. TRANSFORMACE	7
2.3.1. NEPŘÍMÉ TRANSFORMACE	7
2.3.2. DISKOVÁ METODA TRANSFORMACE	8
2.3.3. <i>AGROBACTERIUM</i>	8
2.3.4. TI PLAZMID.....	9
2.3.5. PŘENOS T-DNA	9
2.3.6. PŘÍMÁ TRANSFORMACE	10
2.3.7. TRANSFORMACE RODODENDRONŮ	11
2.4. SELEKČNÍ SYSTÉMY	12
2.5. SIGNÁLNÍ GENY	13
2.5.1. GEN <i>GUS</i>	13
3. Materiál a metodika	14
3.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL	14
3.2. TRANSFORMACE	16
3.2.1. DISKOVÁ METODA TRANSFORMACE	16
3.3. POSTUP SELEKCE	17
3.4. FLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ <i>GUS</i>	18
3.4.1. CHEMIKÁLIE.....	18
3.4.2. PRACOVNÍ POSTUP.....	18
3.5. IZOLACE DNA	19
3.6. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	20
3.6.1. ELEKTROFORÉZA.....	20
4. Výsledky	21
4.1. TRANSFORMACE A NÁSLEDNÁ SELEKCE NA KANAMYCINU	21
4.1.1. TRANSFORMACE ODRŮDY ÁZURO	23
4.1.2. TRANSFORMACE ODRŮDY REBE	24
4.2. ANALÝZA TRANSFORMOVANÝCH ROSTLIN	25
4.2.1. FLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ <i>GUS</i>	25
4.2.2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	26
5. Diskuze	28
6. Závěr	31
7. Použitá literatura	32

1.Úvod

1.1. Šlechtitelství

Počátky šlechtění rostlin sahají pravděpodobně již k začátkům rozvoje zemědělství, kdy lidé cíleně vybírali semena rostlin s lepšími vlastnostmi, např. velikost semen apod. Se vzrůstajícími znalostmi z nejrůznějších oborů se postupně objevovaly i nové metody šlechtění. Přesto zůstává šlechtitelský proces dlouhodobou záležitostí trvajících často deset i více let. Velký pokrok v tomto směru přináší genové inženýrství, které značně urychluje proces šlechtění a umožňuje i rekombinaci DNA nepříbuzných druhů. Při klasickém šlechtění se obvykle kříží rostliny v rámci druhů. Metody genového inženýrství dnes umožňují navodit zcela nové vlastnosti rostlin. U zemědělských plodin se genové inženýrství využívá zejména k navození odolnosti k herbicidům, škůdcům a chorobám. Při šlechtění okrasných rostlin se metody genového inženýrství dále používají i ke změně barvy květů, u řezaných květin k prodloužení jejich životnosti ve váze.

1.2. Šlechtění rododendronů

V přírodě se vyskytuje okolo 1000 původních druhů rododendronů, avšak jen některé mají potřebné vlastnosti pro širší použití v zahradách a parcích. Již téměř 200 let se šlechtitelé snaží o vyšlechtění rododendronů s žádanými vlastnostmi (mrazuvzdornost, nejrůznější barvy květů apod.). Během této doby bylo vyšlechtěno přes 10000 odrůd, avšak jen asi 200 z nich mělo určitou zahradnickou hodnotu. Mezi vyšlechtěné odrůdy patří např. 'Cunningham's White', 'America', 'Nova Zembla', 'Britannia' a mnoho dalších. K rozšíření sortimentu odrůd přispěli i čeští šlechtitelé, např. doc. Dr. B. Kavka odrůdami 'Don Juan', 'Dagmar' nebo Josef Dvořák odrůdami 'Eva' a 'Vilém Heckel'. (Böhm, 2004)

Transformace rododendronů mohou být využity pro změnu barvy květů, morfologických forem nebo pro navození odolnosti ke stresům vnějšího prostředí (Pavingerová, 2000).

1.3. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo ověřit možnost transformace listových disků u dvou vybraných odrůd rododendronu metodou nepřímé transformace pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* s vektorem obsahujícím gen *gus* s intronem a gen *nptII*, navozující rezistenci ke kanamycinu a vybrat vhodný postup selekce. U regenerujících, potenciálně transgenních rostlin ověřit přítomnost vnesených genů pomocí PCR, přítomnost genu *gus* stanovit rovněž fluorimetrickou metodou.

2. Literární přehled

2.1. Rod *Rhododendron*

Rhododendrony čili pěnišníky patří do čeledi vřesovcovitých – *Ericaceae*. Název *Rhododendron* pochází z řečtiny a skládá se ze dvou částí (rhodo – růže, dron - strom), což v překladu znamená růžový strom.

Botanický rod *Rhododendron* se vyznačuje velkou různorodostí. Je známo zhruba 800 - 900 druhů. Jednotlivé druhy se liší např. vzrůstem, najdeme zde keře i stromovité typy. Některé druhy jsou opadavé, další poloopadavé, jiné jsou stálezelené.

Květy rododendronů mají zvonkovitý nebo nálevkovitý tvar a jsou uspořádány na koncích větví. Plodem je tobolka s drobnými semeny. Kvetou převážně na jaře. Rododendrony rostou v přírodě jako součást lesních společenstev, dosti často na samé hranici lesního pásma, hlavně v kyselější humózní půdě. (Böhm, 2004)

Většina rododendronů roste na severní polokouli. Nejvíce druhů se nachází v Číně, na úbočích Himalájí a v přímořských oblastech. Další rostou v severní Asii, Japonsku, Koreji a Malajsii. Z Evropy jsou známé 4 původní volně rostoucí druhy (v Alpách se kupříkladu vyskytují *Rhododendron ferrugineum* a *Rhododendron hirsutum*) a z Austrálie jeden. Oblasti výskytu rododendronů leží především v mírném a chladnějším podnebí, ale i ve vysokých horách, kde teploty klesají až do – 30 °C.

2.2. Regenerace *in vitro* u rododendronů

2.2.1. Růstové látky

Důležitou složkou médií při regeneraci rostlin v *in vitro* podmínkách jsou rostlinné hormony. Z pěti základních skupin rostlinných hormonů (auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a etylén) se využívají hlavně auxiny a cytokininy.

Auxiny

Název auxin pochází z řeckého auxein, což znamená prodlužovat se. Auxiny tedy podporují prodlužování a dělení buněk, způsobují apikální dominanci a podporují zakládání adventivních kořenů (Procházka *et al.*, 1998).

Mezi přírodní auxiny zařazujeme kyselinu indolyl-3-octovou (IAA), kyselinu indolyl-3-máselnou (IBA), fenylloctovou kyselinu (PAA) a 4-chlor-indolylloctovou kyselinu. Existují však také uměle připravované syntetické auxiny jako např. kyselina naftylloctová (NAA) a 2,4-dichlorfenylloctová kyselina (2,4-D).

Cytokininy

Cytokininy jsou N⁶-deriváty adeninu. Svůj název získaly podle své schopnosti stimulace buněčného dělení (cytokinesis), potlačují také apikální dominanci, iniciují tvorbu adventivních pupenů, oddalují senescenci listů aj. (Hess, 1983).

Mezi cytokininy patří například zeatin, který byl prvně izolovaný z kukuřice (*Zea mays*), thidiazuron (TDZ) a isopentyladenin (2iP).

2.2.2. Mikropropagace

Mikropropagace je tradiční způsob vegetativního množení v *in vitro* podmínkách. Tato metoda se u nás začala používat zhruba před 30 lety při množení orchidejí a postupně se rozšířila na celou řadu rostlinných druhů zejména těch, které se klasickými metodami množí obtížně. Množení mikropropagací je mnohem rychlejší než jinými metodami, umožňuje namnožit až desítky tisíc rostlin z jediné původní rostliny (matečnice). Nevýhodou této metody je zejména drahé laboratorní vybavení, provozní náklady a její pracnost (je velmi důležité dbát na sterilitu prostředí). Pro jednotlivé druhy rostlin, které se mikropropagací množí pro komerční účely, jsou vypracovány přesné postupy množení a složení media (Böhm, 2004).

