

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

TRANSFORMACE EMBRYOGENNÍ KULTURY
SMRKU ZTEPILÉHO
(*Picea abies*)

KLÁRA KOLÁŘOVÁ
2009

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. RNDr. Jindřich Bříza, CSc.

Kolářová, K., 2009: Transformace embryogenní kultury smrku ztepilého (*Picea abies*) [Genetic transformation of embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*). Bc. Thesis, in Czech.] - 50 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this study was to develop a transformation procedure for embryonic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) using particle bombardment. Selection of the transgenic tissue was based on the antibiotic resistance conferring by the *nptII* gene, in combination with the antibiotic kanamycin. Expression of the *gus* gene was confirmed by histochemical analysis.

Tato práce byla financována z grantu NAZV QH71290 „Příprava transgenických linií smrku ztepilého toxických pro kůrovcovité“.

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, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2009

.....

Klára Kolářová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli doc. Jindřichu Břízovi za odborné vedení této práce, ochotnou pomoc a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala p. Vlastě Tetourové za trpělivost a cenné rady při zvládnání běžných laboratorních postupů a v neposlední řadě také RNDr. Haně Niedermeierové za přípravu v této práci použitého plazmidového vektoru. Také bych tímto chtěla poděkovat svým rodičům za umožnění studia a podporu při vzniku této práce.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TRANSFORMACE	2
2.1 METODY TRANSFORMACE	2
2.1.1 NEPŘÍMÁ TRANSFORMACE	2
2.1.2 PŘÍMÁ TRANSFORMACE	3
2.2 TRANSFORMACE KONIFER	6
3. SELEKČNÍ SYSTÉMY	9
3.1 SYSTÉMY VYUŽÍVAJÍCÍ GENY PRO REZISTENCI	9
3.1.1 GEN NPT II (NEOMYCINFOSFOTRANSFERÁZA II).....	10
3.1.2 GEN HPT (HYGROMYCINFOSFOTRANSFERÁZA)	10
3.1.3 DALŠÍ GENY PRO REZISTENCI K ANTIBIOTIKŮM.....	10
3.1.4 GENY <i>PAT</i> A <i>BAR</i>	10
3.1.5 GENY PRO EPSP A GOX.....	11
3.2 SYSTÉMY VYUŽÍVAJÍCÍ ALTERNATIVNÍ GENY	11
3.2.1 SELEKCE NA MANÓZE.....	11
3.2.2 SELEKCE NA XYLÓZE	12
3.2.3 SELEKCE NA GALAKTÓZE.....	12
4. TRANSGEN PRO β-GLUKURONIDÁZU	13
4.1 SELEKCE S POUŽITÍM GENU <i>gusA</i>	13
4.2 GEN <i>gusA</i> JAKO SIGNÁLNÍ TRANSGEN	13
5. MATERIÁL A METODIKA	15
5.1 TESTOVÁNÍ SENZITIVITY NA SELEKČNÍ LÁTKY	15
5.2 TRANSFORMACE MIKROPROJEKTILY	17
5.2.1 TESTOVÁNÍ VHODNÝCH TRANSFORMAČNÍCH PODMÍNEK	17
5.2.2 PRVNÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS.....	20
5.2.3 DRUHÝ TRANSFORMAČNÍ POKUS.....	21

5.2.4	TŘETÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS.....	21
5.3	HISTOCHEMICKÉ STANOVENÍ GUS	22
6.	VÝSLEDKY	23
6.1	TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA SELEKČNÍ LÁTKY	23
6.1.1	CITLIVOST NA PAROMOMYCIN	24
6.1.2	CITLIVOST NA KANAMYCIN	25
6.1.3	CITLIVOST NA HYGROMYCIN	26
6.1.4	CITLIVOST NA MANÓZU.....	27
6.2	TRANSFORMACE POMOCÍ MIKROPROJEKTILŮ	28
6.2.1	TESTOVÁNÍ TRANSFORMAČNÍCH PODMÍNEK	28
6.2.2	PRVNÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS.....	30
6.2.3	DRUHÝ TRANSFORMAČNÍ POKUS.....	34
6.2.4	TŘETÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS.....	37
7.	DISKUZE.....	40
8.	ZÁVĚR.....	44
9.	SEZNAM LITERATURY	45

1. ÚVOD

Genové inženýrství rostlin se začalo rozvíjet až ve 20. století spolu s rozvojem molekulárních metod, které odhalily nové možnosti šlechtění rostlin. Do té doby bylo šlechtění založeno hlavně na křížení jednotlivých rostlin a umělém výběru. Molekulární metody pomohly rozluštit podstatu rostlinného genomu a tím usnadnit jeho pozměnění k vypěstování nových odrůd rostlin. Zásadním průlomem byl objev schopnosti půdních bakterií rodu *Agrobacterium* integrovat specifický úsek své DNA do hostitelského (rostlinného) genomu. Ten stál na počátku nové metody genového inženýrství, kterou je transgenóza (transformace) rostlin. Jelikož průnik cizorodé DNA do hostitelského genomu skýtá určitá úskalí, začaly se objevovat snahy o přímé vnesení DNA do rostlinného genomu. Tyto metody se souhrnně nazývají přímá transformace rostlin. Nejpoužívanější z nich se stala biolistická metoda, pomocí níž se vnaší vektorová DNA do genomu rostlinných explantátů kovovými mikroprojektily o velikosti 1-2 μm .

Transformace, ať už přímými či nepřímými metodami, se staly základem genového inženýrství rostlin a pomocí jejich metod již bylo úspěšně vypěstováno mnoho transgenních rostlin. V této práci byl použitým rostlinným druhem smrk ztepilý (*Picea abies*), který patří do čeledi *Pinaceae*. Tato čeleď zahrnuje většinu jehličnatých lesních dřevin. Genové manipulace lesních dřevin jsou velice obtížné z důvodu složitého výběru vhodných vektorů a regeneračních systémů. Dřeviny mají velice dlouhou dobu vývoje regenerantů a dalšího potomstva a také značnou velikost genomu, jehož struktura navíc není prozatím dostatečně prozkoumána. Transformace lesních dřevin se provádějí hlavně za účelem získání jedinců tolerantních k pesticidům, hmyzím škůdcům či vnějším stresorům, popřípadě jedinců s lepší kvalitou dřeva nebo kratším reprodukčním cyklem. Bohužel není dosud známa univerzální metoda transformace, která by se dala úspěšně použít na široké spektrum dřevin.

Cílem mé práce bylo optimalizovat podmínky pro přímou transformaci embryogenní kultury smrku ztepilého (*Picea abies*) metodou mikroprojektilů za pomoci signálního genu pro β -glukuronidázu.

2. TRANSFORMACE

Transformace je přenos a integrace cizorodé DNA do genomu rostlinné buňky. Tohoto procesu se využívá při genetických modifikacích rostlinných buněk a pletiv, které díky nově vnesenému úseku DNA získají nové vlastnosti projevující se na jejich fenotypu. Díky totipotenci rostlinných buněk pak mohou transformované buňky či pletiva regenerovat v celé rostliny, které nový genotyp přenášejí do dalších generací.

2.1 METODY TRANSFORMACE

Metody transformace rostlinného genomu rozlišujeme podle způsobu vnášení cizorodé DNA na přímé a nepřímé.

2.1.1 NEPŘÍMÁ TRANSFORMACE

U tohoto typu transformace se pro vnesení cizorodé DNA používají bakterie rodu *Agrobacterium* (*tumefaciens* nebo *rhizogenes*), což jsou gram-negativní půdní bakterie, které mají přirozenou schopnost vnášet pomocí Ti (*A. tumefaciens*) nebo Ri (*A. rhizogenes*) plazmidu do rostlinného genomu specifické geny lokalizované v těchto plazmidech na T-DNA - transferred DNA (Zaenen et al., 1974). Tato přirozená bakteriální T-DNA obohacuje rostlinný genom o geny pro nové cesty biosyntézy růstových fytohormonů (auxinů a cytokininů) a také opinů. Auxiny a cytokininy způsobí u transformovaného pletiva růst v podobě nediferenciovaných nádorů (crown galls, *A. tumefaciens*) nebo kořenů (hairy roots, *A. rhizogenes*). Opiny jsou nádorově specifické látky, které slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie pro bakterie, které transformaci indukovaly (Hansen et al., 1994; Sheng a Citovsky, 1996).

Bakterie *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes* se používají jako vektory pro přenos upravené T-DNA do rostlinného genomu. Z T-DNA se odstraní všechny geny kromě hraničních sekvencí, což jsou krátké repetice DNA, které jsou důležité pro integraci do hostitelského genomu, a nahradí se jinými. Tyto uměle zkonstruované vektory se dělí na intermediární a binární vektory. Nejčastěji se používají binární vektory, u kterých je Ti plazmid rozdělen na 2 plazmidy. Jeden z nich nese úsek virulence a druhý T-DNA a selektovatelný gen pro rezistenci k některému antibiotiku.

Metody nepřímé transformace lze použít pro většinu dvouděložných, některé jednoděložné a nahosemenné rostliny. Mezi nejznámější metody patří disková metoda transformace (Horsch et al., 1985), transformace semen (Feldmann a Marks, 1987), infiltrace (Bechtold et al., 1993) a transformace protoplastů (Márton et al., 1979).

2.1.2 PŘÍMÁ TRANSFORMACE

Při těchto metodách transformace se nepoužívají k přenosu cizorodé DNA do rostlinného genomu bakterie rodu *Agrobacterium*, ale, jak už název napovídá, úseky cizorodé DNA se vnášejí přímo do jádra rostlinné buňky. K tomu se většinou používají speciální přístroje např. elektroporátor, mikromanipulátor nebo tzv. genová puška. Metody přímé transformace se začaly používat zhruba od roku 1982 díky vývoji binárních vektorů. Pomocí přímé transformace se oproti nepřímé transformaci vnášejí jen malé fragmenty plazmidu obsahující většinou pouze jeden gen. Pro transformaci musíme ale vložit do rostlinného genomu také selektovatelný gen, díky kterému pak lze odlišit transformované buňky od netransformovaných. Proto se využívá mechanismu kotransformace, při kterém se integrují dva geny, nesené každý jiným plazmidem, do stejného místa na chromozomu.

Zpočátku se pro přímou transformaci používaly pouze protoplasty, protože neobsahují buněčnou stěnu, což usnadňuje vniknutí cizorodé DNA do jádra buněk. Dnes už se ale používají i rostlinná pletiva a orgány. Metody přímé transformace mají tu výhodu, že nejsou omezeny pouze na hostitele bakterií rodu *Agrobacterium*. Jednou z nevýhod je ale časté vnesení tandemových kopií do jednoho nebo několika míst na rostlinném genomu. Takovéto transgenní rostliny se pak musejí eliminovat kvůli nebezpečí nízké exprese (Ondřej a Drobník, 2002). Nejčastěji se používají u jednoděložných rostlin např. kukuřice, rýže nebo pšenice (Lankhsminarayan et al., 2000).

❖ VYUŽITÍ POLYETHYLENGLYKOLU (PEG)

Touto metodou byly poprvé transformovány rostliny bez využití bakterií rodu *Agrobacterium* (Krens et al., 1982). Pomocí PEGu a bivalentních kationtů (vápenatých iontů) se transformují rostlinné protoplasty, což jsou rostlinné buňky, u kterých byla mechanicky nebo enzymaticky odstraněna buněčná membrána. Častěji se používá

enzymatické odstranění pomocí enzymatické směsi pektinázy a celulózy, roztoku soli a vysokého osmotického tlaku. Chybějící buněčná stěna usnadňuje proniknutí cizorodé DNA do buňky a navíc se rostlinné protoplasty dají izolovat z řady rostlinných druhů. Nevýhodou je však jejich křehkost a možnost somaklonální variability při regeneraci transgenních rostlin (Ondřej a Drobník, 2002).

❖ ELEKTROPORACE

Elektroporace je metoda přímé transformace, která se používá hlavně u protoplastů, ale lze ji využít i pro rostlinné buňky. Materiál je inkubován v roztoku pufru obsahujícím DNA a je vystaven elektrickým pulsům o vysokém napětí (Fromm et al., 1985). Působením krátkého pulsu stejnoměrného napětí se v plazmatické membráně vytvoří póry, které jsou způsobeny reverzibilními nebo ireverzibilními zlomy buněčných membrán. Vzniklými póry poté může snadno procházet cizorodá DNA a integrovat se do buňky. Úspěšnost závisí na délce trvání elektrického pulsu (50-250 μ s) o napětí v rozsahu několik set až 2000 V/cm. Při působení příliš vysokého napětí se vytvoří příliš velké ireverzibilní póry a naopak při malém napětí se póry uzavřou příliš rychle potom, co elektrický puls přestane působit. Frekvence stabilních transformantů se u této metody pohybuje v rozmezí 10^{-4} – 10^{-2} .

❖ VYUŽITÍ LIPOZÓMŮ

Lipozómy jsou umělé mikroskopické lipidové kapénky, které obsahují roztok DNA. Mají podobnou strukturu jako střední, hydrofobní lamela rostlinné plazmatické membrány, což jim umožňuje snadný přenos DNA do buňky. K enkapsidaci DNA do lipozómu se používají krátké ultrazvukové vibrace, které mohou způsobovat zlomy DNA (Weising et al., 1988). Používají se k transformaci rostlinných pletiv (Gad et al., 1990) a pylových láček (Ahokas, 1987).

❖ MIKROINJEKCE

Při této metodě se pomocí mikromanipulátoru vnaší DNA přímo do jader rostlinných buněk, což zabraňuje působení buněčných exonukleáz na cizorodou DNA a také jejím zlomům, protože nemusí projít přes buněčnou a jadernou membránu. Díky těmto výhodám má tato metoda velice vysokou účinnost transformace (10-20 %).

Bohužel se touto metodou dá injikovat jen malé množství buněk a je velice náročná jak na techniku, tak na zručnost. U rostlin se mikroinjekce aplikují do protoplastů, buněk embryí popřípadě celých pletiv (Ondřej a Drobník, 2002), ale nejvíce se používají pro transformace velkých živočišných buněk. Touto metodou byly poprvé získány transgenní rostliny transformací rýžových výhonků (de la Pena et al., 1987).

