

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra genetiky**



**Molekulární analýza transgenních rostlin  
rododendronů, získaných po transformaci vektorem  
35SGUSint.**

Diplomová práce

Vypracovala: Bc. Petra Skotnicová  
Vedoucí práce: Mgr. Daniela Pavingerová, CSc.  
PřF JU a ÚMBR, BC AV ČR v.v.i.

České Budějovice, 2011

**Skotnicová, P. Bc.**, 2011: Molekulární analýza transgenních rostlin rododendronů, získaných po transformaci vektorem 35SGUSint. [Molecular analysis of transgenic rhododendron plants obtained by transformation with 35SGUSint. construct. Mgr. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

**Anotation:**

The goal of this thesis was molecular analysis of rhododendron plants obtained after transformation by *Agrobacterium tumefaciens* and subsequent selection on kanamycin. Presence of incorporated genes *gusA* and *nptII* was determined by polymerase chain reaction (PCR) and Southern analysis. GUS activity was determined by fluorimetric and histochemical assay too.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.**

V Českých Budějovicích 26. 4. 2011 Podpis:

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala zejména své školitelce Mgr. Daniele Pavingerové, CSc. za celou tu dlouhou dobu, kdy mne vedla a poskytla mi mnoho cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat Jitce Maškové za všestrannou pomoc, zejména za nahrazování všeho co jsem zvládala spotřebovat, a že toho nebylo málo. Velký dík patří také RNDr. Haně Niedermeierové za přínosné rady a pomoc při stanovení proteinů a doc. Jindřichovi Břízovi, CSc. za pomoc při izolaci DNA a Southernově hybridizaci. Ráda bych poděkovala všem z naší a přilehlých laboratoří za přátelské pracovní prostředí a vstřícnost v případech, kdy jsem s něčím potřebovala pomoci či poradit. Velký dík patří také mé rodině a přátelům za poskytnuté zázemí a podporu během studia.

|  |               |
|--|---------------|
| <b>1. ÚVOD .....</b>   | <b>- 1 -</b>  |
| 1.1 Využití transgenozy.....                                   | - 1 -         |
| 1.2 Cíl práce .....  | - 2 -         |
| <b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>                              | <b>- 3 -</b>  |
| 2.1. Rod <i>Rhododendron</i> .....                             | - 3 -         |
| 2.2 Transformace.....  | - 4 -         |
| 2.2.1 Nepřímé transformace.....                                | - 5 -         |
| 2.2.2 Disková metoda transformace.....                         | - 5 -         |
| 2.2.3 Ti plazmid .....   | - 6 -         |
| 2.3 Transformace rododendronů .....                            | - 7 -         |
| 2.4 Selekční systémy .....                                     | - 8 -         |
| 2.4.1 Negativní selekce .....                                  | - 8 -         |
| 2.4.2 Pozitivní selekce .....                                  | - 9 -         |
| 2.5 Signální geny .....  | - 11 -        |
| 2.5.1 Gen <i>gusA</i> .....                                    | - 11 -        |
| 2.5.2 Gen <i>gfp</i> .....                                     | - 12 -        |
| <b>3. METODY .....</b>   | <b>- 13 -</b> |
| 3.1 Experimentální materiál.....                               | - 13 -        |
| 3.1.1 Rostlinný materiál .....                                 | - 13 -        |
| 3.1.2 Plazmidový konstrukt.....                                | - 14 -        |
| 3.2 Kultivace rostlin rododendronů .....                       | - 14 -        |
| 3.3 Analýza transformovaných rostlin.....                      | - 17 -        |
| 3.3.1 Fluorimetrické stanovení GUS.....                        | - 17 -        |
| 3.3.2 Histochemické stanovení GUS aktivity.....                | - 18 -        |
| 3.3.3 Analýza obsahu proteinů .....                            | - 19 -        |
| 3.3.4 Izolace DNA .....  | - 20 -        |
| 3.3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....                  | - 22 -        |
| 3.3.6 Southernova hybridizace .....                            | - 23 -        |
| <b>4. VÝSLEDKY .....</b>                                       | <b>- 26 -</b> |
| 4.1 Regenerace rostlin po transformaci .....                   | - 26 -        |
| 4.1.1 Odrůda Rebe .....  | - 26 -        |
| 4.1.2 Odrůda Azuro .....                                       | - 26 -        |
| 4.2 Fluorimetrické a histochemické stanovení GUS aktivity..... | - 27 -        |
| 4.2.1 Odrůda Rebe .....  | - 27 -        |
| 4.2.2 Odrůda Azuro .....                                       | - 29 -        |
| 4.3 Polymerázová řetězová reakce.....                          | - 31 -        |
| 4.4 Southernova hybridizace.....                               | - 32 -        |

|                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| <b>5. DISKUZE .....</b>           | <b>- 35 -</b> |
| <b>6. ZÁVĚR.....</b>              | <b>- 38 -</b> |
| <b>7. POUŽITÁ LITERATURA.....</b> | <b>- 39 -</b> |

# 1. Úvod

## 1.1 Využití transgenoz

Počátky šlechtění rostlin sahají až do doby před mnoha staletími. Přestože klasické šlechtění dosáhlo značných úspěchů, je výrazně omezeno genofondem daného druhu. Oproti tomu genové inženýrství umožňuje do rostlin vnášet i geny z jiných druhů.

Metodami genového inženýrství se transformují jak kulturní plodiny, tak i okrasné rostliny, vzhledem k jejich možnému komerčnímu využití. Přenos transgenů do rostlin lze využít k získání plodin odolnějších k nejrůznějším stresům a patogenům, ke zlepšení výživových charakteristik (např. omezení, zvýšení syntézy určitých lipidů, optimální množství jednotlivých aminokyselin), dále také k tvorbě protilátek či farmakologicky využitelných vzácných proteinů např. hirudinu.

Transformace okrasných rostlin se využívají stejně jako u kulturních rostlin ke zvýšení odolnosti k chorobám a škůdcům, dále však také k prodloužení životnosti řezaných květin cestou inhibice syntézy ethylenu (Iwazaki, 2004) a k modifikaci barvy květů.

Zejména modifikace barvy květů je klasickými metodami šlechtění často buďto zdlouhavá nebo nemožná. Většina kvetoucích rostlin totiž neobsahuje geny pro všechny barvy květů. Například komerčně velmi důležité okrasné rostliny jako *Rosa* spp., *Dianthus caryophyllus* a *Dendranthema grandiflorum* postrádají modře kvetoucí druhy a kultivary. (Mori, 2006)

Prvním způsobem jak dosáhnout změny barvy květu je potlačení barvy stávající, čímž můžeme získat bílé květy nebo nové odstíny stávající barvy. Dalším způsobem je vnesení genu pro syntézu nového barviva.

Barva květu je určena třemi třídami pigmentů: flavonoidy, karotenoidy a betalainy. Na rozdíl od široce rozšířených flavonoidů a karotenoidů, můžeme betalainy nalézt pouze u několika rostlinných druhů z řádu Caryophyllales. Nejběžnějšími květními pigmenty determinujícími barvu květů jsou flavonoidy (zejména antokyany). Flavonoidy přispívají k rozsahu barev od žluté přes oranžovou, červenou až k nachové (To a Wang, 2006). Biosyntetická dráha flavonoidů je velmi dobře prostudovaná, což je nutnou podmínkou pro využití jednotlivých genů ovlivňujících barvu květu pro modifikace metodami genového inženýrství.

## 1.2 Cíl práce

Cílem mé práce byla molekulární analýza rostlin rododendronů, které jsem získala v rámci mé bakalářské práce po transformaci 2 kultivarů geny *nptII* a *gusA* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

Pro důkaz přítomnosti transgenů byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) a Southern blot, pomocí kterého je možné zjistit i počet kopií vnesené T-DNA. Pro zjištění přítomnosti genu *gusA* jsem použila také fluorimetrickou a histochemickou metodu stanovení aktivity  $\beta$ -glukuronidázy, což je enzym kódovaný tímto genem.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Rod *Rhododendron*

Rhododendron (Pěnišník) je rod rostlin patřící do čeledi vřesovcovité (*Ericaceae*).

*Rhododendron* je latinské slovo pocházející z řeckého rhodos (růžový, červený) a dendron (strom). Tento název byl až do 17. století používán pro oleandr *Nerium oleander*, pěnišníkům ho přiřkl Carl von Linné (Větvička, 1998). Český název je pravděpodobně odvozen z ruského pijanišník.

Rod *Rhododendron* zahrnuje 850 – 1200 druhů a tisíce vyšlechtěných kultivarů. Rododendrony se vyskytují zejména na severní polokouli, nejhojněji v jižní Číně, Himalájích, ale také v Severní Americe, Japonsku a jihovýchodní Asii (Burnie *et al.*, 2007). Rostou většinou v horském až subalpinském pásmu.

Rod *Rhododendron* je velmi pestrý. Nalezneme zde stálezelené, poloopadavé i opadavé keře i stromy. I přes velkou rozmanitost druhů a kultivarů jsou si všechny rododendrony vzhledem značně podobné. Listy jsou střídavé, jednoduché, různého tvaru, lupenité až kožovité. Květy jsou pětičetné, nejčastěji v koncových okoličnatých hroznech a mají nálevkovitý, zvonkovitý nebo trubkovitý tvar. Plodem jsou tobolky s křídlatými semeny. (Koblížek, 2006)

Optimálně rostou rododendrony v kyselé půdě (pH 4,5 – 5,5) nejlépe směsi rašeliny a lesní hrabanky, většina z nich nesnáší půdu bohatou na vápník. Díky jemnému, mělce rozloženému kořenovému systému nemají možnost získávat vláhu a živiny z hloubky či větší vzdálenosti, proto preferují spíše propustné půdy s vyšším obsahem organických látek.

Rododendrony můžeme rozmnožovat pohlavně semeny, nebo nepohlavně řízkováním, roubováním, hřížením (zasypání nižší větve hlínou, aby zakořenila) a také mikropropagací v *in vitro* podmínkách. (Böhm, 2004)

Sbírkou pěnišníků a dalších vřesovcovitých nalezneme u nás např. v Průhonickém parku. Založila ji Uljana Blažková v 80. letech 20. století a obsahuje více jak 100 druhů a kultivarů. (Chytra *et al.*, 2010)

## 2.2 Transformace

Metody genového inženýrství zajišťující přenos genetické informace do rostlin se dělí do dvou kategorií a to na přímé a nepřímé transformace. Při nepřímé transformaci se využívá přirozeného systému přenosu genetické informace půdních bakterií rodu *Agrobacterium*. Tyto bakterie inkorporují část své genetické informace, tzv. T-DNA, do rostlinné buňky. Geny, které jsou součástí T-DNA, jsou poté zodpovědné za zvýšenou produkci růstových hormonů v napadených buňkách, což vede ke vzniku nádoru. Kromě toho obsahuje inkorporovaná T-DNA geny pro produkci látek zvaných opiny (aminokyseliny odvozené od argininu), které může bakterie následně využít jako zdroj uhlíku a dusíku.

Transformace pomocí agrobakteria je využitelná zejména u dvouděložných rostlin. Dvouděložné rostliny vylučují při poranění fenolické látky typu acetosyringonu, které vyvolají jak chemotaxi bakterií rodu *Agrobacterium*, tak také aktivují *vir* geny, které jsou odpovědné za přenos T-DNA. U jednoděložných rostlin se vyskytují odlišné hojivé procesy, díky čemuž většina z nich není citlivá k agrobakteriu. Citlivost k bakterii *Agrobacterium* se často liší i mezi rostlinami stejného rodu. Vzhledem k tomu, že ne u všech rostlinných druhů lze k transformaci použít agrobakteria, byly vyvinuty metody tzv. přímé transformace.

Při přímých metodách transformace je DNA vpravována do rostlinných buněk přímo. Při transformaci rostlinných pletiv se používá metoda, při které jsou do pletiva vstřelovány mikroprojektily (zlaté nebo wolframové kuličky o velikosti 0,6 – 2  $\mu\text{m}$ ) obalené plazmidovou DNA (Klein *et al.*, 1992). Další metody přímé transformace se využívají k transformaci rostlinných protoplastů. Mezi tyto metody patří např. elektroporace (Fromm *et al.*, 1985), kdy jsou v buněčné membráně vytvořeny za použití stejnosměrného proudu reversibilní póry, kterými DNA pronikne do buňky. Další přímou metodou pro transformaci protoplastů je přidání polyethylenglykolu (PEGu) do roztoku DNA a protoplastů. PEG vyvolá shlukování buněk a změny v membráně, což usnadní transport DNA do protoplastů (Lazzeri *et al.*, 1991).