Při mikropropagaci rododendronů se nejčastěji sleduje vliv cytokoninů 2iP a TDZ, případně zeatinu, jejichž účinek se u jednotlivých odrůd často značně liší.

Hsia a Korban (1997) pracovali vliv TDZ a zeatinu na stonkové segmenty odrůdy 'Fuchsia' a 'Hino Crimson'. Jako nejvýhodnější se ukázalo médium s obsahem 2,3 μM TDZ a 2,3 μM zeatinu. Účinné metody mikropropagace popisují i Ettinger a Preece (1985), Norton a Norton (1985).

Pro genetickou transformaci je použití regenerace mikropropagací stonkových segmentů problematické, vzhledem k časté tvorbě chimérických transgenních rostlin vlivem přítomnosti meristematických pletiv (Pavingerová *et al.*, 1997).

2.2.3. Regenerace z listových disků

Iapichino *et al.* (1991) indukovali regeneraci z částí listů použitím média s 22,8 μM IAA a 147,6 μM 2iP u odrůd *R.laetum* a *R.aurigenarum*.

Preece a Imel (1991) zkoumali regeneraci z listových disků u odrůdy 'P.J.M. Hybrids' na médiu s IBA a s různými koncentracemi TDZ nebo 2iP. Explantáty na médiu s obsahem 2iP měly nižší procento přežití, ale byly delší. Nejvíce se osvědčilo po 12 nebo 16 týdnech explantáty z média s TDZ, kde lépe přežívaly a regenerovaly, přendat na médium s 2iP, kde došlo k jejich prodloužení a snáze zakořenily. Zjistili také, že je výhodné předpěstování na médiu obsahujícím 10 μM IBA a 50 μM 2iP po dobu dvou týdnů, před přenesením na kultivační médium s TDZ nebo 2iP, čímž bylo dosaženo přežití více jak 90% explantátů.

Mertens *et al.* (1996) zkoumali působení cytokininů TDZ a zeatinu na regeneraci *Rhododendron simsii* 'Hellmut Vogel' po fázi indukující kalus, při které použili 2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinu (2,4-D) nebo kyselinu naftyloctovou (NAA). Při použití TDZ byl počet regenerujících prýtlů vyšší než u zeatinu, ale byly krátké, tvořily shluky a špatně zakořeňovaly. Se zeatinem byly prýtlky delší než 1 cm a snáze zakořenily. Byla porovnávána i úspěšnost regenerace u různých způsobů stříhání listových disků, kde se jako nejvýhodnější ukázalo přestřížení napůl.

Podle Tomsone a Gertnere (2003) závisí optimální koncentrace TDZ, 2iP a IBA u rododendronů na jejich genotypu a typu explantátu.

2.3. Transformace

2.3.1. Nepřímé transformace

Nepřímé transformace zahrnují transformace pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*. Tato bakterie vnáší do rostlinné buňky část své genetické informace tzv. T-DNA, která obsahuje geny pro nové cesty syntézy auxinů a cytokininů. Zvýšení množství těchto hormonů způsobí proliferaci rostlinných buněk a vznik nádoru.

Při transformaci v laboratorních podmínkách se používají bakterie s upravenou T-DNA, kdy z původní T-DNA zůstávají jen hraniční sekvence, nutné pro přenos, mezi které se vloží další geny (Horsch and Klee, 1986). Upravená T-DNA většinou obsahuje gen pro rezistenci k nějakému antibiotiku (selekční gen) a signální gen, který nám po transformaci umožní rychle ověřit, zda je T-DNA v rostlinné buňce opravdu přítomna.

Metody transformace prodělaly rychlý vývoj. Byly publikovány jednak metody transformace použitelné pro širokou škálu druhů, ale také metody použitelné pouze pro jeden rostlinný druh. Takovým druhem je například *Arabidopsis thaliana*. U této rostliny byla popsána transformace semen (Feldmann a Marks, 1987) a infiltrace (Bechtold *et al.*, 1993), tyto metody jsou u jiných rostlinných druhů nepoužitelné. Byla také prokázána možnost transformace protoplastů jejich kokultivací s bakteriemi rodu *Agrobacterium* (Márton *et al.*, 1979).

Dnes se nejčastěji používá disková metoda transformace, kterou poprvé popsal Horsch *et al.* (1985).

2.3.2. Disková metoda transformace

Disková metoda transformace spočívá v kokultivaci segmentů různých částí rostliny kultivované *in vitro* se suspenzí bakterií *Agrobacterium*. Je nutné nastřížení segmentů vzhledem k tomu, že bakterie *Agrobacterium* reagují na látky vylučované rostlinou při poranění. Bakterie *Agrobacterium* tyto specifické látky rozpozná, což má za následek její přiblížení k rostlinným buňkám chemotaxí a nastartování procesu přenosu T-DNA do rostlinné buňky.

Poté se segmenty přenesou na médium bez antibiotik, kde se ponechají přibližně 24 až 48 hodin, tím se prodlouží doba, během které má bakterie možnost přenosu T-DNA do rostlinné buňky a začlenění T-DNA do rostlinného genomu. Nakonec se segmenty kultivují na agarovém médiu, které obsahuje antibiotikum na eliminaci bakterií (např. timentin, cefotaxime, vancomycin), selekční antibiotikum (např. kanamycin, hygromycin), které dovoluje přežít jen transformovaným buňkám, a dále růstové látky navozující kalogenezi a regeneraci.

2.3.3. *Agrobacterium*

Bakterie rodu *Agrobacterium* jsou gramnegativní půdní bakterie, které jsou schopné předávat část své genové výbavy do rostlinného genomu.

Do rodu *Agrobacterium* se řadí několik druhů, z nichž se při genetických transformacích využívá *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes*.

Za virulenci bakterie *A. tumefaciens*, která způsobuje tvorbu nádorů (crown galls), je zodpovědný plazmid zvaný Ti (Zaenen *et al.*, 1974). U *A. rhizogenes*, které vyvolává intenzivní tvorbu kořenů (hairy roots), je to plazmid nazývaný Ri (Chilton *et al.*, 1982).

2.3.4. Ti plazmid

Velikost Ti plazmidu se pohybuje v rozmezí 150-200 kb. Ti plazmid obsahuje několik úseků. Pro přenos do rostlin jsou nejdůležitější dva – T-DNA a vir oblast.

T-DNA (transferred DNA)

Délka T-DNA bývá v závislosti na typu plazmidu 15-45 kb. Tato část plazmidu je přenášena do rostlinné buňky, přestože sama nemá žádné geny pro vlastní integraci. Bakterie s nezměněnou T-DNA vkládají do rostlinných buněk genetickou informaci pro syntézu látek (opinů), které jim poté slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie, a geny pro růstové látky pomocí nových biosyntetických dráh auxinů a cytokininů (Ondřej a Drobník, 2002).

Úsek virulence

Úsek virulence má 35 kb. Skládá se nejméně ze šesti operonů (vir A, vir B, vir C, vir D, vir E, vir G), které kódují okolo 20 polypeptidů. Tyto polypeptidy sehrávají přesně vymezené funkce při oddělení T-DNA z plazmidu a jejím přenosu do rostlinných buněk (Ondřej a Drobník, 2002).

2.3.5. Přenos T-DNA

Přenos T-DNA je indukován fenolickými látkami typu acetosyringonu, které produkují poraněné buňky většiny dvouděložných. Tyto látky rozpoznané specifickými receptory vyvolají přiblížení bakterií a jejich připojení k poškozeným buněčným stěnám. Proces navázání bakterie *Agrobacterium* na rostlinou buňku zprostředkovávají proteiny kódované geny *chvA*, *chvB*, *pscA*, které se účastní zejména syntézy a vylučování β -1,2-glukanu (Iannino a Ugalde, 1989). Postupně jsou aktivovány geny vir regionu zodpovědné za oddělení a přenos T-DNA.

