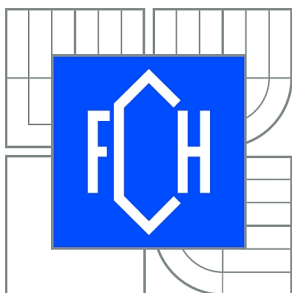




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# IZOLACE TRANSGENNÍCH ROSTLIN NICOTIANA TABACUM A SILENE VULGARIS

ISOLATION OF TRANSGENIC PLANTS NICOTIANA TABACUM AND SILENE VULGARIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VIERA KOVÁČOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

PROF. RNDR. BORIS VYSKOT,  
DRSC.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

|                        |  |                                  |
|------------------------|--|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | <b>FCH-DIP0378/2009</b>                          | Akademický rok: <b>2009/2010</b> |
| Ústav:                 | Ústav chemie potravin a biotechnologií           |                                  |
| Student(ka):           | <b>Bc. Viera Kováčová</b>                        |                                  |
| Studijní program:      | Chemie a technologie potravin (N2901)            |                                  |
| Studijní obor:         | Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010) |                                  |
| Vedoucí práce          | <b>prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.</b>           |                                  |
| Konzultanti:           |  |                                  |

### Název diplomové práce:

IZOLACE TRANSGENNÍCH ROSTLIN NICOTIANA TABACUM A SILENE VULGARIS

### Zadání diplomové práce:

- 1.) Vypracování podmínek kultivace a regenerace in vitro pro *N. tabacum* a *S. vulgaris*.
- 2.) Izolace transgenních rostlin *N. tabacum* a *S. vulgaris* s pomocí binárního vektoru *Agrobacterium tumefaciens*: fyzický (PCR) a biochemický (-glukuronidáza) důkaz přenosu reportérového transgenu.
- 3.) Izolace transgenních buněčných (kořenových) linií *N. tabacum* a *S. vulgaris* s pomocí *Agrobacterium rhizogenes*. Důkaz transgenozie technikou PCR.
- 4.) Molekulární analýza spontánních regenerantů z kořenových kultur technikou PCR.
- 5.) Využití kořenových buněčných linií pro molekulárně-cytogenetickou analýzu.

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Viera Kováčová  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Táto práca sa zaoberá transformáciou *Silene vulgaris*, ktorú sprostredkováva *Agrobacterium tumefaciens* a *A. rhizogenes*. *S. vulgaris* slúži ako modelová rastlina pre štúdium gynodioecických druhov. Gynodioecia je evolučný medzistupeň medzi bisexualitou (hermafroditné druhy) a dvojdomosťou (dioecické druhy). Gynodioecické rastliny nesú na niektorých jedincoch bisexuálne kvety, zatiaľ čo iné jedince majú len samičie kvety. Cieľom tejto práce bolo vyvinúť techniku schopnú integrácie cudzieho génu do tejto rastliny, aby bolo možné študovať hlavne evolúciu pohlavnosti u rastlín. Použitím *A. rhizogenes* boli úspešne pripravené kultúry typu hairy roots, ktoré ale neposkytovali spontánne (transgénne) regeneranty. Podarilo sa experimentálne navrhnúť postup regenerácie *S. vulgaris* z listových fragmentov, ale tento prvý výsledok nepotvrdil, že agrobaktériom infikované rastliny vzniklé regeneráciou z kalusov ponosú transgénny reportérový systém. Ako pozitívna kontrola boli používané rastliny *Nicotiana tabacum*.

## ABSTRACT

This project is focused on transformation of *Silene vulgaris* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. *S. vulgaris* is a good model plant to study gynodioecy, an evolutionary step from bisexuality to dioecy. Gynodioecious plants form in some individuals bisexual flowers, while the others possess only female flowers. The aim of this research is to develop a technique to introduce foreign genes into this plant to study its developmental consequences. Using *A. rhizogenes* we successfully prepared hairy root cultures, which unfortunately do not form shoot regenerants. We have prepared a protocol to induce plant regenerants from *S. vulgaris* leaf fragments. The first results do not confirm that *A. tumefaciens* infected plant regenerants harbor reporter transgenes. We used *Nicotiana tabacum* as a positive control.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

*Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Silene vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, transgénne rastliny

## KEYWORDS

*Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Silene vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, transgenic plants

KOVÁČOVÁ, V. *IZOLACE TRANSGENNÍCH ROSTLIN NICOTIANA TABACUM A SILENE VULGARIS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 62 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc..

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu na téma "Izolace transgenních rostlin *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris*" som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autor uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto diplomovej práce som neporušila autorské práva tretích osôb, hlavne som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovení § 11 a autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovení §152 trestného zákona č. 140/1961 Sb.“

V Brně dne .....

.....  
(podpis autora)

## POĎAKOVANIE

Za ochotu pomôcť a nesčítne rady pri tvorbe mojej diplomovej práce patrí moja vďaka pánovi profesorovi Vyskotovi a celému kolektívu z Laboratória vývojovej genetiky rastlín, BFU AV ČR.

## OBSAH

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Úvod.....  | 7  |
| 2       | Transgenóza vyšších rastlín .....  | 8  |
| 2.1     | Genetická transformácia.....   | 8  |
| 2.2     | Technológia rekombinantnej DNA .....   | 8  |
| 2.3     | Klonovacie vektory pre vnášanie génov do vyšších rastlín .....                 | 9  |
| 2.4     | Najmenší prirodzený genetický inžinier, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..... | 9  |
| 2.4.1   | Ti-plazmid .....   | 10 |
| 2.4.2   | Binárny vektorový systém.....  | 11 |
| 2.4.3   | Výber rastlinného hostiteľa .....  | 12 |
| 2.4.4   | Patogénny cyklus.....  | 13 |
| 2.4.4.1 | Interakcia medzi <i>A. tumefaciens</i> a hostiteľskou bunkou .....             | 13 |
| 2.5     | <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....  | 14 |
| 2.5.1   | Ri plazmid .....   | 15 |
| 2.5.2   | Hairy roots.....   | 15 |
| 3       | Dôkaz transformácie vyšších rastlín .....                                      | 17 |
| 3.1     | Fyzický dôkaz, PCR.....  | 17 |
| 3.1.1   | Návrh primerov pre štandardnú PCR .....  | 18 |
| 3.1.2   | Nested PCR .....   | 19 |
| 3.1.3   | Elektroforéza .....  | 19 |
| 3.2     | Signálne gény a gény pre selekciu .....  | 19 |
| 3.2.1   | Histochemický dôkaz .....  | 20 |
| 3.2.2   | $\beta$ -glukuronidázový systém .....  | 20 |
| 3.2.3   | Selekčný márkér fosfinotricín (PPT).....                                       | 21 |
| 4       | <i>Silene vulgaris</i> .....   | 23 |
| 5       | <i>Nicotiana tabacum</i> .....   | 25 |
| 5.1     | Horizontálny génový prenos, <i>Ngrol</i> gény .....                            | 25 |
| 6       | Metodika.....  | 26 |
| 6.1     | Experimentálny materiál .....  | 26 |
| 6.2     | Živné média.....   | 27 |
| 6.3     | Sterilizácia semienok.....   | 30 |
| 6.4     | Kultivácia baktérií .....  | 30 |
| 6.5     | Regenerácia <i>S. vulgaris</i> i <i>N. tabacum</i> .....                       | 31 |
| 6.6     | Transformácia.....   | 31 |
| 6.7     | Izolácia DNA použitím kitu .....   | 32 |
| 6.8     | PCR .....  | 32 |
| 6.8.1   | Návrh primerov pre <i>gusA</i> gén .....                                       | 33 |
| 6.9     | Elektroforéza .....  | 34 |
| 6.10    | $\beta$ -glukuronidázový (GUS) test .....                                      | 35 |
| 6.11    | Izolácia mitotických protoplastov z kultúry hairy roots.....                   | 36 |
| 7       | Výsledky.....  | 38 |
| 7.1     | Regenerácia z listových fragmentov .....                                       | 38 |
| 7.2     | Fosfinotricínové skúšky .....  | 41 |
| 7.3     | Transformácia sprostredkovaná <i>A. tumefaciens</i> .....                      | 43 |
| 7.4     | Transformácia sprostredkovaná <i>A. rhizogenes</i> .....                       | 46 |
| 8.      | Diskusia a záver .....   | 50 |
| 9.      | Zoznam použitých zdrojov .....   | 53 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 10. | Zoznam použitých skratiek a symbolov ..... | 60 |
| 11. | Zoznam Príloh .....                        | 61 |

# 1 ÚVOD

Pod pojmom genetická modifikácia rozumieme cielený zásah do dedičnej informácie organizmu. To znamená, že nemusia byť vnášané len cudzie gény, ale je možnosť pracovať i so zmenami génov, ktoré sú pre daný organizmus vlastné, teda ich cieľene zapínať či vypínať. Pre samotné vykonanie genetickej modifikácie je možné použiť širokú škálu metód.

Genetické modifikácie v rastlinnej ríši sú v hojnej miere využívané v dnešnej dobe okrem poľnohospodárstva i v základnom výskume. Medzi hlavné metódy získu transgénej rastliny patrí neustále okrem iného aj aplikácia *Agrobacterium tumefaciens*, menej používanou baktériou umožňujúcou horizontálny génový prenos je *A. rhizogenes*. Získ rastlín so zmenenou genetickou informáciou sa uplatňuje hlavne v oblasti pestovania úžitkových plodín (zvyšovanie odolnosti voči škodcom a nepriaznivým podmienkam prostredia, zvyšovanie výnosnosti, zvyšovanie nutričnej hodnoty danej plodiny), slúžia i na produkciu rôznych chemicky a farmaceuticky významných zlúčenín (biodegradabilné plasty, protilátky), je možné vďaka nim znižovať koncentrácie polutantov (ťažké kovy, polychlorované bifenyly) a v nemenšom rade môže vďaka nim prebiehať výskum metabolických dejov, evolúcie, štúdie funkcií jednotlivých génov a podobne.

Medzi oblasti základného výskumu rastlín patrí i štúdium pohlavnosti tejto ríše. *Silene vulgaris* je vhodný modelový organizmus k štúdiu vývoja pohlavných chromozómov, ale jej uplatnenie sa nachádza i na poli aplikovaného výskumu, hlavne čo sa týka fytofarmácie. Návrh optimálnej transformačnej metódy, ktorej výsledkom by bol získ transgénej *S. vulgaris*, by výrazne zrýchlil a zefektívnil oblasti výskumu, v ktorých je používaná.

## 2 TRANSGENÓZA VYŠŠÍCH RASTLÍN

### 2.1 Genetická transformácia

Genetická transformácia zahŕňa inkorporáciu génu do genómu, vynímajúc fúziu gamét alebo somatických buniek. Existujú rôzne metódy pre stabilnú integráciu cudzieho génu do genómu rastlín. Integrácia a expresia cudzích génov v rastlinách poskytuje nástroj na zlepšenie vlastností rastlín a lepší prístup k biologickým štúdiám. Metódy genetického inžinierstva zaisťujú transformačné prístupy vedúce ku generovaniu žiadaných vlastností rastlín, ktoré sú nedosažiteľné cestou kríženia rastlín. Týmto spôsobom sa zefektívňuje pestovanie úžitkových rastlín a uplatňuje sa produkcia rastlinných línií použiteľných v širokom spektre, od produkcie farmakologicky významných látok až po biodegradovateľné plasty.

Na prenos génov a úspešnú regeneráciu transgénnych rastlín existuje niekoľko systémov, najvšeobecnejšou metódou je transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens*, nasleduje biolistická metóda a priamy prenos génov do protoplastu. V systéme prenosu génov je potrebné úspešne splniť tri základné kroky, aby sa získala transgénna rastlina. Prvý krok je správny výber rastlinného pletiva, ktoré je schopné regenerácie, druhým krokom je výber vhodnej metódy na zavedenie cudzej DNA do buniek a tretí krok pozostáva z procedúry selekcie a na ňu naväzujúcej regenerácie transformovaných rastlín vo významnej frekvencii.

Počas procesu prenosu DNA sa nikdy u všetkých cieľových buniek nedosiahne stabilná integrácia DNA a ešte menšie množstvo týchto buniek prežije selektívne liečenie. Preto sú obzvlášť potrebné efektívne systémy pre selekciu transformovaných buniek z veľkého počtu netransformovaných buniek a pre vývoj regeneračných podmienok, vďaka ktorým je umožnený zisk rastliny z jednotlivých transformovaných buniek.

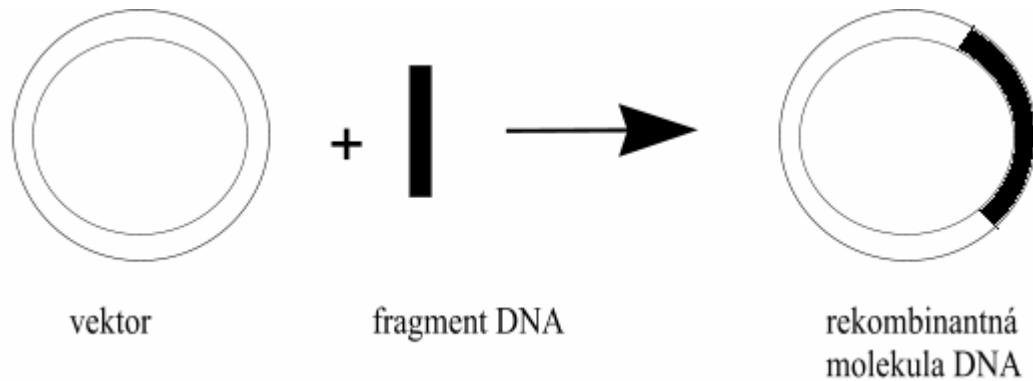
Koľko rôznych genotypov, toľko rôznych odpovedí na kalogenézu a rastlinnú regeneráciu. Mnoho buniek je schopných prijať cudziu DNA bez ohľadu na systém prenosu DNA, ale iba niektoré z nich sú dostatočne kompetentné produkovať fertillné rastliny. Úspech transformačných dejov závisí na normálnom vývoji rastliny z transformovaných buniek [1].

### 2.2 Technológia rekombinantnej DNA

Technológia rekombinantnej DNA sa inak nazýva aj genetické inžinierstvo a za jeho samotné jadro možno považovať proces klonovania génov. Základnými zložkami tohto procesu sú konštrukcia rekombinantnej molekuly DNA, prenos tejto molekuly do hostiteľskej bunky nasledovaný znásobením rekombinantnej molekuly DNA a delenie hostiteľských buniek.



Fragment DNA, obsahujúci gén nášho záujmu, ktorý má byť klonovaný, je vložený do cirkulárnej DNA molekuly nazývanej vektor, a tým dôjde k vzniku rekombinantnej molekuly DNA. Vektor s cieľovým génom sa preniesie do hostiteľskej bunky, obvyčajne baktérie (*E. coli*), ale môžu byť použité rôzne typy živých buniek. V hostiteľskej bunke sa vektor multiplikuje, produkujú sa jeho početné identické kopie, teda i kopie génu, o ktorý máme záujem. Keď sa hostiteľská bunka delí, rekombinantné molekuly DNA sú taktiež odovzdávané potomstvu a v dcérskych bunkách dochádza zas k replikácii vektoru [2].



**Obr. 2.1:** Konštrukcia rekombinantnej DNA molekuly [2]

### 2.3 Klonovacie vektory pre vnášanie génov do vyšších rastlín

Klonovacie vektory pre vyššie rastliny boli objavené v roku 1980 a ich význam tkvie hlavne v produkcii geneticky modifikovaných plodín, ktorých význam neustále rastie.

S rozdielnym stupňom úspechu sú na poli modifikácií vyšších rastlín využívané tri typy klonovacích systémov. Patria sem vektory založené na prirodzenej schopnosti *Agrobacterium tumefaciens* modifikovať rastliny, ďalej priamy prenos génu použitím rôznych typov plasmidov DNA a vektory pochádzajúce z rastlinných vírusov [2].

### 2.4 Najmenší prirodzený genetický inžinier, *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* je gramnegatívna baktéria, aeróbna, nefermentujúca, bez tvorby endospór, teda nesporulujúca, pohyblivá vďaka jednému až šiestim bičíkom, nefluoreskuje, nie je pigmentovaná, oxidázový test je negatívny, katalázový test je pozitívny. Baktéria je chemoorganotrofná, ale dokáže sa živiť aj saprofyticky. Prirodzene je však polyfágnny parazit schopný napadať dikotyledonové rastliny z viac ako šesťdesiatich čeladí i mnohé ďalšie organizmy [3].

*A. tumefaciens* je štíhla mierne zaoblená tyčinka veľkosti 0,6 až 1 na 1,5 až 3 mikrometre. Má jeden až šesť bičíkov rozmiestnených po povrchu (peritricha). Existuje samostatne alebo v pároch. Pri kultivácii v médiu obsahujúcom karbohydráty bunky

produkujú obrovské množstvo extracelulárnych polysacharidov, ktoré dávajú kolóniam objemný slizký vzhľad a sťažujú samotnú manipuláciu s bakteriálnymi kolóniami [3].

Táto baktéria má schopnosť spôsobovať ochorenie známe pod názvom Crown gall disease (CGD), ktoré je asociované s prítomnosťou Ti plasmidu v bakteriálnej bunke. Jedná sa o veľký plazmid, ktorý nesie početné množstvo génov zapojených v infekčnom procese. Pozoruhodným javom spojeným s Ti plazmidom je fakt, že po infekcii rastlinného hostiteľa, je časť molekuly bakteriálneho plazmidu integrovaná do chromozomálnej DNA rastliny. Integrovaný segment DNA sa nazýva T-DNA a tá je udržiavaná v stabilnej forme v rastlinnej bunke a prechádza pri delení aj do dcérskych buniek ako súčasť chromozómov [2].

### 2.4.1 Ti-plazmid

Napriek skutočnosti, že vyššie rastliny prirodzene neobsahujú plazmidy, je v súvislosti s vyššími rastlinami kladený dôraz a záujem na takzvaný Ti plazmid. Ide o plazmid pochádzajúci z *A. tumefaciens* a obsahujúci T-DNA. Označenie plazmidu symbolom Ti znamená tumor indukujúci plazmid. Veľkosť plazmidu je viac ako 200 kb, čo značne znemožňuje použiť ho ako samostatný klonovací vektor [3].

Približne 35 génov *vir* mapuje vonkajšok T-DNA oblasti Ti-plazmidu a kóduje produkty potrebné pre vyčlenenie, transfér a integráciu T-DNA do rastlinného genómu. Gény *vir* sú značené ako trans, čo znamená, že nie je potrebná ich fyzická účasť v T-DNA nato, aby bola T-DNA začlenená do rastlinného genómu.

Hraničné sekvencie, teda 25 bp dlhé nedokonalé repetície ohraničujúce T-DNA, sú potrebné pre transfér T-DNA, pretože obsahujú sekvencie potrebné pre rozpoznanie strán stranovo-špecifickými endonukleázami kódovanými operónom *virD*. Endonukleáza našepuje spodné vlákno DNA z T-DNA označujúc štartovací bod pre transfér. Pravá a ľavá hranica T-DNA sa označujú ako cis-regulačné oblasti, ktoré sú fyzicky prikladané ku génom určeným na prenos do rastlinného genómu. Iné cis-regulačné oblasti zahŕňajú promotéry a terminátory, ktoré lemujú transgény a regulujú ich expresiu. Všeobecne používané promotéry a terminátory sú gén pre syntézu nopalínu (*NOS*) a promotér vírusu mozaiky karfiolovej (*CaMV 35S*).