### 2.2.1 Nepřímé transformace

Při nepřímých genetických transformacích se využívá dvou druhů agrobakteria a to *Agrobacterium tumefaciens* způsobující u rostlin tvorbu nádorů (crown galls) a *Agrobacterium rhizogenes* vyvolávající růst kořenů nazývaných hairy roots (Ondřej a Drobník, 2002). Za virulenci těchto gramnegativních půdních bakterií jsou zodpovědné jejich plazmidy nazývané Ti u *A. tumefaciens* (Zaenen *et al.*, 1974) a Ri u *A. rhizogenes* (Chilton *et al.*, 1982).

Dlouhou dobu se dařilo pomocí agrobakteria transformovat pouze dvouděložné rostliny, do dnešní doby však už byly publikovány i transformace jednoděložných rostlin např. rýže (Hiei *et al.*, 1994) nebo pšenice (Cheng *et al.*, 1997).

Přestože byla popsána řada metod nepřímé transformace, např. transformace semen (Feldmann a Marks, 1987) a infiltrace (Bechtold *et al.*, 1993) u *Arabidopsis thaliana*, či transformace protoplastů jejich kokultivací s *Agrobacterium* (Márton *et al.*, 1979), nejčastěji se při nepřímé transformaci používá disková metoda transformace (Horsch *et al.*, 1985).

### 2.2.2 Disková metoda transformace

Disková metoda transformace spočívá v kokultivaci segmentů různých částí rostliny, které dobře regenerují *in vitro* (listy, stonkové segmenty, segmenty kořenů, hypokotylů apod.), se suspenzí bakterií rodu *Agrobacterium*. Doba kokultivace se může pohybovat od několika minut až po několik dnů (Ondřej *et al.*, 1999). Řezné plochy segmentů zajišťují nutné poranění rostliny, které vyvolá tvorbu fenolických látek typu acetosyringonu vylučovaných při poranění většinou dvouděložných rostlin. Ty hrají důležitou úlohu jak při chemotaxi, tak při aktivaci *vir* genů. Pro přichycení bakterií k povrchu buněk stačí většinou poměrně krátká doba kokultivace, poté jsou segmenty přeneseny na médium bez antibiotik, kde jsou kultivovány 1 až 2 dny, čímž je poskytnut dostatek času pro přenos T-DNA do rostlinných buněk a její integraci do genomu.

Nakonec jsou segmenty kultivovány na médiu s antibiotikem pro eliminaci bakterií (např. timentin, cefotaxim, vancomycin), selekční látkou, která brání růstu netransformovaných buněk (např. kanamycin, hygromycin) nebo poskytuje transformovaným buňkám metabolickou výhodu (např. manóza), a také s růstovými látkami navozujícími kalogenezi a regeneraci.

### 2.2.3 Ti plazmid

Ti plazmid je cirkulární dvouřetězcová molekula DNA nezávisle se replikující v bakteriální buňce. Velikost plazmidu je zhruba 150-200 kb. K indukci tumorů jsou nezbytné dva úseky Ti plazmidu a to T-DNA (transferred DNA) a úsek virulence (*vir*-region).

V úseku virulence jsou lokalizovány geny zodpovědné za přenos T-DNA. Délka úseku je 35 kb a obsahuje nejméně 6 *vir* operonů. Tyto operony jsou v pořadí *virA*, *virB*, *virC*, *virG*, *virD*, *virE* (Rogowsky *et al.*, 1990). Většina z těchto operonů kóduje více než jeden gen. Celkově je geny *vir* regionu kódováno okolo 20 proteinů. Tyto proteiny mají specifické funkce během oddělení T-DNA z Ti plazmidu a jejího přenosu do rostlinné buňky (Drobník a Ondřej, 2002).

T-DNA je úsek Ti plazmidu přenášený do rostlinné buňky. Délka T-DNA se pohybuje mezi 15-45 kb podle typu plazmidu. Pro přenos jsou nutné pouze její pravá a levá hraniční sekvence o velikosti 25 bp (Horsch a Klee, 1986). Nejprve dojde ke zlomu v pravé hraniční sekvenci dolního vlákna T-DNA, následuje jeho odkrucování, které je ukončeno v levé hraniční sekvenci (Jayaswal *et al.*, 1987).

Pro využití bakterií rodu *Agrobacterium* v genovém inženýrství se z T-DNA odstraní původní geny pro syntézu opinů a růstových látek a ponechají se pouze hraniční sekvence, mezi které se inkorporují geny, které chceme vnést do rostliny. Vedle cílového genu to bývá většinou selekční gen nejčastěji pro rezistenci k nějakému antibiotiku a signální gen umožňující ověřit, zda je T-DNA přítomna v rostlinné buňce.

## 2.3 Transformace rododendronů

Transformace rododendronů je možné využít pro genové manipulace vedoucí ke zvýšení jejich odolnosti k chorobám, ke stresům vnějšího prostředí nebo ke změně fenotypu, zejména barvy květů (Pavingerová, 2000). Předpokladem pro tyto genové manipulace je vyvinout vhodný a dostatečně účinný systém přenosu genů do rododendronů, což bylo i cílem mé práce.

Pro transformaci rododendronů byly doposud vyzkoušeny transformace pomocí mikroprojektilů a transformace využívající bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

Transformace mikroprojektily nebyly doposud příliš úspěšné. Hsia a Korban (1998), kteří zkoušeli transformovat kultivary 'Hino-crimson' a 'Fuchsia' za použití plazmidu pZA300 nesoucího *gusA* reportérový gen a selekční gen pro hygromycin fosfotransferázu, získali pouze tranzientní GUS expresi. Knapp *et al.* (2001) dosáhli úspěšnosti transformace 0,2 %, když získali 3 transformanty obsahující selekční gen *nptII* a reportérový gen *gusA* nebo *gfp* z 1500 původně bombardovaných listů. Možnou příčinou nízké úspěšnosti transformace může být podle autorů obtížné pronikání částic zlata do buněk listů rododendronů, vysoký výskyt odumření buněk následkem bombardování částicemi anebo degradace exogenní DNA dříve než se mohla inkorporovat do genomu.

Jako vhodnější pro transformaci rododendronů se zatím jeví použití bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Pro testování účinnosti přenosu jsou do rododendronů vnášeny nejčastěji geny *nptII* a *gusA* (Pavingerová *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 1996). Ueno *et al.* transformovali těmito geny kultivar 'Percy Wiseman' s 5 % úspěšností. Pavingerová *et al.* uskutečnili úspěšnou transformaci 5 kultivarů a to: 'America', 'Catawbiense grandiflorum roseum', 'Madame Carvalho', 'Mars' a 'Nova Zembla'.

Dunemann *et al.* (2002) použili geny *rolABC* nebo pouze gen *rolB* pro transformaci genotypů RD2-2 a RD2-30 a také gen *Fro2* kódující enzym železito-chelátovou reduktázu k transformaci genotypů Rh 10, Rh 33, Rh 37 a kultivaru 'Cunningham's White'. Dosáhli úspěšnosti transformace mezi 1-2 %. Cílem této práce bylo zvýšení příjmu železa, což by mohlo vést ke zlepšení růstu transformovaných rododendronů na vápencovitých půdách.

Citlivost jednotlivých kultivarů k agrobakteriu se však často velmi liší (Tripepi *et al.*, 1999; Pavingerová *et al.*, 1995) a získané transformované rostliny vykazují různé stupně chimérismu (Pavingerová *et al.*, 1997; Dunemann *et al.*, 2002).

## 2.4 Selekční systémy

Při transformaci je nutné spolu s cílovým transgenem vnášet i tak zvaný selektovatelný transgen, který slouží k odlišení buněk transformovaných od netransformovaných. Selekční geny poskytují transformovaným buňkám rezistenci k určité látce či antibiotiku. Látka, proti které gen poskytuje rezistenci je nejčastěji přidávána do agarového média, ale může být také použita jako postřik.

### 2.4.1 Negativní selekce

Pokud jsou netransformované buňky po působení selekční látky usmrceny, jedná se o selekci negativní. Pokud však selekční látka netransformované buňky usmrtí příliš rychle, dojde k vyloučení množství fenolických sloučenin a dalších látek, které jsou pro transformované buňky toxické (Snustad a Simmons, 2009). Selekční účinek jednotlivých selekčních látek se často velmi liší mezi různými druhy rostlin, případně i mezi kultivary určitého druhu. U některých druhů rostlin může již nízká koncentrace daného selekčního činidla mít silný selekční účinek. Je proto nutné určit vhodnou koncentraci selekčního činidla, aby byla zajištěna dostatečná selekce transformovaných buněk od netransformovaných, a zároveň aby růst transformovaných buněk nebyl příliš inhibován látkami vylučovanými hynoucími netransformovanými buňkami.

Nejvíce používaným transgenem pro negativní selekci je gen *nptII* (Fraley *et al.*, 1986). Tento gen kóduje enzym neomycin-fosfotransferázu II a pochází z transpozonu Tn5 bakterie *E. coli*. Pomáhá buňkám fosforylací inaktivovat aminoglykozidová antibiotika (kanamycin, neomycin, geneticin, paramomycin). Při selekci se nejčastěji využívá kanamycin a to v rozmezí koncentrací 50 až 500 mg/l. Některé čeledi rostlin (*Viciaceae*, *Poaceae*) však mají poměrně vysokou hladinu přirozené rezistence (Angenon *et al.* 1994).

Další často používaný selekční transgen je gen *hpt* umožňující rezistenci k hygromycinu (Elzen *et al.* 1985). Hygromycin je antibiotikum blokující proteosyntézu u prokaryot i eukaryot. Z tohoto důvodu se používá spíše tam, kde není možné použít jako selekční látku kanamycin.

Vzácněji jsou používány i transgeny pro rezistenci k antibiotikům gentamicinu (Hayford *et al.*, 1988), bleomycinu (Hille *et al.*, 1986), streptomycinu a spektinomycinu (Svab *et al.*, 1990).

Kromě transgenů navozujících rezistenci k antibiotikům se používají poměrně často také transgeny pro rezistenci k herbicidům. Nejpoužívanější jsou transgeny *pat* (Strauch *et al.*,

1988) a *bar* (Thompson *et al.*, 1987) pro rezistenci k fosfinitricinu a transgeny kódující enzymy EPSP a GOX pro rezistenci k glyfozátu (Shah *et al.*, 1986).

Existují však i systémy využívající pro selekci jiné látky než jsou antibiotika a herbicidy. Pro negativní selekci lze využít například galaktózu (Joersbo *et al.*, 2003), metotrexát (Eichholtz *et al.*, 1987) nebo aminokyselinu D-serin (Erikson *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Pozitivní selekce

V případě pozitivní selekce poskytuje selekční gen transformovaným buňkám metabolickou výhodu, netransformované buňky neodumírají, ale většinou na médiu se selekčním agens strádají a je inhibován jejich růst.

Asi nejpoužívanější transgen pro pozitivní selekci je gen *pmi* (*manA*) pro enzym manóza-6-fosfátizomerázu pocházející z *E.coli* (Miles a Guest, 1984). Manóza je běžně v rostlinách fosforylována za vzniku manózo-6-fosfátu, který již rostliny nedokážou dále metabolizovat, takže se v buňkách hromadí a inhibuje růst rostliny. Rostliny transformované genem *pmi* mohou přeměnit manózo-6-fosfát na fruktózo-6-fosfát, který jakožto prekurzor glykolýzy je rostlinou dále metabolizován. Na podobném principu funguje i transgen *xyIA* kódující enzym xylózoizomerázu, díky kterému dokážou transformované rostliny využít xylózu jako zdroj energie (Haldrup *et al.*, 1998).