Nejprve vzniká pomocí endonukleáz kódovaných geny *virD* zlom v pravé hraniční sekvenci dolního vlákna T-DNA, poté dochází k jeho odkrucování, které je ukončeno v levé hraniční sekvenci (Yanofsky *et al.*, 1986; Jayaswal *et al.*, 1987). Vytvoří se T-komplex složený z T-DNA a *virD2* proteinu, který je připojen na 5' konci T-DNA (Young a Nester, 1988; Howard *et al.*, 1989), a *virE2* proteinů, které obalují jednořetězcovou T-DNA a chrání ji před nukleázami rostlinné buňky (Christie *et al.*, 1988). Přenos T-komplexu do rostlinné buňky podmiňuje další komplex proteinů - produkty *virB* a *virD4* (Vergunst *et al.*, 2000). Do jádra se T-komplex dostane pomocí proteinu D2, který funguje jako signál pro lokalizaci do jádra (Herrera-Estrella *et al.*, 1990). T-DNA se nakonec integruje do genomu (často v místech bohatých na AT).

2.3.6. Přímá transformace

Vzhledem k tomu, že citlivost jednotlivých druhů rostlin k bakteriím rodu *Agrobacterium* se značně liší (často i v rámci rostlin jednoho rodu), byly vyvinuty metody bez použití bakterie *Agrobacterium*, tzv. přímé transformace, při kterých je do buněk vpravována přímo DNA, nejčastěji plazmidová.

Metody přímé transformace se používají především u rostlinných protoplastů. Mezi tyto metody patří např. přidání polyethylenglykolu (PEGu) do roztoku DNA a protoplastů, který vyvolá shlukování buněk a změny v membráně, nebo elektroporace, při které se pomocí stejnosměrného proudu vytváří v membráně reversibilní póry (Fromm, 1985). Tyto póry v obou případech umožní průnik DNA do rostlin.

Mezi méně používané metody se řadí lipozómy, což jsou lipidové kapénky s roztokem DNA (Ahokas, 1987), a případně mikroinjekce, kdy je DNA vnášena přímo do jádra za pomoci mikromanipulátoru (Neuhaus a Spangenberg, 1990).

Pro přímou transformaci rostlinných pletiv lze použít metodu mikroprojektilů (Klein *et al.*, 1992). Při této metodě se do pletiva vstřelují kuličky z inertních kovů (zlato, wolfram) o velikosti 0,6-2 μm , obalené plazmidovou DNA.

2.3.7. Transformace rododendronů

Úspěšná transformace rododendronů se doposud podařila v několika málo případech. Jako první úspěšně transformovali rododendrony Pavingerová *et al.* (1995). Transformaci provedli na 5 kultivarech a to: 'America', 'Catawbiense grandiflorum roseum', 'Madame Carvalho', 'Mars' a 'Nova Zembla'. Vnášeli do těchto kultivarů gen *gus* a *nptII* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

Dále úspěšně transformovali rododendrony Ueno *et al.* (1996), pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vpravili do rododendronů odrůdy 'Percy Wiseman' gen *nptII* a gen *gus*, byla dosažena 5% úspěšnost transformace. Při použití *A. tumefaciens* však někdy dochází k různým stupňům chimérismu získaných rostlin (Pavingerová *et al.*, 1997) a citlivost k agrobakteriu se u jednotlivých kultivarů někdy značně liší (Tripepi *et al.*, 1999).

Dunemann *et al.* (2002) vnesli pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* do několika kultivarů rododendronů geny *rolABC* a gen pro enzym železito-chelátovou reductázu (*Fro2*). Transformace byla provedena u *R. caucasicum*, *R. ponticum* a *R. fortunei* a transformace s genem *Fro2* také u kultivaru 'Cunningham's White'. Úspěšnost transformace se pohybovala mezi 1-2%.

U rododendronů byly provedeny i přímé transformace pomocí mikroprojektilů, doposud s nepříliš vysokou úspěšností. Hsia a Korban (1998) získali tranzientní GUS expresi, ale nepodařilo se jim regenerovat rostliny. Knapp *et al.* (2001) uvádí úspěšnost 0,2%. Autoři toto nízké procento vysvětlují možným špatným průnikem částic zlata do buněk, velkým množstvím odumřelých buněk anebo možností, že tkáň listů degraduje exogenní DNA.

2.4. Selekční systémy

Selekční transgeny jsou geny, které navozují rezistenci k nějaké látce nebo antibiotiku. Transformované rostliny obsahující selekční gen jsou schopné růst i na vyšších koncentracích této látky, netransformované rostliny nikoli. Pokud netransformované buňky po působení selekční látky odumírají, jedná se o selekci negativní, pokud selekční gen poskytuje transformovaným buňkám jen metabolickou výhodu a netransformované buňky neodumírají, ale pouze je zpomalen jejich růst, mluvíme o selekci pozitivní (Joersbo a Okkels, 1996).

Látka, ke které vnášíme do rostliny rezistenci je přidávána do agarového média nebo je používána jako postřik.

Nejčastěji používaným selekčním genem při negativní transformaci je gen *nptII* (Fraleley *et al.*, 1986), který navozuje rezistenci ke kanamycinu, neomycinu, paramomycinu. Tento gen kóduje neomycinfosfottransferázu II, díky které dokáží transformované buňky antibiotikum inaktivovat fosforylací. Dalším často používaným selekčním genem je gen *hpt*, který způsobuje rezistenci k hygromycinu (Cullen *et al.*, 1991). Toto antibiotikum blokuje proteosyntézu u prokaryot i eukaryot.

Příkladem pozitivní selekce je selekce na manóze, kdy se do rostlin integruje gen *manA* (Joersbo *et al.*, 1998). Manóza je v rostlinách fosforylována na manózo-6-fosfát, který ale není dále metabolizován, hromadí se v buňkách a inhibuje růst rostliny. Rostliny transformované genem *manA* však dokáží přeměnit manózo-6-fosfát na fruktózo-6-fosfát, který se začleňuje do metabolismu rostliny. Podobně je to i u selekce na xyloze (Haldrup *et al.*, 1998).

2.5. Signální geny

Signální geny jsou transgeny, jejichž expresi můžeme snadno detekovat a kvantitativně stanovit. Jsou vždy chimérické, to znamená, že úseky DNA pocházejí z různých genomů a většinou obsahují regulační sekvence pro projev v rostlinném genomu. Kódující sekvence je bakteriálního nebo živočišného původu (Ondřej a Drobník, 2002). Nejčastěji se používá gen *gus* pro enzym β -glukuronidázu (Jefferson *et al.*, 1987) anebo gen *gfp* z medúzy *Aequorea Victoria* (Chalfie *et al.*, 1994), který jako jediný známý protein fluoreskuje bez přidání substrátů nebo kofaktorů. Méně často se používá gen pro luciferázu (Ow *et al.*, 1986).

2.5.1. Gen *gus*

Gen *gus* pochází z *E.coli*. Kóduje enzym β -glukuronidázu, což je kyselá hydroláza, která je teplotně stabilní, odolná proti proteázám a funguje v širokém rozmezí pH. Mění snadno dostupné substráty na modře zbarvené nebo fluoreskující látky.

Její výhodou je, že se nenachází v rostlinách ani houbách a u obratlovců má velmi slabou aktivitu a nemůže tak ovlivnit stanovení v transgenních rostlinách. Nevýhodou může být určitá nespecifická aktivita některých rostlinných pletiv.

Používají se dvě metody stanovení:

Fluorimetrické stanovení: Jako substrát slouží 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG), který je účinkem β -glukuronidázy rozštěpen na β -glukuronid a 4-methylumbelliferon (MU). Reakce se zastaví přidáním alkalického roztoku sody, který zároveň umožní ionizaci hydroxyly MU nutnou pro fluorescenci. Po ozáření dlouhovlnným UV-zářením (365 nm) je emitováno záření o vlnové délce 455 nm (modře fluoreskuje).

Histochemické stanovení: Při této metodě se jako substrát používá 5-brom-4-chlor-3-indolylglukuronid (X-gluc). Enzym odštěpuje ze substrátu indol, který oxiduje na modrý nerozpustný derivát indiga.

3. Materiál a metodika

3.1. Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pochází z Výzkumného ústavu Sylva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích.