Na overenie inkorporácie požadovaného génu do rastlinného genómu slúžia takzvané selekčné markerové gény, ktoré poskytujú rozpoznanie a výber buniek so zabudovaným génom. Tieto špeciálne gény sú súčasťou transgénov. Bakteriálne selekčné markery povoľujú identifikáciu baktérií zmenených vektorom, ktorý je nosičom markeru. Príkladom selekčných markerov sú hygromycínfosfotransferáza, kanamycínfosfotransferáza a iné. Princíp selekcie buniek alebo pletív na základe médií s antibiotikami, na ktorých sú schopné vegetovať iba GM bunky sa postupne opúšťa z dôvodu teoretického nebezpečenstva vzniku rezistencie voči antibiotikám a tieto selekčné gény sú nahradzované obvykle génami pre rezistenciu k herbicídum, ako je napríklad glufosinát alebo fosfinotricín. V niektorých selekčných systémoch je ako selektívny gén používaný gén kódujúci enzým manózu.

Pri výskume genetických transformácií sú hojne využívané takzvané signálne alebo reportérové gény. Jedná sa o gény, u ktorých sa dá ľahko zhodnotiť expresiu z hľadiska kvantity i z hľadiska miesta expresie v rámci organizmu alebo v závislosti na podmienkach, ktoré expresiu indukujú. Jedná sa hlavne o transgén  $\beta$ -glukuronidázu pôvodom z baktérie *Escherichia coli*, gén pre tvorbu luciferázy zo svetlušiek (*Photinus pyralis*) alebo fluoreskujúci proteín pochádzajúci z medúzy (*Aequorea victoria*).

Odhladnuc od T-DNA hraničných sekvencií, väčšina génov z T-DNA môže byť nahradená cudzími génmi majúcimi význam v modifikácii rastlín a tieto gény sú tým pádom prenesené do rastliny. Geneticky modifikovaná T-DNA je vo všeobecnosti uvádzaná ako mutantná T-DNA, skonštruovaná T-DNA či odzbrojená T-DNA, pričom presné definície podmienok zmien v T-DNA a často i samotné zmeny nie sú uvádzané, lebo sú chránené patentom.

Pri prenose DNA z *A. tumefaciens* do hostiteľskej bunky je prenášaný iba úsek z Ti plazmidu nazývaný T-DNA, ktorý je ohraničený 25 bp dlhými repetíciami. Dĺžka T-DNA je približne 23 kb. Tieto repetície slúžia ako signálne úseky pre transférový aparát. T-DNA obsahuje gény, ktoré kódujú gény zapojené do syntézy opínov a fytohormónov, napriek tomu že sú to gény sídliace v bakteriálnom plazmide, sú aktívne len v rastlinnej bunke, to znamená, že musia obsahovať typické eukaryotické kontrolné sekvencie. Všetky tieto gény obsahujú TATA a CAAT boxy a typické rastlinné polyadenylované signály [4], [5].

Je známych viacero typov Ti-plazmidu, medzi najvýznamnejšie patrí nopalínový a oktopínový, oba majú T-DNA regióny, ale líšia sa ich štruktúrou. Nopalínová T-DNA je tvorená jedným súvislým segmentom o veľkosti 22 kb a oktopínová T-DNA je tvorená tromi segmentmi, ľavým segmentom ( $T_L$ ) s dĺžkou 13 kb, centrálnym úsekom ( $T_C$ ) dlhým 1,5 kb a pravým segmentom ( $T_R$ ) DNA s veľkosťou 7,8 kb.  $T_L$  DNA má onkogénnu funkciu a  $T_R$  obsahuje gény pre syntézu opínov. K prenosu je postačujúci aj samotný  $T_R$  úsek, avšak zvyšné úseky zvyšujú efektivitu prenosu svojou prítomnosťou. Žiadne iné sekvencie nie sú pri prenose T-DNA žiadané. Pravý segment obsahuje repetíciu s dvoma konzervatívnymi doménami s veľkosťou 13 a 5-7 bp, delícia prvých šesť alebo posledných desať zablokuje transfét T-DNA [6].

Pri transformácii z hľadiska genetickej výbavy agrobaktérií sú dôležité dva kroky: naviazanie baktérie na rastlinnú bunku a transfér DNA do bunky hostiteľa. Každý z krokov zahŕňa odlišnú sadu génov [5].

## 2.4.2 Binárny vektorový systém

Objav, že gény *vir* (gény zodpovedné za virulenciu) nemusia byť v tom istom plazmide s T-DNA regiónom, aby došlo k jeho prenosu a k inzercii do rastlinného genómu, umožňuje vytváranie systémov, kde región T-DNA a región *vir* sú umiestené v odlišných plazmidoch. Z toho vyplýva, že v systéme binárneho vektora sú T-DNA a oblasť *vir* uložené v izolovaných plazmidoch z toho istého poddruhu *A. tumefaciens*. Gény *vir* sú lokalizované v

Ti-plazmide, ktorý neobsahuje tumor spôsobujúce gény, a T-DNA s génmi, ktoré sú určené na inkorporáciu do genómu hostiteľa, je umiestnené v malej vektorovej molekule. Sú použité dva odlišné plazmidy, konkrétne ide o malý replikon a pomocný plazmid.

Malý replikon so širokým spektrom hostiteľov má počiatok replikácie (*ori*) povolujúci údržbu plazmidu v rozsiahlej škále baktérií vrátane *E. coli* a *A. tumefaciens*. Tento plazmid typicky obsahuje cudziu DNA namiesto T-DNA, ľavú a pravú hraničnú sekvenciu T-DNA alebo prinajmenšom pravý hraničný úsek T-DNA, márkry pre selekciu a udržiavanie v *E. coli* a aj v *A. tumefaciens* a selekčné márkry pre rastliny. Pomocný Ti plazmid je poskytnutý *A. tumefaciens* a postráda celý T-DNA región, ale obsahuje neporušený *vir* region [7].

### 2.4.3 Výber rastlinného hostiteľa

Molekulárny a genetický základ pre výber vhodného hostiteľa pre *A. tumefaciens* je nejasný. Skoršie výskumy indikujú, že Ti-plazmid, skôr ako chromozomálne gény, je významnejším genetickým určovateľom pri výbere hostiteľov. Niekoľko virulentných lokusov na Ti-plazmide, vrátane *virC* a *virF*, sa javí byť determinujúcich škálu rastlinných druhov, ktoré môžu byť transformované k tvorbe nádorov. *Locus VirH* sa zdá byť zapojený do schopnosti agrobaktérií transformovať kukuricu a iné gény *vir*, vrátane *virG*, prispievajú k hypervirulencii jednotlivých druhov *Agrobacterium*.

Momentálne je zrejmé, že predurčenie hostiteľov, ktorých je možné prirodzene infikovať, je viac komplexnejší proces ako sa predpokladalo. Tento proces je pod genetickou kontrolou širokej palety faktorov z baktérií aj hostiteľských rastlín [8].

Pre dikotyledonové rastliny je charakteristické, že v prípade poranenia ich orgánov dochádza k produkcii fenolických látok ako je napríklad kyselina 4-hydroxybenzoová, feruklová, sinapová, lysergová, galová, ďalej katechol, vanilín alebo pyrogalol. Prítomnosť týchto fenolických látok v pôde je príčinou pozitívnej chemotaxie a aktivácie génov virulencie, ktoré nesie práve Ti-plazmid *A. tumefaciens*. Špecifická väzba bakteriálnych buniek je založená na princípe väzby signálnych molekúl na receptorové proteíny bunecných stien. Signálne molekuly sú kódované génmi virulentnej oblasti Ti-plazmidu. Jednotlivé kmene *A. tumefaciens* vykazujú často špecifitu voči rôznym botanickým druhom. Táto špecifita je daná práve variabilitou signálnych molekúl. Následne dochádza k aktivácii ďalších génov zaisťujúcich virulenciu plazmidu. Tieto gény kódujú napríklad endonukleázy, ktoré spôsobujú vznik jednoreťazcových zlomov na špecifických miestach Ti-plazmidu. Po náhodnej integrácii T-DNA oblasti do genómu hostiteľskej bunky dochádza k syntéze auxínov a cytokínov, čo má za následok fenotypové zmeny rastlín [9].

Napriek prirodzenej schopnosti *A. tumefaciens* napadať len dikotyledonové rastliny, je možné T-DNA prenos do monokotyledonových rastlín uskutočniť nepriamo s použitím citlivých reportérových systémov.

Rozširujúci sa záber hostiteľov môže byť podporovaný aj interakciou Ti-plazmidu s agrobakteriálnym chromozómom iného pôvodu. Napríklad, Ti-plazmid *pTiBo542* umiestený

prirodzene v *A. tumefaciens* Bo542 má limitujúcu schopnosť tvorby nádorov voči mnohým druhom strukovitých rastlín, ale ak sa daný Ti-plazmid premiestni do *A. tumefaciens* C58, Ti-plazmid *pTiBo542* sa prejaví oveľa silnejšou virulenciou pôsobiacou na sóju a iné strukovité rastliny. Citlivosť voči transformácii rastlín *A. tumefaciens* má genetickú podstatu minimálne u kurkumy, hrášku, sóji, vinnej révy a rozličných ekotypoch *Arabidopsis thaliana* [3].

#### 2.4.4 Patogénny cyklus

Patogénne formy *A. tumefaciens* môžu prežiť saprofytycky v pôde až do dvoch rokov. Ak sa nablízku v okolitej pôde vyskytne hostiteľská rastlina poranená vplyvom presádzania, hmyzom za účelom potravy alebo iným spôsobom, baktéria sa chemotaktickým pohybom presunie k poranenej časti a umiestni sa medzi bunky hostiteľa v rane. Takto umiestnené baktérie začnú stimulovať okolie hostiteľských buniek k rýchlemu a nepravidelnému deleniu. Baktérie dosahujú tohto delenia vložím časti vlastnej DNA do hostiteľských bunčných chromozómov, ktorá spôsobuje nadprodukciu cytokinínov a auxínov, ktoré sú regulátormi rastlinného rastu a zároveň sa tvoria opíny slúžiace k výžive *A. tumefaciens*.

Výsledné tkanivo rastlín získané rýchlym delením je nediferenciované bielej alebo krémovožltej farby a bunky môžu obsahovať jedno alebo viac jadier. Toto tkanivo pokračuje vo svojom zväčšovaní sa, pričom nádor je formovaný na koreni alebo stonke v závislosti od pôvodne poranenej strany rastlinného tela. Baktéria obsadzuje intercelulárny priestor na periférii nádora a nie je prítomná v centre rastúceho tumoru. Nádor nie je chránený epidermis [3].

CGD začína vznikom malých zdurenín na stonke alebo koreni, prípadne na iných častiach rastlinného tela, ktoré sú umiestnené čo najbližšie k pôde. Mladý nádor, najčastejšie pripomínajúci zatvrdnutú kožu, vzniká následne po poranení a je bielej či žltokrémovej farby guľovitého tvaru. Tak ako nádor starne, tak sa mení jeho tvar, stáva sa nepravidelným a farba sa mení na hnedú až čiernu. Nádor môže byť spojený s povrchom hostiteľa len pomerne úzkym pruhom tkaniva ale môže sa javiť aj ako celkový opuch stonky, nie celkom presne oddelený. Tkanivo nádora je zvyčajne porézne a drobiace sa ale vyskytuje sa aj v drevitej forme na povrchu s útvarmi pripomínajúcimi uzlíky. Na jednej rastline sa môže súčasne nachádzať viac nádorov, ktoré práchnivejú a odhnívajú na povrchu rastliny buď čiastočne alebo celé s možnosťou recidívy v tej istej oblasti každú sezónu. Prídavné symptómy zahŕňajú zakrpatenie, chlorotické listy, zvýšenú citlivosť rastliny voči sekundárnemu parazitovi a na zmeny životného prostredia [8].

##### 2.4.4.1 Interakcia medzi *A. tumefaciens* a hostiteľskou bunkou

Pomocou medzibunčných signalizácií nazývaných „quorum-sensing“ medzi *A. tumefaciens* a rastlinnou bunkou na základe produkcie acylovaného homoserínového laktonu (Acyl HSL), ktorý je prevažujúcim extracelulárnym bakteriálnym signálom, dokáže *A. tumefaciens* spustiť syntézu proteínov potrebných na prepojenie rastlinnej bunky

s bakteriálnou bunkou. Acyl HSL je produkovaný v nízkych koncentráciách, ale ľahko difunduje cez bakteriálny obal a reguluje horizontálnu výmenu a replikáciu veľkých plazmidov potrebných pre patogenézu a symbiózu s rastlinným hositeľom, jedná sa o fenolickú zlúčeninu [10].

Fenolické látky sú hlavne nachádzané u dikotyledonov, sú vylučované v prípade poškodenia bunkovej steny rastlinnej bunky, a iba veľmi zriedkavo u monokotyledonov. To je dôvodom prečo *A. tumefaciens* paraziticky napadá a geneticky modifikuje prirodzenou cestou monokotyledony iba v niektorých výnimočných prípadoch, napríklad asparágus.

*A. tumefaciens* pri interakcii s hositeľskou bunkou začína výstavbu tzv. tunela potrebného na prenos T-vlákna, ktorý súvisí s vnútornou aj s vonkajšou bakteriálnou membránou ako i s plazmatickou membránou hositeľa. Takýto typ transportu sa označuje ako typ IV a je využívaný aj u viacerých ľudských patogénov. Tento proces má podobný mechanizmus ako interakcia bakteriálnych buniek pri konjugácii [11].

## 2.5 *Agrobacterium rhizogenes*

Za ďalšieho prirodzeného genetického inžiniera z rodu *Agrobacterium* sa dá označiť *A. rhizogenes*. Napriek tomu, že mechanizmus prenosu T-DNA do rastlín je pravdepodobne úplne zhodný u oboch spomínaných zástupcov rodu *Agrobacterium*, fyziologická podstata tvorby nádorov je celkom iná. Crown gall nádory sú výsledkom nadprodukcie fytohormónov špecifikovaných T-DNA génmi *A. tumefaciens*, kdežto T-DNA niektorých Ri-plazmidov *A. rhizogenes* môže obsahovať auxín biosyntetizujúce gény, ale tie nie sú potrebné na vznik hairy root útvarov. Súčasné výskumy potvrdzujú, že nádory typu hairy root sú výsledkom zvýšenej citlivosti transformovaných buniek k endogénnej hladine auxínov. Tento poznatok bude pravdepodobne viesť k zvýšeniu znalostí o procese prirodzeného rastlinného vývoja.

Nádory typu crown gall iba zriedkavo poskytujú regeneranty a tie sú len výnimočne schopné tvorby koreňov. Po analýze týchto regenerantov sa dospelo k záveru, že majú buď odstránenú väčšinu T-DNA sekvencie alebo má T-DNA inaktivovanú génovú expresiu cestou metylácie DNA. Nádory typu hairy root z rozsiahleho počtu rastlinných druhov sú často schopné poskytovať spontánne regeneranty, ktoré síce mávajú pozmenenú morfológiu, ale vždy obsahujú a exprimujú T-DNA gény.

Nádory typu hairy root sú schopné poskytnúť často regeneranty, tie sa ale zvyčajne prejavujú zmenenými vlastnosťami, napríklad značne vrásčitými listami, zmenenou internodulárnou vzdialenosťou a podobne. Zvláštna zmena bola pozorovaná u *N. tabacum*, spontánne regeneranty pestované na médiu bez prídavku rastových faktorov utvárali v mieste poranenia listu či stonky formácie podobné hairy roots, teda trsy koreňov, takúto odpoveď ponúka aj netransformovaná rastlina po raste v médiu obohatenom o auxín [12].

### 2.5.1 Ri plazmid

Je charakterizovaná pomerne veľká skupina Ri-plazmidov. Ich klasifikácia závisí hlavne od typu opínu, ktorý sa produkuje v napadnutej rastline po začlenení T-DNA. Najskúmanejším typom *A. rhizogenes* je kmeň s Ri-plazmidom agropínového typu *pRiA4* alebo *pRi1855*, či s Ri-plazmidom manopínového typu *pRi8196*. Plazmid agropínového typu obsahuje dve T-DNA (ľavú a pravú). Plazmid manopínového a kukumopínového typu má len jednu T-DNA, ktorá zdieľa DNA sekvencie homologické s ľavou T-DNA plazmidu agropínového typu. Po DNA hybridizácii regiónov pravej T-DNA Ri-plazmidu sa dospelo k záveru, že vykazuje zhodu s *tm1* a *tm2* génmi Ti-plazmidu *A. tumefaciens*. Po analýze viacerých nádorov typu hairy root z rôznych druhov rastlinných hostiteľov napadnutých *A. rhizogenes* agropínového typu je zrejmé, že nie je nutná prítomnosť pravej T-DNA na detekovateľnej úrovni, aby vznikali hairy root formácie.

Experiment s malými delečnými mutáciami a vnášaním transpozónových inzertov do Ri-plazmidu agropínového typu mal veľmi zaujímavé výsledky, hlavne čo sa týka génov obsiahnutých v ľavej T-DNA. Výsledkom bolo zistenie, že morfológia nádorov typu hairy root je ovplyvňovaná predovšetkým štyrmi génovými lokusmi (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*). Explantáty infikované mutantnými kmeňmi *A. rhizogenes* s mutáciou v géne *rolA* poskytovali veľmi rovné korene (použitím prirodzeného kmeňa *A. rhizogenes* sa získajú pomerne vlnité korene), mutácie génu *rolB* ústili v stratu virulencie mutantného kmeňa, mutáciou génu *rolC* vznikali normálne rastúce kalusy s pozastaveným rastom koreňov a mutácie *rolD* génu mali za následok iniciáciu rastu koreňov, ale s postupnou retardáciou ich rastu. Tým bola definovaná dôležitosť špecifických génov ľavej T-DNA Ri-plazmidu. Následná analýza DNA sekvencií a transkripčnej aktivity indikovala, že *rol* gény korešpondujú so špecifickými čítacími rámcami (ORF).

Vnášaním jednotlivých *rol* génov do *Nicotiana tabacum* bolo zistené, že špecificky ovplyvňujú vývoj rastliny, ktorá sa následne rôzne fyziologicky líši od normálne sa vyvíjajúcej rastliny (regenerant z listového explantátu s vneseným *rolA* génom má odlišný fenotypový prejav, a to značne vrásčité listy oproti hladkému profilu netransformovanej rastliny) [12].

### 2.5.2 Hairy roots

K úspešnému zisku stabilných hairy root kultúr je potrebné vziať do úvahy niekoľko podmienok ich kultivácie. Medzi ne patrí vhodný výber kmeňa *A. rhizogenes*, vhodné živné médium, aplikácia antibiotík po kokultivácii pletivových kultúr s baktériami na potlačenie nežiadúcej mikroflóry. Najsilnejšiu indukčnú schopnosť majú kmene agropínového typu. Väčšina rastlinných pletív, od listov, stoniek až po protoplasty, sú vhodným materiálom na transformačné pochody, skôr záleží na veku hostiteľského materiálu a odporúča sa mladší materiál. Vhodnými antibiotikami sú cefotaxime sodium, carbencilin disodium, vancomycin, ampicillin sodium alebo tetracycline, v koncentrácii od sto do päťsto miligramov na liter

živného média. Dekontaminované hairy root kultúry by sa mali kultivovať na médiu neobsahujúcom rastlinné rastové faktory.