Pro pozitivní i negativní selekci lze použít gen *daoI*, který kóduje oxidázu D-aminokyselin (Erikson *et al.*, 2004). Typ selekce závisí na použité selekční látce. Pro negativní selekci se využívají jako selekční látka D-alanin nebo D-serin a pro pozitivní selekci D-izoleucin nebo D-valin. Kombinaci obou typů selekce lze využít při transformaci cílovým genem, po které následuje vyštěpení selekčního transgenu *daoI*. Transformované rostliny jsou nejprve selektovány na médiu s aminokyselinou D-alanin nebo D-serin, která je pro netransformované rostliny toxická, a proto uhynou. Transformované rostliny přežijí díky metabolizaci D-aminokyseliny enzymem. Poté je selekční transgen vyštěpen například místně specifickou rekombinací, či jiným způsobem. Pro selekci rostlin, které již selekční transgen *daoI* neobsahují, je použita pozitivní selekce na D-izoleucinu nebo D-valinu, což jsou látky pouze mírně toxické pro rostlinu. Avšak u těch rostlin, kde nedošlo k vyštěpení transgenu se selekční látky působením oxidázy D-aminokyselin přemění na látky toxické, které způsobí úhyn rostlin. Získané rostliny by tudíž měly obsahovat cílový vnášený gen, ale již by v nich neměl být přítomen selekční transgen.

Pro pozitivní selekci lze dále použít i gen *gusA* z *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Tento gen kóduje enzym  $\beta$ -glukuronidázu. Při použití benzyln-3-glukuronidu jako selekční látky vzniká působením enzymu růstový hormon benzyladenin stimulující růst transgenních buněk. Jako selekční látku lze využít i kyselinu cellobiuronovou, která se skládá z glukózy a kyseliny glukuronové. Rozštěpením vazby pomocí  $\beta$ -glukuronidázy dojde k uvolnění glukózy, kterou transformované rostliny využijí jako zdroj energie, zatímco netransformované strádají. Obě selekční látky však nejsou dosud komerčně dostupné. Gen *gusA* se tedy využívá zejména jako gen signální (viz dále).

## 2.5 Signální geny

Signální (reportérové) geny jsou transgeny, u kterých lze snadno detekovat a kvantitativně stanovit expresi. Jsou to chimérické geny obsahující regulační sekvence pro projev v rostlinném genomu a kódující sekvence bakteriálního nebo živočišného původu (Ondřej a Drobník, 2002). Dnes nejpoužívanější signální geny jsou *gusA* a *gfp*.

### 2.5.1 Gen *gusA*

Gen *gusA* pochází z bakterie *E.coli*, kde je označován jako *uidA*, a kóduje enzym  $\beta$ -glukuronidázu.  $\beta$ -glukuronidáza je hydrolytický enzym štěpící nejrůznější  $\beta$ -glukuronidy, je teplotně stabilní, fungující v širokém rozmezí pH (5-9) a odolný proti proteázám, může být však inhibován některými těžkými kovy. Funkční enzym je tetramer, monomer tohoto polypeptidu má molekulovou hmotnost 68,2 kDa. Enzym se nevyskytuje ve většině rostlin ani hub, u obratlovců má velmi slabou aktivitu. Byla však popsána určitá nespecifická aktivita u netransformovaných rostlin, zejména v pylových zrnech (Jefferson a Wilson, 1991). Enzym GUS mění snadno komerčně dostupné substráty na látky, jejichž přítomnost lze poměrně snadno stanovit. Používají se dvě metody stanovení a to fluorimetrická a histochemická.

Při fluorimetrickém stanovení se jako substrát používá 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid (MUG), který je působením  $\beta$ -glukuronidázy rozštěpen na  $\beta$ -glukuronid a 4-methylumbelliferon (MU). Přidáním alkalického roztoku sody je reakce zastavena a je tím také umožněna ionizace hydroxylu MU nutná pro fluorescenci. MU pak po ozáření dlouhovlnným UV (365 nm) emituje záření o vlnové délce 455 nm (modře fluoreskuje).

Histochemická metoda slouží k určení místa exprese genu ve tkáních. Jako substrát se využívá 5-brom-4-chlor-3-indolylglukuronid (X-gluc). Enzymem je ze substrátu odštěpen indol, který se oxidací změní na nerozpustný derivát indiga mající sytě modrou barvu. Produkt je nedifúzní a zůstává lokalizován v buňkách, ve kterých vznikl. Meziprodukt reakce je však difúzní, následkem toho nemusí modré zbarvení přesně odpovídat místu exprese genu *gusA*. Citlivost metody může být ovlivněna špatnou infiltrací roztoku substrátu do rostlinných tkání.

### 2.5.2 Gen *gfp*

GFP (green fluorescent protein) je bioluminiscentní protein kódovaný genem *gfp* pocházejícím z medúzy *Aequorea Victoria* (Chalfie *et al.*, 1994). Tento protein zeleně fluoreskuje po vystavení UV nebo modrému světlu. Protein nevyžaduje žádný substrát ani kofaktory, je stabilní v širokém rozmezí pH a je termostabilní (do 65 °C). Schopnost fluorescence je zachována i po fúzi s jiným proteinem, čehož může být využito k lokalizaci buněčných proteinů. Původní protein byl pozměněn pro získání lepší exprese v rostlinných buňkách, mutacemi středového chromoforu bylo také dosaženo odlišných barevných variant např. BlueFP, YellowFP.

U některých druhů případně kultivarů rostlin se však může vyskytnout autofluorescence pletiv, kdy pletiva emitují záření o podobné vlnové délce jako GFP. Vyšší úrovně autofluorescence pak mohou bránit odlišení transgenních a netransgenních rostlin (Kůta, 2007). Výskyt autofluorescence některých pletiv byl popsán i u rododendronů (Knapp *et al.*, 2001).



## 3. Metody

### 3.1 Experimentální materiál

#### 3.1.1 Rostlinný materiál

Pro transformace jsem použila rostliny rododendronů odrůdy Azuro (Obr. 1) a Rebe (Obr. 2) udržované v *in vitro* kultuře. Tento rostlinný materiál pochází z Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích.

**Obr. 1** Azuro



**Obr. 2** Rebe

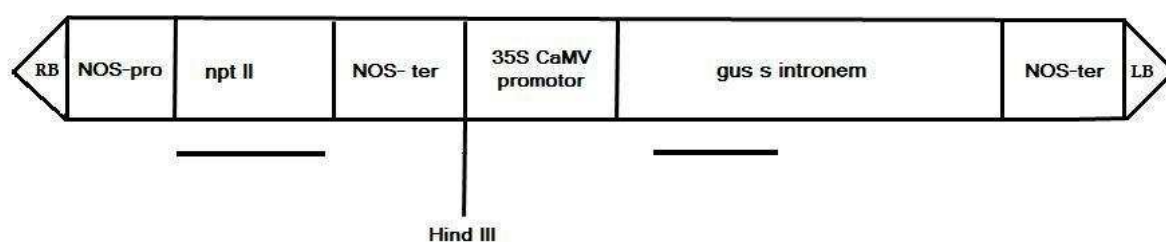


### 3.1.2 Plazmidový konstrukt

Pro transformaci jsem použila plazmidový konstrukt p35SGUSint. (Vancanneyt *et al.*, 1990) z plazmidu pBIN19 (Obr. 3). Tento konstrukt obsahuje gen *nptII* pro neomycin-fosfotransferázu II s promotorem a terminátorem NOS. Gen *nptII* navozuje rezistenci k antibiotiku kanamycin, které jsem použila jako selekční látku.

Konstrukt dále nese gen *gusA* s intronem, který zabraňuje expresi genu v bakteriích. Gen *gusA* je řízený 35S CaMV promotorem a ukončený NOS terminátorem.

**Obr. 3** Plazmidový konstrukt



NOS-pro – NOS promotor, NOS-ter – NOS terminátor, Hind III – restriční místo enzymu *HindIII*,

RB a LB – pravá a levá hraniční sekvence, černou čarou jsou vyznačeny sondy pro Southernovu hybridizaci

### 3.2 Kultivace rostlin rododendronů

Rostlinný materiál jsem pěstovala jako *in vitro* kultury na Andersonově médiu (Anderson, 1984) při teplotě 23 °C, fotoperiodě 16 h a intenzitě osvětlení 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Množení jsem prováděla pomocí stonkových segmentů.

K přípravě Andersonova média jsem použila 2 g/l práškového Andersonova média s vitamíny od firmy Duchefa (Tab. 1) doplněného 2 g/l polyvinylpyrrolidonu K30 (Fluka), 30 g/l sacharosy (Penta), 8 g/l agaru, růstovými látkami a antibiotiky. Všechny složky média kromě růstových látek a antibiotik jsem rozmíchala v redestilované vodě, poté jsem zvýšila pH roztoku za použití KOH na 5,2 a provedla sterilizaci média v tlakovém hrnci trvající 30 minut. Vysterilizované médium jsem za stálého míchání zchladila, aby teplota byla maximálně 60 °C. Následně jsem ve flowboxu přidala do média sterilní roztoky růstových látek a antibiotik. Médium jsem poté rozlila do kultivačních nádob a skladovala v chladicím boxu.

**Tab. 1** Složení Andersonova média

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

Během prvotní fáze selekce, probíhající v počátcích mé bakalářské práce, kdy byly listové disky kultivovány na nižších koncentracích antibiotika kanamycin (20-40 mg/l – Tab. 2), jsem do Andersonova média přidávala 400 mg/l antibiotika timentin k eliminaci bakterií a růstové látky IAA v koncentraci 2 mg/l a thidiazuron (TDZ) v koncentraci 0,2 mg/l. Toto médium bylo vybráno na základě výsledků bakalářské práce F. Musila (2006), kde bylo médium obsahující výše popsané koncentrace růstových látek označováno jako RD 5/1. V pozdější fázi jsem rostliny regenerující na předchozím médiu dále selektovala na koncentraci kanamycinu 100 mg/l a do média jsem přidávala již pouze 200 mg/l antibiotika timentinu a růstové látky IAA v koncentraci 1 mg/l a 2iP v koncentraci 8 g/l.

**Tab. 2** Postup selekce listových disků po transformaci (Skotnicová, 2009)

| <b>Varianta</b> | <b>Po transformaci přendáno<br/>na médium s Km v<br/>koncentraci</b> | <b>Zde ponecháno</b> | <b>Poté přendáno na<br/>médium s Km v<br/>koncentraci</b> |
|-----------------|--|----------------------|---|
| <b>1</b>        | 40 mg/l  | až do regenerace     |   |
| <b>2A</b>       | 20 mg/l  | 2 týdny              | 40 mg/l   |
| <b>2B</b>       | 20 mg/l  | 4 týdny              | 40 mg/l   |
| <b>2C</b>       | 20 mg/l  | 6 týdnů              | 40 mg/l   |
| <b>3</b>        | 30 mg/l  | až do regenerace     |   |
| <b>4A</b>       | 20 mg/l  | 2 týdny              | 30 mg/l   |
| <b>4B</b>       | 20 mg/l  | 4 týdny              | 30 mg/l   |
| <b>4C</b>       | 20 mg/l  | 6 týdnů              | 30 mg/l   |

### 3.3 Analýza transformovaných rostlin

#### 3.3.1 Fluorimetrické stanovení GUS

##### Chemikálie

- 1) Extrakční pufr (GUS pufr): 50 mM Na-fosfátový pufr, pH = 7  
10 mM merkaptoetanol  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
0,1 % Tritol X-100  
0,1 % laurylsarkosin

- 2) Substrát MUG (4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid)  
2 mg MUG v 5 ml extrakčního pufru

- 3) Stop-pufr: 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

##### Pracovní postup

Zhruba 25 mg listové hmoty jsem homogenizovala ve skleněném homogenizátoru společně s 500  $\mu$ l extrakčního pufru. Vzniklý homogenát jsem přelila do mikrozkuhavky a centrifugovala 2 minuty při 13000 ot./min.. Následně jsem 30  $\mu$ l supernatantu přidala do mikrozkuhavky s 300  $\mu$ l substrátu MUG předehřátého v termostatu na 37 °C a promíchala. Zbytek původního vzorku jsem uchovala při -20 °C pro stanovení proteinů. Ze směsi substrátu MUG a supernatantu jsem odebrala 100  $\mu$ l, přidala je do mikrozkuhavky s 900  $\mu$ l stop-pufru a promíchala. Tento odběr jsem si označila jako čas 0. Odběr jsem opakovala po 60 a 240 minutách (100  $\mu$ l směsi supernatant-substrát MUG + 900  $\mu$ l 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.