Pro transformace jsem použila odrůdy Azuro a Rebe udržované v *in vitro* kultuře.

Obr. 1 Azuro



Obr. 2 Rebe



Tento materiál jsem množila pomocí stonkových segmentů na Andersonově médiu (Anderson, 1984). K jeho přípravě jsem používala 2 g/l práškového Andersonova médium s vitamíny od firmy Duchefa (Tab. 1) doplněného o 2 g/l polyvinylpyrrolidonu K30 (Fluka),

30 g/l sacharosu (Penta), 8 g/l agaru a růstové látky. Všechny složky média s výjimkou růstových látek (případně antibiotik) jsem smíchala, upravila pH pomocí KOH na 5,2 a médium vysterilizovala 30 minut v tlakovém hrnci. Po vysterilizování jsem médium za stálého míchání zchladila na 60 °C a ve flowboxu do média přidala sterilní roztoky růstových látek. U média, na kterém byly pěstovány zásobní kultury rododendronů, to bylo 8 ml/l 2iP a 1 mg/l IAA. Médium jsem poté rozlila do kultivačních nádob a skladovala v chladicím boxu.

Tab. 1 Složení Andersonova média

Makroprvky	mg/l
CaCl ₂	332,02
KNO ₃	480
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	400
NaH ₂ PO ₄	330,6
Mikroprvky	
CoC ₁₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	73,4
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,3
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Vitamíny	
Adenin hemisulfát	80
Myo-inositol	100
Thiamin HCl	0,4

Rostlinný materiál byl pěstován na Andersonově médiu při teplotě 23°C, fotoperiodě 16 hodin a intenzitě osvětlení 90 μmol/m²/s.

3.2. Transformace

Pro transformaci jsem používala bakterie *A. tumefaciens* s plazmidem p35SGUSint (Vancanneyt *et al.*, 1990), který obsahuje 35S CaMV promotor, gen *nptII* a gen *gus* s intronem, který zabraňuje expresi genu v těchto bakteriích.

3.2.1. Disková metoda transformace

10 ml přes noc narostlé suspenze bakterií jsem centrifugovala 2 minuty při 10 000 ot./min. Supernatant jsem odstranila a sediment roztřepala ve stejném objemu 10mM MgSO₄ pomocí vortexu. Bakteriální suspenzi jsem přelila do sterilní Petriho misky o průměru 12 cm.

Ve flowboxu jsem do Petriho misky s bakteriální suspenzí nastříhala lístky rododendronů, větší jsem rozstříhla na polovinu, menší lístky jsem pouze nastříhla, abych zajistila poranění nutné pro transformaci. Lístky jsem kokultivovala s bakteriemi 20-30 minut a pak jsem je na 24 hodin přenesla na MS médium bez antibiotik (Murashige a Skoog, 1962), které bylo připraveno z práškového média od firmy Duchefa (2 g/l). Nakonec jsem lístky přendala na misky s Andersonovým médiem doplněným růstovými látkami, různou koncentrací selekčního antibiotika kanamycinu (viz 3.3.) a 400 mg/l timentinu, pro eliminaci agrobakteria. Koncentrace použitých růstových látek je popsána v kapitole 3.3..

3.3. Postup selekce

Abych ověřila nejvýhodnější postup selekce, ovlivňovala jsem listové disky po transformaci různou koncentrací kanamycinu podle schématu v Tab 2.

Tab.2 Postup selekce listových disků po transformaci

Varianta	Po transformaci přendáno na médium s Km o koncentraci	Zde ponecháno	Poté přendáno na médium s Km o koncentraci
1	40 mg/l	až do regenerace	
2A	20 mg/l	2 týdny	40 mg/l
2B	20 mg/l	4 týdny	40 mg/l
2C	20 mg/l	6 týdnů	40 mg/l
3	30 mg/l	až do regenerace	
4A	20 mg/l	2 týdny	30 mg/l
4B	20 mg/l	4 týdny	30 mg/l
4C	20 mg/l	6 týdnů	30 mg/l

Listové disky regenerující na Km 30 a 40 mg/l jsem pasážovala na médium s koncentrací kanamycinu 100 mg/l.

Při počátečních fázích, kdy selekce probíhala na nižších koncentracích kanamycinu (20-40 mg/l) jsem disky pěstovala na Andersonově médiu s přidavkem 2 mg/l IAA a 0,2 mg/l TDZ. Toto médium bylo vybráno na základě bakalářské práce F. Musila (2006), kde bylo označováno jako varianta RD 5/1. Později při selekci na koncentraci kanamycinu 100 mg/l jsem používala Andersonovo médium, do kterého jsem přidala 8 ml/l 2iP a 1 mg/l IAA.

3.4. Fluorimetrické stanovení GUS

3.4.1. Chemikálie

- 1) Extrakční pufr (GUS pufr):
 - 50 mM Na-fosfátový pufr, pH = 7
 - 10 mM merkptoetanol
 - 1 mM Na₂EDTA
 - 0,1% Tritol X-100
 - 0,1% laurylsarkosin
- 2) Substrát MUG (4-methyl-umbelliferyl-β-D-glukuronid)
 - 2 mg MUG v 5 ml GUS pufru
- 3) Stop-pufr: 0,2 M Na₂CO₃

3.4.2. Pracovní postup

Z každé rostliny jsem odvážíla přibližně 25 mg listů, které jsem pak zhomogenizovala v homogenizátoru společně s 500 μl extrakčního pufru. Vzniklý homogenát jsem přelila do mikrozkušavek a centrifugovala 2 minuty při 13000 ot./min.. 30 μl supernatantu jsem přidala do mikrozkušavky s 300 μl substrátu MUG předeštěného v termostatu na 37 °C a promíchala. Z této směsi jsem odebrala 100 μl a přidala je do mikrozkušavky s 900 μl stop-pufru a promíchala. Tento odběr jsem si označila jako čas 0. Odběr jsem opakovala po 30 a 240 minutách (100 μl směsi supernatant-substrát + 900 μl stop-pufru). Mezi jednotlivými odběry jsem vzorky inkubovala v termostatu při 37 °C. Fluorescenci vzorků ve stop-pufru v jednotlivých časech jsem měřila na DYNAQUANT fluorimetru. Aktivitu enzymu β-glukuronidázy jsem vypočetla v pmol MU/min/mg listu podle vzorce:

Aktivita = č.h. x 55 x 0,1 / č.hm. / min.

č.h. = čtená hodnota pro daný čas minus čtená hodnota v čase 0

55 = použitá ředění (500/30 x 330/100)

0,1 = 1 nM MU (vzniká působením β-glukuronidázy na substrát MUG) odpovídá 10
čteným dílkům

č.hm. = čerstvá hmotnost v gramech

min. = délka inkubace v minutách

3.5. Izolace DNA

Ze 100 mg listů jsem izolovala DNA pomocí GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma. Postupovala jsem podle návodu, pouze jsem při drcení přidala ke 100 mg listů 0,07 g polyvinylpyrrolidonu K30 (PVP).

Získané vzorky DNA jsem poté přečistila fenolem. K 100 µl vzorku jsem přidala 10 µl 3M NaAc a 100 µl fenolu. Řádně jsem vše promíchala pomocí vortexu a poté 3 minuty centrifugovala při maximálních otáčkách. Mezi tekutinami vzniklo zřetelné rozhraní. Do nové mikroskopické zkumavky jsem odpipetovala horní vrstvu. Poté jsem 2 krát provedla přečištění chloroformem tak, že jsem přidala do mikroskopické zkumavky s roztokem DNA 100 µl chloroformu, opět rozmíchala pomocí vortexu, centrifugovala 3 minuty a odpipetovala jsem i tentokrát horní vrstvu. Poté jsem přidala množství NH₄Ac odpovídající 20 % získané vodní fáze. Poté jsem přidala trojnásobek celkového objemu (tedy vodní fáze a NH₄Ac) 100 % Merck EtOH a ponechala vše jeden den při -70 °C. Druhý den jsem směs v mikroskopických zkumavkách centrifugovala 7 minut při maximální rychlosti. Vylila jsem supernatant, ještě jednou krátce centrifugovala a pak jsem odpipetovala zbylou tekutinu. Mikroskopické zkumavky jsem nechala asi 10-15 minut vyschnout a následně jsem vyschlou usazeninu rozpustila v 20 µl sterilní destilované vody.