Aplikácia hairy root kultúr má vzrastajúce tendencie. Využívajú sa na funkčnú analýzu génov, expresiu cudzích proteínov, na prípravu mitotických chromozómov, produkciu sekundárnych metabolitov, produkciu zlúčenín, ktoré sa nenachádzajú v netrasformovaných koreňoch, regeneráciu celých rastlín. Momentálne sa v týchto aplikáciách stretávame s viacerými možnými problémami, medzi ktoré patrí rozdielna regulácia sekundárnych metabolizmov v hairy root kultúrach odvodených z rozličných rastlinných druhov, pričom nadexpresia kľúčových enzýmov nemusí vždy zvyšovať tvorbu sekundárneho metabolitu. Ďalším problémom je možná redukcia počtu chromozómov počas subkultivácie, morfológické zmeny regenerovaných rastlín a spolupôsobenie endogénnych a cudzích génov, ktoré vedie k zníženiu koncentrácie požadovaného produktu aj v prípade vnášania väčšieho počtu cudzích génov. Napriek tomu sa hairy root kultúry javia byť sľubným potencionálnym prístupom k produkcii sekundárnych metabolitov, hlavne farmaceutických, pretože majú veľa dobrých vlastností, ako napríklad rýchly rast, ľahkú kultiváciu, dostupné genetické manipulácie a to najdôležitejšie, vzrastajúcu schopnosť syntézy využiteľných metabolitov, ktoré nemôžu byť produkované neorganizovanými bunkami [13].



## 3 DÔKAZ TRANSFORMÁCIE VYŠŠÍCH RASTLÍN

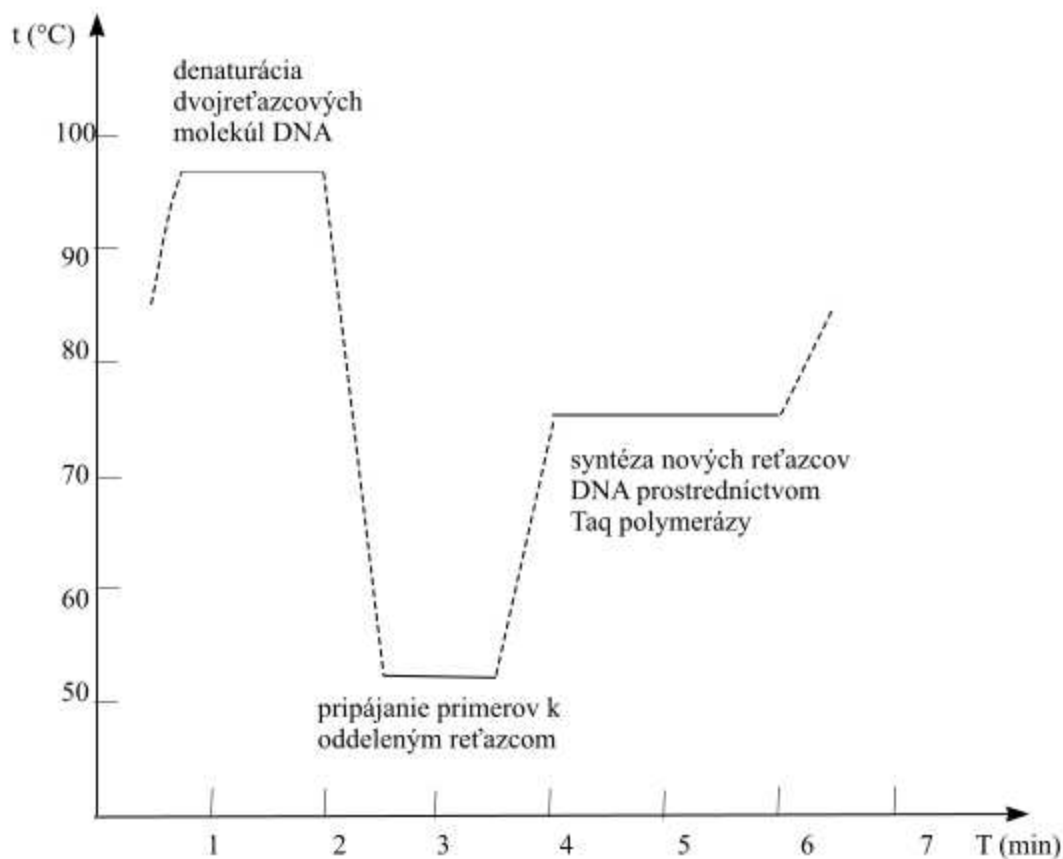
### 3.1 Fyzický dôkaz, PCR

Polymerázová reťazová reakcia patrí napriek veškerým technickým vymoženostiam v modernej molekulárnej biológii k najviac využívaným technikám. Táto technika slúži na zmnožovanie požadovaných DNA sekvencií. Počnúc od neuveriteľne malých množstiev DNA molekúl, PCR môže byť použitá k vyprodukovaniu až mikrogramových množstiev DNA. PCR je dostatočne citlivá, aby mohla naamplifikovať potrebné množstvo DNA na klonovanie alebo sekvenovanie z jednej bunky. PCR amplifikuje len vybrané segmenty (cieľové úseky) na pôvodnom DNA templáte, nie celú predlohu DNA molekuly. Výsledným produktom PCR sú amplikony, teda úseky DNA o definovanej dĺžke, obvykle ide o desiatky až tisíce párov báz.

Pre PCR sú nevyhnutné nasledujúce komponenty: DNA templát, PCR primery, Taq polymeráza, zmes nukleotidov dNTP, vhodný pufer, termocykler.

V prvom kroku polymerázovej reťazovej reakcie sa od seba oddelujú reťazce templátu DNA teplotou pohybujúcou sa okolo 94°C. Nasleduje zníženie teploty na rozmedzie od 50°C do 60°C, aby sa primery prítomné v zmesi na PCR mohli naviazať na príslušný úsek teplátovej DNA. Dĺžka primerov sa pohybuje od 15 do 20 párov báz, ale na zvýšenie presnosti môže byť aj dlhšia. Rozmedzia teplôt sa môžu prípadne líšiť vzhľadom na znižovanie alebo zvyšovanie špecifickosti a účinnosti reakcie.

V treťom kroku sa udržiava teplota okolo 70°C, aby sa zaistilo predlžovanie nových reťazcov z primerov. Taq polymeráza je schopná len predlžovať nové vlákna, nie iniciovať syntézu nových reťazcov. DNA syntéza beží od 5' k 3' koncu pre obe nové vlákna. Optimálny počet cyklov je 25 až 35, príliš vysoký počet cyklov významne zvyšuje množstvo vznikajúcich nešpecifických produktov PCR [14].



Obr. 3.1: Teplotný profil PCR [2], [14]

### 3.1.1 Návrh primerov pre štandardnú PCR

Presnosť a úspešnosť PCR pri amplifikácii určitého génu alebo časti sekvencie genómovej DNA je závislá na správnom návrhu oboch primerov, pričom treba brať v úvahu aj celkovú sekvenciu študovaného genómu.

Vhodne navrhnuté primery pre štandardnú PCR by mali mať dĺžku pohybujúcu sa okolo 18 až 25 nukleotidov, obsah GC 40 % až 60 % a rovnomerne rozložené oblasti bohaté na G/C a A/T páry. Teplota nasadenia primerov  $T_m$  by mala byť minimálne 50 °C, pričom tieto teploty si majú byť podobné u oboch primerov. Na matricovej DNA nesmú byť nešpecifické väzbové miesta. Primery nemôžu obsahovať komplementárne sekvencie, inak by z nich vznikali duplexy, ďalej musia byť bez vnútorných sekundárnych štruktúr, to jest vláseniek. Na 3' konci primerov je vhodné zaradiť jeden alebo dva zbytky C alebo G, ktoré slúžia na zaistenie presnej väzby na templát [15].

### 3.1.2 Nested PCR

V určitých situáciach sa vyskytujú neriešiteľné problémy s kvantitou a kvalitou templátu, ktorý má byť amplifikovaný. Ide o prílišnú nariedenosť materiálu obsahujúceho cieľovú sekvenciu DNA alebo o nevhodnú úroveň čistoty štartovacieho materiálu. Práve na riešenie daných problémov bola vyvinutá metóda nested PCR.

Nested PCR je anglický výraz pre odstupňovanú PCR alebo PCR využívajúcu vonkajších a vnútorných primerov. V porovnaní so štandardnou PCR ide o veľmi citlivú metódu, ktorá umožňuje detekovať i jedinou molekulu templátovej DNA. Pri klasickom protokole sa amplifikácia robí v dvoch krokoch. Prvý krok zahŕňa 15 až 30 cyklov s jedným párom tzv. vonkajších primerov. V tomto kroku vzniká produkt, ktorý je prevedený do novej skúmavky a následuje druhý amplifikačný krok pomocou páru tzv. vnútorných primerov, ktoré sú špecifické pre vnútornú časť sekvencie amplifikovanej s párom vonkajších primerov.

Druhý amplifikačný krok zahŕňa ďalších 15 až 30 cyklov a po jeho dokončení sa produkt detekuje elektroforézou. Prenos amplifikačných produktov z prvej reakcie do druhej umožňuje nariedenie inhibítorov, ktoré mohli byť prítomné v pôvodnom vzorku, ale prináša so sebou i možnosť kontaminácie [15].

### 3.1.3 Elektroforéza

Elektroforéza patrí v molekulárnej biológii k najpoužívanejším separačným technikám pri izolácii a analýze nukleových kyselín (NK). Princípom elektroforetickej separácie je pohyb nabitých molekúl v elektrickom poli. Hlavným nositeľom náboja NK sú negatívne nabité fosfátové skupiny, preto sa NK v elektrickom poli pohybujú k anóde.

Ako nosič sa obvykle používa gel, najčastejšie tvorený polyakrylamidom alebo agarózou, ktoré vytvárajú zložitú sieťovú štruktúru polymérnych molekúl s pórami, ktorých veľkosť možno ovplyvniť zložením roztoku a koncentráciou polyméru. Agarózové gely sú vhodné na separáciu molekúl NK o veľkosti 100 bp až po približne 50 kb.

Po dokončení elektroforézy sa identifikuje poloha separovaných molekúl na základe ich zviditeľnenia po použití vhodného farbiva. Najčastejšie sa používa etídiumbromid, ktorý sa vmedzeruje medzi susedné páry báz v DNA a vytvorí s nimi komplex, ktorý po osvetlení ultrafialovým svetlom červeno fluoreskuje. Molekuly DNA o zhodnej veľkosti sú následne na gele viditeľné ako pružky, ktorých intenzita je úmerná koncentrácii DNA [15].

## 3.2 Signálne gény a gény pre selekciu

Signálne gény sú také, ktorých biochemický produkt je možno ľahko pozorovať a kvantitatívne stanovovať. Medzi známe signálne gény patrí chimerický gén skladajúci sa z kódujúcej sekvencie génu pre rezistenciu ku kanamycínu, ktorý kóduje neomycínfosfotransferázu II (NPT II). Rezistencia ku kanamycínu sa prejavuje v rastlinných pletivách veľmi výrazne. Medzi ďalšie využívané signálne gény patrí transgén pre

chloramfenykolacetyltransferázu, transgén pre  $\beta$ -glukuronidázu, transgén pre luciferázu s následnou aplikáciou bioluminiscenčnej skúšky na overenie správnosti začlenenie génu, transgén pre zeleno fluoreskujúci proteín (GFP).

Selektovateľné gény sú také, ktoré nesú rezistenciu voči látke, ktorá môže byť pridaná do agarového média, alebo ktorou môžu byť látky sprejované, a ktorá zaručí selekciu transgénnych buniek a pletív. Využitie transgénov, kódujúcich rezistenciu k toxickým látkam umožňuje, aby na selektívnych médiach prežívali a delili sa iba transgénne bunky. K dispozícii je viacero selekčných systémov pre transformované rastlinné bunky a pletivá, patrí medzi ne i využitie chimerického transgénu pre rezistenciu k prokaryotickému i eukaryotickému antibiotiku hygromycínu, transgén pre rezistenciu k herbicídu glufosinátu, transgén pre rezistenciu voči manóze, transgén pre rezistenciu voči herbicídu fosfotricínu a iné [16].

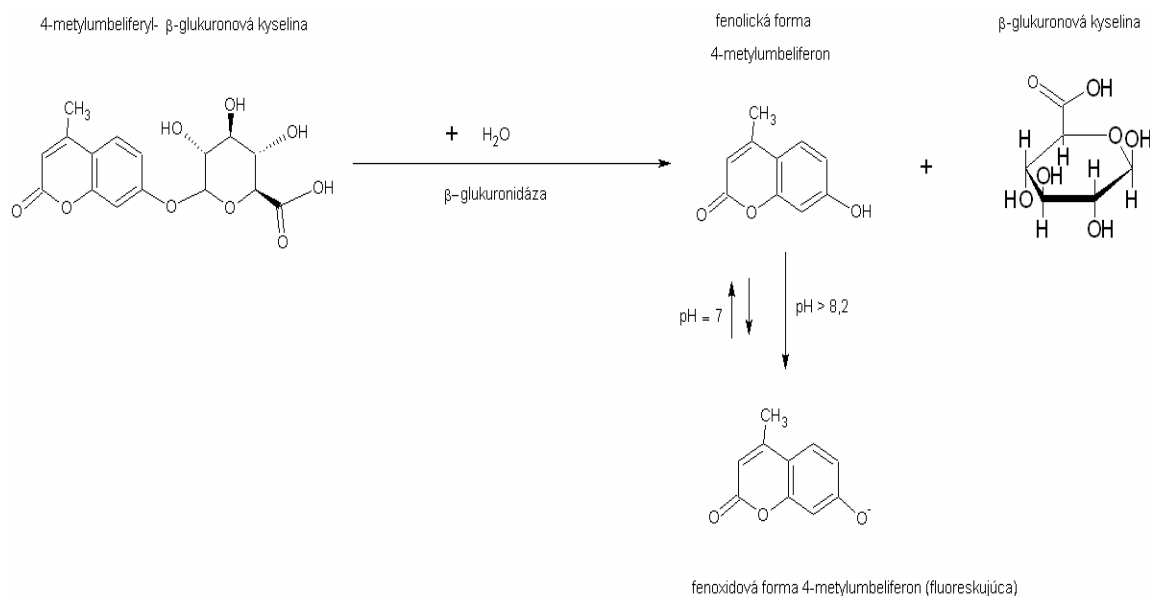
### 3.2.1 Histochemický dôkaz

Overenie správnosti včlenenia T-DNA do rastlinného genómu sa dá urobiť pomocou histochemického dôkazu súvisiaceho s reportérovým, signálnym, génom. Medzi gény s možnosťou histochemického testovania patrí napríklad gén *lacZ* a gén *uidA*. Oba tieto gény sú pôvodom z *E. coli* [2].

### 3.2.2 $\beta$ -glukuronidázový systém

$\beta$ -glukuronidáza je kódovaná lokusom *uidA*, jedná sa o hydrolázu, ktorá katalyzuje štiepenie rôznych  $\beta$ -glukuronidov, z ktorých mnohé sú komerčne dostupnými spektrofotometrickými, fluorometrickými a histochemickými substrátmi.  $\beta$ -glukuronidázový gén bol klonovaný a sekvenovaný, kóduje enzým, ktorý má žiadané vlastnosti pre konštrukciu a analýzu génových fúzií. Má pH optimum 5,2 až 8,0 a nevyžaduje žiadne kofaktory. Prirodzene sa vyskytuje len v bakteriálnych a živočíšnych bunkách, takže ho je možné využívať ako dominantný signálny gén pri transgenóze u rastlín a húb [17].

Produkcii  $\beta$ -glukuronidázy je možné dokázať cestou fluorometrickej reakcie, indigovou metódou a azokopulačnou reakciou. Fluorescenčný test sa robí v homogenáte, je potrebný substrát 4-metylumbeliferyl- $\beta$ -D-glukuronid (MUG). Táto látka nemá schopnosť fluorescencie, pokiaľ nie je rozštiepená na  $\beta$ -D-glukuronid a 4-metylumbeliferon (MU), priebeh reakcie je znázornený na obrázku 3.2. Po ožiarení dlhovlnným ultrafialovým žiarením produkt reakcie, teda MU, dáva modrú fluorescenciu [18].



**Obr. 3.2:** Pôsobením  $\beta$ -glukuronidázy vo vodnom prostredí na 4-metylbelferyl- $\beta$ -D-glukuronid vznikajú dva produkty:  $\beta$ -D-glukuronid a 4-metylbelferon (MU). MU sa môže vyskytovať vo fenolickej i fenoxidovej forme, ale zásadité pH zaručí výrazný posun smerom k vzniku fenoxidovej formy, ktorá v prostredí pôsobenia ultrafialového svetla fluoreskuje [18].

Produkcia sa dá dokázať aj použitím farbiva X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid), ktoré po rozštiepení dáva modrú, vo vode nerozpustnú kryštalickú zlúčeninu, ktorá zostáva lokalizovaná v bunkách. V rastlinách sa využíva gén, do ktorého bol zabudovaný intrón. Tento intrón zaručuje, že k expresii bude dochádzať iba v rastlinných bunkách, nie v baktériách [19].

GUS reportérový systém, ktorého súčasťou je aj  $\beta$ -glukuronidázový gén, je najčastejšie využívaný monitorovací rastlinný systém. V súčasnosti sa stáva populárnejšie aj využívanie génu pre produkciu proteínu vykazujúceho zelenú fluorescenciu (GFP) a ustupuje sa od používania reportérového systému založeného na produkcii enzýmu vykazujúceho kanamycínovú rezistenciu, ktorý kóduje neomycínofototransferáza II (NPT-II) [16].

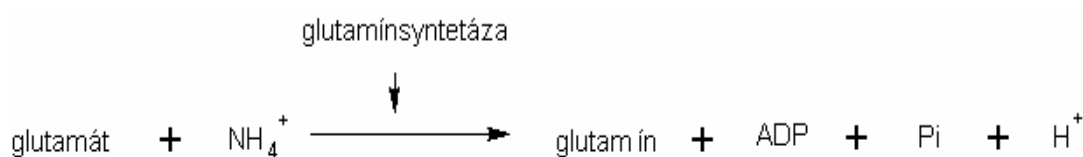
### 3.2.3 Selekčný marker fosfinitricín (PPT)

Fosfinitricín (synonymum: glufosinate) je herbicíd, s ktorým sa je možné stretnúť pod obchodným názvom Basta, Liberty a ďalšími. Vyrába sa biotechnologicky z mikroorganizmov *Streptomyces viridochromogenes* a *Streptomyces hygroscopicus*, tieto baktérie súčasne syntetizujú enzým fosfinitricin-N-acetyltransferázu (PAT), ktorý acetyluje voľnú NH<sub>2</sub>- skupinu PPT a tým ho inaktivuje. Gén, ktorý kóduje fosfinitricinacetyltransferázu, klonovaný z aktinomycéty *S. hygroscopicus* je v literatúre označovaný ako *bar* a gén z *S. viridochromogenes* ako *pat*. Oba sú zložené zo 183 aminokyselín a ich primárna štruktúra vykazuje značnú homológiu. Oba gény boli včlenené do vektorových plazmidov baktérie *A. tumefaciens* a sú už využívané v odrodách repky a kukurice, povolených napríklad aj

v USA alebo Kanade [16].

PPT spôsobuje blokáciu enzýmu glutamínsyntetázy. Enzým sa nevratne inaktivuje a tým dochádza k narušeniu metabolizmu dusíka, čo vedie k hromadeniu amoniaku v toxických koncentráciach. Nastáva blokácia fotosyntézy a rozpad chloroplastov, po niekoľkých dňoch rastliny zožltnú a odumrú [20].

DL-fosfinitricín ( $C_5H_{15}N_2O_4P$ , molekulová relatívna hmotnosť 198,2) je analóg glutamátu a vystupuje ako kompetitívny inhibítor glutamínsyntetázy. Tento enzým je zahrnutý v asimilačných pochodoch amoniaku a hrá kľúčovú rolu v asimilácii dusíka (viz obrázok 3.3) [21].