Vzhledem k náročnosti drcení ve skleněných homogenizátorech a většímu množství vzorků ke zpracování jsem vyzkoušela také drcení přímo v 1,5 ml mikrozkuhavkách s plochým dnem pomocí skleněného tloučku. V tomto postupu se homogenizovalo menší množství vzorku (zhruba 5 mg listové hmoty) v 75  $\mu$ l extrakčního pufru. 4,5  $\mu$ l homogenátu jsem následně přidávala k 75  $\mu$ l substrátu MUG. V daných časových intervalech jsem 20  $\mu$ l směsi vzorku a MUGu přidávala do 1,5 ml stop-pufru, promíchala a změřila fluorescenci vzorků.

Aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy jsem vypočetla v pmol MU/min/mg listu podle vzorce:

$$\text{Aktivita} = \frac{\text{č.h.} \times \text{p.ř.} \times 0,1}{\text{č.hm.} / \text{min.}}$$

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

p.ř. = použitá ředění ( $500/30 \times 330/100$ ) = 55 pro postup s homogenizováním v 0,5 ml GUS pufru

= použitá ředění ( $75/4,5 \times 79,5/20 \times 1,52$ ) = 100,7 pro postup s homogenizováním v 75  $\mu$ l GUS pufru

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

č.hm. = čerstvá hmotnost v gramech

min. = délka inkubace v minutách

Po stanovení obsahu proteinů v homogenátu jsem vypočetla aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy také v pmol MU/min/ $\mu$ g proteinu podle vzorce:

$$\text{Aktivita} = \frac{10 \times \text{č.h.}}{\text{min.} \times \text{m.pr.}}$$

10 =  $0,1 \times 1,52 \times 79,5/20 \times 75/4,5$

m.pr. = množství proteinu ve vzorku (v  $\mu$ g)

### 3.3.2 Histochemické stanovení GUS aktivity

#### Chemikálie

##### Substrát X-Gluc

4 mg X-Gluc jsem rozpustila ve 150  $\mu$ l dimethyl formamidu a přidala 45 ml 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH=7

#### Pracovní postup

Do jednotlivých oddílů mikrostičky jsem napipetovala 2,5 ml substrátu X-Gluc. Do roztoku jsem vložila odstřiženou část rostliny. Poté jsem destičku vložila do exikátoru, ve kterém se působením podtlaku substrát infiltroval do pletiva po dobu zhruba 30 minut. Následně jsem vzorky inkubovala 24 hodin při 37 °C. Nakonec jsem zelené části rostlin odbarvila pomocí ethanolu.

### 3.3.3 Analýza obsahu proteinů

Koncentrace proteinů v homogenátu získaného při fluorimetrickém stanovení GUS aktivity byla zjištěna metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976). Reakce spočívá v tom, že se proteiny v kyselém prostředí kyseliny fosforečné váží na barvivo (roztok činidla Bradfordové – coomassie dye). Výsledkem je spektrální posun formy barviva z červeno-hnědé na modrou. Vazbou barviva na protein se změní absorpční maximum ze 464 nm na 595 nm. Vzrůst absorbance vzorku při vlnové délce 595 může být použit ke stanovení koncentrace proteinu. Zbarvení vzorku je přímo úměrné koncentraci bílkoviny. Jako standard se používá nejčastěji hovězí sérový albumin (BSA).

Pro stanovení proteinů jsem k 50  $\mu$ l destilované vody a 200  $\mu$ l Bradford činidla (Protein Assay Bio-Rad) přidala 1  $\mu$ l homogenátu vzorku s extrakčním (GUS) pufrům, jehož zbytek jsem po použití pro fluorimetrické stanovení GUS aktivity uchovávala zamražený při -20 °C.

Ke stanovení koncentrace proteinu jsem použila koncentrační řadu standardního vzorku BSA. Pro vytvoření koncentrační řady jsem smíchala 5  $\mu$ l vzorku BSA o příslušné koncentraci s 50  $\mu$ l destilované vody a 200  $\mu$ l Bradford činidla. Optickou denzitu vzorků jsem měřila při 620 nm na spektrofotometru SpectraFluor Plus (Tecan), měření jsem prováděla proti blanku, což je 50  $\mu$ l destilované vody a 200  $\mu$ l Bradford činidla.

Množství proteinů ve vzorku (v  $\mu$ g) jsem vypočetla podle vzorce:

$$\text{Množství proteinu} = (\text{OD}/k) \times (v_1/v_2)$$

OD – optická denzita

k – směrnice získaná po lineární regresi mezi množstvím proteinů (v  $\mu$ g) a naměřenou OD standardního vzorku – BSA

$v_1$  – objem GUS pufru, ve kterém byl vzorek homogenizován (75 nebo 500  $\mu$ l)

$v_2$  – objem vzorku přidaného k roztoku činidla

### 3.3.4 Izolace DNA

K izolaci DNA jsem použila metodu izolace DNA podle Tai a Tanksley (1991), kterou jsem v některých bodech modifikovala. Při drcení vzorku jsem ke vzorku navíc přidávala polyvinylpyrrolidon (PVP), z důvodu odstranění fenolických látek vyskytujících se u rododendronů ve větší míře. Dále bylo prováděno méně oplachování sedimentu ethanolem, než uvádějí autoři, vzhledem k tomu, že při izolaci DNA rododendronů vzniká nepříliš velký sediment, který se navíc v ethanolu částečně rozpadá. Méně oplachování je tedy nutné pro omezení ztrát ve výtěžnosti.

#### Chemikálie

- |                          |  |
|--------------------------|--|
| 1) <u>Extrakční pufr</u> | 100 mM Tris-HCl pH 8,0                       |
|                          | 50 mM EDTA pH 8,0                            |
|                          | 500 mM NaCl                                  |
|                          | 1,25 % SDS                                   |
|                          | 8,3 mM NaOH                                  |
|                          | Na-bisulfite (0,38 g do 100 ml)              |
|                          | Na-diethyldithiocarbamate (0,38 g do 100 ml) |
| 2) <u>T5E pufr</u>       | 50 mM Tris pH 8,0                            |
|                          | 10 mM EDTA pH 8,0                            |

#### Pracovní postup

Nejdříve jsem si připravila potřebné množství čerstvého extrakčního pufru. Alespoň jeden gram listové hmoty jsem rozdrtila v tekutém dusíku, při drcení jsem přidala jeden gram polyvinylpyrrolidonu K30 (PVP) od firmy Fluka. Nadrcený vzorek jsem přenesla do centrifugační kyvety, přidala 15 ml extrakčního pufru, protřepala a uchovávala na ledu do doby, než budou hotové i ostatní vzorky.

Následně jsem vzorky inkubovala 15 minut při 65 °C ve vodní lázni za občasného protřepání. Poté jsem přidala 4,65 ml 5 M octanu draselného, promíchala a nechala 20 minut stát na ledu. Pak jsem vzorky centrifugovala 10 minut při 4000 ot./min. a 4 °C. Po centrifugaci jsem přefiltrovala supernatant přes filtr Miracloth (Calbiochem) do nové kyvety.

K přefiltrovanému supernatantu jsem přidala 14 ml isopropanolu, otáčením centrifugační kyvety jsem směs pomalu promíchala a nechala 10 minut stát. Opět jsem centrifugovala při 4000 ot./min. a 4 °C 10 minut. Vylila jsem supernatant a sediment opláchla 70 % ethanolem.



Ethanol jsem odpipetovala a sediment nechala chvíli vysušit. Poté jsem ho rozpustila v 0,84 ml T5E.

Vzniklý roztok jsem přenesla do nové mikrozkušavky, přidala 0,36 ml 10 M octanu amonného a nechala stát 10-15 minut na ledu. Poté jsem vzorky centrifugovala 5 minut při 13500 ot./min.. Vzniklý supernatant jsem rovnoměrně rozdělila do 2 mikrozkušavek, do každé přidala 0,5 ml isopropanolu, promíchala a nechala 5 minut stát. Znovu jsem centrifugovala 5 minut při 13500 ot./min., vylila supernatant a sediment jsem opláchla 70 % ethanolem. Sediment jsem nechala částečně oschnout a poté jsem ho rozpustila v 25  $\mu$ l sterilní destilované vody a nechala přes noc v ledničce.

Druhý den jsem vzorky ošetřila RNázou. Přidala jsem 1,25  $\mu$ l RNázy v koncentraci 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l do 25  $\mu$ l roztoku DNA. Vzorky jsem inkubovala 15 minut v termostatu při 37 °C.

Poté jsem stanovila koncentraci izolované DNA. Izolovanou DNA jsem 10x naředila a provedla elektroforézu v 0,8 % agarózovém gelu s ethidiumbromidem. Jako standard pro určení koncentrace DNA jsem použila DNA bakteriofága  $\lambda$  (New England Biolabs) v koncentracích 0,05; 0,1; 0,2 a 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l. Vzorky jsem pro lepší odhad nanášela minimálně ve dvou různých ředěních. Koncentraci izolované DNA jsem u většiny vzorků měřila také pomocí přístroje Gene Quant II od firmy Pharmacia Biotech.

### 3.3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro stanovení přítomnosti genu *gusA* pro enzym  $\beta$ -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 amplifikovaly 495 bp dlouhý fragment, který se skládá z genu *gusA* (pozice nukleotidů 263 – 385 a 575 – 757) a intronu (pozice nukleotidů 386 - 574).

K detekci přítomnosti genu *nptII* pro neomycin-fosfotransferázu II jsem použila primery NPT1 (5'- ACG CAG GTT CTC CGG CCG CTT G – 3') a NPT2 (5'- GAA GCG GTC AGC CCA TTC GCC G – 3'), které amplifikovaly fragment o délce 699 bp (pozice nukleotidů 23 - 720).

Nejprve jsem si připravila Master mix skládající se ze 77 % sterilní destilované vody, 10 % PCR pufru, 10 % dNTP, 1 % primeru 1, 1 % primeru 2 a 1 % Taq polymerázy (TaKaRa).

Do každé mikrozkušavky jsem pipetovala 24  $\mu$ l Master mixu a 1  $\mu$ l izolované DNA. U každého vzorku jsem se pokusila nalézt pro PCR optimální ředění izolované DNA s ohledem na obsah DNA a dostatečné zředění inhibujících látek.

Jako negativní kontrolu jsem použila DNA kontrolního netransformovaného rododendronu. Jako pozitivní kontrolu jsem používala prokazatelně transformovaný rododendron nesoucí geny *gusA* a *nptII* z práce Pavingerová *et al.* (1997) a kmen agrobakteria, kterým jsem listové disky rododendronů transformovala. Obě pozitivní kontroly byly 100x ředěné a do směsi na PCR jsem této DNA přidávala pouze 0,5  $\mu$ l.

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.).

Po PCR jsem vzorky rozdělila elektroforézou v 1 % agarózovém gelu s ethidiumbromidem. Pro odečtení velikosti fragmentů jsem použila 100 bp DNA ladder (New England Biolabs). Elektroforéza probíhala zhruba 50 minut při 120 V. Výsledky jsem odečetla pomocí UV transiluminátoru od firmy Vilber Lourmat a poté vyfotografovala.

### 3.3.6 Southernova hybridizace

#### Štěpení DNA

Izolovanou DNA jsem štěpila pomocí restriční endonukleázy *HindIII*, jejíž cílová sekvence je A/AGCTT.

#### Reakční směs pro štěpení restriční endonukleázou *HindIII*

40 µl 10x M restričního pufru (TaKaRa)

10 µl (120 jednotek) enzymu *HindIII* (TaKaRa)

4 µl BSA (hovězí sérový albumín) 10 mg/ml (New England Biolabs)

146 µl sterilní destilované vody

Reakční směs jsem přidala ke 200 µl roztoku DNA. Konečný objem 1 reakce byl tedy 400 µl. V 2 hodinových intervalech jsem ještě čtyřikrát přidala po 10 µl enzymu. Celkem jsem použila ke štěpení 1 vzorku 600 jednotek enzymu *HindIII*. Takto vysoké množství enzymu bylo nutné, jelikož při nižších dávkách nedocházelo ke štěpení, nejspíš z důvodu rychlé inaktivace enzymu. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C.