❖ MIKROPROJEKTILY

Biolistická metoda transformace je nejčastěji používanou metodou přímé transformace rostlin, a to hlavně díky široké využitelnosti na prakticky všechny typy rostlinných tkání a buněk (Bommineni et al., 1993). Poprvé byla použita u epidermálních buněk cibule (Sanford et al., 1987) a o rok později její postup detailně popsal ve své práci J. C. Sanford. Tato metoda postupně našla využití i např. u živočišných buněk a tkání (Zelenin et al., 1989; Fitzpatrick-McElligot, 1992), kvasinek (Armaleo et al., 1990) a řas (Kindle et al., 1989). Jeví se jako nejlepší způsob, jak vnést cizorodou DNA přímo do regenerovaných buněk, pletiv a orgánů bez závislosti na hostitelích agrobakteria a úskalí souvisejících s regenerací tkáňových kultur (Birch, 1997).

Mikroprojektily jsou mikroskopické kuličky z inertních kovů (Au, W) většinou o velikosti 1- 2 μm , které se smíchají s roztokem obsahujícím DNA a další důležité látky. Po nanesení na speciální nosiče (macrocarriers) se nechá ze suspenze mikroprojektilů a DNA přirozeně vypařit etanol a tím plazmidová DNA ulpí na kovových mikroprojektilech. Ty se pak vstřelují do pletiva pomocí speciální aparatury (genová puška) rychlým vyrovnání přetlaku helia. V komoře, ve které je cílové pletivo umístěno, musí být vakuum. Vytvořený tlak helia prorazí tzv. rupture disk a mikroprojektily spolu s nosičem (macrocarrier) jsou uvedeny do pohybu směrem k cílové tkáni, kam však doputují jen mikropartikelky s navázanou DNA, protože pohyb nosiče je zastaven po několika milimetrech letu kovovou mřížkou (stopping screen).

Úspěšná integrace transgenu do genomu proběhne pouze pokud mikroprojektil pronikne až do jádra a buňka tento zásah přežije. Pokud jsou tyto podmínky splněny, bývá frekvence transformace vysoká. Bohužel se alespoň do epidermis dostane pouze

7-10% mikroprojektilů, ale buňky epidermis nejsou schopné poté vytvořit kalus a diferencovat v transgenní rostlinu. U většiny ze zasažených buněk se dostane mikroprojektil pouze do cytoplazmy, kde neprobíhá transkripce a tudíž nedojde k expresi vneseného genu. Pokud se mikroprojektil dostane až do jádra, většina buněk do 2 dnů po zásahu odumírá (Ondřej a Drobník 2002). Z těchto důvodů je tato metoda závislá na optimalizaci vhodných podmínek, za kterých dojde k co největší úspěšnosti transformace. Mezi tyto podmínky patří stav explantátu před transformací, vnější faktory (teplota, vlhkost,...) a parametry ovlivňující tranzientní aktivitu signálního genu (Birch, 1997).

Biolistickou metodou již bylo transformováno mnoho rostlinných druhů, především jednoděložných rostlin, např. kukuřice (Klein et al., 1989), rýže (Christou et al., 1991), pšenice (Vasil et al., 1992), ječmen (Wan a Lemaux, 1994) nebo cukrová třtina (Gambley et al., 1993), ale také dvouděložných, např. tabák (Klein et al., 1988), sója (McCabe et al., 1988) nebo bavlník (Finer a McMullen, 1990) a nahosemenných, např. modřín (Klimaszewska et al., 1997), smrk (Robertson et al., 1992), borovice (Walter et al., 1998) nebo douglaska (Goldfarb et al., 1991). Navíc byla tato metoda také použita pro vnesení genů do chloroplastů (Boynton et al., 1988) a mitochondrií (Johnston et al., 1988).

2.2 TRANSFORMACE KONIFER

Genetické modifikace konifer (jehličnanů) patří v poslední době k důležité součásti lesních biotechnologií. Používají se ke zlepšení kvality a vlastností dřeva, zrychlení růstu stromů, získání rezistence vůči škůdcům a herbicidům a také tolerance ke stresu. K transformacím jehličnanů se nejvíce využívá nepřímá transformace pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* a přímá transformace pomocí mikroprojektilů nebo elektroporace.

Od roku 1968 bylo u různých druhů jehličnatých stromů objeveno, že je možné je infikovat pomocí různých kmenů rodu *Agrobacterium*. Patří k nim například *Abies nordmanniana* a *Picea abies* (Clapham and Ekberg, 1968) a *Pinus taeda* (Sederoff et al., 1968). Posléze byla u mnoha druhů jehličnanů testována nepřímá transformace pomocí těchto bakterií. Ne všechny experimenty vedly k získání stabilních transformantů, ale

bylo díky nim objeveno mnoho faktorů ovlivňujících transformaci konifer pomocí této bakterie. Mezi důležité faktory patří kmen agrobakteria, druh a genotyp jehličnanu, fyziologické a vývojové stádium explantátu, selektovatelný gen a selekční látka a také promotor (Tang a Newton, 2003). K nejpoužívanějším explantátům používaným při nepřímé transformaci konifer patří embryogenní kultura, pyl a semena. Jako první se úspěšně podařilo transformovat *Larix decidua* pomocí *A. rhizogenes* v roce 1991 (Huang et al., 1991). Od té doby byly transformovány různé druhy a kultivary hlavně rodů *Picea*, *Pinus* a *Larix* pomocí bakterie *A. rhizogenes* i *A. tumefaciens* (Tang a Newton, 2003). Úspěšnost transformace konifer limituje hlavně složitá propagace explantátů, selekční neúčinnost a nízká frekvence transformace (Wenck et al., 1999). Stabilní transformanty se podařilo získat, např. u hybridního modřínu (*Larix kaempferi* × *L. decidua*; Levee et al., 1997), *Picea abies* (Wenck et al., 1999; Klimaszewska et al., 2001), *Pinus taeda* (Tang et al., 2001), *Pinus radiata* (Charity et al., 2002) a *Pinus halepensis* (Tzsfira et al., 1996).

Druhou nejčastěji používanou transformační metodou při genových manipulacích konifer je transformace pomocí mikroprojektilů. Tato metoda patří mezi metody přímé transformace, a proto má tu výhodu, že výběr materiálu není omezen jeho genotypem. Navíc bylo prokázáno, že pomocí mikroprojektilů lze úspěšně vnést cizorodý gen do všech typů explantátů konifer, u kterých byla tato metoda testována (Tang a Newton, 2003). K důležitým faktorům ovlivňujícím úspěšnost transformace patří stav explantátů před transformací, vnější vlivy (teplota, vlhkost), stupeň poničení materiálu a načasování selekce. Pro integraci cizorodé DNA do transformovaných buněk je nejvhodnější S-fáze jejich buněčného cyklu. Stabilní exprese vnesených genů byla prokázána u embryogenní kultury *Larix laricina* (Klimaszewska et al., 1997), *Picea abies* (Robertson et al., 1992; Walter et al., 1999; Clapham et al., 2000; Elfstrand et al., 2001), *Picea glauca* (Ellis et al., 1991; Bommineni et al., 1993), *Picea mariana* (Charest et al., 1996) a *Pinus radiata* (Walter et al., 1998; Bishop-Hurley et al., 2001).

Poslední metodou, která se používá k transformacím konifer, je elektroporace. Touto metodou se běžně transformují pouze protoplasty, hlavně ty, které jsou schopny regenerovat v somatická embrya a klíčící rostliny. Problémem u této metody je, že protoplasty konifer velice problematicky regenerují v celé rostliny. Proto se tato

metoda u konifer využívá hlavně ke studiu transientní exprese reportérových genů a faktorů ovlivňujících expresi transgenů vneseného do protoplastu (Tang a Newton, 2003). Touto metodou již byly transformovány protoplasty izolované z embryogenní kultury *Picea glauca* (Bekkaoui et al., 1988), *Picea mariana* (Tautorus et al., 1989), *Pinus taeda* (Gupta et al., 1988) a *Larix X eurolepis* (Charest et al., 1991) a také z neembryogenní kultury *Pinus radiata* (Campbell et al., 1992) a *Pinus banksiana* (Tautorus et al., 1989).

3. SELEKČNÍ SYSTÉMY

Selekční systémy se využívají k rozlišení transgenních buněk od netransgenních. Součástí selekčních systémů jsou selektovatelné geny a k nim příslušné selekční látky. Rozlišují se podle principu selekce, ta může být buď negativní, nebo pozitivní. Negativní selekce způsobí, že na médiu s danou selekční látkou přežijí pouze transformované buňky obsahující ve svém genomu selektovatelný gen a ty netransformované hynou, protože selekční látka je pro ně toxická. Při pozitivní selekci přežívají na selekčním médiu oba dva typy buněk. Transformované buňky nesou určitou metabolickou výhodu oproti buňkám netransformovaným, a proto výrazně lépe prosperují a dají se odlišit od netransgenních buněk, které strádají a vykazují inhibici růstu. Selektovatelné geny nesou rezistenci k antibiotikům nebo toleranci k herbicidům popřípadě způsobí v cílové buňce změnu metabolismu dané selekční látky. Selekční látka se pak přidá do agarového média nebo se jí postříkuje přímo celá rostlina (Ondřej a Drobník, 2002).

3.1 SYSTÉMY VYUŽÍVAJÍCÍ GENY PRO REZISTENCI K ANTIBIOTIKŮM NEBO HERBICIDŮM

Tyto selekční systémy patří ke starším typům systémů, které jsou často používané díky své vysoké účinnosti. Využívají princip negativní selekce, která má tu nevýhodu, že odumírající netransformované buňky uvolňují látky, které jsou toxické pro transformované buňky. Proto je důležité před jejich použitím určit správnou koncentraci selekční látky v médiu, tak aby selekční tlak byl dostatečně silný a zároveň nedocházelo k odumírání transgenních buněk. Nejsou vhodné pro selekci transformovaných rostlin určených pro přímou konzumaci nebo jako krmivo kvůli nepřijatelnosti pro laickou veřejnost.

3.1.1 GEN NPT II (NEOMYCINFOSFOTRANSFERÁZA II) (FRALEY AT AL., 1983)

Tento selektovatelný transgen je původně součástí transpozonu Tn5 z bakterie *E. coli*, (Ondřej a Drobník, 2002). Kóduje rezistenci k aminoglykosidickým antibiotikům kanamycinu, neomycinu, paromomycinu a geneticinu (G418). Neomycinfosfotransferáza II fosforyluje hydroxylovou skupinu příslušného antibiotika a tím ho inaktivuje. Selekcí systém využívající kanamycin jako selekční agens stále patří k nejpoužívanějším selekčním systémům. Má široké využití u většiny rostlinných druhů kromě čeledí Poaceae a Viciaceae, které vykazují relativně vysoký stupeň spontánní rezistence (Ondřej a Drobník, 2002).

3.1.2 GEN HPT (HYGROMYCINFOSFOTRANSFERÁZA) (WALDRON AT AL., 1985)

Chimérický transgen *hpt* se skládá z kódující sekvence genu *aph IV* z *E. coli*, rostlinného promotoru, zaváděcí sekvence a terminátoru. Kóduje rezistenci k antibiotiku hygromycinu B, které blokuje proteosyntézu u prokaryot i eukaryot. Je vysoce toxický pro všechny rostlinné i živočišné druhy (i pro člověka), proto se většinou používá jen v případech, kde nelze použít kanamycin.

3.1.3 DALŠÍ GENY PRO REZISTENCI K ANTIBIOTIKŮM

Existuje ještě řada dalších chimérických selektovatelných genů, které kódují rezistenci k různým antibiotikům, ale jsou oproti dvěma výše uvedeným používány poměrně vzácně. Patří sem například gen *npt I* kódující neomycinfosfotransferázu I (rezistence ke kanamycinu, neomycinu a geneticinu), gen *dhfr* kódující dihydrofolátreduktázu (rezistence k metotrexátu), gen *ble* (rezistence k bleomycinu), gen kódující streptomycinfosfotransferázu (rezistence k streptomycinu) nebo gen pro rezistenci ke gentamycinu.

3.1.4 GENY PAT A BAR (DE BLOCK ET AL., 1987)

Tyto dva geny pocházejí z aktinomycet rodu *Streptomyces* a kódují rezistenci k herbicidu fosfinotricinu, který se z nich biotechnologicky vyrábí. Používá se jako širokospektrální postemergentní herbicid (sady a vinice) a desikant (brambory, luštěniny, jeteloviny, ...), který způsobuje ireverzibilní inaktivaci glutaminsyntázy. Ta

je klíčovým enzymem metabolismu dusíku, protože detoxikuje amoniak za vzniku glutamátu. Po její inaktivaci se hromadí amoniak ve vysokých koncentracích, což následně vede k zastavení fotosyntézy a rozpadu chloroplastů. Gen *pat* pochází ze *S. viridochromogenes* (Strauch et al., 1988) a gen *bar* ze *S. hygrosopicus* (Thomson et al., 1987). Oba geny kódují enzym fosfotricin-N-acetyltransferázu (PAT), která inaktivuje fosfotricin acylací jeho volné NH₂ skupiny.

3.1.5 GENY PRO EPSP A GOX

Rezistenci k herbicidu glyfozátu kódují 3 geny. První je gen pro enzym EPSP (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntáza), který podmiňuje jeho nadprodukcí (Shah et al., 1986). Druhý gen *aroA* kóduje modifikovaný enzym EPSP tolerantní k glyfozátu (Comai et al., 1985) a třetí gen kóduje enzym GOX (glyfozát oxidoreduktáza), který tento herbicid metabolizuje. Herbicid glyfozát inhibuje enzym EPSP v šikimátové biosyntetické dráze (lokalizována v chloroplastech) a tím blokuje syntézu aromatických kyselin.

3.2 SYSTÉMY VYUŽÍVAJÍCÍ ALTERNATIVNÍ GENY

Tyto selekční systémy používají jako selektovatelné geny takové, jejichž produkty pozmění v transgenních buňkách metabolickou dráhu dané selekční látky. Tou bývá látka, která je neškodná pro člověka a životní prostředí. Další výhodou těchto systémů je skutečnost, že většinou využívají princip pozitivní selekce, při které nehynou netransformované buňky. Alternativní selekční systémy se začaly více využívat až v posledních 10 letech, kvůli obavám společnosti z možného negativního dopadu tradičních selektovatelných genů (pro rezistenci k antibiotikům či toleranci k herbicidům) na lidské zdraví a životní prostředí.