3.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro stanovení přítomnosti genu *gus* pro enzym β -glukuronidázu jsem použila primery GUS1 (5'- TCG ATG CGG TCA CTC ATT AC - 3') a GUS2 (5'- CCA CGG TGA TAT CGT CCA C - 3'), které naamplifikovaly 495 bp dlouhý fragment, který se skládá z částí genu *gus* (pozice nukleotidů 263 – 385 a 575 – 757) a intronu (pozice nukleotidů 386 - 574)

Připravila jsem si Master mix :

- 79,5 % sterilní destilované vody
- 10 % PCR pufru (složení?)
- 8 % dNTP
- 1 % primeru 1 – GUS 1
- 1 % primeru 2 – GUS 2
- 0,5 % Taq polymeráza (Takara)

Napipetovala jsem do mikrozkušavek vždy 24 μ l Master mixu a přidala 1 μ l vhodně zředěné vyizolované DNA.

PCR probíhala v přístroji XP cycler od firmy BIOER. Počet reakčních cyklů byl 35. Každý cyklus se skládal z fáze denaturace (94 °C, 45s), navázání primerů (55 °C, 30s) a syntézy DNA (72 °C, 2 min.).

3.6.1. Elektroforéza

Vzorky jsem po PCR rozdělila pomocí elektroforézy. Gel jsem připravila z 20 ml 10x koncentrovaného zásobního roztoku TBE (85,1 g/l práškového pufru od firmy Duchefa, pH 8,3), 180 ml destilované vody a 2 g agarosu (SERVA). Agarosu jsem rozvařila 3 minuty v mikrovlnné troubě a po zchlazení na zhruba 60 °C jsem přidala 20 μ l ethidium bromidu ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/l, promíchala, nalila do elektroforézové vany a nechala zhruba 1 hodinu tuhnout. Pufř, ve kterém elektroforéza probíhala, jsem připravila smícháním 50 ml 10x koncentrovaného TBE s 450 ml destilované vody. Do každé jamky gelu jsem nanesla 20 μ l vzorku smíchaného s 3 μ l vkladacího pufru značky Takara. Pro odečtení velikosti fragmentů jsem použila 7 μ l 100 bp DNA ladderu (BioLabs). Elektroforéza probíhala zhruba 45-50 minut při 110 V. Odečtení výsledků jsem provedla pomocí UV transiluminátoru od firmy Vilber Lourmat a poté vyfotografovala.

4. Výsledky

4.1. Transformace a následná selekce na kanamycinu

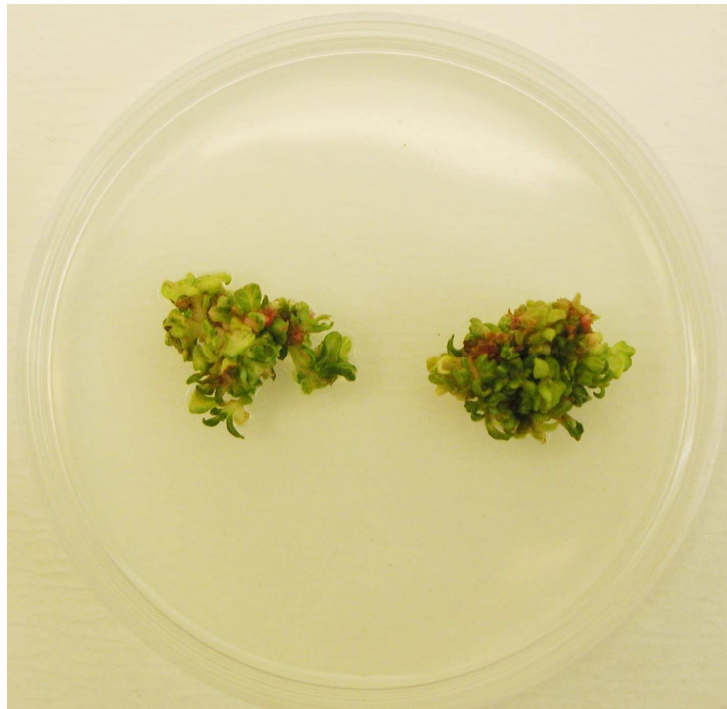
U každé z odrůd (Azuro, Rebe) jsem provedla 2 transformace bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* nesoucími plazmid p35GUSint. Celkem jsem provedla transformaci 220 listových disků odrůdy Azuro, u odrůdy Rebe jsem transformovala 245 listových disků. Optická denzita suspenze bakterií byla u všech transformací zhruba 1,6. Délka transformace byla 20-30 minut.

U obou odrůd jsem pěstovala 40 netransformovaných listových disků na Andersonově médiu s přidavkem 2 mg/l IAA a 0,2 mg/l TDZ jako kontrolu. Transformované listové disky jsem pěstovala na stejném médiu s přidavkem 20-40 mg/l kanamycinu (podle postupu selekce – Tab. 2) a 400 mg/l timentinu, který měl zabránit přerůstání bakterií.

Regenerující listové disky obou odrůd byly přendány na Andersonovo médium s koncentrací kanamycinu 100 mg/l. V tomto médiu byl změněn obsah růstových látek vzhledem k tomu, že na Andersonově médiu s přidavkem TDZ sice listové disky dobře regenerovaly, ale prýty byly krátké a vytvářely shluky (Obr. 3). Při selekci na Km 100 se do Andersonova média přidávalo 1 mg/l IAA a 8 ml/l 2iP. Na tomto médiu došlo k prodloužení prýtů.

Při regeneraci na médiu s TDZ a koncentrací kanamycinu 30 nebo 40 mg/l tvořily regenerující disky obou odrůd shluky krátkých prýtů, které byly často chimérické povahy, což se projevilo odumřením částí těchto shluků po přenesení na médium s koncentrací kanamycinu 100 mg/l. Na médiu s 2iP a koncentrací kanamycinu 100 mg/l došlo k prodloužení prýtů, ty pak byly odděleny a pěstovány samostatně na Km 100 (Obr. 4).

Obr. 3 Odrůda Azuro, regenerující listové disky na Km 40, varianta 2B



Obr. 4 Odrůda Azuro varianta 4B na Km 100 (rostlina č. 4)



4.1.1. Transformace odrůdy Azuro

U transformovaných listových disků se po 2-4 týdnech po transformaci začaly objevovat kalusy a po dalších zhruba 2 týdnech docházelo u některých variant k regeneraci. U kontrolních netransformovaných listových disků docházelo k tvorbě kalusu a regeneraci o několik dní dříve.

U této odrůdy se objevily problémy s přerůstáním bakterií, zejména u transformovaných disků, které měly být přendány po 6 týdnech z Km 20 na vyšší koncentraci kanamycinu. Zde došlo zhruba v 5. týdnu k přerůstání bakterií na všech miskách a díky tomu zcela chybí selekční varianta 2C. Rovněž u varianty 4C zůstalo podstatně méně listových disků než u ostatních variant (Tab. 3).

V tabulce 3 jsou proto uvedeny počty listových disků, které zůstaly z původně 220 transformovaných. Tvorba kalusů a regenerace byly v konečné fázi sledovány u 89 listových disků. U některých disků se nevytvořil kalus, ale došlo rovnou k regeneraci. Nejlepší z hlediska počtu regenerujících disků se ukázala být varianta 4B. U této varianty je také nejvyšší počet rostlin regenerujících na médiu s koncentrací kanamycinu 100 mg/l.