Naštěpení vzorků jsem ověřila pomocí elektroforézy v 0,8 % agarózovém gelu s ethidiumbromidem 3 hodiny při 80 V.

#### **Přesrážení naštěpených vzorků**

Roztok ze štěpící reakce jsem rovnoměrně rozdělila do 2 mikrokumavek. Ke každému roztoku DNA jsem přidala 40 µl octanu amonného a 600 µl 100 % ethanolu, promíchala a zamrazila 45 minut při -70 °C. Pak jsem vzorky centrifugovala 7 minut při 13500 ot./min., sediment jsem opláchla 70 % ethanolu a ponechala 5 minut stát. Následovala centrifugace 2 minuty, odlití ethanolu, vysušení sedimentu a poté jeho rozpuštění v 30 µl sterilní destilované vody.

## **Elektroforéza restrikčních fragmentů**

Ke vzorkům jsem přidala 5  $\mu$ l vkladacího pufru a poté jsem je elektroforeticky rozdělila v 1 % agarózovém gelu bez ethidiumbromidu. Pro následné odečtení velikosti fragmentů jsem nanesla 7,5  $\mu$ l 1 kb DNA ladderu (Gibco BRL). Elektroforéza probíhala 17,5 hodiny při napětí 90 V. Gel jsem dodatečně obarvila roztokem ethidiumbromidu v koncentraci 1 mg/l. Následně jsem gel vyfotografovala pod UV světlem a odstranila nadbytečné části.

Gel jsem dále ošetřila ve třech různých roztocích pro následný lepší přenos fragmentů na membránu.

### Roztok 1 – kyselá depurinace DNA

Kyselá depurinace slouží k naštěpení DNA na kratší fragmenty. Gel jsem 14 minut inkubovala za mírného třepání v 0,25N HCl a poté opláchla destilovanou vodou.

### Roztok 2 – alkalické denaturace DNA

Gel jsem 30 minut inkubovala za mírného protřepávání v 0,4N NaOH a 1,5M NaCl. Poté opět následovalo promytí v destilované vodě.

### Roztok 3 – neutralizace DNA

Gel byl 30 minut mírně třepán v neutralizačním roztoku 0,5M Tris-HCl a 1,5M NaCl. Gel jsem opět opláchla destilovanou vodou.

## **Kapilární přenos DNA na membránu**

Do plastové vany jsem nalila 1 litr 10x koncentrovaného SSC (1,5M NaCl + 0,15M citrát sodný, doplněno destilovanou vodou na 1 litr, pH 7,0). Přes vanu jsem položila skleněnou desku a přes ni pruh papíru 3MM Whatman, tak aby jeho konce byly ponořeny v roztoku SSC. Papír jsem navlhčila roztokem SSC, uhladila a položila na něj gel. Na gel jsem poté umístila nylonovou membránu Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech) o stejné velikosti jako gel. Dále jsem přes membránu navrstvila 2 papíry 3MM Whatman a zhruba 15 cm vysokou vrstvu buničité vaty. Vše jsem zatížila závažím o hmotnosti zhruba 750 g. Přenos DNA na membránu probíhal do druhého dne.

Po přenosu DNA jsem membránu krátce omyla v 2x SSC. DNA byla fixována na membráně nejprve zapečením 10 minut při 80 °C v termostatu, poté ozářením UV světlem (120 mJ/cm<sup>2</sup>) a opětovným zapečením 30 minut při 80 °C.

## Značení DNA sond

Sondy pro hybridizaci s geny *gusA* a *nptII* byly radioaktivně označeny pomocí soupravy Redprime<sup>TM</sup> II (random prime labelling system od firmy Amersham Pharmacia Biotech). K 45 µl TE pufru jsem přidala 0,5 µl sondy GUS (koncentrace zásobního roztoku sondy 130 µg/µl) a v druhém případě 0,3 µl sondy NPTII (koncentrace zásobního roztoku sondy 175 µg/µl). Při značení sondy pro ladder Gibco BRL jsem k 43 µl TE pufru přidala 2 µl sondy (0,1 µg/µl). Směsi jsem ponořila na 5 minut do vroucí vody a poté 5 minut chladila na ledu. Následně jsem ve specializované izotopové laboratoři přidala do mikrozkušavek po 5 µl značeného dCTP (110 Bq/mmol) a inkubovala vše 15 minut při 37 °C. Poté jsem přidala ke značícím roztokům sond genů 200 µl TE pufru a k roztoku ke značení sondy ladderu 600 µl TE pufru. Směs jsem opět 5 minut ponechala ve vroucí vodě a následně 5 minut chladila na ledu. Dobře naznačenou sondu daného genu a 0,25 µl sondy ladderu jsem poté přidala do hybridizačního roztoku.

## Hybridizace

Hybridizaci jsem prováděla postupem uvedeným v práci Church a Gilbert (1984).

Nejprve jsem membránu prehybridizovala 30 minut v 50 ml hybridizačního roztoku při 65 °C. Poté jsem přidala denaturovanou označenou sondu a nechala hybridizovat přes noc při stejné teplotě. Druhý den jsem membránu třikrát promyla předehřátým promývacím roztokem. Membránu jsem zatavila do mikrotenové fólie a nechala ji 5 hodin exponovat ve speciální kazetě (storage phosphor screen). Detekce radioaktivního signálu byla provedena pomocí přístroje Typhoon 9410. Po detekci jsem sondu odmyla v 0,1 % roztoku horkého SDS a membránu jsem opět použila pro hybridizaci se sondou pro druhý gen.

Hybridizační roztok: 20 ml sterilní destilované vody (v závěru doplnění do objemu 50 ml)

20 ml 1M NaPO<sub>4</sub> (pH 7,2)

100 µl 0,5M EDTA (pH 8,3)

3,5 g SDS (sodium dodecyl sulfát)

0,5 g BSA (hovězí sérový albumín)

Promývací roztok: 399 ml sterilní destilované vody

50 ml 10 % SDS

50 ml 1M NaPO<sub>4</sub> (pH 7,2)

1 ml 0,5M EDTA (pH 8,3)

## 4. Výsledky

### 4.1 Regenerace rostlin po transformaci

Ve své bakalářské práci (Skotnicová, 2009) jsem uskutečnila transformaci plazmidovým vektorem p35SGUSint. 220 listových disků odrůdy Azuro a 245 listových disků odrůdy Rebe. Po transformaci jsem v průběhu bakalářské práce zkoušela různé varianty selekce na koncentraci kanamycinu 20-40 mg/l (Tab. 2). V konečné fázi byly shluky regenerujících krátkých prýtů přeneseny na médium s koncentrací kanamycinu 100 mg/l a po jejich prodloužení byly jednotlivé prýty kultivovány samostatně.

#### 4.1.1 Odrůda Rebe

U odrůdy Rebe jsem po transformaci 245 listových disků získala pro následnou molekulární analýzu 49 regenerujících rostlin, z toho 18 rostlin pocházelo z varianty 1 a 31 rostlin z varianty 4B (varianty selekce – Tab. 2). Celkově byl však růst regenerujících rostlin této odrůdy velmi pomalý, díky čemuž jsem měla dostatek rostlinného materiálu pouze pro provedení fluorimetrického stanovení GUS aktivity.

#### 4.1.2 Odrůda Azuro

U odrůdy Azuro jsem po transformaci 220 listových disků provedla molekulární analýzu u 147 regenerujících rostlin. 33 rostlin bylo z varianty 2A, 46 rostlin z varianty 2B, 27 rostlin z varianty 4A a 43 rostlin z varianty 4B. U většiny rostlin bylo provedeno vzhledem k nedostatečnému množství listové hmoty pouze fluorimetrické stanovení GUS aktivity, u několika náhodně vybraných také histochemické stanovení GUS aktivity. U 28 rostlin a kontroly byla izolována DNA. U 16 vzorků izolované DNA byla provedena Southernova hybridizace. U 3 rostlin, které jsem vybrala pro Southernovu hybridizaci, byla již dříve v mé bakalářské práci (Skotnicová, 2009) prokázána přítomnost genu *gusA* pomocí PCR, případně fluorimetrickým stanovením GUS aktivity. Zbylé rostliny, u kterých byla izolována DNA, vykazovaly dobrý růst na médiu s koncentrací kanamycinu 100 mg/l.

## **4.2 Fluorimetrické a histochemické stanovení GUS aktivity**

### **4.2.1 Odrůda Rebe**

Fluorimetrické stanovení aktivity enzymu  $\beta$ -glukuronidázy jsem provedla celkem u 49 regenerujících rostlin odrůdy Rebe. U 15 rostlin jsem zjistila mírně zvýšenou aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy, u 7 rostlin byla aktivita  $\beta$ -glukuronidázy zhruba 5x vyšší a u 3 rostlin a minimálně 10x vyšší v porovnání s kontrolní netransformovanou rostlinou (Tab. 3). Vzhledem k tomu, že jsem měření prováděla ve dvou časech, v tabulce uvádím průměr obou hodnot aktivity enzymu. Hodnota kontroly je průměrem hodnot získaných ze všech měření.

**Tab. 3** Aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u rostlin odrůdy Rebe

| Označení rostliny | Varianta selekce | pmol MU/min/mg listu                | pmol MU/min/ $\mu$ g proteinu       |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| kontrola          |                  | 0,191 $\pm$ 0,083                   | 0,127 $\pm$ 0,049                   |
| 1                 | 4B               | 0,905 $\pm$ 0,221                   | 0,490 $\pm$ 0,120                   |
| 2                 | 1                | 0,482 $\pm$ 0,154                   | 0,139 $\pm$ 0,044                   |
| 3                 | 1                | 0,457 $\pm$ 0,091                   | 0,390 $\pm$ 0,078                   |
| 4                 | 1                | 0,563 $\pm$ 0,063                   | 0,237 $\pm$ 0,027                   |
| 5                 | 1                | 0,418 $\pm$ 0,113                   | 0,164 $\pm$ 0,044                   |
| 6                 | 1                | 0,496 $\pm$ 0,122                   | 0,179 $\pm$ 0,044                   |
| 7                 | 4B               | 1,269 $\pm$ 0,024                   | 0,660 $\pm$ 0,012                   |
| 8                 | 4B               | 0,464 $\pm$ 0,134                   | 0,295 $\pm$ 0,085                   |
| 10                | 4B               | 0,454 $\pm$ 0,098                   | 0,106 $\pm$ 0,023                   |
| 11                | 4B               | 0,431 $\pm$ 0,062                   | 0,256 $\pm$ 0,037                   |
| 12                | 4B               | 0,506 $\pm$ 0,114                   | 0,383 $\pm$ 0,086                   |
| 13                | 4B               | 0,626 $\pm$ 0,005                   | 0,262 $\pm$ 0,002                   |
| 14                | 4B               | 0,424 $\pm$ 0,078                   | 0,314 $\pm$ 0,058                   |
| 15                | 4B               | 0,628 $\pm$ 0,020                   | 0,605 $\pm$ 0,019                   |
| 16                | 4B               | 0,669 $\pm$ 0,006                   | 0,551 $\pm$ 0,005                   |
| 17                | 4B               | 0,616 $\pm$ 0,059                   | 0,360 $\pm$ 0,034                   |
| 24                | 4B               | 1,223 $\pm$ 0,299                   | 0,685 $\pm$ 0,167                   |
| 25                | 4B               | 0,765 $\pm$ 0,037                   | 0,545 $\pm$ 0,026                   |
| 26                | 4B               | 1,227 $\pm$ 0,299                   | 0,290 $\pm$ 0,071                   |
| 27                | 4B               | 1,658 $\pm$ 0,337                   | 0,898 $\pm$ 0,182                   |
| 28                | 4B               | 1,840 $\pm$ 0,609                   | 0,929 $\pm$ 0,307                   |
| 29                | 4B               | 0,887 $\pm$ 0,350                   | 0,828 $\pm$ 0,327                   |
| 30                | 4B               | <b>3,144 <math>\pm</math> 0,654</b> | <b>3,255 <math>\pm</math> 0,678</b> |
| 31                | 4B               | <b>2,504 <math>\pm</math> 0,485</b> | 0,671 $\pm$ 0,130                   |
| 32                | 4B               | <b>2,905 <math>\pm</math> 0,857</b> | <b>1,772 <math>\pm</math> 0,523</b> |