3.2.1 SELEKCE NA MANÓZE

Tento selekční systém je založen na vnesení transgenu *pmi* pro fosfomanózaizomerázu pocházející z genomu bakterie *E. coli*. Jako selekční látka se používá sacharid manóza, který má několik výhod. Je snadno dostupný, levný a lehce stravitelný. Manóza je u mnoha rostlinných druhů fosforylována enzymem hexokinázou na manóza-6-fosfát, který už dále není metabolizován. Buňky pak nemají

dostatek fosforu a zvýšeně syntetizují škrob a maltózu, tím dochází k inhibici dělení buněk i jejich růstu. Pokud rostlinný genom obsahuje gen *pmi*, jím kódovaný enzym mění fyto toxický manóza-6-fosfát na fruktóza-6-fosfát, který se začleňuje do normálního metabolismu a rostlina ho využívá jako doplňkový zdroj energie. Selektce na manóze je vhodným typem selekčního systému, protože je zcela neškodný pro konzumenta. Využití manózy jako selekční látky spolu s genem *pmi* bylo popsáno už u řady různých druhů rostlin, např. u cukrové řepy (Joersbo et al., 1998), kukuřice (Negrotto et al., 2000), manioku (Zhang et al., 2000), huseníčku (Todd a Tague, 2001) nebo brambor a rajčete (Bříza et al., 2008).

3.2.2 SELEKCE NA XYLÓZE

Součástí tohoto selekčního systému je gen *xylA* a sacharid xylóza. Gen *xylA* byl izolován z bakterií *Streptomyces rubiginous* (Wong et al., 1991) a *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* (Lee et al., 1990). Jeho produktem je enzym xylózaizomeráza, který konvertuje D-xylózu na D-xylulózu. Používá se u rostlin, kterým chybí vlastní enzym xylulokináza, který v pentózovém cyklu fosforyluje D-xylulózu. Tu většina rostlin nedokáže metabolizovat, kdežto D-xylulózu využívají jako zdroj energie. Tento selekční systém je také považován za bezrizikový, enzym xylózaizomeráza se běžně používá v potravinářském průmyslu při zpracování škrobu. Úspěšně byl testován u rajčete, brambor a tabáku (Haldrup et al., 2001).

3.2.3 SELEKCE NA GALAKTÓZE

V tomto selekčním systému se používá jako selektovatelný gen *galT*, který pochází z bakterie *E. coli*. Jeho produkt, enzym galaktóza-1-fosfát-uridylyltransferáza, řídí v metabolismu galaktózy přestavbu galaktózy-1-fosfátu na UDP-galaktózu. Ta je poté ještě přeměněna na UDP-glukózu, která je již plně metabolizovatelná. Vnesením genu *galT* transgenní buňky nezískají metabolickou výhodu, ale oproti netransgenním nehynou na tzv. galaktózový šok. Proto se tento selekční systém řadí mezi ty, které využívají princip negativní selekce. Byl zatím úspěšně testován u brambor a řepky (Joersebo et al., 2003).

4. TRANSGEN PRO β -GLUKURONIDÁZU

β -glukuronidáza je enzym kódovaný v bakterii *Escherichia coli* genem *uidA*, který se v rostlinách označuje jako *gusA* a enzym jako GUS. Tento tetrametr s monomerem o molekulové hmotnosti 68,2 kDa patří mezi kyselé hydrolázy. Je velmi stálý a štěpí různé β -glukuronidy. Nemá žádné kofaktory, ale inhibují ho některé těžké kovy. Gen *gusA* se používá jako selektovatelný, ale lze ho využít i jako reportérový gen.

4.1 SELEKCE S POUŽITÍM GENU *gusA*

U tohoto alternativního selekčního systému se do média přidává jako selekční látka inaktivní derivát cytokininů benzyladenin-N-3-glukuronid. β -glukuronidáza hydrolyzuje derivát na aktivní cytokinin, který transgenním buňkám umožňuje růst. Selektce probíhá na médiu bez cytokininů, takže netransgenní buňky trpí jejich nedostatkem a nerostou. Poprvé úspěšně použili tento typ selekce Joersbo a Okkels (1996) při transformaci listových disků tabáku. Selektce pomocí genu *gusA* byla 2x-3x účinnější než při použití klasického kanamycinu. K výhodám tohoto systému patří hlavně skutečnost, že gen *gusA* lze použít jako selektovatelný i signální gen zároveň. Nevýhodou ovšem je komerční nedostupnost selekčního agens a nedostatečná eliminace transgenních úniků při selekci.

4.2 GEN *gusA* JAKO SIGNÁLNÍ TRANSGEN

(JEFFERSON ET AL., 1987)

Signální (reportérové, markerové) transgeny jsou takové transgeny, jejichž expresi lze snadno detekovat a kvantitativně stanovovat (Ondřej a Drobník, 2002). Vždy jsou chimérické, obsahují regulační sekvence pro projev v rostlinném genomu a kódující sekvenci z bakteriálního nebo živočišného genomu. Jeli jejich exprese dočasná (tranzientní), je to způsobeno tím, že do jader buněk proniká větší množství úseků T-DNA a k jejich expresi dojde dříve, než se integrují do genomu nebo jsou degradovány nukleázami. Tohoto jevu se využívá pro orientační porovnání účinnosti různých promotorů, různých způsobů aplikace u určitého materiálu nebo k porovnání účinnosti téhož konstruktů v různých materiálech.

Gen *gusA* je nejpoužívanějším signálním genem transformace rostlin v dnešní době. Jeho produkt, označovaný jako GUS, mění substráty na modře zbarvené nebo fluoreskující látky. Výhodná je jeho rychlá a spolehlivá detekce a také skutečnost, že se glukuronidázy nevyskytují v rostlinách, houbách a velké většině bakterií. Můžeme ho detekovat 3 různými metodami:

- a) **Fluorimetrická metoda** (Jefferson et al., 1987) se provádí v mikrozkušnicích nebo na mikrotitračních destičkách, kam se vloží homogenizát spolu s MUG (4-metylumbelliferyl- β -D-glukuronid), který je fluorogenním substrátem pro β -glukuronidázu. Tato látka je během inkubace rozštěpena β -glukuronidázou na β -glukuronid a MU (4-metyumbelliferon), který má schopnost fluoreskovat. Po přidání alkalického roztoku sody (Na_2CO_3) se inkubace zastaví a zároveň dojde k ionizaci MU, což je nezbytné pro fluorescenci. Ta se potom měří pod UV lampou nebo přesněji pomocí fluorimetru, kde MU modře (455nm) fluoreskuje po excitaci UV světlem kolem 365nm.
- b) **Histochemická metoda** (Vitha et al., 1999) využívá jako substrát barvivo X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylglukuronid), ze kterého během inkubace při 37 °C β -glukuronidáza odštěpuje indol. Ten pak oxiduje na derivát indiga, který je nerozpustný a intenzivně modrý. Zůstává lokalizován v buňkách, ve kterých vznikl, takže se transformované buňky snadno rozpoznají.
- c) **Spektrofotometrická metoda** (Jefferson et al., 1987) se dnes už nepoužívá i přesto, že je levná a nenáročná. Jako substrát se zde používá p-nitrofenyl- β -D-glukuronid a je založena na absorpci světla při 415 nm. Zde mohou nastat problémy kvůli absorpci světla pigmenty v extraktu.

Jako signální transgen se také používá bakteriální transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu (CAT; Seed a Sheen, 1988), transgen pro luciferázu ze světlušky (*Photinus pyralis*; Luehrsen et al., 1992) nebo kódující sekvence bakterie *Vibrio harvei* a transgen pro GFP (zeleně fluoreskující protein) klonovaný z medúzy *Aequorea victoria* (Prasher et al., 1992).

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1 TESTOVÁNÍ SENZITIVITY NA SELEKČNÍ LÁTKY

Na začátku své práce jsem testovala, jak je embryogenní kultura smrku ztepilého (*Picea abies*) citlivá na určité selekční látky. Použitá embryogenní kultura byla získána z Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i., který je spoluřešitelem grantu, ze kterého vychází zadání této práce. Nejprve jsem si namnožila dostatečné množství rostlinného materiálu dvou genotypů (S a S17). K tomu jsem použila sterilní kultivační skleničky s Litvayovým médiem (dále médium L; Litvay et al., 1985). Embryogenní kulturu z jedné sterilní skleničky jsem rozdělovala sterilně ve flowboxu do několika skleniček s nově navařeným médiem a nechala růst 14 dní ve tmě při teplotě 22 °C.

➤ **složení média L (1 l média):**

- ultračistá voda
- 2,5 g Litvay média (Duchefa)
- 1 ml glycinu (zásobní roztok o c = 200 mg/100 ml)
- 400 mg kasein hydrolyzátu
- 20 g sacharózy
- 5 ml BAP (zásobní roztok o c = 10 mg/100 ml)
- 5 ml kinetinu (zásobní roztok o c = 10 mg/100 ml)
- 2 ml 2,4 D (zásobní roztok o c = 50 mg/100 ml)
- 400 mg L-glutaminu
- 2 g gerlitu (Duchefa)
- pH 5,8

Na Petriho misky (9 cm) s 20 ml Erikssonovým médiem (dále médium E; Eriksson et al., 1965) a přidanou určitou selekční látkou (paromomycin, kanamycin, hygromycin nebo manóza), jejíž roztok jsme sterilizovala filtrací membránovým filtrem, jsem sterilně ve flowboxu umístila 3 malé části embryogenní kultury o hmotnosti zhruba 5 mg (14 dní kultivované na médiu L) a kultivovala 3 týdny ve tmě při 22 °C.

➤ **složení média E (350 ml média):**

- ultračistá voda
- 3,5 ml roztoku A (243 g KNO₃; 22,5 g NH₄NO₃; 18,5 g MgSO₄ · 7 H₂O; 8,5 g KH₂PO₄ na 1 l zásobního roztoku)
- 3,5 ml roztoku B (22 g/l CaCl₂ · 2 H₂O)
- 3,5 ml roztoku C (1,86 g Na₂EDTA; 1,39 g FeSO₄ · 7 H₂O na 1 l zásobního roztoku)
- 350 µl roztoku D (0,31 g H₃BO₃; 1,12 g MnSO₄ · 1H₂O; 0,43 g ZnSO₄ · 7 H₂O; 40 mg KI; 10 mg Na₂MoO₄ · 2 H₂O na 100 ml zásobního roztoku + 1 ml roztoku – 50 mg CuSO₄ · 5 H₂O; 50 mg CoCl₂ · 6 H₂O do 50 ml)
- 350 µl vitamínů (100 mg thiaminu, 50 mg pyridoxinu, 50 mg nikotinové kyseliny na 100 ml zásobního roztoku)
- 35 mg myo-inositolu
- 350 µl glycinu (zásobní roztok o c = 200 mg/100 ml)
- 140 mg kasein hydrolyzátu
- 7 g sacharózy
- 1,75 ml BAP (zásobní roztok o c = 10 mg/100 ml)
- 1,75 ml kinetinu (zásobní roztok o c = 10 mg/100 ml)
- 700 µl 2,4 D (zásobní roztok o c = 50 mg/100 ml)
- 140 µg L-glutaminu
- 0,7 g gerlitu (Duchefa)
- pH 5,8
- selekční látka (přidaná po zklávkování, kromě manózy)

➤ **koncentrace selekčních látek:**

- **paromomycin (mg/l)**
0, 20, 50, 100, 150, 200, 300
- **kanamycin (mg/l)**
0, 25, 50, 100, 150, 200, 300
- **hygromycin (mg/l)**
0, 5, 10, 15, 20, 25
- **manóza (mg/l)**
0, 5, 15, 50, 150, 250, 500

Citlivost embryogenní kultury k selekční látce jsem zjišťovala vážením jednotlivých kalusů na analytických vahách. Od těchto hodnot jsem poté odečetla průměrnou hmotnost kalusu na začátku kultivace. Tím jsem získala hodnotu nárůstu hmotnosti kalusu během kultivace na selekčním médiu o různé koncentraci selekční látky, z čehož jsme určila nejvhodnější selekční látku a její vhodnou koncentraci pro selekci transformovaných buněk.

5.2 TRANSFORMACE MIKROPROJEKTILY

5.2.1 TESTOVÁNÍ VHODNÝCH TRANSFORMAČNÍCH PODMÍNEK

1) PŘÍPRAVA EMBRYOGENNÍ KULTURY

Před samotnou transformací jsem si připravila rostlinný materiál. Smrkovou embryogenní kulturu (14 dní starou) jsem sterilně ve flowboxu nanasla na příslušný počet Petriho misek (9 cm) s médiem L a sterilními papírovými filtry o průměru 6 cm. Takto připravený materiál jsem kultivovala 24 hodin ve tmě při 22 °C.

2) STERILIZACE SPOTŘEBNÍHO MATERIÁLU

Pro transformaci mikroprojektily (particle bombardment) se používá mnoho spotřebního materiálu, který se musí předem sterilizovat. Používá se sterilizace klávováním, 70 % etanolem nebo 70 % isopropanolem.

a) sterilizace klávováním

- nosič rupture disků (zabalené v alobalu)
- kovová část nosiče stopping screenů a macrocarrierů (zabalené v alobalu)
- nosiče macrocarrierů (v Petriho misce)
- macrocarrieri (v Petriho misce)
- stopping screeny (v Petriho misce)

b) sterilizace 70 % etanolem

- plastová část nosiče stopping screenů a macrocarrierů
- nosič Petriho misek
- vakuová komora

c) sterilizace 70 % isopropanolem

- rupture disky (ponoření na několik vteřin)

3) PŘÍPRAVA ZLATÝCH PARTIKULÍ

18 µg zlatých partikulí o velikosti 1 µm byly žíhány přes noc (12 hodin) při 180 °C. Sterilizace proběhla v 1,5 ml mikrozkuvkách v 750 µl 70 % etanolu (HPLC) 5 minutovým intenzivním třepáním. Po 15 minutové inkubaci při laboratorní teplotě jsem partikule 3 vteřiny centrifugovala a odebrala supernatant. K sedimentu jsem přidala 500 µl sterilní ultračisté destilované vody, 2 minuty intenzivně třepala, minutu nechala volně sedimentovat a 3 vteřiny centrifugovala. Celý proces promývání jsem opakovala třikrát. Po třetím promytí jsem přidala k sedimentu 200 µl 50% sterilního roztoku glycerolu a opět několik minut intenzivně třepala. Poté jsme do mikrozkuvky rychle za sebou přidala 20 µl DNA (1µl/1µg), 200 µl 2,5 M CaCl₂ · 2 H₂O a 80 µl 0,1 M spermidinu. Jako DNA jsem používala plazmid nesoucí gen *gus* s intronem pod 35S promotorem (35SGUS-intron) připravený RNDr. H. Niedermeierovou. Celý obsah mikrozkuvky jsem 3 minuty velmi mírně třepala, nechala 1 minutu sedimentovat, 3 vteřiny centrifugovala a odsála supernatant. Vzniklý pelet jsem vymyla 560 µl 70 % etanolu (HPLC) a poté stejným množstvím 100 % etanolu (HPLC). V obou případech jsem nejdříve pomocí pipety nebo krátkým mírným třepáním resuspendovala pelet přidaným etanolem a pak po krátké sedimentaci 3 vteřiny centrifugovala a odsála supernatant. Posledním krokem bylo resuspendování peletu pipetou ve 152 µl 100 % etanolu (HPLC), čímž jsem měla připravenou suspenzi mikropartikulí s navázanou plazmidovou DNA na 24 střel.