**Obr. 3.3:** *Reakcia metabolizmu amoniaku za účasti enzýmu glutamínsyntetázy. Priebeh tejto reakcie je blokovaný pôsobením fosfinitricínu a v dôsledku toho dochádza k hromadeniu amoniaku, ktoré má toxický efekt [21].*

Fosfinitricín je z chemického hľadiska toxická látka, ktorá je za čistého stavu stála, ale v pôde dochádza k jej rozkladu vplyvom mikroorganizmov. Táto látka je teplotne stabilná, preto je možné autoklavovať (sterilizovať) médium s jej prídavkom. Komerčný fosfinitricín je zmes D- a L- izomérov. L-izomér je v transgénnych rastlinách acetylovaný na acetyl-PPT, zatiaľčo D-PPT zostáva stály.

Dľa známych údajov sa používa koncentrácia PPT dvadsaťpäť maximálne päťdesiat miligramov PPT na liter média, pri prekročení tohto koncentračného stropu nastáva aj u transgénnych rastlín so správne začleneným génom *bar* odumieranie v dôsledku herbicídnych účinkov PPT.

V prípade, že rastlina je extrémne senzitívna na PPT za normálnych okolností (pred transgenózou), môže byť tento fakt kritickým bodom v aplikácii PPT v rámci transformačného procesu a aj napriek pozitívnemu priebehu transgenózy sa budú rastliny javiť ako netransgénne a odumierať, čím stráca PPT ako selekčný márker zmysel. Ďalším dôležitým faktorom pri používaní PPT ako selekčného márkera je zachovanie sterilného prostredia v Petriho miskách po kokultivácii, teda prostredie bez plesní a zvyšnej agrobakteriálnej mikroflóry. Nepriaznivým faktorom pri selekcii je aj príliš dlhá expozícia transformovaných explantátov na médiu s PPT, ktoré môže po dlhšej dobe začať negatívne účinkovať aj na rezistentné pletivá [16].

## 4 *SILENE VULGARIS*

*Silene vulgaris*, v minulosti synonymicky označovaná *Oberna behen*, teda silenka nadmutá, patrí do rodu *Silene*, čeľaď *Caryophyllaceae* (hvozdíkovité).

Rastlina dorastá do výšky tridsať až šesťdesiat centimetrov, pričom samotný koreň, ktorý je vetvený, môže mať až šesťdesiat centimetrov. Dolné listy má špicaté, skoro zasychajú. Stredné a horné listy majú eliptický zašpicatený tvar, dĺžka sa pohybuje medzi tromi až dvanástimi centimetrami, šírka obvykle nepresahuje dva centimetre. Plocha čepelí listov je hladká. Kvetenstvo vytvára vidlice, väčšinou viackveté. Kvety môžu byť obojpohlavné alebo jednopohlavné. Kalich je päťzubý, v obryse vajcovitý až široko eliptický. Korunné lístky majú bielu farbu, výnimočne na okraji nafialovelú. Semená majú obličkovitý tvar, dĺžka sa pohybuje okolo jedného milimetra. Rastlina sa vyskytuje na kamenitých miestach, skalnatých svahoch, okrajoch ciest, často je súčasťou trávinatej vegetácie od nížinných oblastí až po horské polohy. Na celom území Čiech rastie od najnižších polôh až do alpínskeho stupňa [22].

Rod *Silene* je unikátny tým, že väčšina zástupcov je diploidná a majú zhodný počet chromozómov, a to dve sady s celkovým počtom dvadsaťštyri. Výnimkou je *Silene conica* s dvoma sadami chromozómov s celkovým počtom dvadsať a približne desať percent cudzokrajných (Škandinávia) sileniek sú polyploidné.

Reprodukčný systém tohto rodu je rozmanitý a zahŕňa jedincov od hermafroditov cez rôzne možné medzistupne (gynomonoeický, gynodioeický, andromonoeický a trioecický stupeň) až po dioecických zástupcov. Najvýznamnejší zástupci rodu *Silene* sú *S. latifolia*, hlavný predstaviteľ dioecických rastlín tohto druhu, a *S. vulgaris*, gynodioeický zástupca. Hlavným cieľom štúdie rodu *Silene* je determinácia pohlavia v gynodioecických a dioecických rastlinách, evolúcia pohlavných chromozómov na úrovni DNA sekvencie [23].

*Silene vulgaris* je gynodioeický druh, ktorý slúži ako modelový organizmus pre štúdium evolúcie cytoplazmatickej samčej sterility (štúdium dvojdomosti) a pre štúdium rezistencie voči ťažkým kovom [24].

*Silene vulgaris* sa prirodzene vyskytovala v Európe, ale bola prenesená i do severovýchodnej a centrálnej časti Severnej Ameriky po jej kolonizácii Európanmi, dobre sa tu aklimatizovala.

Porovnávajúcou analýzou recipročných krížení bolo dokázané, že minimálne dva, ale ešte pravdepodobnejšie tri, rozdielne gény nesú zodpovednosť za cytoplazmatickú samčiu sterilitu (cytoplasmatic male sterility, CMS). Populácie *S. vulgaris* sa veľmi líšia v zastúpení jedincov nesúcich samičie kvety a jedincov nesúcich obojpohlavné kvety, rozmedzie pre jedincov so samičími kvetmi je od nula až po sedemdesiatosem percent v populácii. Zachovanie samičích jedincov nesúcich gény pre CMS môže byť v dôsledku produkcie

vyššieho počtu semienok s lepšou kvalitou v porovnaní s hermafroditnými jedincami. Bolo tiež potvrdené, že v prirodzenej populácii s rednúcim výskytom hermafroditov klesá i relatívna produkcia semienok a ich vyklíčenie v prípade samičích jedincov. Pokles plodnosti sa vysvetľuje faktom, že samičie rastliny sú limitované poklesom peľových zrníčok. Pohlavná determinácia u *S. vulgaris* sa v poslednej dobe javí byť menej komplikovaná ako sa zdalo a takisto sa ustupuje od myšlienky striktnej maternálnej transmisie CMS faktorov, nakoľko bola preukázaná heteroplasmicita u *S. vulgaris*, teda prítomnosť koexistencie samičej i samčej mitochondriálnej DNA v jednom jedincovi. U jedincov v jednej populácii je jej výskyt až dvadsaťšesť percent vzhľadom na celkový počet jedincov [23].



## 5 NICOTIANA TABACUM

*Nicotiana tabacum*, tabák virginský, patrí do rodu *Nicotiana*, ktorý zahŕňa šesťdesiatpäť druhov rastúcich v Amerike, Austrálii a Tichomorí. Do Európy bola táto bylina dovezená v šestnástom storočí. Ide o jednoročnú, v trópoch aj o viacročnú, chlpatú bylinu vysokú osemdesiat až tristo centimetrov. Lodyha je priama, málo vetvená, na báze drevnatejúca. Listy sú prisadlé, až šesťdesiat centimetrov dlhé, vajcovitého tvaru. Koruna je nálevkovitá, kvety sú v koncových kvetenstvách, korunný len je päťcípý, často ružový alebo červený. Rastlina kvitne od júna do septembra [22].

*N. tabacum* je prirodzený amfidiploid. Konkrétne sa jedná o alotetraploida, ktorý vznikol hybridizáciou *Nicotiana sylvestris* (samičí rodič,  $n = 12$ ) a *Nicotiana tomentosiformis* (samčí rodič,  $n = 12$ ) nasledovanou zdvojením počtu chromozómov ( $2n = 48$ ).

Rod *Nicotiana*, čeľaď *Solanaceae*, prirodzene sa vyskytujúci v Bolívii, ale rozšírený do celého sveta, je síce malý čo do rozmanitosti počtu jedincov, ale veľmi dobre charakterizovaný. Rod *Nicotiana* je najviac študovanou skupinou rastlín, čiastočne z hľadiska jeho evolúcie, ďalšie štúdie sa zaoberajú morfológiou a distribúciou druhov, a je dôležité aj využitie jeho zástupcov v genetike ako modelových organizmov [25].

### 5.1 Horizontálny génový prenos, *Ngrol* gény

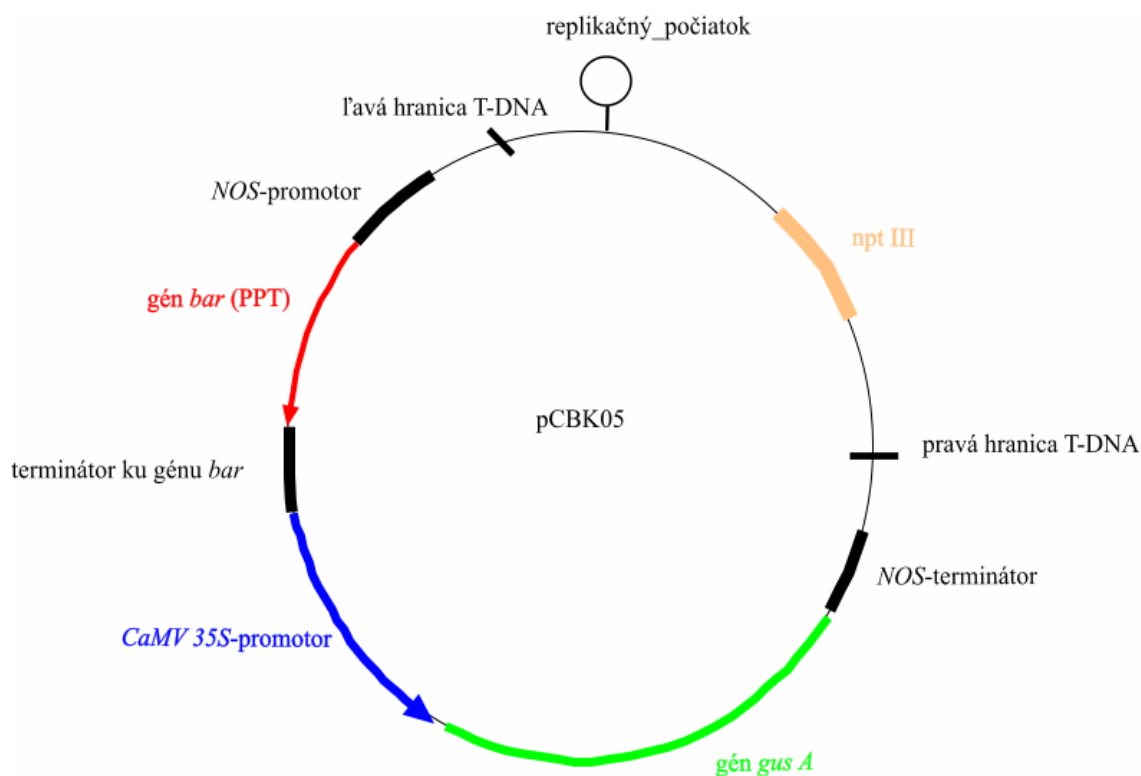
*Ngrol* gény (*NgrolB*, *NgrolC*, *NgORF13* a *NgORF14*), ktoré sú podobné sekvenciou s génmi v ľavej časti transferovanej  $T_L$ -DNA *A. rhizogenes*, boli nájdené v genóme netransformovanej rastliny *Nicotiana glauca*. Následne bolo potvrdené, že bakteriálna infekcia vyústila v transformáciu *Ngrol* génov počas ranej evolúcie rodu *Nicotiana*. Teda v *N. glauca* sa vyskytujú štyri *rol* gény korešpondujúce s  $T_L$ -DNA, ktoré vyvolávajú syndróm hairy root v rastlinách, ale u rastlín transformovaných *Ngrol* génmi nedochádza k tomuto typickému fenotypovému prejavu. Jedná sa o horizontálny génový prenos. V prípade *N. tabacum* bol zatiaľ potvrdený prirodzený výskyt génov *rolC*, *ORF13*, *ORF14*, dľa dostupných štúdií k expresii dochádza len u génu *ORF13*, v listoch aj v kalusoch [26].

## 6 METODIKA

### 6.1 Experimentálny materiál

Na transformačné pokusy boli použité rastliny *Silene vulgaris*, ktoré boli vypestované v *in vitro* podmienkach zo sterilných semienok, ktoré boli získané z rastlín z okolia Tišnova a Brna. Rastliny *Nicotiana tabacum* boli takisto získané zo sterilných semienok pestovaných v *in vitro* kultúre.

Na transformáciu boli použité baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV310, s plazmidom pCBK05 (viz obrázok 6.1). Tento kmeň je rezistentný voči kanamycínu (binárny plazmid) a gentamicínu (pomocný plazmid). Binárny plazmid je pôvodom z *E. coli* a má včlenenú T-DNA, ktorá neobsahuje onkogény. Pomocným plazmidom sa nazýva plazmid, ktorý nesie *vir* gény, ktoré sú súčasťou transportného systému T-DNA, ale ich prítomnosť v samotnej T-DNA nie je nutná [2].



**Obr. 6.1:** Binárny plazmid pCBK05, ktorý je súčasťou *A. tumefaciens* používaného na transformáciu *S. vulgaris* a *N. tabacum* (gén *npt III* je bakteriálnym génom pre rezistenciu voči kanamycínu, gén *BAR*, ktorý kóduje enzým fosfinotricinacetyltransferázu, je súčasťou selekčného systému rezistencie voči fosfinotricínu a gén *gusA* je súčasťou reportérového systému  $\beta$ -glukuronidázy) [2], [27].

Druhou baktériou slúžiacou na transformačné pochody bolo *A. rhizogenes*, prirodzene sa vyskytujúci geneticky nemodifikovaný typ, kmeň *ARIIS4*.

## 6.2 Živné média

Sterilizované semienka *S. vulgaris* a *N. tabacum* sa pestovali na sterilnom živnom médiu s označením BMS-30 (viz tabuľka 6.1), ktoré obsahuje špecifické makroelementy a mikroelementy (viz tabuľky 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7), listové explantáty boli opäť kultivované na tomto médiu, dľa potreby a použitia boli pridávané k médiu BMS-30 iné chemikálie v príslušnej koncentrácii, napríklad rastové faktory, PPT, antibiotiká a iné.

*A. tumefaciens* bolo kultivované pri teplote pohybujúcej sa okolo 25 °C, nepresahujúcej však 26 °C, na médiu Luria-Bertani (viz tabuľka 6.8), na potlačenie nežiadúcej mikroflóry sa pridáva antibiotikum kanamycín a gentamicín, voči ktorému sú baktérie so správne funkčným plazmidom rezistentné.

*A. rhizogenes* bolo kultivované na médiu špeciálne určenom na jeho kultiváciu (viz tabuľka 6.9), na potlačenie nežiadúcej mikroflóry sa používa rifampicín v koncentrácii 50 mg na liter živného média.

Na kultiváciu hairy root kultúr sa používa médium označené MJV (viz tabuľka 6.10), ktoré obsahuje niektoré zložky zhodné s médiom BMS-30 (viz tabuľky 6.2 – 6.6).

**Tab. 6.1:** Živné médium BMS-30

| BMS-30             |              |
|--------------------|--------------|
| zložky:            | koncentrácia |
| makroelementov B5  | 100,0 ml/l   |
| mikroelementy MS-B | 10,0 ml/l    |
| mikroelementy MS-C | 1,0 ml/l     |
| železo MS          | 2,5 ml/l     |
| vitamíny MOREL     | 2,0 ml/l     |
| inositol           | 2,0 ml/l     |
| sacharóza          | 30,0 g/l     |
| agaróza            | 7,0 g/l      |
| pH                 | 5,6 - 5,8    |

**Tab. 6.2:** Makroelementy B5, súčasť živného média BMS-30 a MJV

| Makroelementy B5                       |              |
|--|--------------|
| zložky:                                | koncentrácia |
| síran amonný                           | 1,34 g/l     |
| dihydrát chloridu vápenatého           | 1,50 g/l     |
| síran horečnatý                        | 2,50 g/l     |
| dusičnan draselný                      | 25,00 g/l    |
| monohydrát dihydrofosforečnanu sodného | 1,50 g/l     |
| celkový objem                          | 1 l          |

**Tab. 6.3:** Mikroelementy MS-B, súčasť živného média BMS-30 a MJV

| Mikroelementy MS-B |              |
|--------------------|--------------|
| zložky:            | koncentrácia |
| kyselina boritá    | 124 mg       |
| síran manganatý    | 446 mg       |
| síran zinočnatý    | 172 mg       |
| celkový objem      | 200 ml       |

**Tab. 6.4:** Mikroelementy MS-C, súčasť živného média BMS-30 a MJV

| Mikroelementy MS-C |              |
|--------------------|--------------|
| zložky:            | koncentrácia |
| jodid draselný     | 166 mg       |
| molybdenan sodný   | 50 mg        |
| síran meďnatý      | 5 mg         |
| chlorid kobaltnatý | 5 mg         |
| celkový objem      | 200 ml       |

**Tab. 6.5:** Vitamíny MOREL, súčasť živného média BMS-30 a MJV

| Vitamíny MOREL         |              |
|------------------------|--------------|
| zložky:                | koncentrácia |
| inozitol               | 2 500 mg     |
| Ca-pantotenát          | 25 mg        |
| biotin                 | 0,25 mg      |
| kyselina nikotínová    | 25 mg        |
| pyridoxin-hydrochlorid | 25 mg        |
| thiamin-hydrochlorid   | 25 mg        |
| celkový objem          | 50 ml        |

**Tab. 6.6:** Zásobný roztok železa MS, súčasť živného média BMS-30 a MJV

| Zásobný roztok železa MS   |              |
|--|--------------|
| zložky:  | koncentrácia |
| chelaton III ( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) | 7,45 g       |
| heptahydrát síranu železnatého                                   | 2,80 g       |
| celkový objem  | 500 ml       |

**Tab. 6.7:** Zásobný roztok inozitolu MS, súčasť živného média BMS-30

| Zásobný roztok inozitolu MS |              |
|-----------------------------|--------------|
| zložky:                     | koncentrácia |
| inozitol                    | 1 000 mg     |
| celkový objem               | 200 ml       |

**Tab. 6.8:** Médium na kultiváciu *A. tumefaciens*, Luria-Bertani.

| Bakteriálne médium Luria - Bertani (LB) |              |
|---|--------------|
| zložky:                                 | koncentrácia |
| bakteriálny tryptón                     | 10,0 g/l     |
| bakteriálno-kefálný extrakt             | 5,0 g/l      |
| chlorid sodný                           | 10,0 g/l     |
| agar                                    | 15,0 g/l     |
| pH                                      | 7            |

**Tab. 6.9:** *Médium na kultiváciu A. rhizogenes*

| Medium pre kultiváciu <i>A. rhizogenes</i> |              |
|--|--------------|
| zložky:                                    | koncentrácia |
| extrakt z kvasiniek                        | 5,0 g/l      |
| hydrolyzát kazeínu                         | 0,5 g/l      |
| manitol                                    | 8,0 g/l      |
| síran amonný                               | 2,0 g/l      |
| chlorid sodný                              | 5,0 g/l      |
| agar                                       | 15,0 g/l     |
| pH   | 6,6          |

**Tab. 6. 10:** *Médium na kultiváciu hairy root kultúr*

| MJV                |              |
|--------------------|--------------|
| zložky:            | koncentrácia |
| makroelementy B5   | 75,0 ml/l    |
| mikroelementy MS-B | 10,0 ml/l    |
| mikroelementy MS-C | 1,0 ml/l     |
| vitamíny MOREL     | 2,0 ml/l     |
| železo MS          | 5,0 ml/l     |
| sacharóza          | 20,0 ml/l    |
| pH                 | 5,7          |

### 6.3 Sterilizácia semienok

Semienka určené na kultiváciu rastlín *in vitro* sa premývali približne hodinu pod prúdom studenej vody, následne boli prenesené do 7 % roztoku Sava s prídavkom jednej až dvoch kvapiek detergentu Triton X, v ktorom sa premývali 10 minút. Z roztoku Sava sa preniesli do 50 % roztoku etanolu, na dobu maximálne 30 sekúnd. Nasledoval preplach v sterilenej vode trvajúci 15 minút, bola použitá sterilná banka so zátkou umiestnená na trepačku, tento krok sa opakoval ešte raz. Semienka sa osušili na sterilnom filtračnom papieri a umiestnili na živné médium BMS-30 (približne 30 ml na 1 Petriho misku) v počte sedem až desať na misku. Po vyklíčení semienok sa mladé rastlinky individuálne prepasážujú do sterilných kultivačných nádob s živným médiom.