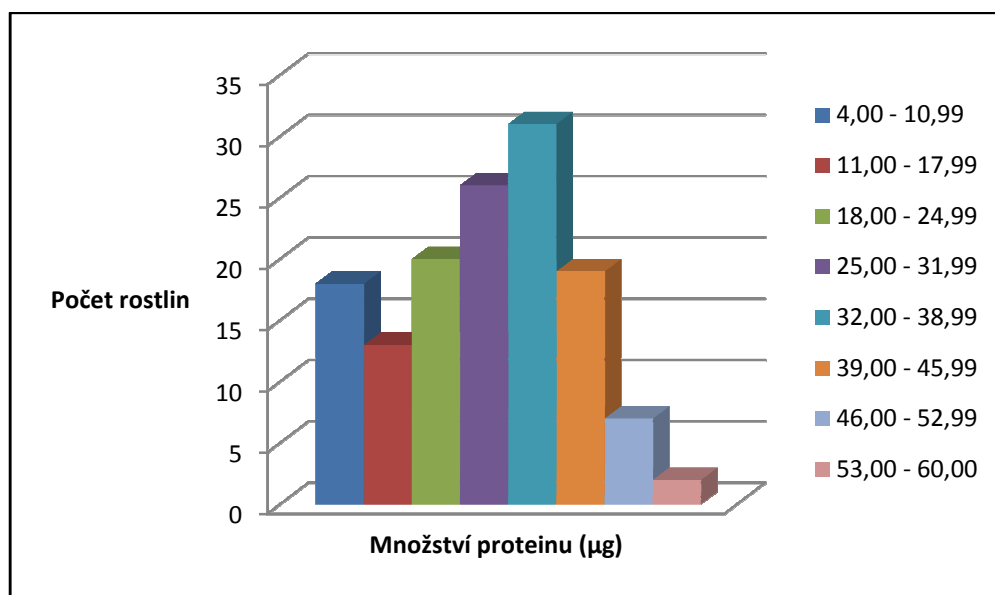


#### 4.2.2 Odrůda Azuro

U odrůdy Azuro jsem fluorimetricky zjišťovala aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u 147 regenerujících rostlin. U 16 rostlin byla aktivita  $\beta$ -glukuronidázy mírně zvýšená a u 1 rostliny zhruba 5x vyšší oproti kontrole (Tab. 4). Uváděné hodnoty jsou průměrem hodnot získaných v čase 60 a 240 minut. Hodnoty kontroly jsou průměrem hodnot kontrol ve všech měřeních. Naprostá většina rostlin má zvýšenou aktivitu enzymu pouze při přepočtu na listovou hmotu, což je z velké části způsobeno rozdílným obsahem proteinů v kontrolních a ostatních rostlinách. Kontrolní rostliny měly podstatně nižší obsah proteinů a to 7,5; 8; 7,5 a 16,3  $\mu\text{g}$  oproti vzorkům ostatních rostlin (Graf 1). V grafu jsou vyneseny počty rostlin včetně rostlin kontrolních, u kterých byl zjištěn obsah proteinů v daném rozmezí hodnot. Nižší obsah proteinů v kontrolních rostlinách se po přepočtu podle vzorce uvedeného v kapitole 3.3.1 projevil vyšší hodnotou aktivity enzymu. Toto potvrzuje i fakt, že zatímco průměrná aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u kontrolních rostlin byla  $0,294 \pm 0,134$  pmol MU/min/ $\mu\text{g}$  proteinu, průměrná hodnota aktivity enzymu od všech rostlin byla  $0,150 \pm 0,092$  pmol MU/min/ $\mu\text{g}$  proteinu.

U několika rostlin jsem také provedla histochemické stanovení GUS aktivity. Histochemickým stanovením GUS aktivity u listů regenerujících rostlin jsem nezískala pozitivní výsledek (modré zbarvení). Negativní výsledek může být způsoben nedostatečným nasátím substrátu do listů. Pletiva rododendronů jsou voskovité a často lignifikované, což může znemožňovat proniknutí substrátu do pletiva (Knapp *et al.*, 2001).

**Graf 1** Obsah proteinů v homeogenátu vzorků rostlin rododendronů odrůdy Azuro



**Tab. 4** Aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u rostlin odrůdy Azuro

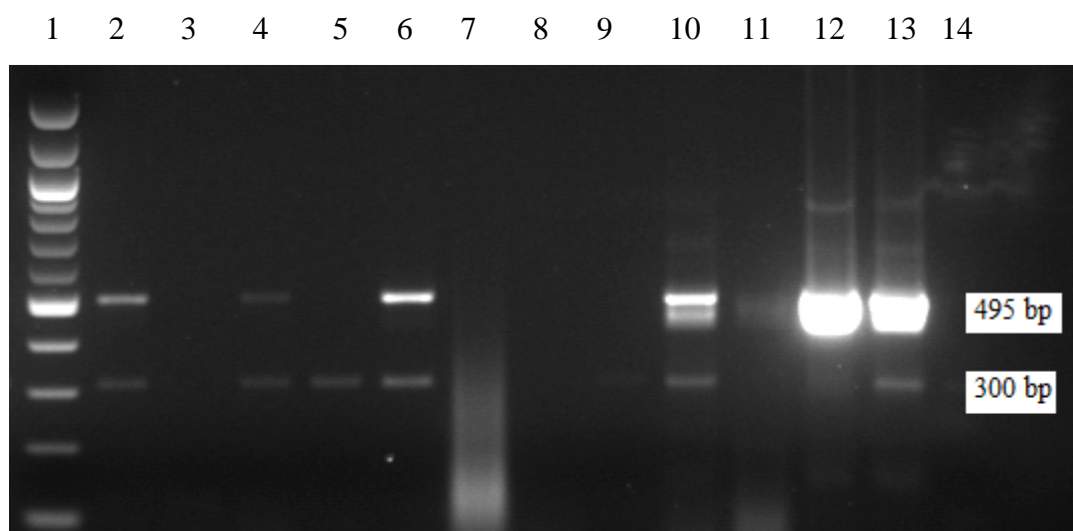
| Označení<br>rostlin | Varianta<br>selekcce | pmol MU/min/mg<br>listu             | pmol MU/min/ $\mu$ g<br>proteinu |
|---------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| kontrola            |                      | 0,546 $\pm$ 0,247                   | 0,294 $\pm$ 0,134                |
| 9                   | 4A                   | 1,112 $\pm$ 0,021                   | 0,172 $\pm$ 0,003                |
| 19                  | 2A                   | 0,835 $\pm$ 0,020                   | 0,596 $\pm$ 0,014                |
| 22                  | 2A                   | 1,382 $\pm$ 0,266                   | 0,171 $\pm$ 0,033                |
| 30                  | 2A                   | 1,079 $\pm$ 0,325                   | 0,141 $\pm$ 0,043                |
| 32                  | 2A                   | 1,309 $\pm$ 0,649                   | 0,763 $\pm$ 0,378                |
| 33                  | 2B                   | 1,192 $\pm$ 0,013                   | 0,182 $\pm$ 0,002                |
| 35                  | 2B                   | 1,652 $\pm$ 0,271                   | 0,227 $\pm$ 0,037                |
| 40                  | 2B                   | 1,058 $\pm$ 0,146                   | 0,157 $\pm$ 0,022                |
| 46                  | 4A                   | 1,186 $\pm$ 0,091                   | 0,249 $\pm$ 0,019                |
| 49                  | 2B                   | 1,239 $\pm$ 0,027                   | 0,185 $\pm$ 0,004                |
| 50                  | 2B                   | 1,213 $\pm$ 0,105                   | 0,171 $\pm$ 0,015                |
| 56                  | 4B                   | 1,607 $\pm$ 0,043                   | 0,302 $\pm$ 0,008                |
| 58                  | 2B                   | 1,284 $\pm$ 0,159                   | 0,185 $\pm$ 0,023                |
| 103                 | 2A                   | 1,030 $\pm$ 0,064                   | 0,145 $\pm$ 0,009                |
| 106                 | 2A                   | <b>2,821 <math>\pm</math> 0,026</b> | 0,342 $\pm$ 0,003                |
| 107                 | 2A                   | 1,453 $\pm$ 0,036                   | 0,402 $\pm$ 0,010                |
| 130                 | 4B                   | 1,101 $\pm$ 0,097                   | 0,106 $\pm$ 0,009                |

### 4.3 Polymerázová řetězová reakce

Ověření přítomnosti genů *nptII* a *gusA* pomocí PCR jsem provedla pouze u 28 rostlin odrůdy Azuro, vzhledem k tomu, že u regenerujících rostlin odrůdy Rebe a zbylých rostlin odrůdy Azuro nebylo získáno dostatek materiálu pro izolaci DNA. Již během mé bakalářské práce (Skotnicová, 2009) jsem prokázala přítomnost genu *gusA* (velikost fragmentu 495 bp) u rostlin s označením 2 a 4 (Obr. 4). Další amplifikovaný fragment na obrázku o velikosti 300 bp je gen *gusA* bez intronu, pocházející z *E. coli*, ze které je připravována používaná Taq polymeráza. Na základě této PCR byly tyto rostliny vybrány pro Southernovu hybridizaci.

U ostatních vzorků se mi přítomnost genů nepodařila prokázat, což může být v některých případech způsobené vyšším obsahem látek inhibujících PCR vyskytujících se u rododendronů.

**Obr. 4** Detekce genu *gusA* pomocí PCR (Skotnicová, 2009)

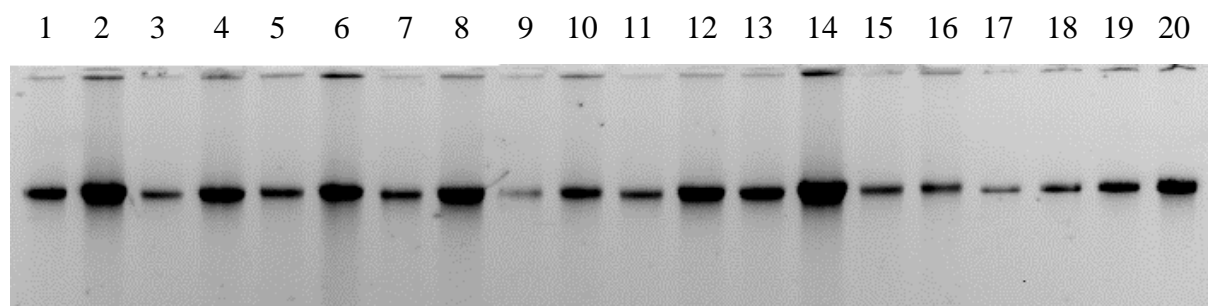


1 – standard molekulové hmotnosti (100 bp leader), 2-5 - rostlina číslo 2 (ředění 10x, 100x, 1000x, 10000x), 6-9 – rostlina číslo 4 (ředění 10x, 100x, 1000x, 10000x), 10,11 – pozitivní kontrola (transgenní rododendron s genem *gusA*) ředění 100x a 1000x, 12,13 – *Agrobacterium tumefaciens* (pozitivní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

#### 4.4 Southernova hybridizace

Z 28 rostlin odrůdy Azuro, u kterých bylo získáno alespoň 1 g listové hmoty jsem izolovala genomovou DNA. K určení přibližné koncentrace izolované DNA jsem použila elektroforetické porovnání s DNA bakteriofága  $\lambda$  (Obr. 5).

**Obr. 5** Příklad určení koncentrace izolované DNA



Ve slotech 1-14 jsou vždy vzorky ve dvou koncentracích – neředěná a 3x zředěná DNA.