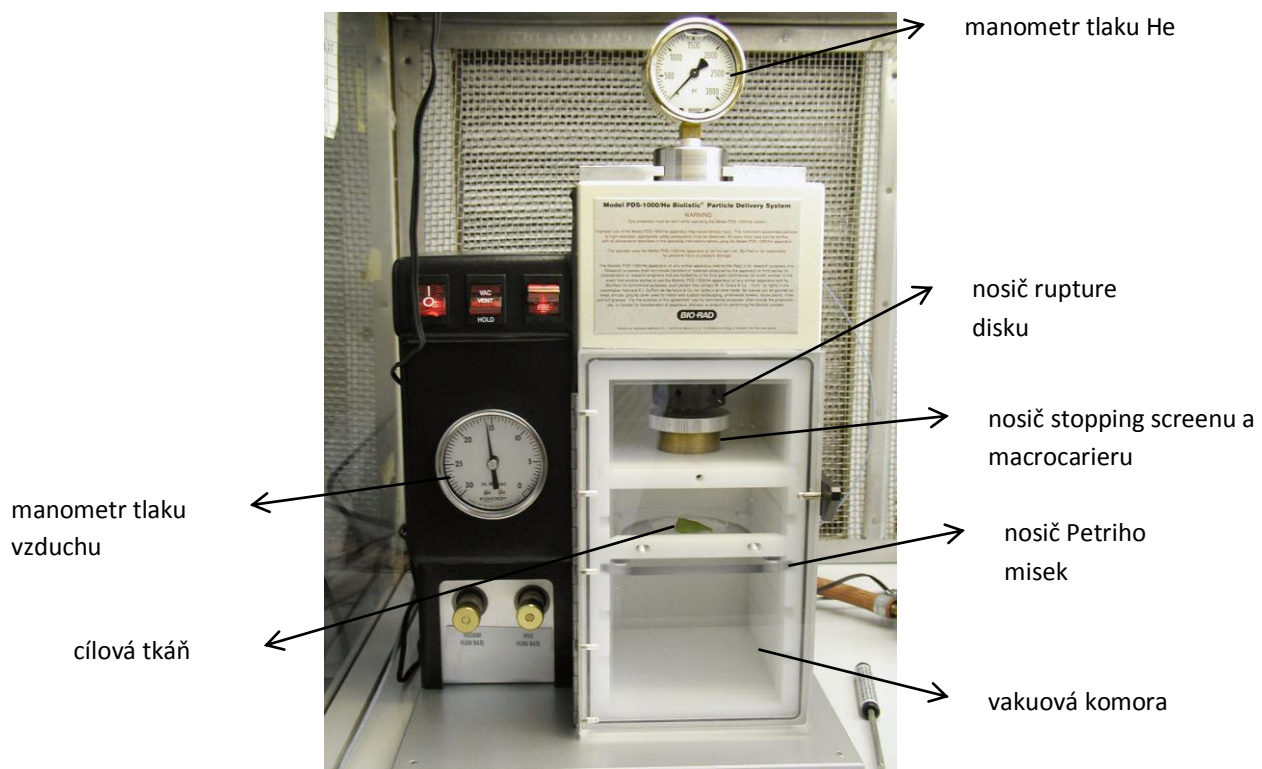
Suspenzi s mikropartikulemi zlata jsem aplikovala po 6 µl na macrocarriers, které jsem předem vložila do nosičů. Macrocarriers s roztokem zlatých partikulí jsem potom dala po 3-4 do Petriho misek, rozmístila do velké Petriho misky se silikagelem a nechala minimálně 10 minut vyschnout.

4) VLASTNÍ TRANSFORMACE

Vlastní transformaci jsem provedla sterilně ve flowboxu v zařízení (PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System od firmy BioRad), kde nosným médiem pro mikroprojektily je hélium.

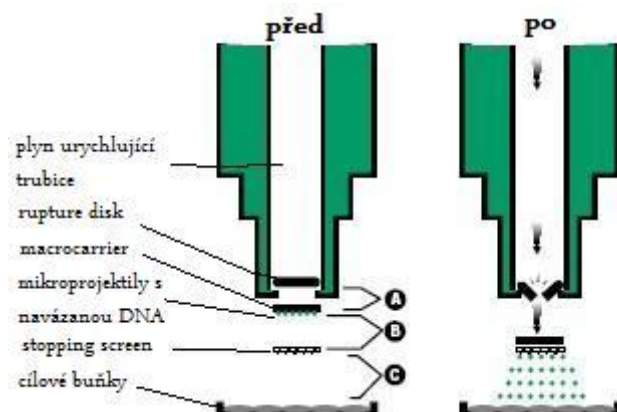
Nejprve jsem vložila sterilní rupture disk (pro daný přetlak; 1100, 1350 nebo 1550 psi, 1 psi [pound-force per square inch] = 6894,8 Pa) do kovového nosiče a zašroubovala na příslušné místo ve vakuové komoře. Potom jsem vložila stopping screen do příslušného nosiče a na něj položila nosič s macrocarrierem s nanesenými zlatými partikulemi a navázanou DNA. To celé jsem zašroubovala příslušným krytem a vsunula na příslušné místo do vakuové komory. Nakonec jsem umístila nosič misek do vakuové komory v dané vzdálenosti od nosiče macrocarrieru a stopping screenu (6, 9 nebo 12 cm).

➤ **Obr. 1: Použité zařízení (PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System od firmy BioRad)**



Poté jsem ve vakuové komoře genové pušky snížila tlak vzduchu o 28 in. Hg (1 atm = 1013,25 kPa = 29,92 in. Hg; 28 in. Hg = 948,2 kPa) olejovou vývěvou a ihned potom pustila helium. Po dosažení určitého přetlaku rupture disk praskl, což způsobilo následné prolétnutí mikroprojektilů přes stopping screen a jejich vstřelení do embryogenní kultury na Petriho misce. Po výstřelu jsem vakuovou komoru zavzdušnila.

- **Obr. 2:** Schématické znázornění systému PDS-1000/He před a po spuštění. A, B a C jsou nastavitelné vzdálenosti, které ovlivňují rychlost, s jakou mikroprojektily zasáhnou cílové buňky. A- vzdálenost mezi rupturou diskem a macrocarrierem, B- pohybová vzdálenost macrocarrieru a C- cílová vzdálenost. Šipky označují směr proudu helia.



Tímto způsobem jsem v prvním experimentu testovala 24 misek s embryogenní kulturou smrku (po 12 s genotypem S a S17) za 6 různých variant transformačních podmínek s cílem nalézt podmínky, při kterých bude tranzientní exprese genu *gus* nejvyšší. Při výběru variant transformačních podmínek jsem již vycházela z předchozích pokusů provedených Doc. J. Břízou. Zbylé 4 misky jsem použila jako kontrolní vzorky, 2 kontrolní vzorky jsem podrobila výstřelu v genové pušce bez použití zlatých partikulí při nejvyšším v pokusu použitém přetlaku 1550 psi a vzdálenosti 9 cm pro kontrolu možného poškození kultury vzniklým tlakem při výstřelu. Další 2 kontrolní vzorky jsem netransformovala ani nepodrobila „slepému“ výstřelu pro kontrolu správného složení použitého média.

5.2.2 PRVNÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS

Na základě výsledků předchozího experimentu jsem přistoupila k prvnímu transformačnímu pokusu. Připravila jsem si po 15 miskách (9 cm) s embryogenní smrkovou kulturou obou genotypů, a to na sterilních papírových filtrech položených na médiu L. Po jednodenní kultivaci ve tmě při 22 °C jsem materiál transformovala stejným způsobem, jako při testování vhodných podmínek transformace jen s tím rozdílem, že jsem použila pouze transformační podmínky, které vykazaly nejvyšší

hodnoty tranzientní exprese. Každou variantou podmínek jsem transformovala 6 vzorků. Odlišný byl také počet použitých kontrolních vzorků. Pro kontrolu poškození buněk během transformace jsem použila od každého genotypu 2 misky, které jsem podrobila oběma variantám podmínek (1100 psi a 9 cm, 1550 psi a 12 cm).

Transformované embryogenní kultury smrku spolu s kontrolními vzorky jsem týden kultivovala ve tmě při 22 °C. Potom jsem je přenesla i s papírovými filtry na misky (6 cm) se selekčním médiem obsahujícím kanamycin (koncentrace = 25 mg/l). Kontroly jsem rozdělila na 2 poloviny, jednu jsem také přenesla na selekční médium a druhou jsem dala na čerstvé kultivační médium. Vše jsem nechala selektovat 15 dní při 22 °C. Po uplynutí této doby jsem vzorky zkontrolovala a vyhodnotila jejich stav použitím stereomikroskopu a přenesla je na čerstvé selekční médium se stejnou koncentrací kanamycinu. Takto jsem postupovala ještě třikrát vždy po 2 týdnech s tím, že na čerstvé médium jsem už přenesla pouze části kalusů, které ještě vykazovaly alespoň minimální růst.

5.2.3 DRUHÝ TRANSFORMAČNÍ POKUS

Během druhého transformačního pokusu jsem postupovala stejným způsobem jako u prvního pokusu, jenom s tím rozdílem, že jsem použila jako kontrolní vzorky pouze 2 misky od každého genotypu po jednom kontrolním vzorku pro kontrolu média.

5.2.4 TŘETÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS

Při posledním transformačním pokusu jsem postupovala podle metody použité v článku publikovaném Clapham et al. v roce 2000. Připravila jsem si po 14 vzorcích obou genotypů na papírových filtrech o průměru 6 cm, které jsem hodinu kultivovala na médiu L s přídavkem 0,5 M myo-inositolu. Po 10 vzorcích obou genotypů jsem transformovala zlatými mikroprojektily o velikosti 1,6 μm za transformačních podmínek 1100 psi a 9 cm. Jako kontrolní vzorky jsem použila 2 vzorky s odlišnými genotypy, které jsem „střílela“ bez použití zlatých partikulí, a další 2 vzorky rozdílných genotypů, které jsem vůbec netransformovala. Všechny vzorky jsem po jednodenní kultivaci ve tmě při 22 °C přendala na selekčním médiu s kanamycinem

(koncentrace = 25 mg/l). Dále už jsem postupovala stejně jako u dvou předchozích postupů.

5.3 HISTOCHEMICKÉ STANOVENÍ GUS

Jako kontrolu transientní exprese genu *gusA* kódujícího β -glukuronidázu v genomu smrkových embryogenních buněk jsem použila metodu histochemického stanovení GUS.

Nejdříve jsem rozpustila 12 mg substrátu X-glc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid, Duchefa) v 600 μ l DMF (dimethylformamid) v mikrozkuhavce, vzniklý roztok jsem převedla do kádinky s 24 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH = 7). Tento roztok jsem ve flowboxu sterilizovala filtrací membránovým filtrem a poté jsem ho pipetovala po 1 ml do 24 jamek mikrodestičky. Ze všech 24 Petriho misek jsem sterilně ve flowboxu přenesla kalusové pletivo do jednotlivých jamek a inkubovala při 37 °C v termostatu minimálně 6 hodin. Výsledky jsem vyhodnotila pomocí stereomikroskopu spočítáním buněk, které zmodraly reakcí X-glc s β -glukuronidázou, což se projevilo jako modré skvrny.

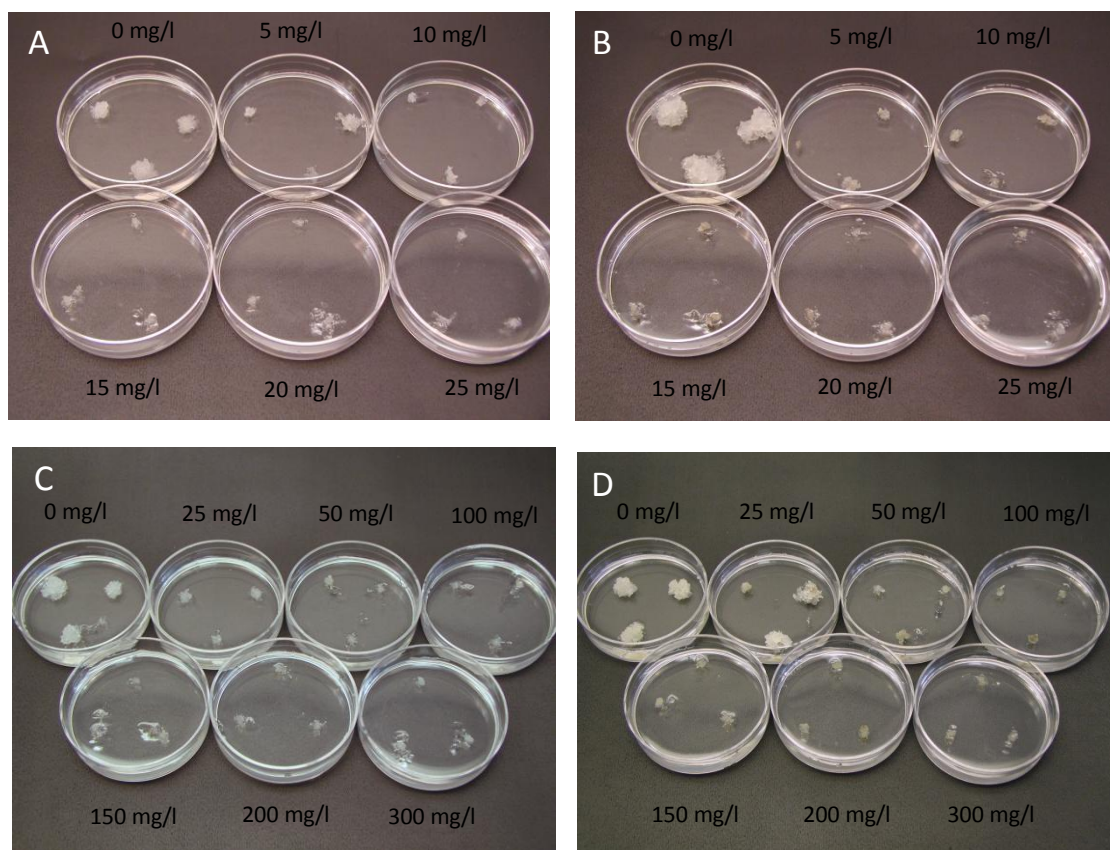
U následných 3 vlastních transformačních pokusů jsem histochemicky stanovovala tranzientní expresi genu *gusA* pouze u 4 vybraných misek (o 2 různých genotypech a 2 různých transformačních podmínkách), zbytek misek jsem podrobila selekci k získání stabilních transformovaných buněk. Proto jsem používala pouze 2 mg X-glc, které jsem rozpustila v 50 μ l DMF a poté převedla do 4 ml 0,05 M fosfátového pufru.