### 6.4 Kultivácia baktérií

Príslušné kmene baktérií boli dodané v eppendorfových skúmavkách zaliate pod parafínom. Bol vykonaný krížová rozster a baktérie sa dva dni nechali rásť na danom živnom

médiu s prídavkom antibiotík pri teplote okolo 25 °C. Misky s narastenými kolóniami boli uskladnené pri teplote 0 °C po dobu jedného mesiaca.

Z narastených kolónií bol urobený odpich do mraziaceho boxu s teplotou -70 °C, pričom sa použil 1 % roztok DMSO (dimetylsulfoxid), ktorý pôsobí jako výborný kryoprotektant. Týmto spôsobom je možné uchovávať baktérie po veľmi dlhú dobu. V prípade potreby sa opäť baktérie krížovým rozsterom aplikujú na živné médium s adekvátnymi antibiotikami, čím sa overí, či nedošlo k inaktivácii plazmidu [28].

## 6.5 Regenerácia *S. vulgaris* i *N. tabacum*

Regeneračné skúšky boli vykonané na živnom médiu BMS-30 s prídavkom cytokinínov a auxínov v rôznych pomeroch, vychádzalo sa z údajov dostupných v literárnych zdrojoch [29], [30], [31], [32]. Boli použité listové fragmenty zo sterilne pestovaných rastlín. Medzi testované rastové faktory patrila kyselina  $\alpha$ -naftalénoctová (NAA), benzylaminopurín (BAP), gibberelínová kyselina, tidiazuronid (TDZ), 3-indolmaslová kyselina. Po stanovení optimálnej koncentrácie rastových faktorov bola stanovovaná optimálna koncentrácia fosfinotricínu ako selekčného márkru. K médiu BMS-30 s rastovými faktormi boli pridané alikvótne množstvá PPT dľa stanoveného rozpätia koncentrácií.

Explantáty boli kultivované v sterilnom prostredí vo vzdialenosti cca 25 cm od priameho zdroja svetla pri teplote asi 28 °C. Pasáže pletivových kultúr boli vykonávané každé dva týždne. Do Petriho misiek bolo dávkovaných približne 25 ml média.

## 6.6 Transformácia

Z príslušného druhu *Agrobacteria* narasteneho na pevnom médiu v Petriho miskách sa preniesla kolónia do Erlenmayerovej banky pomocou mikrobiologickej kľučky a pridalo sa cca 30 ml tekutého LB média. Daná zmes sa kultivovala cez noc na trepačke pri 26 °C, rýchlosť miešania bola zhruba 150 otáčok za minútu.

Na druhý deň sa k roztoku baktérii pridali fragmenty listov narezané na obdĺžniky o veľkosti hrán približne dva centimetre. Listové fragmenty pochádzali zo sterilne pestovaných rastlín. Dostatočný nárast baktérií sa poznal dľa značného zakalenia inak číreho tekutého média. Zmes obsahujúca baktérie i listové fragmenty sa za mierneho miešania kokultivovala 15 minút.

Po kokultivácii sa listové fragmenty osušili na sterilnom filtračnom papieri a preniesli sa do misiek so živným médiom obsahujúcim acetosyringón. Na jednu Petriho misku sa kladlo približne 5 až 7 listových fragmentov. Pre transformáciu *A. tumefaciens* sa použilo médium BMS-30 s vhodnou koncentráciou rastových faktorov pre danú rastlinu a v prípade *A. rhizogenes* len samotné médium BMS-30, v oboch prípadoch sa pridával acetosyringón.

Zároveň sa robila negatívna kontrola, kedy sa listové fragmenty sterilných rastlín

dávali rovno na príslušné živné médium, vynechával sa krok kokultivácie, inak boli všetky podmienky zhodné.

Transformáty sa kultivovali dva dni, v prípade že baktérie neprerastali, tak i dlhšie. Nasledoval oplach explantátov. Bola použitá sterilná voda, sterilné laboratórne sklo i sterilné filtračné papiere.

Na filtračnom papieri osušené explantáty sa prenesú do banky s vodou a prídavkom jednej kvapky detergentu Tween 80. Za neustáleho premiešavania na trepačke sa explantáty premývali desať minút. Explantáty sa preniesli do čistej vody už bez prídavku detergentu a nasledovalo ďalšie premývanie po dobu desať minút za neustáleho premiešavania, tento krok sa opakoval dvakrát. Osušené explantáty sa uložili na misky s médiom obsahujúcim antibiotikum claforan (cefotaxim) v koncentrácii  $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ktoré pôsobí proti nežiaducej mikroflóre, ktorou je v tomto bode aj samotné *Agrobacterium*. V prípade prerastania explantátov baktériami sa explantáty znovu odmyli a aplikovala sa ďalšia dávka antibiotík do media. Pre explantáty kokultivované s *A. tumefaciens* sa po odmytí používalo živné médium BMS-30 s prídavkom rastových faktorov, pre explantáty kokultivované s *A. rhizogenes* médium MJV, v oboch prípadoch aj s antibiotikami. Antibiotikum sa zvyčajne aplikovalo aj do média použitého na prvú pasáž. Explantáty, ktoré javili známky regenerácie a médium už neobsahovalo nežiaducu mikroflóru, sa pasážujú do príslušného média bez antibiotík [31],[32],[33].

## 6.7 Izolácia DNA použitím kitu

Regeneranty, či už po transformácii alebo k nim príslušné negatívne kontroly, a kultúry hairy roots boli otestované na prítomnosť génov indikujúcich úspešnú transformáciu, jednou z metód na dôkaz úspešného začlenenia T-DNA bola aj PCR. Pred vykonaním polymerázovej reťazovej reakcie sa izolovala genomická DNA z rastlinného pletiva a kultúr hairy roots pomocou kitu s názvom DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN. Postupovalo sa dľa priloženého návodu. Izolovaná DNA v elučnom pufre mala koncentráciu pohybujúcu sa okolo  $150 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Koncentrácia vyizolovanej DNA bola zisťovaná porovnávaním koncentrácií s pripravenou koncentračnou radou plazmidu *pBR322*.

## 6.8 PCR

DNA vyizolovaná pomocou QIAGEN kitu sa použila na polymerázovú reťazovú reakciu. Bol použitý termocykler T 3000 od firmy Biometra. Pre všetky vykonané polymerázové reťazové reakcie sa dávkovalo zhodné množstvo zložiek. V prípade klasickej i nested PCR je objem jednotlivých zložiek určených na práve jednu reakciu v  $0,2 \text{ ml}$  Eppendorfových skúmavkách uvedený v tabuľke 6.11. [34].



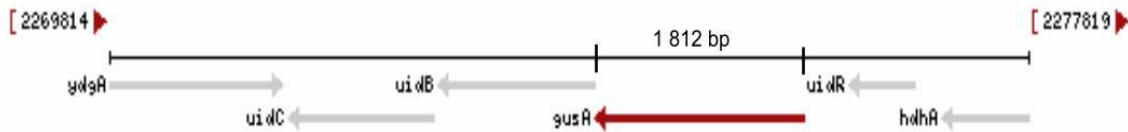
**Tab. 6.11:** Množstvá jednotlivých zložiek PCR reakcie s celkovým objemom 20  $\mu$ l

| klasická PCR          |                  | nested PCR                                     |                  |
|-----------------------|------------------|--|------------------|
| zložka                | objem ( $\mu$ l) | zložka   | objem ( $\mu$ l) |
| voda                  | 15,2             | voda   | 15,2             |
| 10x pufer             | 2                | 10x pufer                                      | 2                |
| dNTP (10nM)           | 0,4              | dNTP (10nM)                                    | 0,4              |
| primer F              | 0,8              | primer F                                       | 0,8              |
| primer R              | 0,8              | primer R                                       | 0,8              |
| polymeráza Taq        | 0,4              | polymeráza Taq                                 | 0,4              |
| eluát DNA po izolácii | 0,4              | roztok ampliconov získaný po prvej PCR reakcii | 0,1              |
| objem celkom          | 20               | objem celkom                                   | 20               |
| počet skúmaviek       | 1                | počet skúmaviek                                | 1                |

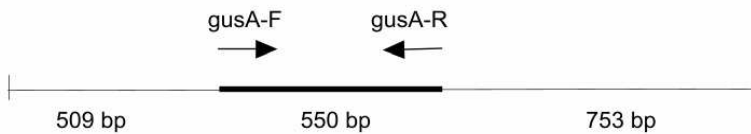
### 6.8.1 Návrh primerov pre *gusA* gén

Primery pre PCR, ktorej cieľom bolo naamplifikovať požadovanú sekvenciu obsiahnutú v géne pre tvorbu  $\beta$ -glukuronidázy, boli navrhnuté na základe známej sekvencie *gusA* génu prirodzene sa vyskytujúcom v *E. coli* (viz obrázok 6.2). Vychádzalo sa zo sekvencie, ktorá je verejne prístupná v databáze biotechnologických informácií NCBI (viz príloha) [35].

a.)



b.)



c.)

primer gusA forward (21 bp): GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA

primer gusA reverse (21 bp): CTG TGC GTC ACA GCC AAA AGC

5' → 3'

**Obr. 6.2:** Návrh primerov na amplifikáciu úseku génu *gusA* pochádzajúceho prirodzene z *E. coli*, gén je v danom prípade súčasťou reportérového systému pri prenose T-DNA z *A. tumefaciens* do hostiteľskej rastliny. Na návrh primerov bola použitá voľne dostupná sekvencia *gusA* génu z databázy NCBI: a.) náčrt pozície génu *gusA* v *E. coli* indikujúci dĺžku génu 1 812 párov báz, b.) náčrt oblasti v géne *gusA*, ktorá bude amplifikovaná po použití navrhnutých primerov, očakávaná dĺžka produktu je 550 párov báz, c.) sekvencie primerov v smere od 5' k 3' koncu, oba navrhnuté primery majú zhodnú dĺžku, teda 21 párov báz (primery sú farebne znázornené aj v prílohe týkajúcej sa zobrazenia celej sekvencie génu *gusA* z databázy NCBI) [35].

## 6.9 Elektroforéza

Na elektroforetickú separáciu naaplifikovaných fragmentov DNA sa použil 2% agarózový gel. Agaróza bola rozpúšťaná v jednopercentnom roztoku TAE, ktorý vznikne po päťdesiatnásobnom rozriedení zásobného roztoku TAE (viz tabuľka 6.12).

Elektroforetická separácia prebiehala pri 60 V asi 40 minút. Gel sa po elektroforéze na približne 10 minút ponoril do roztoku etídiumbromidu a umiestnil na trepačku s nastavenou veľmi nízkou rýchlosťou pohybu. Výsledok separácie fragmentov DNA bol zaznamenaný pomocou UV lampy spojenej s fotoaparátom od firmy Syngene In Genius.

**Tab. 6.12:** Zloženie zásobného roztoku TAE

| Zásobný roztok TAE    |          |
|-----------------------|----------|
| zložky                | množstvo |
| Tris                  | 242 g    |
| deionizovaná voda     | 750 ml   |
| čistá kyselina octová | 57,1ml   |
| 0,5 M EDTA, pH 8      | 100 ml   |
| celkový objem         | 1000 ml  |
| pH                    | 8,5      |

### 6.10 $\beta$ -glukuronidázový (GUS) test

Sto miligramov rastlinného materiálu bolo pinzetou prenesených do Eppendorfovej skúmavky (objem skúmavky 2 ml), bolo pridaného trochu purifikovaného morského piesku a 100  $\mu$ l GUS extrakčného pufru, ktorý sa uchováva pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (viz tabuľka 6.12). Sklenenou tyčinkou dobre zhomogenizovaný materiál bol odstredovaný po dobu desiatich minút v chlade ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pri otáčkach 20 000 za minútu. Pipetou bolo odobratých 40  $\mu$ l supernatantu, ten bol prenesený do novej Eppendorfovej skúmavky a pridaný zhodný objem MUG reakčného pufru, takisto uchovávaný pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (viz tabuľka 6.13). Zmes bola inkubovaná dve hodiny pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na konci inkubácie bolo pridaných 0,9 ml 0,2 M roztoku uhličitanu sodného (zásadité pH zaručí premenu všetkej fenolickej formy 4-MU na fenoxidovú formu 4-metylbelferónu, ktorá fluoreskuje), zmes bola dobre premiešaná a bola zistená fluorescencia vzorkov na UV-transiluminátore. Ako pozitívna kontrola, vzorka, ktorá za daných podmienok preukazuje fluorescenciu, bol použitý samotný 4-metylbelferón v práškovej forme, teda zlúčenina, ktorá je očakávaným produktom  $\beta$ -glukuronidázového testu [36].

**Tab. 6.12:** Zloženie GUS extrakčného pufru používaného v  $\beta$ -glukuronidázovej reakcii

| GUS extrakčný pufer (10 ml)          |            |
|--------------------------------------|------------|
| zložky:                              | množstvo   |
| 0,1M fosfátový pufer pH 7,0          | 5 ml       |
| 0,5M $\text{Na}_2\text{EDTA}$ pH 7-8 | 20 $\mu$ l |
| Triton X-100                         | 10 $\mu$ l |
| merkaptóetanol                       | 7 $\mu$ l  |
| sarkosyl                             | 10 mg      |
| celkový objem doplnený vodou         | 5 ml       |

**Tab. 6.13:** Zloženie MUG reakčného pufru používaného v  $\beta$ -glukuronidázovej reakcii

| MUG reakčný pufer (5 ml)                   |          |
|--|----------|
| zložky:                                    | množstvo |
| 4-metylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid | 3,5 mg   |
| GUS extrakčný pufer                        | 5 ml     |

## 6.11 Izolácia mitotických protoplastov z kultúry hairy roots

Východzí materiál kultúry hairy roots sa dvakrát v priebehu týždňa prepasáždžoval do tekutého živného média MJV (viz tabuľka 6.10), počas inkubácie v tekutom médiu bol umiestnený na trepačke (rýchlosť približne päťdesiat otáčok za minútu) a mikroskopicky bola overovaná kvalita koreňových špičiek. Synchronizácia bola započatá dva dni po poslednej pasáži.

Boli odrezané staršie korene, kalusy a odstránené i zbytky agaru. Mladšie korene s meristémami sa čiastočne osušili a synchronizovali pomocou aphidicolinu (dodavaný firmou Sigma), tak aby jeho finálna koncentrácia v MJV médiu bola 30  $\mu$ mol/l. Synchronizácia trvala dvanásť hodín za neustáleho trepania na trepačke. Následne bolo médium s aphidicolinom odstránené, v intervale 15 minút boli korene trikrát premyté živným médiom MJV. Ďalším krokom bola inkubácia v živnom médiu MJV štyri hodiny za pretrvávajúceho trepania.

Nasledoval krok nazývaný akumulácia metafáz. Bol aplikovaný roztok oryzalínu, tak aby jeho finálna koncentrácia v živnom médiu bola 15  $\mu$ mol/l. Znovu sa vzorky inkubovali štyri hodiny za neustáleho trepania.

Médium bolo odsaté pomocou vodnej vývevy a bol pridaný enzymatický roztok, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 6.14 a 6.15. Na jednu Petriho misku sa pipetovalo zhruba osem mililitrov tohto enzymatického roztoku. Pomocou olejovej vývevy sa vykonala infiltrácia enzýmov do koreňov vo vákuu, zmes bola inkubovaná približne dve hodiny pri teplote 26 °C za neustáleho mierneho trepania. Inverzným mikroskopom sa kontrolovalo uvoľňovanie meristémov a protoplastov z koreňových explantátov. Hneď po detekcii počiatku uvoľňovania sa meristémov v jednotlivé protoplasty sa pridalo 5 ml 25% roztoku solí s označením W5 (viz tabuľka 6.15) do Petriho misky obsahujúcej korene c enzymatickom roztoku, zmes sa jemne zamiešala a precedila cez sitko (veľkosť ôk asi 100  $\mu$ m).

Suspenzia protoplastov sa preliala do kónických skúmaviek a zcentrifugovala (desať minút pri rýchlosti 800 otáčok za minútu). Protoplasty vytvorili viditeľný sediment, supernatant bol odstránený Pasteurovou pipetou. Sediment bol resuspendovaný v zbytku tekutiny a bolo pridaných zhruba 6 ml 25% roztoku solí W5, tak aby výsledný objem bol osem mililitrov, zmes bola premiešaná. Následne sa pridali štyri mililitre vody, zmes sa premiešala a nechala stáť desať minút, čo spôsobilo hypotonický šok.

Opäť nasledovalo sedimentovanie. Protoplasty sa usádzali pomocou odstredovania

(10 minút pri rýchlosti 800 otáčok za minútu). Supernatant sa odstránil a protoplasty sa resuspendovali v zvyšku tekutiny v skúmavke. Bolo pridaných desať mililitrov čerstvého predchladeného fixačného roztoku, ktorý pozostáva z troch objemov etanolu denaturovaného metanolom a z jedného objemu ľadovej kyseliny octovej. Zmes sa viackrát jemne premiešala a ponechala v mrazničke pri -20 °C minimálne hodinu, ale pokojne i niekoľko mesiacov.

Po odstránení väčšej časti fixačnej zmesi odstredovaním (20 minút pri rýchlosti 1 000 otáčok za minútu) sa protoplasty resuspendovali v zvyšku fixáže a po 15 minútach bolo možné suspenziu kvapkať na podložné sklíčka [37].

Takýmto spôsobom sa pripravili preparáty na karyologické štúdie, in situ hybridizáciu, in situ nick trasláciu a iné.

**Tab. 6.14:** Zloženie enzymatického roztoku používaného pri izolácii mitotických protoplastov z kultúr hairy root na uvoľňovanie meristémov a ich rozvoľňovanie na jednotlivé protoplasty

| Enzymatický roztok           |           |
|------------------------------|-----------|
| zložky:                      | množstvo  |
| W5 soli                      | 80 ml     |
| D-sorbitol                   | 1,8 g     |
| celuláza Onozuka RS          | 4,0 g     |
| macerozym R-10               | 2,0 g     |
| hemiceluláza Sigma           | 2,0 g     |
| pektolyáza Y-23              | 0,8 g     |
| pH                           | 5,0 - 5,2 |
| celkový objem doplnený vodou | 200 ml    |

**Tab. 6.15:** Zloženie zásobného roztoku solí W5. Tento roztok je súčasťou enzymatického roztoku, ale 25% roztok solí W5 sa používa i samostatne v jednotlivých krokoch izolácie mitotických protoplastov (25% roztok solí W5 získame po nariadení zásobného roztoku vodou v pomere 1:3, teda jeden objem zásobného roztoku W5 solí k trom objemom vody)

| Zásobný roztok solí W5       |          |
|------------------------------|----------|
| zložky:                      | množstvo |
| chlorid sodný                | 9,00 g   |
| chlorid vápenatý bezvodý     | 13,87 g  |
| chlorid draselný             | 0,37 g   |
| glukóza                      | 0,90 g   |
| celkový objem doplnený vodou | 1,00 l   |
| pH                           | 5,8      |

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Regenerácia z listových fragmentov

Bolo testovaných niekoľko rastových faktorov pre *S. vulgaris*, najvhodnejšou kombináciou je kombinácia syntetického cytokinínu benzylaminopurínu (BAP), podporujúceho rast výhonkov, so syntetickým auxínom  $\alpha$ -naftalénoctovou kyselinou (NAA), ktorý podporuje rast koreňového systému. Okrem týchto rastových faktorov boli použité i kombinácie auxínov indol-3-maslová kyseliny (IBA), ktorá má prírodný charakter, a kyseliny 2,4-dichlórfenoxyoctovej (2,4-D), ktorá je predstaviteľom syntetického auxínu, so syntetickým cytokinínom tidiazuronom (TDZ). Bola otestovaná aj prítomnosť giberelínu GA<sub>3</sub> v živnom médiu na podporu regenerácie. Výsledky a priebeh regenerácie z listových fragmentov pri rôznych kombináciách rastových faktorov je v tabuľke 7.1.