Tab. 3 Tvorba kalusů a regenerace u transformovaných listových disků odrůdy Azuro

Varianta selekce	Počet listových disků	Počet l. disků tvořících kalusy	Počet regenerujících listových disků	Počet rostlin regener. na Km 100
1)	10	1	0	0
2A)	17	0	2	13
2B)	10	5	4	20
3)	10	6	4	0
4A)	22	9	7	24
4B)	15	3	8	43
4C)	5	0	3	0

4.1.2. Transformace odrůdy Rebe

U transformovaných listových disků odrůdy Rebe se kalusy začaly tvořit spíše až kolem 4. týdne, první regenerace se sice objevila již v šestém týdnu, ale jen výjimečně. U některých listových disků se objevila regenerace až po 4 měsících. U kontrolních netransformovaných listových disků dochází k regeneraci mezi 6-8 týdnem.

V porovnání s odrůdou Azuro bylo u odrůdy Rebe množství odumřelých listových disků po transformaci výrazně vyšší, k tvorbě kalusů a regeneracím docházelo u menšího počtu disků, později a také růst regenerujících rostlinek byl pomalejší (Tab. 4).

K přerůstání bakterií docházelo v podstatně menší míře než u odrůdy Azuro.

V tabulce 4 jsou uvedeny počty listových disků, které přežily z původně 245 transformovaných. Tvorba kalusů a regenerace byly tedy sledovány u 64 listových disků. U některých listových disků chybí stádium kalusu a rovnou došlo k regeneraci. Nejvíce regenerujících disků bylo opět u varianty 4B.

Tab. 4 Tvorba kalusů a regenerace u transformovaných listových disků odrůdy Rebe

Varianta selekce	Počet listových disků	Počet listových disků tvořících kalusy	Počet regenerujících listových disků
1)	6	6	3
2A)	14	1	2
2B)	4	1	1
2C)	4	4	0
3)	7	3	0
4A)	13	6	2
4B)	10	1	4
4C)	6	0	0

Doposud jsem získala u této odrůdy 1 rostlinu z varianty 4A a 2 rostliny z varianty 4B regenerující na Andersonově médiu s koncentrací kanamycinu 100 mg/l. U variant 1 a 4B regenerují na Km 100 prozatím shluky krátkých prýtlů. Jakmile dojde k jejich prodloužení, budou odděleny a samostatně kultivovány.

4.2. Analýza transformovaných rostlin

4.2.1. Fluorimetrické stanovení GUS

U rostlin, regenerujících na médiu s koncentrací kanamycinu 100 mg/l, ze kterých bylo možné odebrat dostatečné množství listů, jsem stanovila aktivitu enzymu β -glukuronidázy. Fluorimetrické stanovení jsem mohla provést pouze u rostlin odrůdy Azuro, rostliny odrůdy Rebe nenarostly dostatečně, aby mohlo být odebráno potřebné množství listů (25 mg).

Z 15 rostlin, u kterých jsem provedla fluorimetrické stanovení GUS, byla u dvou rostlin naměřena poměrně vysoká aktivita β -glukuronidázy a u pěti dalších byla mírně zvýšená (pmol MU/min/mg listu v rozmezí hodnot 2-3,5). Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 5.

Tab. 5 Výsledky aktivity β -glukuronidázy u rostlin odrůdy Azuro rostoucích na Km 100

Označení rostliny	Varianta selekce	pmol MU/min/mg listu
1 – kontrola		1,45
2	4A	1,52
3	4B	1,65
4	4B	56,92
5	4B	2,01
6	4B	2,09
7	4B	2,00
8	4B	2,31
9	4A	3,34
10	4B	1,52
11	4B	0,78
12	4B	1,30
13	4B	1,65
14	4A	1,63
15	4B	0,59
17	4B	38,95

4.2.2. Polymerázová řetězová reakce

U rostlin odrůdy Rebe nebylo dost rostlinného materiálu k izolaci DNA. U odrůdy Azuro jsem z 15 rostlin a kontroly izolovala DNA. Koncentrace získané DNA byla přibližně 0,02 µg/µl. Poté jsem vzorky přečistila fenolem a analyzovala na přítomnost genu *gus*.

U rododendronů je často PCR inhibována nečistotami v izolované DNA, proto je důkaz přítomnosti genů v mnoha případech značně obtížný. Při PCR nepřečištěné DNA nebyl potvrzen žádný pozitivní výsledek, proto jsem vzorky přečistila fenolem a hledala jsem nejvhodnější ředění DNA nejprve u rostlin 2 a 4. Rostlina 4 byla vybrána vzhledem k vysoké naměřené aktivitě β-glukuronidázy (Tab. 5), rostlina 2 byla vybrána díky výborné regeneraci na Km 100, přestože hodnota aktivity β-glukuronidázy byla zhruba stejná jako u kontrolní netransformované rostliny. U rostliny 17, u které byla také zjištěna vysoká hodnota aktivity β-glukuronidázy, nebyl doposud nashromážděn dostatek materiálu pro izolaci DNA a následné provedení PCR.

Při PCR jsem použila 2 pozitivní kontroly. Jednak plazmidovou DNA agrobakteria, se kterým jsem transformovala, jednak DNA z transgenního rododendronu, u kterého byla přítomnost genu *gus* ověřena v práci Pavingerové *et al.* (1997).

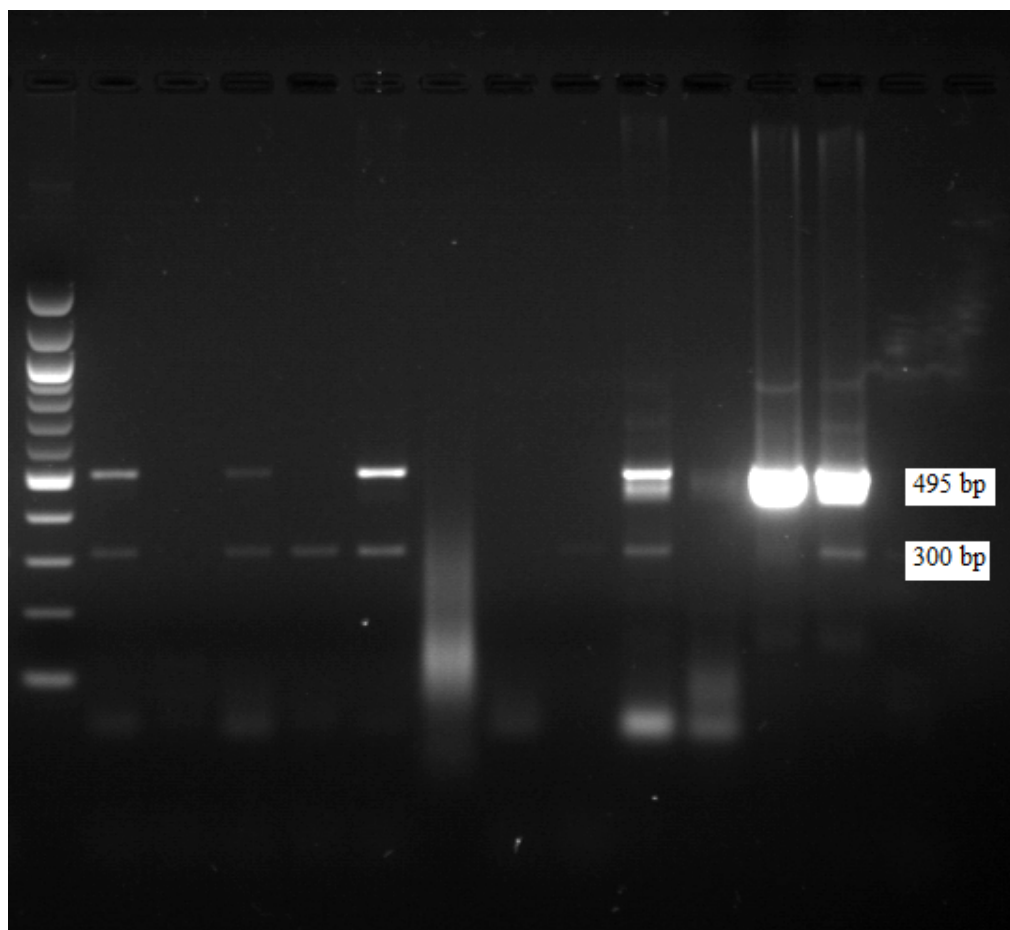
U rostlin 2 a 4 jsem získala při PCR pozitivní reakci (Obr. 5), a to zejména u ředění 10 krát. Když jsem toto ředění použila u vzorků DNA ostatních rostlin, nepodařilo se mi získat pozitivní výsledek. Bude proto nutné nalézt vhodné ředění, což si však vyžádá více času.