6. VÝSLEDKY

6.1 TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA SELEKČNÍ LÁTKY

Testovala jsem citlivost smrkové embryogenní kultury dvou genotypů (S a S17) na 4 selekční látky - paromomycin, kanamycin, hygromycin a manózu. Tři vzorky netransformované embryogenní kultury jsem 3 týdny kultivovala v 9 cm P. misce s médiem E a s danou selekční látkou a poté všechny kalusy zvážíla na analytických vahách pro zjištění zvýšení jejich hmotnosti během kultivace. Cílem bylo nalézt nejvhodnější selekční látku a její nejúčinnější koncentrace v médiu.

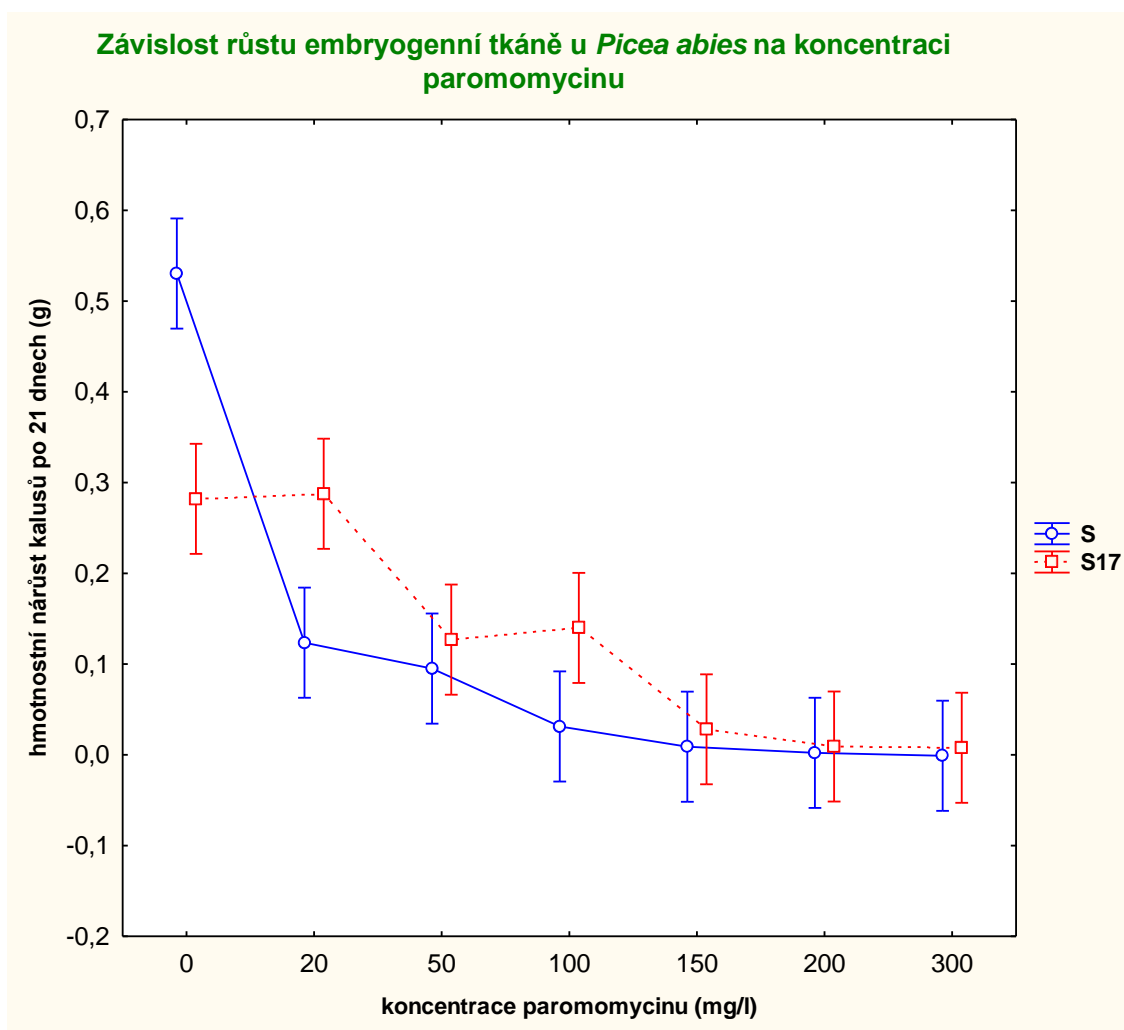
- **Obr. 1:** Ukázka netransformované smrkové embryogenní kultury po 3 týdenní kultivaci na médiu se selekční látkou. Panel A - hygromycin, genotyp S; panel B - hygromycin, genotyp S17; panel C - kanamycin, genotyp S; panel D - kanamycin, genotyp S17.



6.1.1 CITLIVOST NA PAROMOMYCIN

Pro testování senzitivity embryogenní kultury na paromomycin jsem použila selekční řadu o 7 různých koncentracích paromomycinu v médiu. Pro oba genotypy jsem testovala od každé koncentrace 2 misky po 3 vzorcích. Od hmotnosti vzorků po 3 týdenní kultivaci jsem odečetla průměrnou hmotnost vzorků na začátku kultivace a výsledné hodnoty jsem zpracovala do grafu (viz graf 1).

➤ **Graf 1: Závislost růstu embryogenní kultury smrku ztepilého na koncentraci paromomycinu v médiu.**



Pozn.: Všechny grafy v tomto dokumentu jsou vytvořeny statistickým programem Statistica 8 pomocí statistické metody faktoriální ANOVA.

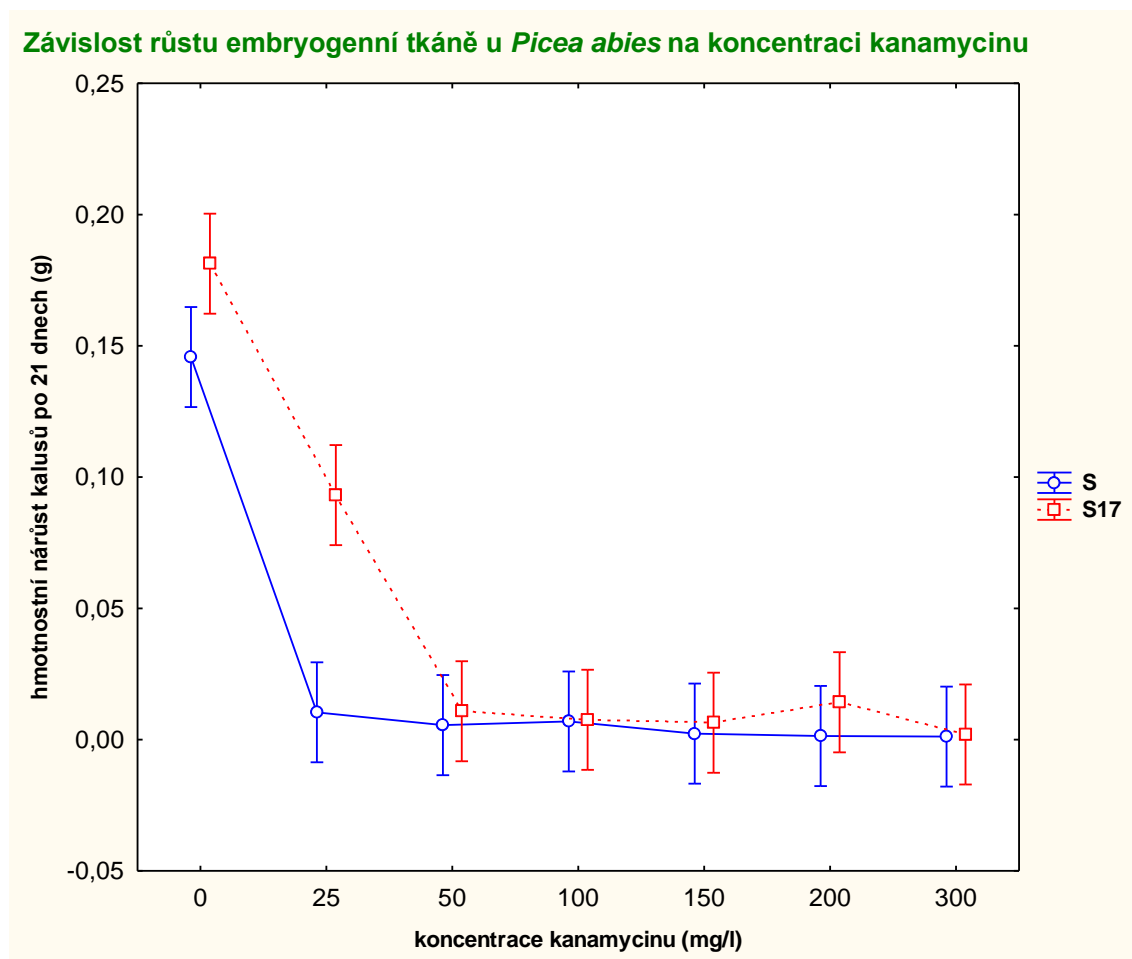
Výsledný graf ukázal, že smrková embryogenní kultura je na použité antibiotikum paromomycin značně citlivá, ale projeví se rozdíly v citlivosti dvou použitých genotypů. Citlivost genotypu S se zvyšovala se zvyšující se koncentrací paromomycinu

v médiu s tím, že se projevil značný rozdíl nárůstu hmotnosti vzorků na kontrolním médiu bez obsahu paromomycinu a na médiu s nejnižší koncentrací antibiotika. Citlivost genotypu S17 nebyla tak výrazná, především při nižších koncentracích antibiotika. S citlivostí druhého genotypu byla srovnatelná až od koncentrace 150 mg/l.

6.1.2 CITLIVOST NA KANAMYCIN

Při testování citlivosti smrkové embryogenní kultury na antibiotikum kanamycin jsem postupovala naprosto stejně jako u předchozího antibiotika jen s tím rozdílem, že jsem zvýšila nejnižší použitou koncentraci selekční látky na 25 mg/l. Výsledné hodnoty jsem poté zpracovala do grafu (viz graf 2).

➤ **Graf 2: Závislost růstu embryogenní kultury smrku ztepilého na koncentraci kanamycinu v médiu.**



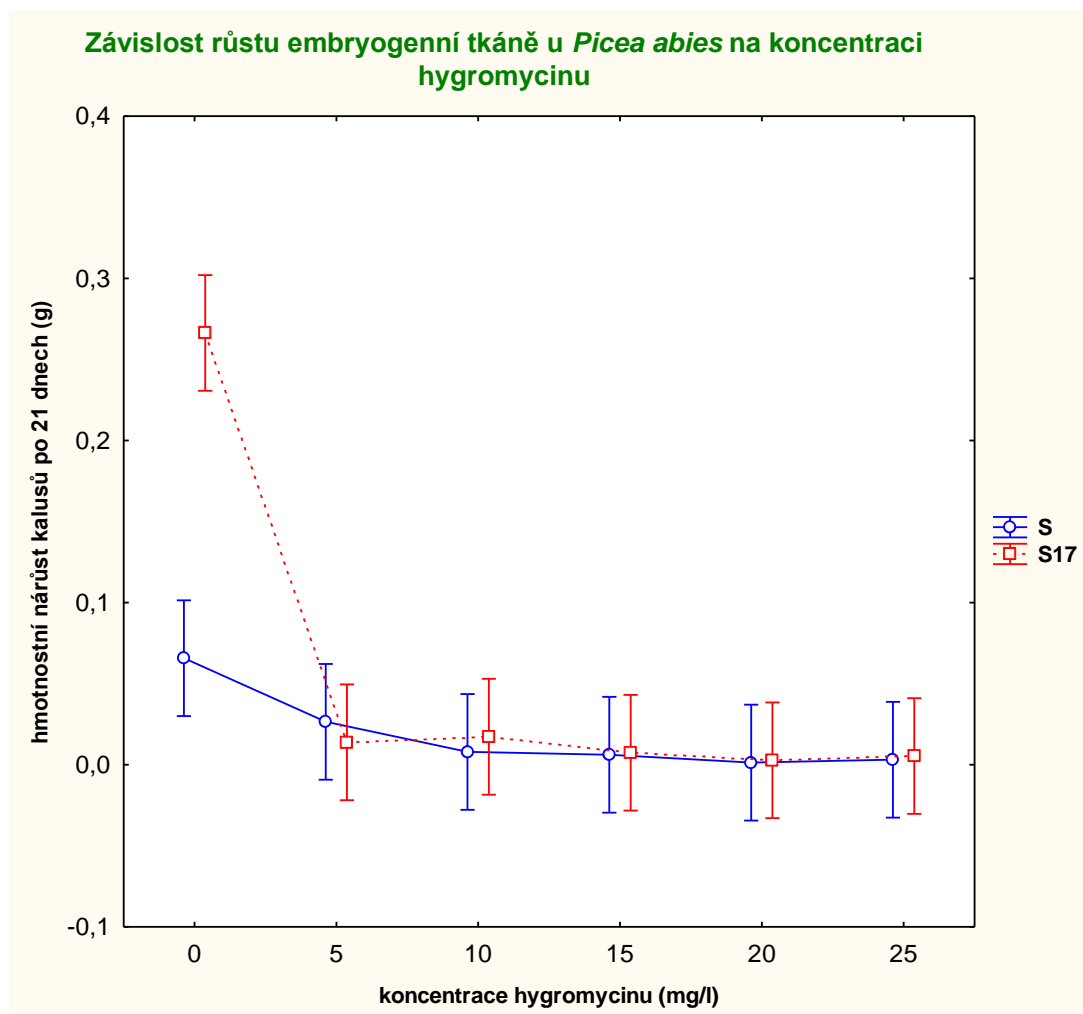
Výsledný graf ukázal silnou citlivost smrkové embryogenní kultury na kanamycin u obou použitých genotypů. Už při použití 50 mg/l kanamycinu byl nárůst hmoty

kalusů obou genotypů téměř nulový. Z těchto důvodů jsem se také nakonec rozhodla použít pro selekci transgenních buněk toto antibiotikum.