Optimálna koncentrácia rastových faktorov pre regeneráciu z listových fragmentov u *S. vulgaris* bola stanovená na 3 mg BAP na liter živného média a 0,5 mg NAA na liter média, pre *N. tabacum* je to koncentrácia 1 mg/l BAA a 0,1 mg/l NAA, ktorá je bežne uvádzaná v literárnych zdrojoch (viz obrázky 7.1, 7.2, 7.3 a 7.4).



**Obr. 7.1:** Regenerácia *S. vulgaris* z listového fragmentu na médiu BMS-30 s prídavkom 3 mg/l BAP a 0,5 mg/l NAA. Snímka je zhotovená z obdobia po 7 týždňoch od prvého polozenia listového fragmentu na živné médium s rastovými faktormi.

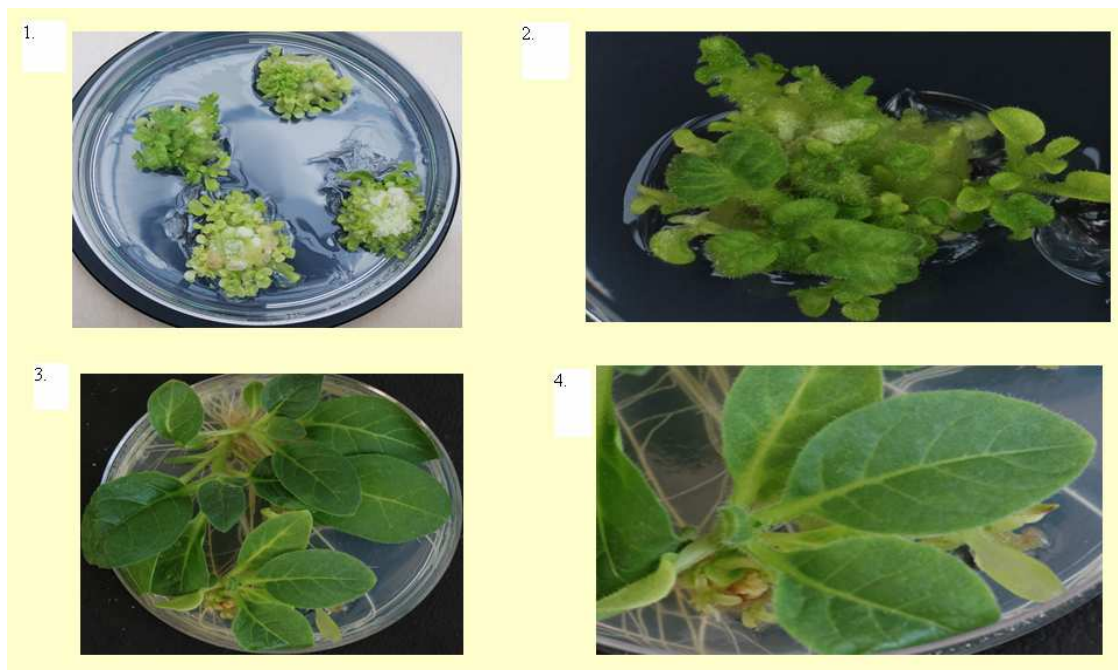


**Obr. 7.2:** Regenerácia *S. vulgaris* z listového fragmentu na médiu BMS-30 s prídavkom 3 mg/l BAP a 0,5 mg/l NAA. Snímka je zhotovená z obdobia po 9 týždňoch od prvého polozenia listového fragmentu na živné médium s rastovými faktormi, na margách listového kalusu sú už jasne viditeľné prvé výhonky z kalusu naznačujúce vývoj regenerantu.



**Obr. 7.3:** Regenerácia *S. vulgaris* z kalusu na médiu BMS-30 s prídavkom 3 mg/l BAP a 0,5 mg/l NAA. Snímka je zhotovená z obdobia po 12 týždňoch od prvého polozenia listového fragmentu na živné médium s rastovými faktormi, je možné pozorovať vznik prvých lístkov regenerantu pestovaného v *in vitro* kultúre.





**Obr. 7.4:** Časový sled regenerácie *N. tabacum* z listového fragmentu na médiu BMS-30 s prídavkom 1 mg/l BAP a 0,1 mg/l NAA (1. snímka je zhotovená z obdobia po 3 týždňoch, 2. snímka po 4 týždňoch, 3. a 4. snímka po 5 týždňoch od prvého polozenia listových fragmentov na živné médium s rastovým faktormi)



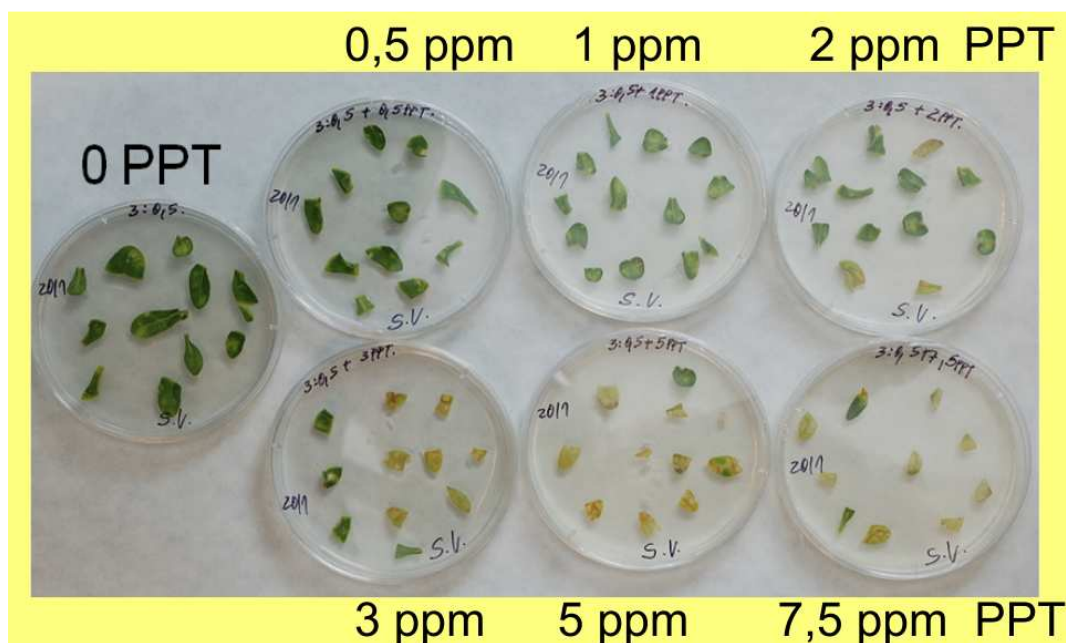
**Tab. 7.1:** Priebeh regenerácie *S. vulgaris* z listových fragmentov na živnom médiu BMS-30 s prídavkom rôznych rastových faktorov.

| koncentrácia rastových faktorov (mg/l) |      |       |      |      |                 | vzhľad listových fragmentov, priebeh regenerácie, vzhľad kalusov |                          |                                      |                         |
|--|------|-------|------|------|-----------------|--|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| NAA                                    | IBA  | 2,4-D | TDZ  | BAP  | GA <sub>3</sub> | 1. týždeň (list. fragmenty)                                      | 3. týždeň                | 6. týždeň                            | 8. týždeň               |
| 0,50                                   |      |       |      | 2,00 |                 | zelené, krehké   | bledozelený kalus        | rast pakoreňov                       | bez zmeny               |
| 0,50                                   |      |       |      | 4,00 |                 | zelené, krehké   | začiatok kalogenézy      | hnedozelený krehký kalus             | bez zmeny               |
| 0,50                                   |      |       |      | 3,00 |                 | zelené, pevné  | začiatok kalogenézy      | zelený kalus                         | prvé zelené púčiky      |
| 0,10                                   |      |       |      | 3,00 |                 | zelené, pevné  | začiatok kalogenézy      | svetlozelený kalus                   | zelený kalus            |
| 1,00                                   |      |       |      | 3,00 |                 | svetlozelené, krehké   | žltý krehký kalus        | nadmerný rast pakoreňov              | bez zmeny               |
| 3,00                                   |      |       |      | 1,00 |                 | žlté, sypké  | žltý rôsolovitý kalus    | svetlý kalus s pakoreňmi             | bez zmeny               |
| 0,05                                   | 0,05 |       |      | 3,00 | 0,05            | zelené, pevné  | zelený pevný kalus       | tmavozelený pevný kalus              | zeleno-červený kalus    |
|  |      | 0,50  |      | 4,00 |                 | žlté, sypké  | biely kalus              | biely kalus                          | biely veľmi sypký kalus |
|  | 0,50 |       | 0,20 |      |                 | zelené, pevné  | začiatok kalogenézy      | zelený kalus, list. fragment červený | zeleno-červený kalus    |
| 0,50                                   |      |       | 1,50 |      |                 | červeno-zelené   | svetlé kalusy na margách | svetlý kalus, list. fragment hnedý   | bez zmeny               |

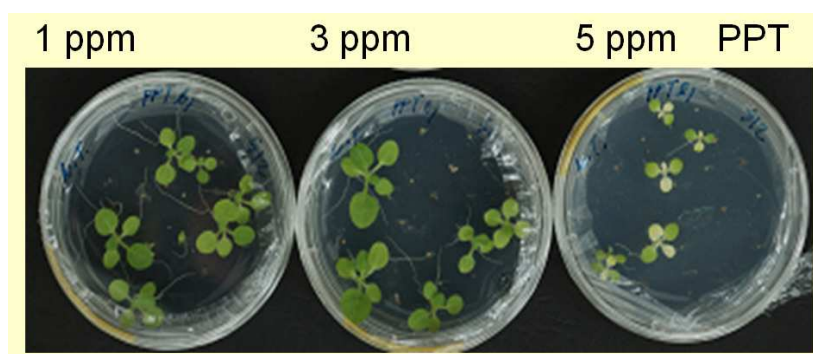
## 7.2 Fosfinotricínové skúšky

Bola zhotovená koncentračná rada prídavkom fosfinotricínu do živného média s optimálnymi koncentraciami rastových faktorov pre daný explantát, rozmedzie PPT bolo od nula do dvadsiatich miligramov na liter. Pre *S. vulgaris* bola stanovená optimálna koncentrácia na 3 mg/l PPT a pre *N. tabacum* 5 mg/l PPT, pri tejto koncentrácii dochádza k viac ako polovičnému uhýnu netransformovaných explantátov, to znamená, že listové fragmenty postupne zožltli, následne boli temer priehľadné a zoschlé (viz obrázok 7.5 a 7.6).

Boli testované listové fragmenty i semenka, ktoré sa po vysterilizovaní umiestnili na médium s PPT a pozorovalo sa ich rast, respektívne klíčenie. Vyklíčené semenka menili zafarbenie lístkov od zelenej po svetložltú v závislosti od koncentrácie PPT v médiu. Výsledky oboch testov boli zhodné.



**Obr. 7.5:** Petriho misky s listovými fragmentmi netrasformovanej *S. vulgaris* po piatich dňoch pôsobenia PPT, in vitro kultúry, živné médium s prídavkom rastových faktorov 3 mg/l BAP a 0,5 mg/l NAA. S rastúcou koncentráciou PPT v médiu očividne nastáva vo väčšom rozsahu i rozklad chloroplastov, žltnutie listov, vysychanie a rozpad pletiva. Ako limitná koncentrácia pôsobenia PPT vhodná pre selekciu bola zvolená koncentrácia 3 mg/l.



**Obr. 7.6:** Petriho misky s aseptickými semenkami *N. tabacum* pestované v in vitro podmienkach po siedmich dňoch pôsobenia PPT od vyklíčenia. Ako limitná koncentrácia je v tomto prípade stanovená koncentrácia PPT 5 mg/l, kedy zjavne dochádza k žltnutiu lístkov v zhruba 50% rozsahu.

### 7.3 Transformácia sprostredkovaná *A. tumefaciens*

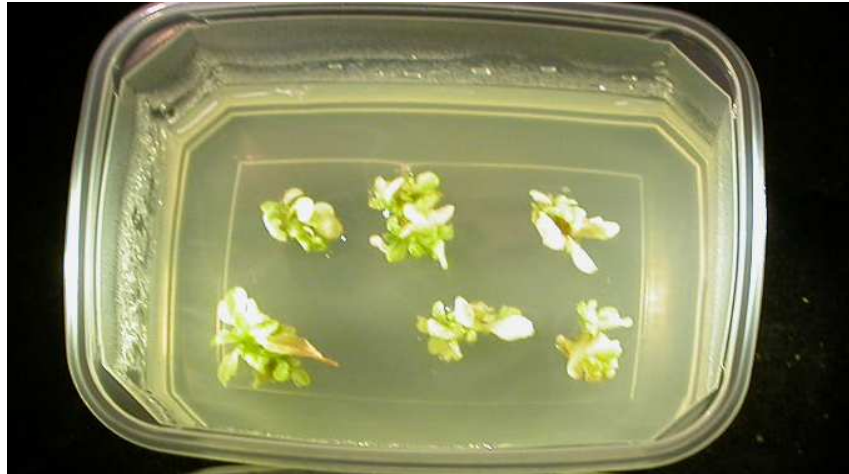
V prípade tabaku prebehla transformácia pomocou *A. tumefaciens*, kmeň *GV3101*, úspešne a boli získané transgénne regeneranty *N. tabacum* pestované na živnom médiu s prídavkom rastových faktorov. V prípade silenky došlo po transformácii ku kalogenéze, ale nenastala regenerácia ani po dobe dlhšej ako tri mesiace. Selekčný márkér fosfinotricín bol nasadený spolu s antibiotikom cefotaximom hneď po ukončení transformačných pochodov na dobu desiatich dní, došlo k úhynu nežiadúcej mikroflóry (hlavne pozostatky agrobaktéria po odmyvaní, ktoré je súčasťou posledného kroku transformácie) a značná časť listových regenerantov postupne podľahla rozkladu chloroplastov, fragmenty vybledli a uschli.

Tvorba kalusov z listových fragmentov tabaku nastala zhruba po troch týždňoch a bola nasledovaná okamžitou regeneráciou, po piatich týždňoch od transformácie boli regeneranty už schopné prenosu do samostatných misiek s živným médiom bez rastových faktorov. Z jedného listového fragmentu sa tvorilo i desať regenerujúcich rastlín. Vzhľadom na rapidnú regeneračnú schopnosť tabaku, bolo opakované vystavenie zregenerovaných rastlín pôsobeniu PPT. Fosfinotricín bol nasadený do živného média po prenose regenerantu do samostatnej nádoby. Časti regenerantov tabaku po tomto procese dodatočne zožltli listy a rastlina prestala rásť (viz obrázok 7.7). Rastliny tabaku, ktoré opakovanému vystaveniu pôsobenia PPT odolali a ich rast nebol zastavený boli všetky transgénne, ako ukazoval fyzický dôkaz pomocou PCR.

Tvorba kalusu z listových fragmentov silenky začala po dvoch týždňoch, kalusy mali často žltú farbu a rôsolovitý charakter, postupne nadobúdali zelenú farbu, ale pravdepodobne vplyvom zvýšenej stresovej záťaže dochádzalo i k tvorbe červených farbív a rýchlejšieho starnutia explantátov. Kalusy boli najkrajšie, to jest pomerne hutné a zelené, zhruba po desiatich týždňoch od kokultivácie, ale s pribúdajúcim časom sa v niektorých prípadoch hlavne v spodnej časti začínali tvoriť zhľuky bieleho nediferencovaného pletiva, ktoré pozvoľna nadobúdalo až hnedú farbu, tento jav neovplyvnila, respektívne nezvrátila, ani mierna zmena zloženia média, napríklad zníženie koncentrácie auxínu NAA z 0,5 mg/l na 0,1 mg/l. U niekoľkých explantátov sa po zhruba desiatich týždňoch dal pozorovať vznik veľmi malých výhonkov, ktoré ale následne boli prerastené nediferencovaným pletivom. Kalusy predstavujúce negatívnu kontrolu, teda tie ktoré neprešli transformačným procesom, a boli pestované na živnom médiu s prídavkom rastových faktorov a PPT s limitnou koncentráciou určenou na selekciu, nápadne rýchlo podľahli vplyvu PPT, úplne zhnedli a pod sebemenším tlakom pinzety na ne dochádzalo k ich rozpadu respektívne rozdroleniu, mali veľmi krehkú vodnatú konzistenciu (viz obrázok 7.8).

Dôkaz prenosu genetickej informácie z T-DNA do hostiteľa bol vykonaný fyzicky pomocou PCR s použitím primerov pre gén *GUS* prítomný v T-DNA *A. tumefaciens* (viz obrázok 7.9), bola použitá metóda klasickej PCR, do reakčnej zmesi bolo pridaných 60 ng DNA vyizolovanej z príslušných rastlín. Podmienky boli nasledovné: 95 °C po dobu troch minút, nasledovalo 33 cyklov s tromi opakujúcimi sa krokmi, prvý krok pozostával z teploty 94 °C pôsobiacej 30 sekúnd, ďalej nasadenie primerov pri teplote 55 °C po dobu 30 sekúnd a predlžovanie požadovanej sekvencie pri teplote 72 °C po dobu 45 sekúnd, reakcia bola ukončená pôsobením teploty 72 °C po dobu šiestich minút. Očakávaný produkt mal mať

dĺžku 587 párov báz. Prítomnosť génu v regenerantoch tabaku pestovaných na živnom médiu s prídavkom PPT bola dokázaná, gén sa nevyskytoval v netransformovanej rastline. Výsledky fyzického testovania prítomnosti génu pre tvorbu  $\beta$ -glukuronidázy boli potvrdené aj histochemickou skúškou zameranou na dôkaz prítomnosti  $\beta$ -glukuronidázy (viz obrázok 7.10).

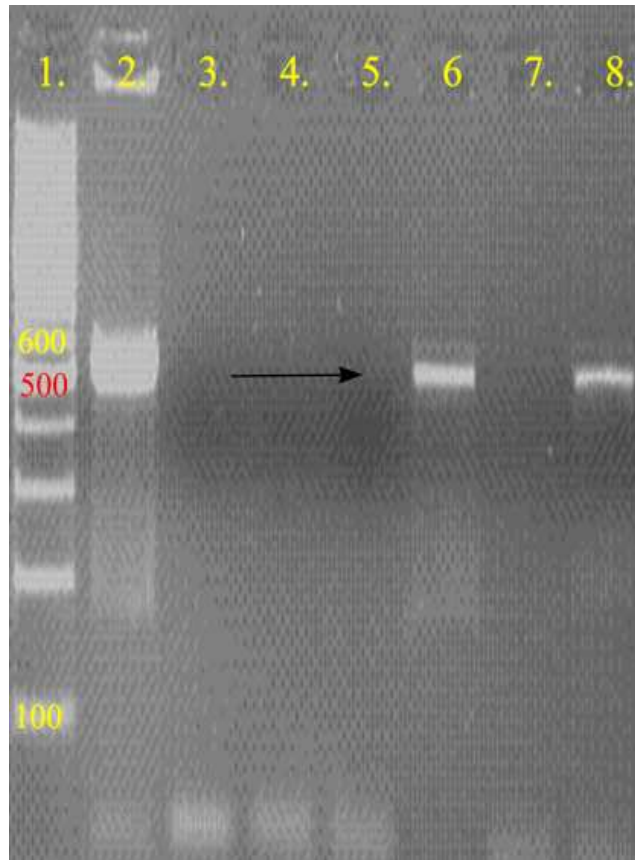


**Obr. 7.7:** Vzhľadom na veľmi vysokú regeneračnú schopnosť tabaku, aj napriek jeho vystaveniu stresovým faktorom, bola s odstupom času znovu zopakovaná selekcia na živnom médiu s prídavkom PPT (5 mg/l). Niektorým rastlinám aj napriek transformácii dodatočne zožltli listy, ale táto druhá selekcia umožnila zisk skutočne transgénnych rastlín a všetky takto selektované rastliny boli po kontrole pomocou PCR transgénne.