Hledaný fragment má velikost 495 bp. Fragment o velikosti 300 bp odpovídá velikosti genu *gus* bez intronu. Tento gen je přítomen v *E. coli*, ze které je připravována Taq polymeráza (Takara), kterou jsem při PCR používala.

Obr. 5 Detekce genu *gus* pomocí PCR u dvou rostlin odrůdy Azuro rostoucích na Km 100.

Při reakci se amplifikoval fragment dlouhý 495 bp.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Dráhy: 1 – standard molekulové hmotnosti (100 bp leader), 2-5 - rostlina číslo 2 (ředění 10x, 100x, 1000x, 10000x), 6-9 – rostlina číslo 4 (ředění 10x, 100x, 1000x, 10000x), 10,11 – pozitivní kontrola (transgenní rododendron s genem *gus*) ředění 10x a 100x, 12,13 – *Agrobacterium tumefaciens* (pozitivní kontrola), 14 – Master mix bez DNA

5. Diskuze

Ve své práci jsem použila metodu transformace listových disků pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* u dvou odrůd rododendronů - Azuro a Rebe. Sledovala jsem vliv koncentrace selekčního antibiotika kanamycinu na tvorbu kalusů a regeneraci u transformovaných listových disků během prvních měsíců po transformaci. Regenerující listové disky jsem následně pěstovala na Andersonově médiu s koncentrací kanamycinu 100 mg/l a u rostlin regenerujících i na tomto médiu jsem ověřovala přítomnost vnesených genů pomocí fluorimetrického stanovení GUS a pomocí PCR.

Předpokladem pro transformaci listových disků je zvládnutí regenerace listových disků u použitých odrůd vzhledem k tomu, že se optimální koncentrace růstových látek u jednotlivých odrůd často značně liší. V minulosti byla publikovány spíše práce týkající se mikropropagace rododendronů z meristemických pletiv, její využití při transformaci však není vhodné vzhledem k výskytu chimérismu a ztrátě vnesených genů (Pavingerová *et al.*, 1997).

Vlivem různých růstových látek na regeneraci listových disků a zjišťováním nejvhodnější koncentrace těchto látek se zabývali například Tomsone a Gertnere (2003), kteří zkoumali vliv různých kombinací koncentrací IBA, 2iP a TDZ. Hsia a Korban (1998) zjišťovali optimální koncentraci TDZ a IAA a Iapichino *et al.* (1991) určovali nejvhodnější koncentraci IAA a 2iP pro regeneraci.

Jak zjistili ve své práci Mertens *et al.* (1996), listy rododendronů kultivované na médiu s TDZ dobře regenerovaly, avšak měly krátké prýty a tvořily shluky. Naopak listy pěstované na 2iP sice hůře regenerovaly, ale měly delší prýty. Jako vhodné řešení se ukázalo po kultivaci na médiu s TDZ přenesení na médium s 2iP, kde došlo k elongaci prýtů (Preece a Imel, 1991).

Vliv 2iP a TDZ na regeneraci listových disků řady odrůd rododendronů byl podrobně rozpracován také v bakalářských pracích Musil (2006) a Stárková (2006) a v publikaci Pavingerová a Novotná (v tisku). Z těchto poznatků jsem vycházela při volbě optimální kombinace a koncentrace růstových látek pro odrůdy Azuro a Rebe, což bylo Andersonovo médium s obsahem 2 mg/l IAA a 0,2 g/l TDZ. V pozdější fázi při selekci rostlin na koncentraci kanamycinu 100 mg/l jsem přidávala do média 8 ml/l 2iP a 1 mg/l IAA. Potvrdila jsem, že cytokinin 2iP ovlivňuje prodloužení regenerujících prýtů.

Selekci listových disků po transformaci jsem prováděla na různých koncentracích antibiotika kanamycinu, které jsem během kultivace postupně zvyšovala. Nejlépe se osvědčilo

pěstovat listové disky 4 týdny na médiu s 20 mg/l kanamycinu a poté je přendat na médium s 30 mg/l kanamycinu (varianta 4B – kapitola 3.3.), poměrně dobré výsledky byly i u varianty 4A, kdy došlo k přendání z média s 20 mg/l na médium s 30 mg/l kanamycinu již po dvou týdnech.

U odrůdy Rebe docházelo k regeneraci často až po delší době a u menšího počtu listových disků, také růst regenerujících rostlin byl mnohem pomalejší než u odrůdy Azuro a díky tomu nebylo zatím z žádné z regenerujících rostlin získáno dostatečné množství materiálu pro provedení fluorimetrického stanovení GUS nebo izolaci DNA nutnou pro PCR. Vzhledem k tomu, že kontrola regenerovala dříve než transformované disky, mohlo by to svědčit o inhibičním vlivu kanamycinu a bylo by proto vhodné vyzkoušet i jiné selekční látky.

Odrůda Azuro regenerovala velmi dobře, problémem však bylo poměrně časté přerůstání bakterií. Vzhledem k tomu, že se přerůstání nejčastěji objevovalo u listových disků, které byly na médiu déle než 4 týdny, bylo by ho možné omezit častější kontrolou a přesazením nezasažených listových disků nebo také častějším přenášením na nové médium během několika prvních měsíců. Bylo by možné také vyzkoušet vyšší koncentrace použitého antibiotika (timentin) , případně jiné antibiotikum pro eliminaci agrobakteria. U toho by ale bylo nutné předem ověřit případný inhibiční efekt na regeneraci.

Pouze u odrůdy Azuro u rostlin z variant 4A a 4B regenerujících na koncentraci kanamycinu 100 mg/l jsem získala dostatek materiálu pro provedení fluorimetrického stanovení GUS a PCR. Z 15 vykazovaly 2 rostliny prokazatelnou aktivitu β -glukuronidázy a 5 rostlin mírně zvýšenou oproti kontrole. Nižší aktivita β -glukuronidázy mohla být způsobena částečným chimérismem rostlin, k jehož odstranění by bylo potřeba delší kultivace na médiu s vyšším obsahem kanamycinu. Ihned po transformaci nelze dát listové disky na médium s příliš vysokou koncentrací kanamycinu, protože by to vzhledem k počáteční vyšší citlivosti listových disků na kanamycin vedlo k jejich odumření. Bylo by rovněž vhodné vyzkoušet prodloužení doby inkubace se substrátem MUG.

Přítomnost genu *gus* v regenerujících rostlinách jsem zjišťovala rovněž pomocí PCR. Gen *gus* jsem prokázala pouze u 2 rostlin z 15, u kterých jsem izolovala DNA. U zbývajících rostlin mohlo být důvodem nepřítomnosti transgenu doposud nezjištěné vhodné ředění izolované DNA. Vhodné ředění izolované DNA je nutné stanovit u každého vzorku zvlášť. PCR mohla být inhibována nečistotami v izolované DNA, také mohlo během čištění fenolem dojít ke ztrátě DNA nebo mohly v některých vzorcích po čištění fenolem zůstat látky inhibující PCR.

U rostliny 4 byla prokázána přítomnost genu *gus*, jak bylo očekáváno vzhledem k vysoké naměřené aktivitě β -glukuronidázy. Naopak rostlina 2, u které byla také potvrzena přítomnost genu *gus* pomocí PCR, měla při fluorimetrickém stanovení hodnotu aktivity β -glukuronidázy zhruba stejnou jako kontrolní rostlina. Je proto zřejmé, že k ověření přítomnosti transgenu v rododendronech regenerujících po transformaci, je nutné porovnat výsledky z několika metod.

6. Závěr

Provedla jsem transformaci listových disků u dvou odrůd rododendronů (Azuro, Rebe) pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Transformací jsem do rostlin vnášela plazmidový vektor p35SGUSint obsahující gen *nptII* navozující rezistenci ke kanamycinu a gen *gus* pro enzym β -glukuronidázu.