6.1.3 CITLIVOST NA HYGROMYCIN

Při testování citlivosti embryogenní kultury na tuto selekční látku jsem postupovala opět stejně jako u předchozích dvou pokusů jen s tím rozdílem, že jsem použila mnohem menší koncentrace antibiotika v médiu a také jsem snížila selekční řadu na pouze 6 koncentrací. Hygromycin je totiž vysoce toxická látka jak pro rostlinné, tak i pro živočišné buňky (včetně lidských). Z tohoto důvodu se příliš nepoužívá v praxi, i když se jeví jako velice účinná selekční látka.

➤ **Graf 3:** Závislost růstu embryogenní kultury smrku ztepilého na koncentraci hygromycinu v médiu.

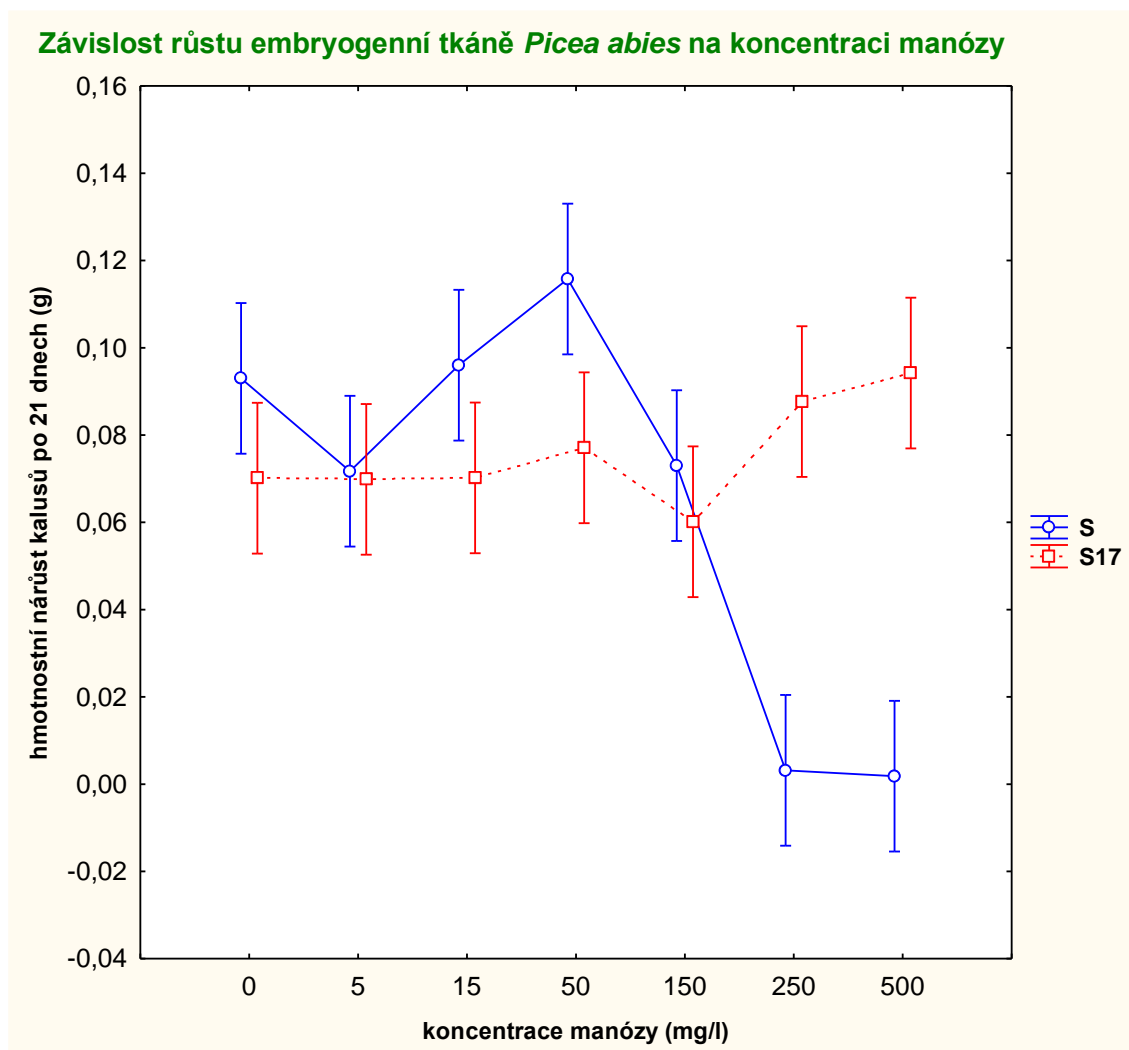


Výsledný graf opět ukázal vysokou selekční schopnost antibiotika u obou genotypů smrkové embryonální kultury jako u předešlého kanamycinu. Toto antibiotikum se také jeví jako velice vhodné pro selekci transgenních buněk použité smrkové embryonální kultury, ale z důvodu jeho vysoké toxicity i pro živočišné buňky jsem raději vybrala kanamycin.

6.1.4 CITLIVOST NA MANÓZU

Pro testování senzitivity embryonální kultury na manózu jsem opět postupovala stejným způsobem jako u předchozích pokusů jen s použitím jiných koncentrací selekční látky v médiu z důvodu odlišného chemického typu použité látky.

➤ **Graf 4:** Závislost růstu embryonální kultury smrku ztepilého na koncentraci manózy v médiu.



Výsledný graf ukázal, že manóza není vhodná pro selekci smrkové embryogenní kultury. Oba použité genotypy nevykazovaly přílišnou citlivost k manóze, která v případě genotypu S17 naprosto neovlivňovala negativně jeho růst. U genotypu S se projevila určitá fytoxicita manózy až u nejvyšších použitých koncentrací 250 a 500 mg/l, avšak genotyp S17 při těchto koncentracích reagoval naopak mírným zvýšením intenzity růstu.

6.2 TRANSFORMACE POMOCÍ MIKROPROJEKTILŮ

6.2.1 TESTOVÁNÍ TRANSFORMAČNÍCH PODMÍNEK

Vhodné transformační podmínky pro embryogenní kulturu smrku ztepilého pro přímou metodu transformace prováděnou pomocí genové pušky (PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System od firmy BioRad) se zlatými mikroprojektily o velikosti 1 μm jsem zjišťovala vnášením plazmidová DNA nesoucí mj. signální gen pro β -glukuronidázu (GUS). Po 24 hodinové kultivaci jsem zjišťovala tranzientní expresi genu *gus* v kalusech histochemickou metodou. Výsledky tranzientní exprese jsem hodnotila pomocí stereomikroskopu (viz Tab. 1).

➤ **Tab. 1:** Tranzientní exprese genu *gusA* u vzorků embryonální kultury smrku ztepilého transformovaných pomocí mikroprojektilů. S_x - směrodatná odchylka.

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Číslo varianty	Průměrný počet modrých bodů	S_x
S	1100	6	1	29	16,97
		9	2	43,5	6,36
	1350	6	3	26	0
		9	4	38,5	9,19
	1550	9	5	32	4,24
		12	6	58	15,56
S17	1100	6	7	60,5	21,92
		9	8	37,5	3,54
	1350	6	9	72	16,97
		9	10	53,5	3,54
	1550	9	11	89	21,21
		12	12	76,5	14,85

Výsledky ukázaly, že genotyp S17 je o něco vhodnější pro transformace pomocí mikroprojektilů, ale rozdíl oproti druhému použitému genotypu není tak výrazný. U genotypu S se největší množství tranzientní exprese objevilo po transformaci za tlaku 1550 psi a 12 cm vzdálenosti cílového pletiva, druhá neúspěšnější varianta byla 1100

psi a 9 cm. Genotyp S17 nejlépe reagoval na transformaci za tlaku 1550 psi u obou vzdáleností. Nakonec jsem se rozhodla pro vlastní transformační pokusy použít pro oba genotypy stejné podmínky, a to ty, které se ukázaly jako nejvhodnější u genotypu S.

6.2.2 PRVNÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS

Při prvním transformačním pokusu jsem transformovala 28 vzorků embryogenní smrkové kultury za 2 různých transformačních podmínek (1100 psi a 9 cm, 1550 psi a 12 cm). Z toho jsem 4 vzorky a další 2 netransformované použila jako kontrolní. Z 24 transformovaných vzorků jsem vybrala 4 (2 genotypy, 2 transf. podmínky), které jsem podrobila histochemickému stanovení genu *gusA*. Ty jsem po jednodenní inkubaci vyhodnotila (viz Tab. 2). Zbylé transformované vzorky jsem po týdnu přendala na selekční médium s kanamycinem o koncentraci 25 mg/l, kontrolní vzorky jsem rozdělila na poloviny, jednu jsem přendala na čerstvé médium L a druhou na selekční médium s koncentrací kanamycinu 25 mg / l. Všechny tyto vzorky jsem v 2-3 týdenních intervalech přenášela na čerstvé selekční médium se stejnou koncentrací kanamycinu a pokaždé vyhodnotila jejich růstovou aktivitu (viz Tab. 3 a 4).

➤ **Tab. 2:** Tranzientní exprese genu *gusA* u vybraných transformovaných vzorků embryogenní kultury smrku ztepilého.

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Číslo misky	Počet *
S	1100	9	1C	14
	1550	12	2B	5
S17	1100	9	3C	84
	1550	12	4D	62

* ... počet modrých bodů (sektorů) odpovídajících tranzientní expresi genu *gus*

Z tabulky je zřejmé, že vyšší hodnoty tranzientní exprese genu *gusA* vykazoval opět genotyp S17, tentokrát však velmi výrazně.

- **Tab. 3: Zhodnocení růstové aktivity transformovaných kalusů smrkové embryogenní kultury na selekčním médiu s kanamycinem (25 mg/l).** +++ růstová aktivita u více než 40 % plochy kalusu; ++ růstová aktivita do 40 %; + růstová aktivita do 15 %; (+) ojedinělá růstová aktivita do 5 %; - žádná růstová aktivita; číslo značí počet misek s uvedenou růstovou aktivitou.

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Růstová aktivita			
			Délka kultivace			
			15 dní	30 dní	44 dní	68dní
S	1100	9	2 +	3 (+)	5 -	5 -
			3 (+)	2 -		
	1550	12	3 +	4 (+)	1 (+)	5 -
			2 (+)	1 -	4 -	
S17	1100	9	4 ++	1 ++	4 (+)	5 -
			1 +	2+	1 -	
				2 (+)		
	1550	12	3 ++	3 +	3 (+)	5 -
			2 +	2 (+)	2 -	

- **Tab. 4: Zhodnocení růstové aktivity kontrolních vzorků kalusů smrkové embryogenní kultury na selekčním médiu s kanamycinem (25 mg/l) a na médiu bez kanamycinu. +++** růstová aktivita u více než 40 % plochy kalusu; ++ růstová aktivita do 40 %; + růstová aktivita do 15 %; (+) ojedinělá růstová aktivita do 5 %; - žádná růstová aktivita; číslo značí počet misek s uvedenou růstovou aktivitou. L - médium L; K₂₅ - selekční médium s kanamycinem o koncentraci 25 mg/l

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Růstová aktivita							
			Délka kultivace							
			15 dní		30 dní		44 dní		68 dní	
			L	K ₂₅	L	K ₂₅	L	K ₂₅	L	K ₂₅
S	0	0	+++	+	+++	(+)	+++	(+)	+++	-
	1100	9	+++	+	+++	(+)	+++	-	+++	-
	1550	12	+++	+	+++	(+)	+++	(+)	+++	-
S17	0	0	+++	++	+++	+	+++	(+)	+++	-
	1100	9	+++	++	+++	++	+++	(+)	+++	-
	1550	12	+++	++	+++	+	+++	(+)	+++	-

Z tabulek je patrné, že **genotyp S** se celkově ukázal jako citlivější ke kanamycinu. Hned po 15 denní selekci vykazoval maximálně 15 % růstovou aktivitu, a to pouze u poloviny transformovaných vzorků. Po měsíci na selekčním médiu už 7 vzorků tohoto genotypu mělo pouze ojedinělou růstovou aktivitu a 3 úplně přestaly růst. Po následujících 14 dnech se růstová aktivita ztratila u většiny zbylých vzorků, pouze jeden si ještě zachoval nepatrnou růstovou aktivitu. Během dalších 24 dnů i ten přestal růst, což ukázalo, že se u žádného vzorku tohoto genotypu nepodařilo integrovat DNA do jádra. Kontrolní vzorky tohoto genotypu na selekčním médiu vykazovaly podobný růstový pokles jako transformované vzorky a kontrolní vzorky na médiu L podle očekávání vykazovaly vysokou růstovou aktivitu.

Naopak **genotyp S17** se od počátku jevil jako odolnější vůči selekčním účinkům kanamycinu, po 15 denní selekci většina vzorků vykazovala poměrně vysoký růst, pouze 3 z 10 vzorků vykazovaly růst pouze do 15 %. Po měsíci už byla selekce výraznější, pouze 1 vzorek si zachoval růst do 40 %, další 5 už měly růst pouze do 15 % a poslední 4 vzorky dokonce vykazovaly pouze ojedinělou růstovou aktivitu. Za dalších 14 dní se růstová aktivita opět snížila, u 7 vzorků na ojedinělý růst a zbylé 3 přestaly růst úplně. Během následujících 24 dnů už všechny vzorky přestaly úplně růst, což i u tohoto genotypu ukázalo, že se nepodařilo integrovat DNA do jádra. Kontrolní vzorky na selekčním médiu opět snižovaly svůj růst podobným způsobem jako transformované vzorky a kontrolní vzorky na médiu L rostly bez viditelného poklesu růstu.