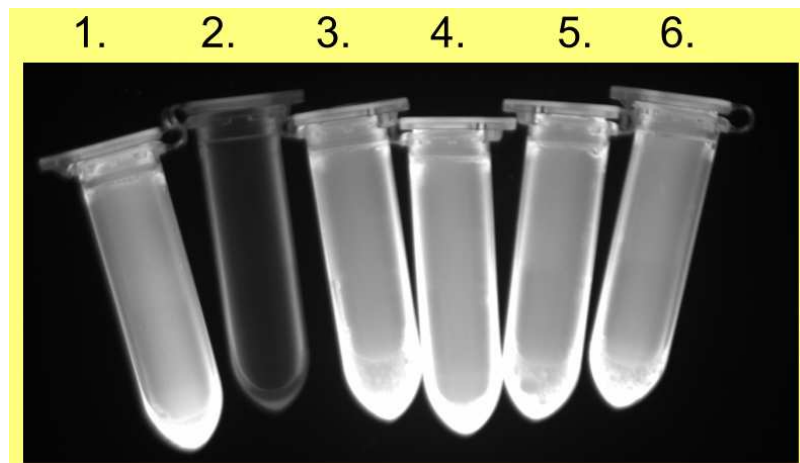
**Obr. 7.8:** Kalusy silenky pestované na živnom médiu s prídavkom rastových faktorov (3 mg/l BAP a 0,5 mg/l NAA). Snímka je zhotovená z obdobia zhruba siedmeho týždňa od ukončenia transformácie, pričom prvých desať dní bol v živnom médiu prítomný aj PPT (selekčný márker) a cefotaxim (antibiotikum odstraňujúce nežiadúcu mikroflóru). Vľavo (detailnejší pohľad) a v strede sú kalusy vytvorené z listových fragmentov, ktoré prešli transformačným pochodom (zelené, hutné) a vpravo sú kalusy, ktoré slúžia ako negatívna kontrola, teda bez pôsobenia *A. tumefaciens* počas transformácie

(prevažne hnedé, sypké). Bunky kalusov z negatívnej kontroly masívne podľahli pôsobeniu zvýšenej koncentrácie amoniaku, ktorý sa tvorí v toxických dávkach pôsobením fosfinotricínu, ktorý blokuje glutamínsyntetázu.



**Obr. 7.9:** Snímok elektroforetickej separácie molekúl DNA po dofarbení etídiumbromidom. Fyzický dôkaz prítomnosti génu *GUS* včleneného do T-DNA, ktorej nositeľom je *A. tumefaciens*. DNA bola izolovaná zo všetkých vzoriek za zhodných podmienok. PCR reakcia bola v prípade rastlín účastniacich sa transformácie vykonaná na vzorkách tabaku po prvej selekcii. Šípkou je naznačená pozícia očakávaného produktu o veľkosti 550 bp. V prvej jamke je rebríček s postupnosťou krokov 100 párov báz, 2. jamka predstavuje pozitívnu kontrolu, teda *A. tumefaciens*, v 3. jamke je vzorka negatívnej kontroly, teda PCR zmes bez templátu. V 4. jamke je netransformovaný list tabaku, v 5. jamke sa nachádza netransformovaný koreň tabaku, v 6. jamke je úspešne transformovaný list tabaku, v 7. jamke je vzorka z listu tabaku zo zregenerovanej rastliny tabaku, ktorá prešla transformačným pochodom i prvou selekciou na PPT, ale očividne nie je transformovaná, to svedčí opätovne o vysokej regeneračnej schopnosti tabaku, v poslednej 8. jamke je transformovaný list tabaku z odlišnej rastliny ako v prípade jamky číslo 6.





**Obr. 7.10:** Histochemický dôkaz prítomnosti  $\beta$ -glukuronidázy v extraktoch z rastlín *N. tabacum*, fluorometrická reakcia, výsledok reakcie pozorovaný pod UV transiluminátorom spojeným s fotoaparátom (výrobok spoločnosti Syngene In Genius). Prvá skúmavka predstavuje pozitívnu kontrolu, v skúmavke je prítomný očakávaný finálny produkt reakcie na dôkaz aktivity  $\beta$ -glukuronidázy, teda 4-metylnumbeliferon v čistej forme. V druhej skúmavke je negatívna kontrola, teda reakcia, ktorá prebehla za použitia vzorky homogenátu z netransformovaného listu (skúmavka neobsahuje finálny produkt,  $\beta$ -glukuronidáza nie je aktívna a tým pádom neštiepi substrát 4-metylnumbelifery-  $\beta$ -glukuronovú kyselinu). V skúmavkách s číslom 3 až 6 je výsledok reakcie uskutočnenej na homogenátoch z nezávislých regenerantov *N. tabacum* po ich transformácii *A. tumefaciens*. Skúmavky 3 až 6 obsahujú finálny produkt, čo je viditeľné vzhľadom na silnú fluorescenciu ako v prípade skúmavky číslo 1. Teda možno vysloviť predpoklad, že vzorky v skúmavkách 3 až 6 pochádzajú z transgénnych rastlín, čo by mala dodatočne potvrdiť i skúška pomocou PCR.

#### 7.4 Transformácia sprostredkovaná *A. rhizogenes*

V oboch prípadoch prebehla transformácia pomocou štandardného typu *A. rhizogenes* úspešne a boli získané pravé hairy root kultúry *S. vulgaris* aj *N. tabacum* pestované na živnom médiu bez prídavku rastových faktorov. V prípade silenky začala tvorba pravých koreňov z listových fragmentov po šiestich dňoch od transformácie, u tabaku po desiatich dňoch od transformácie.

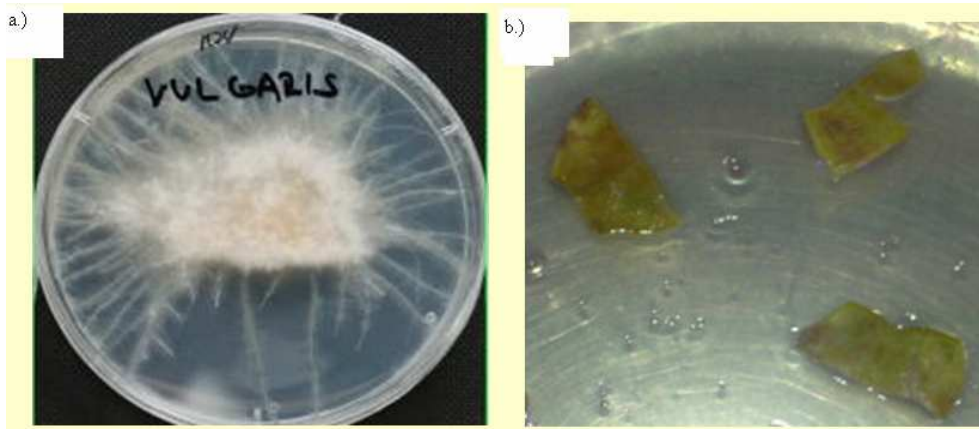
Hairy root kultúra *S. vulgaris* vytvára rýchlo bohatú spleť koreňov bielej farby, ktorá má strednú časť tvaru polgule, koreňová kultúra tabaku je menej bohatá bez výrazného nakupenia koreňov a korene majú farbu od bielej až po svetlohnedú.

Dôkazom transformácie je i samotný vznik kultúry hairy root pozorovateľný voľným okom v porovnaní s negatívnou kontrolou, teda v porovnaní s listovými fragmentmi bez účasti na transformačných pochodoch umiestnenými na živnom médiu (viz obrázok 7.11 a 7.12).

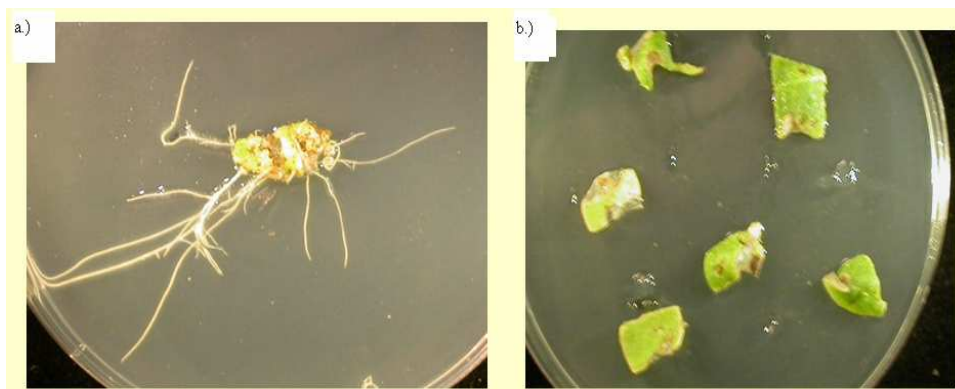
Ako ďalší dôkaz prenosu genetickej informácie medzi ríšami slúži PCR s použitím

primerov pre gén *rolA* prítomný v *A. rhizogenes* (viz obrázok 7.13 a 7.14), bola použitá metóda nested PCR. Po prvej amplifikácii s vonkajším párom primerov (20 cyklov) bola vykonaná ďalšia amplifikácia s vnútorným párom primerov. Do PCR zmesi s vnútorným párom primerov sa na jednu skúmavku použilo 0,15 µl vzorku DNA pochádzajúceho s amplifikácie s vonkajším párom primerov. Podmienky boli pre obe reakcie zhodné, po optimalizácii podmienok priebehu PCR boli stanovené na pôsobenie teploty 95 °C po dobu troch minút, nasledovalo 25 cyklov s troma opakujúcimi sa krokmi, prvý krok pozostával z teploty 94 °C pôsobiacej 30 sekúnd, ďalej nasadenie primerov pri teplote 58 °C po dobu 30 sekúnd a predlžovanie požadovanej sekvencie pri teplote 72 °C po dobu 45 sekúnd, reakcia bola ukončená pôsobením teploty 72 °C po dobu šiestich minút. Očakávaný produkt mal mať dĺžku 532 párov báz. V oboch koreňových kultúrach bol tento gén dokázaný, tak ako aj v spontánných (transgénných) regenerantoch, ktoré vznikali z koreňovej kultúry u tabaku. Gén nebol prítomný u netransformovaných rastlín *S. vulgaris*. V prípade netransformovaných rastlín *N. tabacum* je nález tohto génu otázný, nakoľko spadá do úvahy horizontálny génový prenos medzi *A. rhizogenes* a rodom *Nicotiana* v priebehu evolúcie [38].

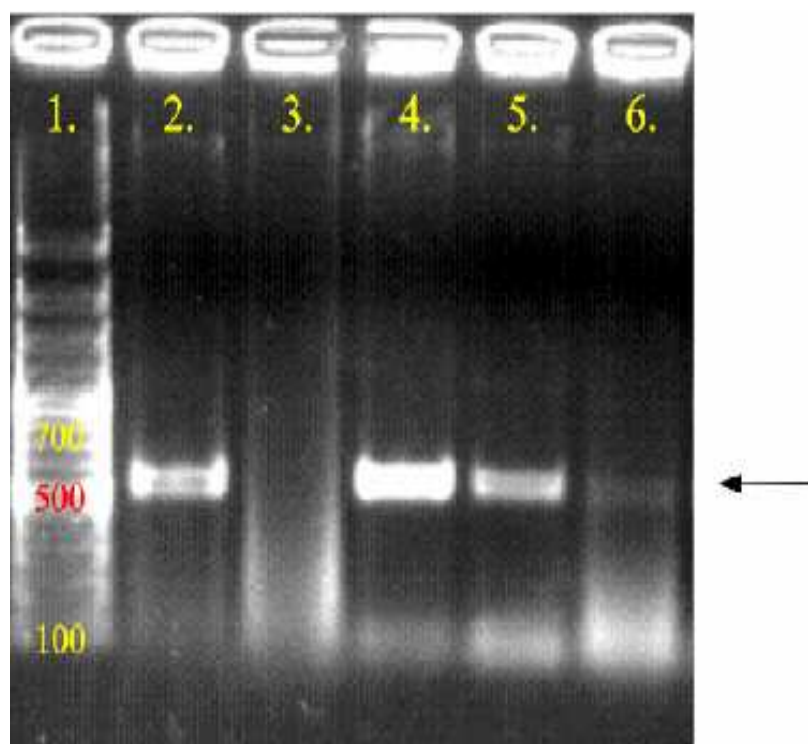
Spontánna regenerácia a vznik výhonkov z tabakových koreňových kultúr obvykle nastal po druhej pasáži, zhruba tri týždne od transformácie, v počte troch až štyroch rastlín na jednu koreňovú kultúru. V prípade silenky regenerácia nenastala. Z koreňovej kultúry silenky boli naizolované mitotické protoplasty, výsledok izolácie je na obrázku 7.12.



**Obr. 7.11:** Koreňová kultúra (*hairy roots*) *S. vulgaris* na živnom médiu bez prídavku rastových faktorov. Na snímku a.) je úspešne transformovaný listový fragment po troch mesiacoch od transformácie v porovnaní so snímkom b.), na ktorom je negatívna kontrola po dvoch týždňoch, pričom boli dodržané zhodne všetky podmienky, až na samotný krok aplikácie *A. rhizogenes*, ktorý v prípade negatívnej kontroly nenastal. Negatívna kontrola po zhruba trojtýždňovom pestovaní na živnom médiu bez rastových faktorov zhnedla, listové fragmenty postupne zoschli a odumreli.

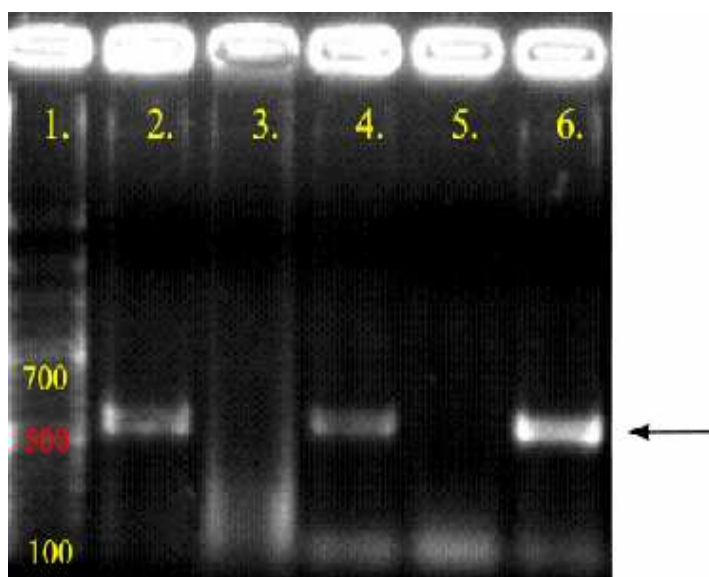


**Obr. 7.12:** Koreňová kultúra *N. tabacum*, na a.) snímku je zachytený rast nádorov typu hairy roots z listového fragmentu po dvoch týždňoch od transformácie a na b.) snímku príslušná negatívna kontrola, teda listové fragmenty na zhodnom živnom médiu bez transformácie. Do živného média neboli pridané rastové faktory. U negatívnej kontroly masívny nárast koreňov nenastáva.

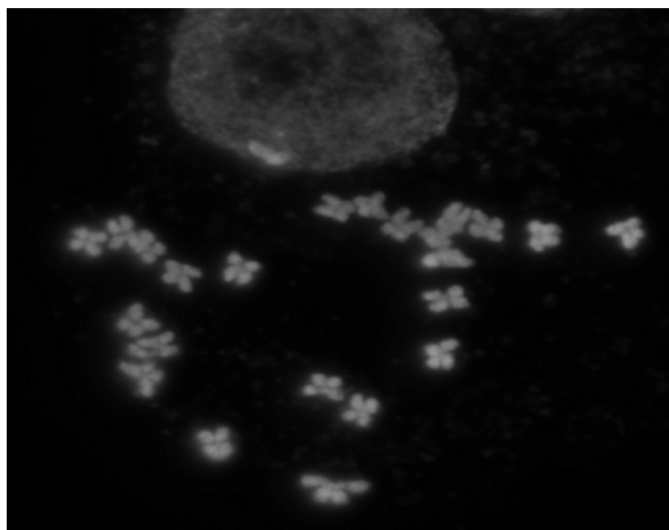


**Obr. 7.13:** Snímok elektroforetickej separácie molekúl DNA po dofarbení etídiumbromidom. Fyzický dôkaz prítomnosti génu *rolA* pôvodom z *A. rhizogenes* vo vzorkách DNA izolovaných z *N. tabacum*. Šípkou na pravom okraji je upozornené na očakávaný produkt veľkosti 542 bp. V prvej jamke je rebríček s postupnosťou krokov 100 párov báz, 2. jamka predstavuje pozitívnu kontrolu, teda *A. rhizogenes*, v 3. jamke je vzorka negatívnej kontroly, teda PCR zmes bez templátu. V jamke číslo štyri je testovaná DNA, ktorá bola izolovaná z hairy root kultúry *N. tabacum*, 5. jamka predstavuje spontánny transgénny regenerant (DNA bola izolovaná z listu zregenerovanej rastliny) a v 6. jamke je testovaná vzorka DNA z rastliny, ktorá nebola geneticky modifikovaná pomocou *A. rhizogenes* (DNA opäť izolovaná z listu).





**Obr. 7.14:** Snímok elektroforetickej separácie molekúl DNA po dofarbení etídiumbromidom. Fyzický dôkaz prítomnosti génu *rolA* pôvodom z *A. rhizogenes* vo vzorkách DNA izolovaných zo *S. vulgaris*. Šípkou na pravom okraji je upozornené na očakávaný produkt veľkosti 542 bp. V prvej jamke je rebríčok s postupnosťou krokov 100 párov báz, 2. jamka predstavuje pozitívnu kontrolu, teda *A. rhizogenes*, v 3. jamke je vzorka negatívnej kontroly, teda PCR zmes bez templátu. V jamke číslo štyri je testovaná DNA, ktorá bola izolovaná z hairy root kultúry *S. vulgaris*, 5. jamka predstavuje rastlinu, ktorá neprisla do styku s *A. rhizogenes* (teda netransformovanú rastlinu) a v 6. jamke je zas DNA izolovaná z koreňovej kultúry *S. vulgaris*, ale odlišnej línie ako v prípade jamky č. 4.



**Obr. 7.15:** Snímka zobrazujúca výsledok izolácie mitotických protoplastov *S. vulgaris*. V hornej časti sa nachádza hmota jadra susednej bunky čiastočne prekrývajúca jeden chromozóm. Je vidieť 24 chromozómov v metafáze.

## 8. DISKUSIA A ZÁVER

Tak ako je uvedené v úvode tejto práce, cieľom bolo získať transgénnu rastlinu *S. vulgaris*, ktorá nachádza uplatnenie vo výskume pohlavnosti rastlín [39] i v odstraňovaní ťažkých kovov zo znečistených pôd [40]. Ako pozitívna kontrola bola použitá rastlina *Nicotiana tabacum* známa svojimi dobrými regeneračnými schopnosťami [41].