1,2 – rostlina 19; 3,4 – rostlina 20; 5,6 – rostlina 21; 7,8 – rostlina 22; 9,10 – rostlina 23; 11,12 – rostlina 24; 13,14 – rostlina 26; 15 – neředěný vzorek rostliny 25; 16 – neředěný vzorek kontrolní rostliny; 17-20 DNA bakteriofága  $\lambda$  v koncentraci 0,05; 0,1; 0,2; 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

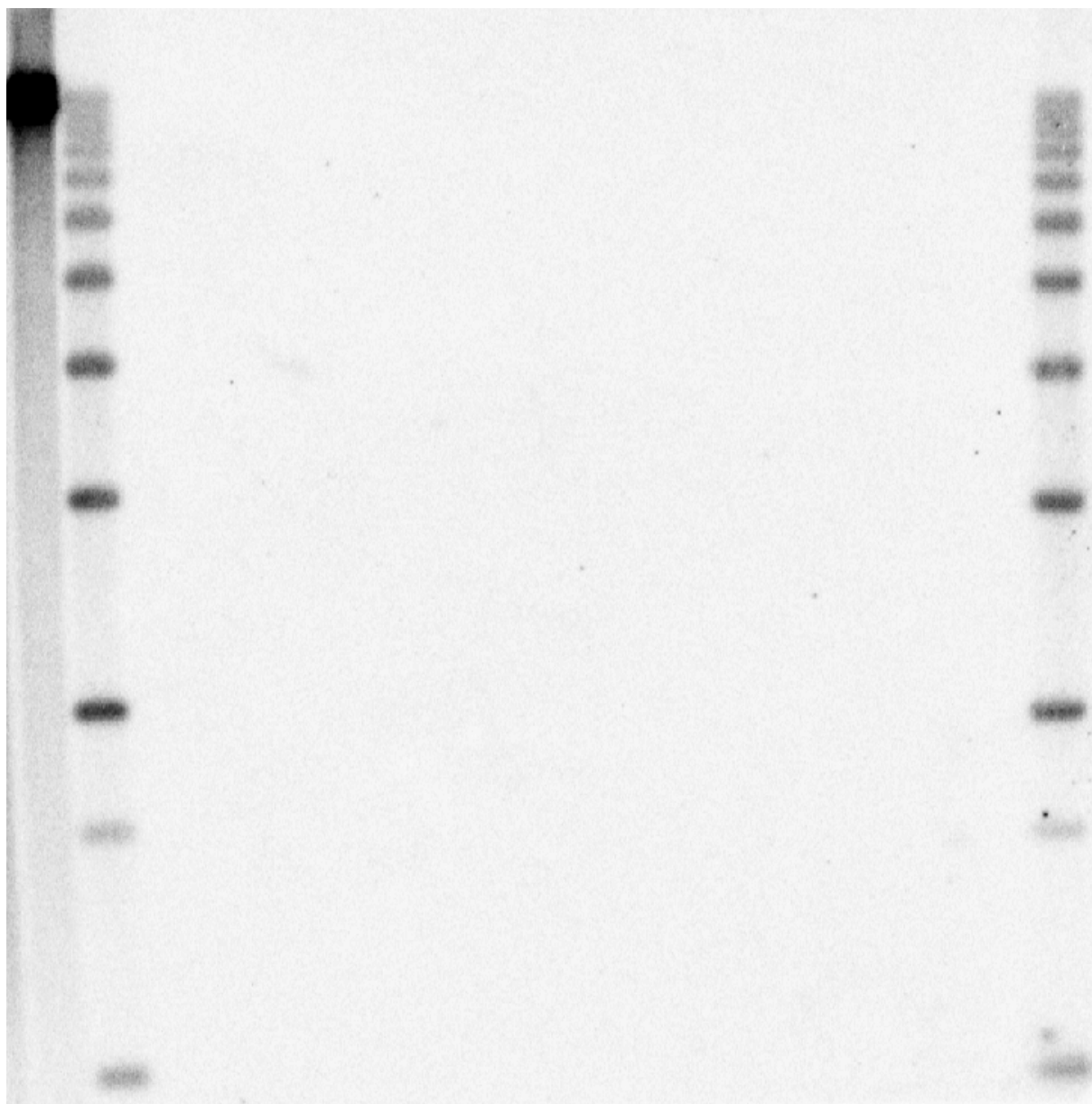
Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí od 0,005 do 1,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro prokázání přítomnosti genů *nptII* a *gusA* Southernovou hybridizací jsem použila vzorky 16 rostlin o obsahu DNA zhruba 10  $\mu\text{g}$ . U 3 z těchto rostlin byla již dříve prokázána přítomnost genu *gusA*.

Izolovanou DNA daných rostlin jsem štěpila restriční endonukleázou *HindIII*, pro kterou je v plazmidovém konstruktu 35SGUSint. jedno štěpné místo (Obr. 3). Naštěpená DNA byla elektroforeticky rozdělena v 1 % agarózovém gelu a poté přenesena na nylonovou membránu. Sondy i velikostní standard byly radioaktivně značeny pomocí soupravy Redprime<sup>TM</sup> II. Jako kontrola funkčnosti sond pro geny *nptII* a *gusA* jsem použila nenaštěpený plazmid v koncentraci 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

U zkoumaných 16 vzorků rostlin se nepodařilo Southernovou hybridizací prokázat přítomnost genu *gusA* ani genu *nptII* (Obr. 6, 7). Funkčnost a dostatečné naznačení sond byly potvrzeny pozitivní kontrolou.

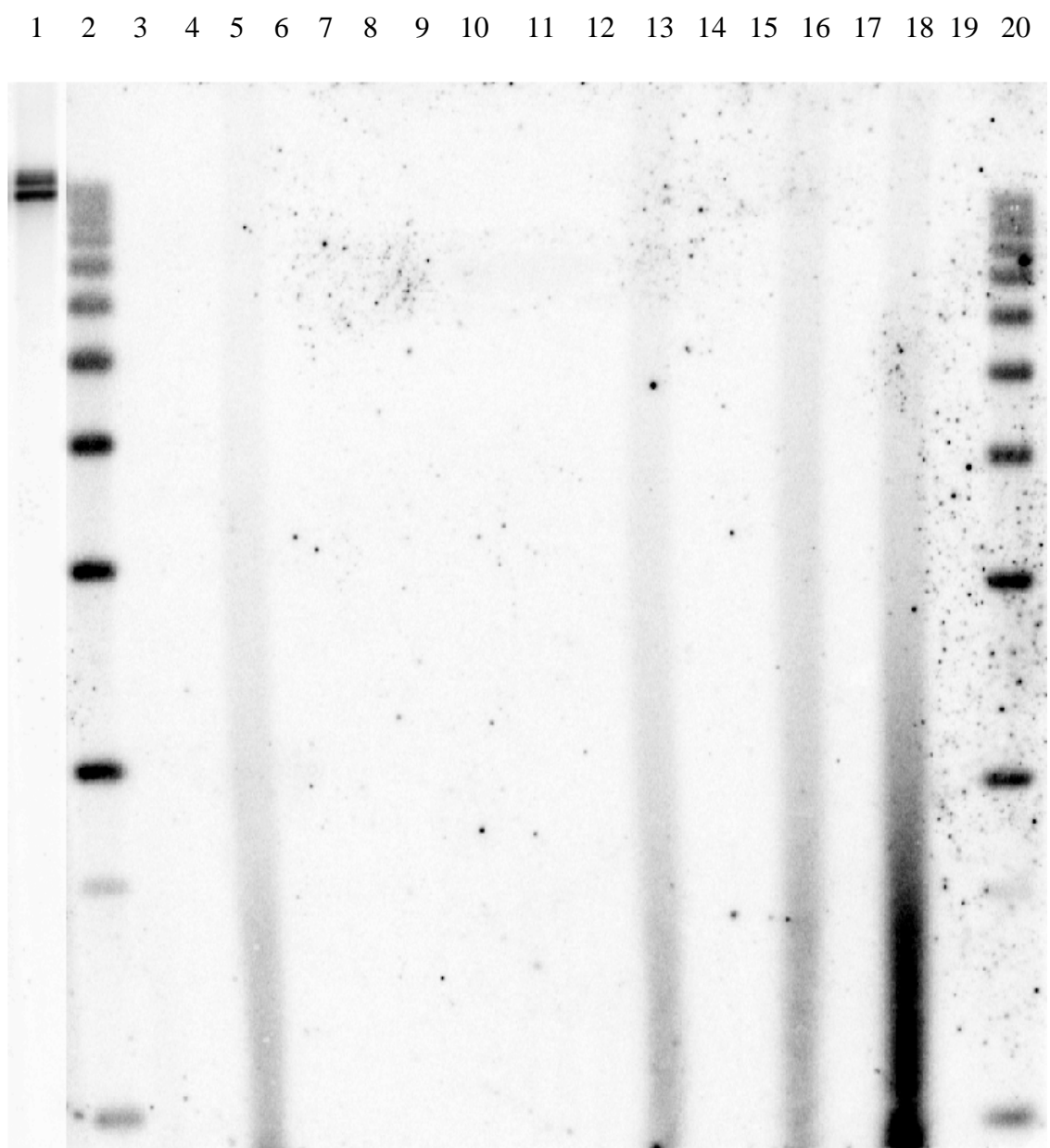
**Obr. 6** Southernova hybridizace DNA izolované z rostlin rododendronů odrůdy Azuro se sondou *gusA*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Sloty: 1 – pozitivní kontrola (plazmid 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2 a 20 – ladder, 3-18 – vzorky, 19 – negativní kontrola

**Obr. 7** Southernova hybridizace DNA izolované z rostlin rododendronů odrůdy Azuro se sondou *nptII*



Sloty: 1 – pozitivní kontrola (plazmid 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2 a 20 – ladder, 3-18 – vzorky, 19 – negativní kontrola

## 5. Diskuze

Pro transformaci určitým cílovým genem a získání transgenních rostlin je nejprve nutné vyvinout dostatečně účinný systém přenosu genů, přičemž úspěšnost přenosu genů je často velmi odlišná v závislosti na použitém kultivaru a bakteriálním kmenu.

Doposud bylo publikováno pouze několik prací zabývajících se transformací rododendronů. Při přímé transformaci využívající mikroprojektily byla získána buďto pouze tranzientní exprese (Hsia a Korban, 1998) nebo velmi nízká účinnost transformace a to 0,2 % (Knapp *et al.*, 2001). Při transformaci pomocí agrobakteria bylo dosaženo o něco vyšší úspěšnosti transformace, nejvýše však 5 % (Ueno *et al.*, 1996). Při transformaci rododendronů agrobakteriemi se u získaných rostlin vyskytly různé stupně chimérismu (Pavingerová *et al.*, 1997; Dunemann *et al.*, 2002).

Jedním z nutných předpokladů pro úspěšnou transformaci listových disků je zvládnutá regenerace rostlin z explantátů. Optimální koncentrace růstových látek pro navození regenerace rostlin bývá značně odlišná mezi jednotlivými kultivary. Koncentrace a druh růstových látek použitých pro regeneraci rostlin jsem zvolila na základě prací zabývajících se regenerací z listových disků u několika kultivarů rododendronů včetně mnou použitých kultivarů Azuro a Rebe (Musil, 2006; Stárková, 2006; Pavingerová, 2009).

Ve své diplomové práci jsem provedla molekulární analýzu regenerujících rostlin získaných po transformaci 2 kultivarů rododendronů (Azuro a Rebe) pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí plazmidový vektor 35SGUSint. Při transformaci kultivarů Azuro a Rebe v mé bakalářské práci se jednalo o první pokus o získání transgenních rostlin těchto kultivarů.

U odrůdy Rebe jsem provedla stanovení exprese enzymu  $\beta$ -glukuronidázy fluorimetrickou metodou u 49 regenerujících rostlin. Touto metodou jsem zjistila u 15 rostlin mírně zvýšenou GUS expresi v porovnání s kontrolou, minimálně 5x vyšší u 7 rostlin a více než 10x vyšší u 3 rostlin. Bohužel byl růst regenerujících rostlin této odrůdy příliš pomalý k získání dostatečného množství materiálu pro další analýzy, které by mohly potvrdit přítomnost genů, případně určit počet integrovaných kopií. Snížená regenerace rostlin této odrůdy mohla být způsobena negativním účinkem některého z použitých antibiotik (kanamycin, timentin).

U odrůdy Azuro jsem pomocí fluorimetrické metody zjišťovala aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy u 147 regenerujících rostlin. Mírně zvýšenou aktivitu enzymu vykazovalo 16 rostlin a u 1 rostliny byla exprese enzymu zhruba 5x vyšší oproti kontrole. U některých rostlin této odrůdy jsem provedla také histochemické stanovení GUS aktivity, avšak s negativním výsledkem. U žádného ze vzorků listů jsem nezískala indigově modré zbarvení značící místo exprese genu.