6.2.3 DRUHÝ TRANSFORMAČNÍ POKUS

V tomto transformačním pokusu jsem transformovala stejný počet vzorků naprosto stejným způsobem jako u předchozího pokusu. Rozdíl byl pouze u kontrolních vzorků, protože jsem už použila od každého genotypu pouze 1 vzorek, který jsem netransformovala.

➤ **Tab. 5:** Tranzientní exprese genu *GusA* u vybraných transformovaných vzorků embryogenní kultury smrku ztepilého

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Číslo misky	Počet *
S	1100	9	1C	5
	1550	12	2A	4
S17	1100	9	3C	32
	1550	12	4A	42

* ... počet modrých bodů (sektorů) odpovídajících tranzientní expresi genu *gus*

V tomto pokusu se hodnoty tranzientní exprese oproti předchozímu pokusu o něco snížily, ale genotyp S17 opět vykazoval výrazně vyšší hodnoty než druhý genotyp.

➤ **Tab. 6: Zhodnocení růstové aktivity transformovaných kalusů smrkové embryogenní kultury na selekčním médiu s kanamycinem (25 mg/l).** +++ růstová aktivita u více než 40 % plochy kalusu; ++ růstová aktivita do 40 %; + růstová aktivita do 15 %; (+) ojedinělá růstová aktivita do 5 %; - žádná růstová aktivita; číslo značí počet misek s uvedenou růstovou aktivitou.

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Růstová aktivita			
			Délka kultivace			
			13 dní	27 dní	51 dní	63 dní
S	1100	9	1 +	2 (+)	5 -	5 -
			3 (+)	3 -		
			1 k *			
	1550	12	4 +	1 +	5 -	5 -
			1 (+)	3 (+)		
				1 -		
S17	1100	9	4 ++	1 ++	3 (+)	5 -
			1 +	4 +	2 -	
	1550	12	2 ++	3 +	4 (+)	5 -
			3 +	2 (+)	1 -	

* ... kontaminace

Genotyp S stejně jako v předchozím pokusu vykazoval mnohem větší citlivost ke kanamycinu než druhý genotyp. Po prvních 13 dnech na selekčním médiu 5 vzorků mělo 15 % růstovou aktivitu, další 4 už vykazovaly pouze ojedinělý růst a jeden vzorek kontaminoval. Po dalších 14 dnech na selekčním médiu pouze 1 vzorek vykazoval ještě 15 % růst, dalších 5 snížilo svůj růst na ojedinělý a 4 přestaly růst úplně. Za následujících 24 dní už nevykazovaly žádnou růstovou aktivitu všechny zbylé vzorky, což opět dokazuje, že se nepodařilo integrovat DNA do jádra. Kontrolní netransformovaný vzorek byl tentokrát o něco odolnější vůči selekční schopnosti kanamycinu, ale samozřejmě nakonec také na selekčním médiu přestal růst. Druhá polovina kontrolního vzorku na médiu L vykazovala opět kompletní růstovou aktivitu.

Genotyp S17 opět ukázal vyšší odolnost ke kanamycinu, ale nižší než v předchozím pokusu. Po 13 denní selekci 6 z 10 vzorků ještě vykazovaly 40 % růst a zbylé 4 vzorky měly pouze 15 % růstovou aktivitu. Za následujících 14 dní si 40 % růstovou aktivitu ponechal pouze 1 vzorek, 7 vykazovalo 15 % růst a 2 už měly dokonce pouze ojedinělý růst. Po dalších 24 dnech se u 7 vzorků růstová aktivita snížila na ojedinělou a 3 vzorky přestaly růst úplně. Po uplynutí další 12 denní selekce už všechny vzorky ztratily růstovou aktivitu, takže se opět nepodařilo integrovat DNA do jader buněk. Netransformovaný kontrolní vzorek byl podobně jako u předchozího genotypu o něco odolnější vůči selekčnímu účinku kanamycinu než transformované vzorky.

6.2.4 TŘETÍ TRANSFORMAČNÍ POKUS

Při posledním transformačním pokusu jsem transformovala 24 vzorků na médiu L s přídavkem myo-inositolu o koncentraci 0,25 M zlatými mikroprojektily o velikosti 1,6 μm . Další 2 vzorky byly stříleny bez použití zlatých partikulí a 2 poslední vzorky jsem vůbec netransformovala. Všechny vzorky s výjimkou 4, které byly použity na zhodnocení úrovně tranzientní exprese genu *gus*, jsem hned druhý den přendala na selekční médium s kanamycinem o koncentraci 25 mg/l (u kontrolních vzorků jsem stejně jako u předchozích pokusů polovinu přenesla na médium L bez antibiotika).

➤ **Tab. 7:** Tranzientní exprese genu *gusA* u vybraných transformovaných vzorků embryonální kultury smrku ztepilého

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Číslo misky	Počet *
S	1100	9	1A	72
			1B	36
S17			2A	47
			2B	39

* ... počet modrých bodů (sektorů) odpovídajících tranzientní expresi genu *gus*

Tranzientní exprese v tomto pokusu vykazovala poměrně zvláštní hodnoty, neboť na rozdíl od všech mých předcházejících pokusů s těmito genotypy, jakož i na rozdíl od pokusů školitele, genotyp S zde vykázal vyšší hodnoty než genotyp S17.

➤ **Tab. 8: Zhodnocení růstové aktivity transformovaných kalusů smrkové embryogenní kultury na selekčním médiu s kanamycinem (25 mg/l).** +++ růstová aktivita u více než 40 % plochy kalusu; ++ růstová aktivita do 40 %; + růstová aktivita do 15 %; (+) ojedinělá růstová aktivita do 5 %; - žádná růstová aktivita; číslo značí počet misek s uvedenou růstovou aktivitou.

Genotyp	Tlak He [psi]	Vzdálenost [cm]	Růstová aktivita			
			Délka kultivace			
			14 dní	28 dní	42 dní	56 dní
S	1100	9	7 +	2 +	10 -	10 -
			3 (+)	6 (+)		
				2 -		
S17			6 ++	2 ++	4 (+)	10 -
			4 +	7 +	5 -	
				1 (+)		

Genotyp S se i u tohoto pokusu ukázal jako citlivější ke kanamycinu. Po 14 denní selekci 7 z 10 vzorků vykazovalo 15 % růstovou aktivitu a zbylé 3 měly ojedinělý růst. Za následujících 14 dní si 15 % růstovou aktivitu zachovaly pouze 2 vzorky, dalších 6 kleslo nebo si ponechalo ojedinělý růst a zbylé 2 vzorky přestaly růst. Během další 14 denní selekce již nevykazovaly žádný růst všechny vzorky. Kontrolní netransformované vzorky na obou typech médií vykazovaly podobný růst jako vzorky transformované.

Genotyp S17 vykazoval po prvních 14 dnech na selekčním médiu u 6 vzorků vysoký 40 % růst a zbylé 4 vzorky měly nižší 15 % růstovou aktivitu. Po dalších 14 dnech si pouze 2 vzorky zachovaly 40 % růstovou aktivitu, počet vzorků s 15 % růstem se zvýšil na 7 a poslední vzorek vykazoval dokonce ojedinělý růst. Následující 14 denní selekce úplně inhibovala růst u 5 vzorků a 4 si ponechaly alespoň ojedinělý růst. Za dalších 14 dní na selekčním médiu již ani tyto poslední 4 vzorky nevykazovaly žádnou růstovou aktivitu. Kontrolní vzorky stejně jako u předchozího genotypu vykazovaly podobný růst jako transformované vzorky.

7. DISKUZE

Ve své práci jsem se zabývala určením vhodných transformačních podmínek pro přímou transformaci smrkové embryogenní kultury biolistickou metodou, která využívá zlaté nebo wolframové partikule s navázanou vektorovou DNA jako mikroprojektily k „ostřelování“ rostlinného materiálu. Podobnou práci u smrku ztepilého již úspěšně provedli Robertson et al., 1992, Walter et al., 1999 a Clapham et al., 2000, buď na embryích či na embryogenních kulturách, samozřejmě však na zcela jiných genotypch.

Během své práce jsem provedla celkem 3 transformační pokusy. Během každého z nich jsem transformovala 24 vzorků smrkové embryogenní kultury zlatými mikroprojektily s navázaným plazmidem 35SGUSintron, z čehož byla vždy polovina genotypu S a druhá polovina genotypu S17. K selekci transgenních buněk jsem používala selekční médium s obsahem antibiotika kanamycinu o koncentraci 25 mg/l a pro ověření tranzientní exprese genu *gus* metodu histochemického stanovení produktu tohoto genu.

Před vlastními transformačními pokusy jsem musela provést experiment zabývající se citlivostí smrkové embryogenní kultury daných genotypů k různým selekčním látkám. Účelem tohoto experimentu byl výběr správné selekční látky a její koncentrace k pozdější selekci transformovaných buněk. Celkem jsem testovala 4 selekční látky, 3 z nich byly antibiotika (paromomycin, kanamycin a hygromycin) a poslední byl sacharid manóza. Jako nejvhodnější selekční látku jsem určila kanamycin o koncentraci 25 mg/l, a to vzhledem k výborným selekčním schopnostem, které vykazoval i za této nejnižší použité koncentraci. Toto selekční antibiotikum bylo také úspěšně použito v transformačních experimentech na rodu *Picea* autorů Ellis et al. (1989), Ellis et al. (1993), Bommineni et al. (1993), Charest et al. (1996), Wenck et al. (1999), Walter et al. (1999), Le et al. (2001), Klimaszewska et al. (2001) a Tian a Seguin, (2004). Zbývající dvě antibiotika také vykazovala poměrně vysokou toxicitu, ale ne tak ideální jako kanamycin. Hygromycin je navíc vysoce toxická látka nejen pro rostlinné, ale také živočišné buňky a tudíž nebezpečná i pro člověka. Manóza se oproti

antibiotikům ukázala pro selekci smrkové embryogenní kultury jako nevhodná. Pravděpodobně by k jejímu použití bylo potřeba provést samostatný pokus zabývající se určením správného poměru manózy a sacharózy v médiu. Sacharóza snižuje fytotoxicitu manózy, což bylo pozorováno už u několika rostlinných druhů např. u cukrové řepy (Joersbo et al., 1998), rajčete (Sigareva et al., 2004) nebo salátu (Růžičková, 2006).

Dalším samostatným experimentem předcházejícím vlastní transformační pokusy bylo otestování různých transformačních podmínek za účelem určení těch, které budou vykazovat nejvyšší hodnoty tranzientní exprese. Testovanými transformačními podmínkami byly tlak, při kterém praskne ruptur disk, a vzdálenost, kterou urazí mikroprojektily k rostlinnému explantátu. Jako neúčinnější transformační podmínky pro genotyp S se ukázali kombinace 1100 psi, 9 cm a 1550 psi, 12 cm. U genotypu S17 to byli kombinace 1550 psi, 9 cm a 1550 psi, 12 cm. Pro možnost srovnání transformační účinnosti u obou použitých genotypů za stejných transformačních podmínek jsem se rozhodla použít kombinaci 1100 psi a 9 cm i u genotypu S17.

V prvním transformačním pokusu jsem zaznamenala vyšší hodnoty tranzientní exprese u genotypu S17 než u genotypu S. Stejně tak se genotyp S17 ukázal jako odolnější vůči kanamycinové selekci, během které se jevila kombinace podmínek 1100 psi a 9 cm u tohoto genotypu vhodnější než druhý typ transformačních podmínek. Genotyp S velice rychle podléhal toxicitě kanamycinu v selekčním médiu. Jako vhodnější se u tohoto genotypu jevila kombinace transformačních podmínek 1550 psi a 12 cm. Bohužel jsem ani od jednoho genotypu nezískala trvalé transformanty.

Během druhého transformačního pokusu jsem zaznamenala podobné výsledky jako u předchozího pokusu. Výraznější rozdíl se projevil pouze u výsledků tranzientní exprese, u které se ukázaly nižší hodnoty než v předchozím pokusu.

Ve třetím pokusu jsem vycházela z práce Clapham et al., 2000, kde embryogenní kulturu *Picea abies* nejprve 1-3 hodiny před transformací kultivovali na médiu s myo-inositolem o koncentraci 0,25 M a po 8 dnech od transformace ho nahradily herbicidem Basta jako selekčním agens. Vlastní transformaci provedli pomocí mikroprojektilů o velikosti 1,6 μm . Touto metodou se jim podařilo získat 138 transformantů z více jak 200

linií rezistentních k herbicidu Basta. Tuto metodu jsem upravila podle předchozích pokusů školitele J. Břízy tak, že jsem vzorky přendala na selekční médium s kanamycinem už druhý den po transformaci vzhledem k použití jiné selekční látky než v popsaném experimentu. V tomto pokusu jsem použila kombinaci transformačních podmínek 1100 psi a 9 cm a zaznamenala jsem poněkud zvláštní hodnoty tranzientní exprese hlavně u genotypu S, kde se objevila jedna hodnota výrazně vyšší oproti ostatním hodnotám u obou genotypů a druhá se skoro nelišila od hodnot genotypu S17. Tento jev se dá nejspíš vysvětlit špatným výběrem vzorků pro stanovení tranzientní exprese. Bohužel se mi ani tímto pokusem nepodařilo získat trvalé transformanty.

Celkově lze konstatovat, že hodnoty tranzientní exprese jsou za konstantních podmínek experimentů silně až extrémně variabilní. Domnívám se, že hlavní příčinou je v praxi obtížně reprodukovatelný proces přípravy mikroprojektilů a hlavně jejich nanášení na nosiče (macrocarriers).

Protože se mi v žádném z transformačních pokusů bohužel nepodařilo získat trvalé transformanty, jsou výsledky mé práce v rozporu s již publikovanými pracemi Robertson et al., 1992, Walter et al., 1999, Clapham et al., 2000, Elfstrand et al., 2001 a Bishop-Hurley et al., 2001, které uvádějí úspěšně vypěstované stabilně transformované rostliny smrku ztepilého (*Picea abies*) získané pomocí mikroprojektilů. Ve všech těchto pracech byly ale použity jiné typy plazmidů než v mé práci, což mohlo být jednou z příčin, proč se mi nepodařilo získat trvalé transformanty. Mnou použitý plazmid 35SGUSintron byl velký 14 kb, což je pro tuto metodu transformace poměrně hodně a mohlo to zapříčinit neschopnost vektoru integrovat se do jaderného genomu. Dalším důležitým rozdílem od výše uvedených prací byl použitý genotyp rostlinného materiálu, což mohlo také být jedním z problémů v mé práci. Závislost genotypu na úspěšnosti transformace je všeobecně známá a je zmíněna např. v práci Walter et al., 1999. Genotyp S se vzhledem k výsledkům tranzientní exprese ukázal jako méně vhodný pro tuto metodu transformace.