Ověřila jsem nejvhodnější způsob selekce na médiu s různou koncentrací selekčního antibiotika kanamycinu. U obou odrůd se jednalo o variantu 4B, při které byly listové disky po transformaci nejprve pěstovány na médiu s koncentrací kanamycinu 20 mg/l, po 4 týdnech přendány na médium s 30 mg/l kanamycinu a regenerující listové disky pak kultivovány na médiu se 100 mg/l kanamycinu.

Prokazatelnou přítomnost vneseného genu *gus* jsem potvrdila pomocí fluorimetrického stanovení u 2 rostlin z 15 zkoumaných a pomocí PCR rovněž u 2 rostlin z 15, u kterých jsem izolovala DNA, přičemž pouze u 1 rostliny byla přítomnost genu *gus* potvrzena oběma metodami.

Zjistila jsem, že pro transformaci pomocí bakterie *Agrobacterium* a při použití selekce na kanamycinu je vhodnější odrůda Azuro než odrůda Rebe.

7. Použitá literatura

- **Ahokas, H.** (1987) Transfection by DNA – associated liposomes evidence at pea pollination. *Hereditas* 106: 129-138
- **Anderson, W.C.** (1984) A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Amer. Hort. Sci.* 109: 343-347
- **Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.** (1993) In Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of *Arabidopsis thaliana* plants. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-1199
- **Böhm, Č.** (2004) Vše o rododendronech. Květ, Praha
- **Cullen, D., Yang, V., Jeffries, T., Bolduc, J., Andrews, J.H.** (1991) Genetic transformation of *Aureobasidium pullulans*. *J. Biotechnol.* 21: 283-288
- **Dunemann, F., Illgner, R., Stange, I.** (2002) Transformation of *Rhododendron* with genes for abiotic stress tolerance. *Acta Hort.* 572: 113-120
- **Ettinger, T.L., Preece, J.E.** (1985) Aseptic Micropropagation of *Rhododendron* P.J.M. hybrids. *J. Hort. Sci.* 60: 269-274
- **Feldman, K.A., Marks, M.D.** (1987) *Agrobacterium* mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208: 1-9
- **Fraley, R.I., Rogers, S.G., Horsch, R.B.** (1986) Genetic transformation in higher plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 4: 1-46
- **Fromm, M., Taylor, L.P., Walbot, V.** (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828
- **Haldrup, A., Petersen, S.G., Okkels, F.T.** (1998) Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in food industry. *Plant Cell Rep.* 18: 76-81
- **Herrera-Estrella, A., Van Montagu, M., Wang, K.** (1990) A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino acid portion of *Agrobacterium* VirD2 protein directs the β -galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9534-9537
- **Hess, D.** (1983) Fyziologie rostlin. Academia, Praha

- **Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T.** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 229-1231
- **Horsch, R.B., Klee, H.J.** (1986) Rapid assay of gene expression in leaf disks transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: Role of T-DNA borders in the transfer process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4428-4432
- **Howard, E. A., Winsor, B. A., De Vos, G., Zambryski, P.** (1989) Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand - protein complex: Tight association of VirD2 with the 5' ends of T-strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4017-4021
- **Hsia, Ch., Korban, S.S.** (1997) The influence of cytokinins and ionic strength of Anderson's medium on shoot establishment and proliferation of evergreen azalea. *Euphytica* 93: 11-17
- **Hsia, Ch., Korban, S.S.** (1998) Effect of growth regulators, dark treatment and light intensity on shoot organogenesis from leaf tissues of evergreen azalea. *J. Hort. Sci. Biotech.* 73: 53-60
- **Hsia, Ch., Korban, S.S.** (1998) Microprojectile-mediated genetic transformation of *Rhododendron* hybrids. *J. Am. Rhododendron Soc.* 52: 187-191
- **Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
- **Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., Tempe, J.** (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. *Nature* 295: 432-434
- **Christie, P. J., Ward, J. E., Winans, S. C., Nester, E. W.** (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *J. Bacteriol.* 170: 2659-2667
- **de Iannino, N. I., Ugalde, R.A.** (1989) Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of β -(1-2)glucan. *J. Bacteriol.* 171: 2842-2849
- **Iapichino, G., Chen, T.H.H., Fuchigami, L.H.** (1991) Plant regeneration from somatic tissue of *Rhododendron laetum* \times *aurigeranum*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 27: 37-43

- **Jayaswal, R. K., Veluthambi, K., Gelvin, S. B., and Slightom, J. L.** (1987) Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a virD-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol* 169: 5035-5045
- **Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W.** (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907
- **Joersbo, M., Donaldson, I., Kreiberg, J., Peterson, S.G., Brunstedt, J., Okkels, F.T.** (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4: 111-117
- **Joersbo, M., Okkels, F.T.** (1996) A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep.* 16: 219-221
- **Klein, T.M., Arentzen, R., Lewis, P.A., Fitzpatrick-McElligott, S.** (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology* 10: 286-291
- **Knapp, J.E., Kausch, A.P., Auer, C., Brand, M.H.** (2001) Transformation of *Rhododendron* through microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 20: 749-754
- **Márton, L., Wullems, G.J., Molendijk, L., Schilperoort, R.A.** (1979) *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotina tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277: 129
- **Mertens, M., Werbrouck, S., Samyn, G., Botelho dos Santos Moreira da Silva, H., Debergh, P.** (1996) *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45: 231-236
- **Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 437-497
- **Musil, F.** (2006) Studium vlivu cytokininu thidiazuronu na regenerační proces *in vitro* kultur rododendronů. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v ČB
- **Neuhaus, G., Spangenberg, G.** (1990) Plant transformation by microinjection techniques. *Plant Physiol.* 79: 213-217
- **Norton, M.E., Norton, C.R.** (1985) *In vitro* propagation of *Ericaceae*: A comparison of the activity of the cytokinins N⁶-benzyladenine and N⁶-isopentyladenine in shoot proliferation. *Sci. Hort.* 27: 335-340
- **Ondřej, M., Drobník, J.** (2002) Transgenozé rostlin. Academia, Praha

- **Ow, D.W., de Wet, J.R., Helinski, D.R., Howell, S.H., Wood, K.V., Deluca, M.** (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859
- **Pavingerová, D.** (2000) Využití transgenozu u okrasných rostlin. *Rostlinná výroba* 46: 284-288
- **Pavingerová, D., Bísková, R., Niedermeierová, H., Kodýtek, K.** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Rhododendrons*. *Acta Hort.* 420: 89-91
- **Pavingerová, D., Bříza, J., Kodýtek, K., Niedermeierová, H.** (1997) Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with a GUS-intron chimeric gene. *Plant Sci.* 122: 165-171
- **Pavingerová, D., Novotná, K.** (v tisku) The influence of cytokonin thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cutvars of *Rhododendron*. *Biol. Plant*
- **Preece, J.E., Imel, M.R.** (1991) Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P.J.M. Hybrids'. *Sci. Hort.* 48: 159-170
- **Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.** (1998) Fyziologie rostlin. Academia, Praha 484 s
- **Stárková, K.** (2006) Studium vlivu cytokininu isopentyladeninu na regenerační proces *in vitro* kultur rododendronů. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v ČB
- **Tomsone, S., Gertnere, D.** (2003) *In vitro* shoot regeneration and leaf explants in *Rhododendron*. *Biol. Plant.* 46: 463-465
- **Tripepi, R.R., George, M.W., Sripo, T., Johnsen, S.A., Caplan, A.B.** (1999) Infection and transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens* strain B6. *Hort. Sci.* 34: 440- 565
- **Ueno, K., Fukunaga, Y., Arisumi, K.** (1996) Genetic transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 16: 38-41
- **Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M.** (1990): Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220: 245-250
- **Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J.G., Hooykaas, P.J.J.** (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 290: 979-982

- **Yanofsky, M. F., Porter, S. G., Young, C., Albright, L. M., Gordon, M. P., Nester, E. W.** (1986) The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47: 471-477
- **Young, C., Nester, E. W.** (1988) Association of the *virD2* protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 170: 3367-3374
- **Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., Schell, J.** (1974) Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109–127