Nepotvrzení exprese genu *gusA* u rostlin regenerujících na selekční látce není neobvyklé, u rododendronů bylo popsáno také v práci Pavingerové *et al.* (1997). Tento jev může být způsobený buďto vyšším počtem kopií inkorporovaných genů a jejich následnou methylací (Hobbs, 1990) nebo chimérismem regenerujících rostlin. Při transformacích rododendronů byl chimérismus u některých regenerujících rostlin zjištěn v pracích Pavingerová *et al.* (1997) a Dunemann *et al.* (2002). Byla také pozorována variabilita mezi jednotlivými transgenními klony rododendronů v úrovni GUS exprese (Ueno *et al.*, 1996), která může být způsobena opět počtem kopií nebo také pozičním efektem inkorporovaných genů. Výše uvedené příčiny proměnlivé exprese genu *gusA* mohou být také důvodem negativního výsledku histochemického stanovení GUS aktivity. Další příčinou může být voskovitost a lignifikace pletiv rododendronů, která neumožnila dostatečné proniknutí barvicího substrátu do pletiv (Knapp *et al.*, 2001).

Kromě 2 rostlin, u kterých byla přítomnost genu *gusA* prokázána pomocí PCR v průběhu mé bakalářské práce (Obr. 4), se mi nepodařilo získat další pozitivní výsledek PCR pro geny *gusA* a *nptII*.

Prokázání přítomnosti genu pomocí PCR u dřevin bývá často problematické vzhledem k jejich vysokému obsahu polysacharidů, polyfenolů a sekundárních metabolitů inhibujících PCR. V určitém rozsahu lze obsah polyfenolických látek zmírnit použitím polyvinilpyrrolidonu (PVP) při izolaci genomové DNA. Dochází k tvorbě komplexu mezi PVP a polyfenolickými sloučeninami, který je v dalších krocích odstraněn.

Často může být problém inhibujících látek vyřešen ředěním roztoku izolované DNA použitého pro PCR, což může vést k dostatečnému naředění inhibujících látek a umožnění proběhnutí PCR reakce.

U některých rostlin regenerujících na kanamycinu by mohl být negativní výsledek PCR pro gen *gusA* způsoben tím, že nedošlo k přenosu celé T-DNA. Při přenosu T-DNA vzniká nejprve zlom v pravé hraniční sekvenci a poté dochází k odkrucování jednovláknové T-DNA



(Jayaswal *et al.*, 1987). Ukončení odkrucování vlákna u levé hraniční sekvence není vždy přesné a díky tomu může část T-DNA chybět. Gen *gusA* se v plazmidovém konstruktu 35SGUSint. nachází právě poblíž levé hraniční sekvence (Obr. 3).

U 16 rostlin nebyla potvrzena přítomnost genu *gusA* ani *nptII* pomocí Southernovy hybridizace, přestože tyto rostliny regenerovaly na médiu se 100 mg/l kanamycinu. Přirozená rezistence rostlin rododendronů nebyla dosud popsána. Vysvětlením regenerace rostlin na selekčním antibiotiku i přes nepotvrzení přítomnosti selekčního genu *nptII* může být zvýšená odolnost rostlin ke kanamycinu následkem somaklonální variability.

Během kalusového stádia dochází k dediferenciaci pletiv. V kalusovém pletivu se často vyskytují buňky s různými stupni ploidie. Rostliny regenerující z kalusových kultur se zdají být náchylnější k indukci genetické variability. V důsledku genetických změn během kultivace, která může na rostliny stresově působit, pak mohou mít kultivované rostliny jiné vlastnosti než rostliny původní. Proto je žádoucí při kultivaci používat orgánové kultury procházející přímou diferenciací s minimální nebo žádnou kalusovou formací, což minimalizuje riziko somaklonální variability. (Jain *et al.*, 1998)

U 2 ze 16 rostlin, u kterých byla provedena Southernova hybridizace, byla již dříve v mé bakalářské práci prokázána přítomnost genu *gusA* pomocí PCR (Obr. 4) a u 1 z těchto 2 rostlin a 1 další byly také získány při fluorimetrickém stanovení více než 25x vyšší hodnoty aktivity enzymu  $\beta$ -glukuronidázy v porovnání s kontrolou (Skotnicová, 2009).

Je možné, že se v případě některých rostlin jednalo o rostliny chimérické, u kterých mohlo během vegetativního množení dojít ke zvýšení podílu netransformovaných buněk. Následkem toho mohl být podíl transformovaných buněk příliš malý pro detekci transgenu v izolované DNA.

Pro počáteční fázi selekce je žádoucí nižší koncentrace selekční látky z důvodu omezení negativního účinku látek vylučovaných hynoucími buňkami na buňky transgenní. Pro případné další transformace odrůdy Azuro by však v další fázi selekce bylo vhodné použít vyšší koncentrace selekčního antibiotika kanamycinu než 100 mg/l nebo vyzkoušet cestu přes jednobuněčný původ transgenních rostlin např. ze somatických embryí. Indukci somatických embryí rododendronů popsaly ve své práci Vejsadová a Petrová (2003). Jednobuněčný původ transgenních rostlin a silnější selekční tlak by měly vést k omezení výskytu chimérismu u získaných rostlin.

## 6. Závěr

Ve své diplomové práci jsem provedla molekulární analýzu rostlin regenerujících na selekčním médiu s koncentrací kanamycinu 100 mg/l. Tyto rostliny byly získány transformací 2 kultivarů rododendronů (Azuro a Rebe) pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí plazmidový konstrukt 35SGUSint., který obsahuje gen *nptII* umožňující selekci transgenních rostlin na kanamycinu a signální gen *gusA* kódující enzym  $\beta$ -glukuronidázu.

U 49 regenerujících rostlin kultivaru Rebe bylo provedeno pouze fluorimetrické stanovení GUS aktivity. Důvodem byl pomalý růst regenerujících rostlin a z toho plynoucí nedostatek materiálu pro další analýzy. Při fluorimetrické metodě byla u 15 rostlin zjištěna mírně zvýšená aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy, u 7 rostlin zhruba 5x vyšší a u 3 rostlin více než 10x vyšší v porovnání s kontrolou.

U 147 regenerujících rostlin kultivaru Azuro byla měřena aktivita enzymu  $\beta$ -glukuronidázy. U 16 rostlin byla při fluorimetrickém stanovení zjištěna mírně zvýšená a u 1 rostliny 5x vyšší aktivita enzymu. Histochemickým stanovením GUS aktivity nebyl získán pozitivní výsledek.

Přestože rostliny odrůdy Azuro regenerovaly na médiu se selekčním antibiotikem kanamycin nebyla u 28 rostlin pomocí PCR, ani u 16 rostlin pomocí Southernovy hybridizace v průběhu diplomové práce potvrzena přítomnost genů *gusA* a *nptII*.

## 7. Použitá literatura

- **Anderson, W.C.** (1984) A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. J. Amer. Hort. Sci. 109: 343-347
- **Angenon, G., Dillen, W., van Montagu, M.** (1994) Antibiotic resistance markers for plant transformation. Plant Mol. Biol. Man. C1: 1-13
- **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
- **Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254
- **Burnie G. et al.** (2007) Botanika. Slovart, Praha, str.742
- **Dunemann, F., Illgner, R., Stange, I.** (2002) Transformation of *Rhododendron* with genes for abiotic stress tolerance. Acta Hort. 572: 113-120
- **Eichholtz, D.A., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Klee, H.J., Hayford, M., Hoffmann, N.L., Bradford, S.B., Fink, C., Flick, J., O'Connell, K.M., Fraley, R.T.** (1987) Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. Somatic Cell Mol. Genet. 13: 67-76
- **Elzen, P., Townsend, J., Lee, K.Y., Bedbrook, J.R.** (1985) A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. Plant Mol. Biol. 5: 299-302
- **Erikson, O., Herzberg, M., Nasholm, T.** (2004) A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. Nature Biotech. 22: 455-458
- **Erikson, O., Herzberg, M., Nasholm, T.** (2005) The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. Plant Mol. Biol. 57: 425-433
- **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.T., 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
- **Hayford, M.B., Medford, J.I., Hoffman, N.L., Rogers, S.G., Klee, H.J.** (1988) Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases. *Plant Physiol.* 86: 1216-1222
- **Hiei, Y., Ohta, S., Komiki, T., Kumashiro, T.** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271–282
- **Hille, J., Verheggen, F., Roelvink, P., Franssen, H., Van Kammen, A., Zabel, P.** (1986) Bleomycin resistance: A new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol. Biol.* 7: 171-176
- **Hobbs, S.L.A., Kpodar, P., DeLong, C.M.O.** (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant. Mol. Biol.* 15: 851-864
- **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
- **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
- **Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T., Wan, Y.** (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971–980
- **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

- **Church, G.M., Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995
- **Chytra, M., Hanzelka, P., Kacerovský, R.** (2010) Botanické zahrady a arboreta České republiky. Academia, Praha
- **Iwazaki, Y., Kosugi, Y., Waki, K., Yoshioka, T., Satoh, S.** (2004) Generation and ethylene production of transgenic carnations harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientation. J. Appl. Hort. 6: 67-71
- **Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S.** (1998) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- **Jayaswal, R.K., Veluthambi, K., Gelvin, S.B., 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., Burgess, S.M., Hirsch, D.** (1986)  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8447-8451
- **Jefferson, R.A., Wilson, K.J.** (1991) The GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Man. B14: 1-33
- **Joersbo, M., Jorgensen, K., Brunstedt, J.** (2003) A selection system for transgenic plants based on galactose as selective agent and UDP-glucose:galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene as a selective gene. Mol. Breeding 11: 315-323
- **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
- **Koblížek, J.** (2006) Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků. Sursum, Tišnov
- **Kůta, V.** (2007) Možnosti využití signálního genu pro zeleně fluoreskující protein k identifikaci a selekci transformantů lnu. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v ČB
- **Lazzeri, P.A., Brettschneider, R., Lührs, R., Lörz, H.** (1991) Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. Theor. Appl. Genet. 81: 437-444

- **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
- **Miles, J.S., Guest, J.R.** (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene* 32: 41-48
- **Mori, S.** (2006) Fundamental studies on the molecular breeding for flower color modification in Liliaceous ornamentals. Graduate School of Science and Technology, Niigata University
- **Musil, F.** (2006) Studium vlivu cytokininu thidiazuronu na regenerační proces *in vitro* kultur rododendronů. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v ČB
- **Ondřej, M., Drobník, J.** (2002) Transgenozie rostlin. Academia, Praha
- **Ondřej, M., Drobník, J., Gartland, K.M.A., Gartland, J.S.** (1999) Genové inženýrství rostlin. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha
- **Pavingerová, D.** (2000) Využití transgenozie u okrasných rostlin. *Rostlinná výroba* 46: 284-288
- **Pavingerová, D.** (2009) The influence of thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cultivars of *Rhododendron*. *Biol. Plant* 53: 797-799
- **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
- **Rogowsky, P.M., Powell, B.S., Shirasu, K., Lin, T.S., Morel, P., Zyprian, E.M., Steck, T.R., Kado, C.I.** (1990) Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63-kbp regulon cloned as a single unit. *Plasmid* 23: 85-106
- **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
- **Skotnicová, P.** (2009) Ověření metody transformace listových disků rododendronů. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v ČB
- **Snustad, D.P., Simmons, M.J.** (2009) Genetika. Masarykova univerzita, Brno, str. 524

- **Stárková, K.** (2006) Studium vlivu cytokininu isopentyladeninu na regenerační proces *in vitro* kultur rododendronů. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v ČB
- **Strauch, E., Wohlleben, W., Pühler, A.** (1988) Cloning of a phosphinothricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* 63: 65-74
- **Svab, Z., Harper, E.C., Jones, J.D.G., Maliga, P.** (1990) Aminoglycoside-3-adenyltransferase resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 14: 197-205
- **Tai, T., Tanksley, S.** (1991) A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 297-303
- **Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J.** (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523
- **To, K.-Y., Wang, Ch.-K.** (2006) Molecular breeding of flower color. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume I*, Global Science Books. England 35: 300-310
- **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
- **Vejsadová, H., Petrová, A.S.** (2003) Somatic embryogenesis in *Rhododendron catawbiense* 'Grandiflorum'. *Acta Hort.* 616: 467-470
- **Větvička, V.** (1998) Stromy a keře. Aventinum, Praha
- **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