Největší úskalí této transformační metody spočívá ve velice rychlé sedimentaci kovových partikulí při jejich přípravě před vlastní transformací. Z tohoto důvodu se

s nimi musí pracovat velice rychle a také často třepat, aby zbytečně nedocházelo k jejich usazování na dně mikroskopické. Problém nastane ve chvíli, kdy se do suspenze přidá plazmidová DNA. Pak už je třeba se suspenzí zacházet velice opatrně, aby zbytečně nedocházelo k poškození DNA a tím i snížení možnosti její úspěšné integrace do jaderného genomu. Z tohoto důvodu pak může v této části postupu přípravy partikulí docházet k nedostatečnému třepání a tím k sedimentaci partikulí na dně mikroskopické, což má za následek možné nanesení příliš malého nebo naopak velkého množství partikulí na jejich nosič. Bohužel se tomuto jevu dá velice těžko zabránit, je potřeba hlavně zkušenost a obratné zacházení se suspenzí.

8. ZÁVĚR

Ve své práci jsem se zabývala optimalizací podmínek pro přímou transformaci embryogenní kultury druhu *Picea abies* dvou genotypů (S a S17) pomocí zlatých mikroprojektilů s navázaným plazmidem nesoucím gen *gus* s intronem pod 35S promotorem (35SGUS-intron).

Určila jsem kanamycin v koncentraci 25 mg/l jako nejvhodnější selekční látku pro následnou selekci embryogenní smrkové kultury obou genotypů.

Za nejvhodnější transformační podmínky, vykazující nejvyšší hodnoty tranzientní exprese, jsem určila kombinace podmínek 1100 psi a 9 cm a také 1550 psi a 12 cm.

Ani v jednom transformačním pokusu se mi nepodařilo získat trvalé transformanty embryogenní kultury smrku ztepilého genotypů S a S17.

9. SEZNAM LITERATURY

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

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

Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis* plants. *C R Acad Sci (Paris), Life Sci* 316: 1194-1199

Bekkaoui F., Pilon M., Laine E., Raju D.S.S., Crosby W.L., Dunstan D.L. (1988) Transient gene expression in electroporated *Picea glauca* protoplasts. *Plant Cell Rep* 7: 481-484

Birch R.G. (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 297-326

Bishop-Hurley S.L., Zabkiewicz R.J., Grace L., Gardner R.C., Wagner A., Walter C. (2001) Conifer genetic engineering: transgenic *Pinus radiata* (D. Don) and *Picea abies* (Karst) plants are resistant to the herbicide Buster. *Plant Cell Rep* 20: 235-243

Bommineni V.R., Chibbar R.N., Dalta R.S.S., Tsang E.W.T. (1993) Transformation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* 13: 17-23

Boyton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hoster J.P., Johnson A.L., Jones A.R., Randolph-Anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., Sanford J.C. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538

Bříza J., Pavingerová D., Přikrylová P., Gazdová J., Vlasák J., Niedermeierová H. (2008) Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato. *Biol Plantarum* 52: 453-461

Charest P.J., Devantier Y., Ward C., Jones C., Schaffer U. (1991) Transient expression of foreign chimeric genes in the gymnosperm hybrid larch following electroporation. *Can J Bot* 69: 1731-1736

Charest P.J., Devantier Y., Lachance D. (1996) Stable genetic transformation of *Picea mariana* (Black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 32: 91-99

Charity J.A., Holland L., Donaldson S.S., Grace L., Walter C. (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum-infiltration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 70: 51-60

Christau P., Ford T., Kofron M. (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9: 957-62

Clapham D.H., Ekberg I. (1986) Induction of tumors by various strains of *Agrobacterium tumefaciens* on *Abies nordmanniana* and *Picea abies*. *Scand J For Res* 1: 435-437

- Clapham D., Demel P., Elfstrand M., Koop H.U., Sabala I., Von Arnold S. (2000)** Gene transfer by particle bombardment to embryonic cultures of *Picea abies* and the production of transgenic plantlets. *Scand J For Res* 15: 151-160
- Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson R.W.E., Stalker D.M. (1985)** Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744
- De Block M., Botterman M., van der Weile J., Dockx M., Thoen C., Gosselé V. (1987)** Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6: 2513-2518
- De la Pena A., Lórz H., Shell J. (1987)** Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* 325: 247-276
- Elfstrand M., Fossdal C.G., Sitbon F., Olsson O., Lonneborg A., Von Arnold S. (2001)** Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene *spi 2* in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. *Plant Cell Rep* 20: 596-603
- Ellis D., Roberts D., Sutton B., Lazaroff W., Webb D., Flinn B. (1989)** Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 8: 16-20
- Ellis D.D., McCabe D., Russell D., Martinell B., McCown B.H. (1991)** Expression of inducible angiosperm promoters in a gymnosperm, *Picea glauca* (white spruce). *Plant Biol* 19: 19-27
- Ellis D.D., McCabe D.E., Mcinnis S., Ramachandran R., Russell D.R., Wallance K.M., Martinell B.J., Roberts D.R., Raffa K.F., McCown B.H. (1993)** Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Biotechnology* 11: 84-89
- Eriksson T. (1965)** Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol Plant* 18: 976-993
- Feldmann 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
- Finer J.J., McMullen M.D. (1990)** Transformation cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 8: 586-589
- Fitzpatrick-McElligot S. (1993)** Gene transfer to tumor-infiltrating lymphocytes and other mammalian somatic cells by microprojectile bombardment. *Biol-Technology* 10: 1036-1040
- Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Fick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry Y.S., Gallupi G.R., Golberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C. (1983)** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4803-4807
- From 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: 5824-8
- Gad A.E., Rosenberg N., Altman A. (1990)** Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol Plant* 79: 154-157

- Gambley R.L., Ford R, Smith G.R. (1993)** Microprojectile transformation of sugarcane of shoots expressing β -glucuronidase. *Plant Cell Rep* 12: 343-346
- Goldfarb B., Strauss S.H., Horwe G.T., Zaerr J.B. (1991)** Transient gene expression of microprojectile- introduced DNA in Douglas-fir cotyledons. *Plant Cell Rep* 10: 517-521
- Gupta P.K., Dandekar A.M., Durzan D.J. (1988)** Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in Douglas fir and loblolly pine protoplasts. *Plant Sci* 58: 85-92
- Haldrup A., Noerremark M., Okkels F.T. (2001)** Plant selection principle based on xylose isomerase. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 114-119
- Hansen G., Das A., Chilton M.-D. (1994)** Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7603-7607
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. (1985)** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- Huang Y., Diner A.M., Karnosky D.F. (1991)** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 27: 201-207
- 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., Okkels F.T. (1996)** A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep* 16: 219-221
- Joersbo M., Donadsen I., Kreiber J., Peterssen S.G., Brunstedt J., Okkels F.T. (1998)** Analysis of manose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breeding* 4: 111-117
- Joersbo M., Jorgensen K., Brunstedt J. (2003)** A selection system for transgenic plants based on galactose as selective agent and UDP-glucose: galaktose-1-phosphate uridylyltransferase gene as selective gene. *Mol Breeding* 11: 315-323
- Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K.B., Sanford J.C., Butow R.A. (1988)** Mitochondria transformation in yeast by bombardment with microprojectils. *Science* 240: 1538-1541
- Kindle K.L., Schell R.A., Fernandez E., Lefebvre P.A. (1989)** Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol* 109: 2589-2601
- Klein T.M., Harper E.C., Svab Z., Sanford J.C., Fromm M.E. (1988)** Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8502-8505
- Klein J.M., Rath B.A., Fromm M.E. (1989)** Regulation of anthocyanin biosynthetic genes introduced into intact maize tissue by microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6681-6685
- Klimaszewska K., Devanter Y., Lachance D., Lelu M.A., Charest P.J. (1997)** *Larix laricina* (tamarach): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can J For Res* 27: 538-550

- Klimaszewska K., Lachance D., Pelleter G., Lelu M.-A., Seguin A. (2001)** Regeneration of transgenic *Picea abies* after cocultivation of embryonic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 748-755
- Krens F.A., Molendijk L., Wullems G.J., Schilperoot R.A. (1982)** In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plazmid DNA. *Nature* 296: 72-74
- Lakshminarayan M.I., Kumpatla S.P., Chandraskharan M.B., Hall T.C. (2000)** Transgene silencing in monocots. *Plant Mol Biol* 43: 323-346
- Le V.Q., Belles-Isles J., Dusabenyagysani M., Tremblay F.M. (2001)** An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot* 52: 2089-2095
- Lee C., Bagdasarian M., Meng M., Zeikus J.G. (1990)** Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*: Characterization of the structural gene and function of active site histidine. *J Biol Chem* 265: 19082-19090
- Levee V., Lelu M.A., Jouanin L., Cornu D., Pilate G. (1997)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Rep* 16: 680-685
- Litvay B.I., Verma D.C., Johnson M.A. (1985)** Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4: 325-328
- Luehrsen K.R., de Wet J.R., Walbot V. (1992)** Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol* 216: 397-414
- Márton L., Wullems G.J., Molendik L., Schilperoot R.N. (1979)** In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277: 129-131
- McCabe D.E., Swain W.F., Martinell B.J., Christau P. (1988)** Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926
- Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck A.R. (2000)** The use of phosphomannose – isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep* 19: 798-803
- Ondřej M., Drobník J. (2002)** Transgenozne rostlin. Academia, Praha
- 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
- Robertson D., Weissinger A.K., Ackley R., Glover S., Sederoff R.R. (1992)** Genetic transformation of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst] using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. *Plant Mol Biol* 19: 925-935
- Růžicková, N. (2006)** Použití genu *pmi* jako alternativního selektovatelného genu při transformaci lociky seté (*Lactuca sativa*). Bakalářská diplomová práce BF JU
- Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D., Allen M. (1987)** Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Particle Sci Technol* 5: 27-37

- Sanford J.C. (1988)** The Biolistic Process. Trends in Biotechnology 6: 299-302
- Sederoff R., Stomp A.M., Chilton W.S., Moore L.W. (1968)** Gene transfer into loblolly pine by *Agrobacterium tumefaciens*. Biotechnology 4: 647-649
- Seed B., Sheen J.Y. (1988)** A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. Gene. 30, 67 (2): 271-7
- Shah D.M, Horsch R.B., Klee H.J., Kishore G.M., Winter J.A., Aykentz J.A., Siegel N.R., Rogers S.G., Fraley R.T. (1986)** Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233: 478-481
- Sheng J.S., Citovsky V. (1996)** *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. Plant Cell 8: 1699-1710
- Sigareva M., Spirey R., Willitis M.G., Kramer C.M., Chang Y.F. (2004)** An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants. Plant Cell Rep 23: 236-245
- Strauch E., Wohlleben W., Pühler A. (1988)** Cloning of a phosphinotricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Gene 63: 65-74
- Tang W. (2001)** *Agrobacterium*-mediated transformation and assessment of factors influencing transgene expression in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) Cell Res 11: 237-243
- Tang W., Newton R.J. (2003)** Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. Plant Cell Rep. 22: 1-15
- Taurus T.E., Bekkaoui F., Pilon M., Dalta R.S.S., Crosby W.L., Fowke L.C., Dunstan D.I. (1989)** Factors affecting transient gene in electroporated black spruce (*Picea mariana*) and jack pine (*Pinus banksiana*) protoplasts. Theor Appl Genet 78: 531-356
- Tian, L, and Séguin, A. (2004)** Microprojectile particle effect on stable transformation of black spruce via bombardment. Plant Mol Biol Rep 22: 199.
- Thompson C.J., Movva N.P., Richard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M. (1987)** Characterization of the herbicide - resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J 6: 2519-2523
- Todd R., Tague B.W. (2001)** Phosphomannose isomerase: A versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ – line transformation. Plant Mol Biol Rep 19: 307-319
- Tzfira T., Yarnitzky O., Vainstein A., Altman A. (1996)** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis* Mill. Plant Cell Rep 16: 26-31
- Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K. (1992)** Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. Bio/Technology 10: 667-674
- Vitha S., Beneš K., Phillips J.P., Gartland K.M.A. (1999)** Histochemical GUS Analysis. Methods in Molecular Biology 44: *Agrobacterium* Protocols 185-193

- Waldron C., Murphy E.B., Roberts J.L., Gustafson G.D., Armour S.L., Malcolm S.K. (1985)** Resistance to hygromycin B: A new marker for plant transformation studies. *Plant Mol Biol* 5: 103-108
- Walter C., Grace L.J., Donaldson S.S. (1991)** An efficient biolistic transformation protocol for *Picea abies* embryogenic tissue and regeneration of transgenic plants. *Can J For Res* 29: 1539-1546
- Walter C., Grace L.J., Wagner A., White D.W.R., Walden A.R., Donaldson S.S., Hilton H., Gardner R.C., Smith D.R. (1998)** Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Rep* 17: 460-469
- Walter C., Grace L.J., Donaldson S.S. (1999)** An efficient biolistic transformation protocol for *Picea abies* embryogenic tissue and regeneration of transgenic plants. *Can J For Res* 29: 1539-1546
- Wan Y., Lemaux P.G. (1994)** Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol* 104: 37-48
- Weising K., Schell J., Kahl G. (1988)** Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. *Ann Rev Genet* 22: 421-477
- Wenck A.R., Quinn M., Whetten R.W., Pullman G., Sederoff R. (1999)** High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol Biol* 39: 407-416
- Wong H.C., Ting Y., Lin H.C., Reichert F., Maymbo K., Watt K., Toy P.L., Drummond R.J. (1991)** Genetic organization and regulative of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J Bacteriol* 173: 6849- 6858
- Zaenen I., 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
- Zelenin A.V., Titomorov A.V., Kolesnikov V.A. (1989)** Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection. *FEBS Lett.* 244: 65-67
- Zhang P., Potrykus I., Puonticaerlas J. (2000)** Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. *Transgenic Res* 9: 405-415