Prvým krokom bol zisk regenerantov z listových fragmentov. Pre *Nicotiana tabacum* bola použitá koncentrácia hormónov v živnom médiu, ktorá je bežne uvádzaná v literatúre [42], [43.] Táto koncentrácia bola vyhovujúca a dva týždne po kultivácii vznikali z listových fragmentov prvé výhonky, ktoré rýchlo poskytli regeneranty. Pre kultiváciu listových fragmentov *S. vulgaris* bolo použitých viacero kombinácií hormónov v odlišných koncentráciách, pričom sa vychádzalo z údajov z literatúry, kde sa pokúšali (úspešne či menej úspešne) o regeneráciu druhov príbuzných našej cieľovej rastline [29], [30], [31]. *In vitro* regenerácia silenky z kalusu je zdĺhavá a málo efektívna. Rod *Silene* by sa dal označiť za pomerne odolný voči regeneračným pokusom, čomu nasvedčujú aj regeneračné pokusy so *Silene latifolia*, ktorá netvorí za normálnych podmienok ani kalus a je nutná aplikácia tepelných šokov na iniciáciu kalogenézy [44]. Väčšina listových fragmentov pri rozličných kombináciách hormónov mala sklon vytvárať korene narozdiel od výhonkov, čo vysvetľuje aj relatívne vyššiu potrebu cytokinínov (aby nastalo formovanie výhonkov na úkor rastu koreňov) oproti koncentráciám vhodným pre iné rastlinné čeľade ako aj oproti optimálnej koncentrácii pre tabak. Regeneráciu a organogézu výrazne ovplyvňuje i vek a fyziologický stav rodičovskej rastliny, z ktorej sú zakladané listové disky [45]. Regenerácia je ovplyvňovaná i ekotypom. K formácii kalusu vôbec nedochádza po použití pletiva zo stonky alebo koreňov, čo svedčí o špecifickosti pletiva, v ktorom sa dá pomocou rastových faktorov stimulovať diferenciácia buniek [46].

Ďalším krokom predchádzajúcim samotnú transformáciu bolo overenie účinnosti fosfinotricínu. Vychádzalo sa z koncentračnej rady zhodne použitej pre obe testované rastliny. Limitná koncentrácia vhodná pre selekciu bola pre *S. vulgaris* i *N. tabacum* temer zhodná. Koncentrácia bola stanovovaná pre rastliny pestované v *in vitro* podmienkach a testované boli listové fragmenty aj semienka. Optimálna koncentrácia PPT pre selekciu aplikovaná do média je o rád nižšia ako koncentrácia fosfinotricínu užívaná bežne pri jeho aplikácii vo forme postreku [47].

Tento fakt mohla spôsobiť skutočnosť, že fosfinotricín bol aplikovaný na listové fragmenty pochádzajúce z rastlín z *in vitro* kultivácie, ktoré sú menej rezistentné voči vplyvom okolia na rozdiel od rastlín pestovaných vo vonkajších podmienkach a takisto semienka prešli sterilizačným postupom, pri ktorom bol na ne vytváraný stres, napríklad pôsobením roztoku sava.

Pokusy robené inými skupinami na listových fragmentoch z tabaku či hrachu v podmienkach *in vitro* dokazujú zhodu v stanovenej limitnej koncentrácii PPT určenej na selekciu transgénných rastlín [20], [48].

Transformácia *S. vulgaris* sprostredkovaná *A. tumefaciens* viedla k vzniku kalusov, ktoré ale ani po troch mesiacoch od kokultivácie s agrobaktériom netvorili výhonky. Fyzická ani histochemická skúška na prítomnosť génov záujmu z T-DNA inkorporovaných do genómu *S. vulgaris* realizovaná na kalusoch by nemala zmysel, keďže by bola nejednoznačná a mohla poskytovať falošne pozitívne či falošne negatívne výsledky. Keďže predchádzajúce výskumy nasvedčujú, že transformované kalusy nemusia bezpodmienečne tvoriť transformované výhonky. Dokonca pokusy nasvedčujú, že po analýze kalusu a z neho pučiaceho mladého výhonku, boli získané pozitívne výsledky poukazujúce na úspešnú transformáciu, ale s odstupom času a opakovaním tejto analýzy po troch týždňoch, už nebola zistená prítomnosť génov záujmu z T-DNA v genóme mladého regeneranta získaného z testovaného výhonku [49]. Preto je dôležité testovať až regeneranta, ktorý vznikol z výhonku a bol pestovaný samostatne v živnom médiu, kde sa mu vytvorí i koreňová sústava.

Štúdie robené na modelovom organizme *Arabidopsis thaliana* charakterizujú bunky kompetentné k transformácii sprostredkovanej agrobaktériom a identifikujú potenciálne limity a bariéry hostiteľa. Bez ohľadu na pôvod buniek bolo zjavné, že kompetentná bunka je malá, guľovitá, má tenkú bunečnú stenu, mnoho malých vakuol a cytoplazmu o vyššej hustote. V bunečnej kultúre pochádzajúcej z kotyledona i z koreňa došlo k zvýšeniu počtu kompetentných buniek až po nasadení vhodných rastových faktorov, čo indikuje nedostatočnú aktiváciu a delenie buniek poranením pletiva, ktoré predchádza transformácii a má zefektívniť transformáciu. Vystavením nekompetentných buniek dvojdňovému pôsobeniu *A. tumefaciens* malo za následok postupnú stratu životachopnosti alebo dokonca až bunečnú smrť miesto vzniku charakteristickej stresovej odpovede vedúcej k transformačným pochodom. Z tejto štúdie vyplýva, že k transformácii nie je potrebná len bunečná aktivácia ale i proliferácia a nekompetentné bunky sa môžu stať kompetentnými po vhodnom nasadení rastových faktorov pred agrobakteriálnou infekciou, čo vedie k vývoju novej stratégie určenej na agrobaktériom sprostredkovanú genetickú modifikáciu zdanlivo netransformovateľných rastlín [50].

Iróniou zostáva, že napriek všetkým vedomostiam o genetických modifikáciách, nie je presne známy postup interakcie agrobaktéria s hostiteľskou bunkou. Štúdie naznačujú, že je nevyhnutná prítomnosť niektorých polysacharidov a receptorov na povrchu bunky, aby došlo k vytvoreniu stranovošpecifického prilnutia agrobaktéria na hostiteľskú bunku. Pre začiatok transformácie je nevyhnutné, aby nastal proces tvorby špecifického spojenia [51].

V prípade transformácií za použitia agrobaktéria sa naskytá otázka: kto má problém s transformáciou, my ako výskumníci či agrobaktérium?! V posledných rokoch bol urobený obrovský pokrok v oblasti transformácie využívajúcej agrobaktérium a bolo navrhnutých nesčítne množstvo postupov na získanie transgénnych rastlín, napriek tomu zostáva pomerne veľa dôležitých druhov a inbredných línií vysoko odolných voči agrobakteriálnej transformácii. Tak ako u iných druhov, tak i u *S. vulgaris*, je možné že dochádza k umlčovaniu transgénov. Je dokázané umlčanie transgénu v prípade integrácie T-DNA do rastlinného genómu iba v jednej kopii, ale tak isto v prípade integrácie dvoch kópií T-DNA, ktoré sú umiestnené vedľa seba a orientované v smere „hlava k hlave“ okolo pravej hraničnej oblasti T-DNA. Dokonca môže transkripčné umlčanie vychádzať z integrácie transgénu do oblasti rastlinného

genómu náchylnej k DNA metyláciám a teda môže byť prirodzeným dôsledkom v procese transformácie rastlín [52].

Agrobaktérium spôsobuje nehomologickú genetickú rekombináciu, dochádza k náhodnému vnášaniu T-DNA do genómu (teda do euchromatínu alebo do heterochromatínu), čo vedie k rôznej expresii. Tým pádom ani rastliny nie sú zhodné a vzniká veľká genetická variabilita transformantov [53].

Metylácia je predominantnou epigenetickou modifikáciou DNA. Epigenetickou preto, že modifikuje informáciu obsiahnutú v DNA štruktúre bez toho, aby došlo k zmene danej štruktúry. Metylácie nemenia štruktúru ani funkciu génu, ale ponúkajú informáciu o tom, kde a kedy by mohol byť gén exprimovaný [8], [52].

V prípade tabaku bola transformácia sprostredkovaná *A. tumefaciens* úspešná, viedla k vzniku transgénnych rastlín, ktoré sa v individuálnych prípadoch líšili fenotypovo, čo sa týka hlavne veľkosti a počtu listov, ako i ich vzhľadu od rovných po zvlnené a tak isto rozdielnej sýtosti zelenej farby, čo opätovne potvrdzuje nehomologické vnášanie T-DNA do genómu. Priebeh transformácie *N. tabacum* sa dá považovať za ukážkový, prebieha bez komplikácií, určenie vhodného transformačného postupu i úspešnosť transformácie sa zhoduje s transformačnými pokusmi uvádzanými v literatúre [54], [55].

Transformácia sprostredkovaná *A. rhizogenes* bola úspešná u oboch explantátov, čo sa týka vzniku koreňových kultúr. V prípade tabaku viedla i k vzniku transgénnych (spontánnych) regenerantov z kultúry typu hairy root, žiaľ v prípade silenky spontánna regenerácia nenastala a tak nebol získaný transgénny výhonok. Polymerázová reťazová reakcia v prípade silenky jednoznačne potvrdila pravosť hairy root kultúry, ktorá bola kultivovaná na médiu bez hormónov. V prípade *N. tabacum* je na elektroforetickom snímku patrný i svetlý prúžok pri testovaní rastliny, ktorá neprišla do styku s agrobaktériom a bola kultivovaná v *in vitro* podmienkach zo semienka, ktoré prešlo sterilizáciou.

Vysvetlením sa zdá byť horizontálny génový prenos z agrobaktéria na rod *Nicotiana*, ktorý sa odohral počas evolúcie spomínaného rodu. Tomu nasvedčuje i vysoká podobnosť sekvencie *rol* génov z *A. rhizogenes* so sekvenciami *rol* génov prítomných vo vybraných zástupcoch rodu *Nicotiana* [56].

Kvalita i kvantita vyizolovanej DNA z kultúry hairy roots sa oproti izolácii z pletiva listov značne líši i za dodržania tých istých podmienok (koncentrácia DNA izolovaná z listov býva aj tridsaťkrát väčšia). Nakoľko izolácia DNA z koreňovej kultúry je pomerne obtiažna, časovo náročnejšia a vyžaduje väčšie množstvo materiálu, aby získaná DNA bola dostatočne koncentrovaná a čistá, pristúpilo sa k voľbe metódy nested PCR.

Po úspešnej príprave koreňovej kultúry *S. vulgaris* boli naizolované mitotické protoplasty určené k ďalšiemu štúdiu.

## 9. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] Gilmartin, P. M, Bowler, Ch.: *Molecular Plant Biology*. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. 270 p. ISBN 0 19 963876 4.
- [2] Brown, T. A.: *Gene cloning and data analysis : An Introduction*. 5<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 386 p. ISBN 978-1-405-11121-8.
- [3] Collins, A.: *Soilborne Plant Pathogens : Agrobacterium tumefaciens* [online]. 2001 [cit. 12. 12. 2009]. Dostupné z: [http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Agrobacterium/Alyssa\\_Collins\\_profile.htm](http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Agrobacterium/Alyssa_Collins_profile.htm).
- [4] Riva, G. A., Gonzales-Cabrera, J., Vasquez-Padron, R. *Agrobacterium tumefaciens : a natural tool for plant transformation*. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 1998, vol. 1, no. 3 [cit. 12. 12. 2009]. Dostupný na www: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/1/1.PDF>  
ISSN 0717-3458.
- [5] Zupan, J., Ward, D., Zambryski, P.: *Inter-kingdom DNA transfer decoded*. *Nature Biotechnology* [online]. 2002, vol. 20 [cit. 12. 12. 2009]. Dostupný na www: <http://www.nature.com/nbt/journal/v20/n2/pdf/nbt0202-129.pdf>  
ISSN 1087-0156.
- [6] Citovsky, V., Kozlovsky, S. V., Lacroix, B.: *Biological systems of the host cell involved in Agrobacterium infection*. *Cellular Microbiology*. 2007, vol. 9., no 1. [cit. 12. 12. 2009]. Dostupný na www: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118001405/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>  
ISSN 1462-5822.
- [7] Roa-Rodriguez, C., Nottenburg, C. *Agrobacterium-mediated transformation of plants*. [PDF dokument]. Canberra (Australia): CAMBIA Intellectual Property Resource, July 2003 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný z: [http://www.cougarlaw.com/linked\\_files/AMT\\_v3.pdf](http://www.cougarlaw.com/linked_files/AMT_v3.pdf).
- [8] GELVIN, S. B.: *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation : the Biology behind the „Gene-Jockeying“ Tool*. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 2003, vol. 67, no 1. [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://mibr.asm.org/cgi/reprint/67/1/16.pdf>  
ISSN 1098-5557.
- [9] Vejl, P.: *Geneticky modifikovaný organizmus z pohľadu genetiky a šľachtení*. In *Geneticky modifikované organizmy v agroekosystému a jeho okolí, Praha, květen 2007* [online]. 2007 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupné na www: [http://81.0.228.70/attachments/sbornik\\_GMO\\_2007.pdf](http://81.0.228.70/attachments/sbornik_GMO_2007.pdf).

- [10] Shapiro, J. A.: Thinking About Bacterial Populations As Multicellular Organisms. *Annual Review of Microbiology*. 1998, vol. 52 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.sci.uidaho.edu/newton/math501/Sp05/Shapiro.pdf>  
ISSN 0066-4227.
- [11] Ward, D. V., Zambryski, P. C.: The six functions of *Agrobacterium* VirE2. *PNAS*. 2001, vol. 98, no. 2. [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.pnas.org/content/98/2/385.full.pdf+html>  
ISSN 1091-6490.
- [12] Stanton, B. G.: Crown Gall Disease and Hairy Root Disease : A Sledgehammer and a Trackhammer. *Plant Physiology*. 1990, vol. 92 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/92/2/281>  
ISSN 0032-0889.
- [13] Hu, Z. B., Du, M.: Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2006, vol. 48, no. 2 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.shutcm.edu.cn/shutcm/zybzhyjzx/xswz/swjswz/images/2006/10/13/993.pdf>  
ISSN 1672-9072.
- [14] Clark, D. P.: *Molecular Biology : Understanding the Genetic Revolution*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 784 p. ISBN 0-12-175551-7.
- [15] Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R.: *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [16] Ondřej, M., Drobník, J., Gartland, K. M. A.: *Génové inženýrství rostlin*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1999. 121 s. ISBN 80-7080-370-3
- [17] Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W.: GUS fusions :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*. 1987, vol. 6, no. 13 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553867/pdf/emboj00253-0035.pdf>  
ISSN 1460-2075.
- [18] Pena, L.: *Transgenic Plants : Methods and Protocols*. 1<sup>st</sup> ed. Totowa: Humana Press Inc., 2008. 437 p. ISBN 978-1-58829-263-6.
- [19] Vitha, S. <vitha@mic.tamu.edu> *Histochemical localization of b-glucuronidase (GUS) reporter activity in plant tissues*. [PDF dokument]. Texas: Microscopy and Imaging Center, Texas A & M University, September 2005 [cit. 19. 3. 2010]. Dostupný z: [http://microscopy.tamu.edu/lab-protocols/GUS\\_Localization\\_in\\_plants.pdf](http://microscopy.tamu.edu/lab-protocols/GUS_Localization_in_plants.pdf).
- [20] Wang, M. B., Waterhouse, P. M.: A Rapid and Simple Method of Assaying Plants Transformed with Hygromycin or PPT Resistance Genes. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997, vol. 15 [cit. 10. 11. 2009]. Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/w63636025541v375/>

ISSN 1572-9818.

[21] Wilmink, A., Dons, J. J. M.: Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1993, vol. 11 [cit. 10. 11. 2009]. Dostupný na www:

<http://www.springerlink.com/content/w63636025541v375/>

ISSN 1572-9818.

[22] Hejný, S., Slavík, B.: *Květena České republiky 2*. 1. vyd. Praha: Academia, 1990. 544 s. ISBN 21-045-90.

[23] Zluvova, J., Janousek, B., Hobza, R.: *Genus Silene (Caryophyllaceae) – evolutionary diversification and sex chromosome formation*. In: *PlantGenome – Biodiversity and Evolution*, Vol. 1E – Phanerogam – Angiosperm, 2008. Ed. A. K. et al. New Hampshire (USA): Science Publishers, 2008, p. 173-226. ISBN 978-1-57808-507-1.

[24] Šírokový, J., Lysák, M. A., Doležel, J.: Heterogeneity of rDNA distribution and genome size in *Silene* spp. *Chromosome Research*, 2001, vol. 9, no. 5 [cit. 10. 11. 2009].

Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/n710812277507072/>

ISSN 0967-3849.

[25] Gray, J. C., Kung, S. D., Wildman, S. G.: Origin of *Nicotiana tabacum* L. detected by polypeptide composition of Fraction I protein. *Nature*, 1974, vol. 252 [cit. 10. 11. 2009].

Dostupný na www: <http://www.nature.com/nature/journal/v252/n5480/abs/252226a0.html>

ISSN 1476-4687.

[26] Aoki, S.: Resurrection of an ancestral gene: functional and evolutionary analyses of the *Ngr1* gene transferred from *Agrobacterium* to *Nicotiana*. *Journal of Plant Research*, 2004, vol. 117, no. 4 [cit. 10. 11. 2009].

Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/n08gmcxqrb5mlt3r/>

ISSN 0918-9440.

[27] Weigl, E., Raška, M., Šíma, P.: *Škola molekulárních biotechnologií Profession : Studijní texty k teoretickým modulům*. 1. vyd. Brno: Tribun EU s. r. o., 2010. 126 s.

[28] McGann, L. E.: Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents. *Cryobiology*, 1978, vol. 15 [cit. 25. 10. 2009]. Dostupný na www:

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WD5-4F1HR49-165&\\_user=10&\\_coverDate=08%2F31%2F1978&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&\\_view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&\\_md5=b145144a10eb0ab51dea4d44f36989c4](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WD5-4F1HR49-165&_user=10&_coverDate=08%2F31%2F1978&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&_md5=b145144a10eb0ab51dea4d44f36989c4)

ISSN 0011-2240.

[29] Jack, E. M., Anatasova, S., Verkleij, J. A. C.: Callus induction and plant regeneration in the metallophyte *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *Journal of Plant Biotechnology*, 2005, vol. 80 [cit. 10. 10. 2009].

Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/m6916477272n6888/>  
ISSN 1573-5044.

[30] Miranda, J., Korschuh, M. N., Young, E. C.: In vitro plantlet regeneration from hypocotyl explants of *Stellaria longipes* (Caryophyllaceae). *Canadian Journal of Botany*, 1999, vol. 77, no. 2 [cit. 10. 10. 2009]. Dostupný na www: <http://rparticle.webp.cisti.nrc.ca/rparticle/AbstractTemplateServlet?calyLang=eng&journal=cjb&volume=77&year=1999&issue=2&msno=b99-024>  
ISSN 1916-2804.

[31] Lu, CH.-Y., Nugent, G., Wardley-Richardson, T.: *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Nature Biotechnology*, 1991, vol. 9 [cit. 10. 10. 2009].  
Dostupný na www: <http://www.nature.com/nbt/journal/v9/n9/abs/nbt0991-864.html>  
ISSN 0991-864.

[32] Sarria, R., Torres, E., Angel, F.: Transgenic plants of cassava (*Manihot exculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 2000, vol. 19, no. 4 [cit. 10. 10. 2009].  
Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/ca1rk109fhnebjtn/>  
ISSN 0721-7714.

[33] Vyskot, B., Brzobohatý, B., Karlovská, L.: Structural and Functional Stability of Foreign Genes in Transgenic Tobacco Plants. *Folia Biologica*, 1989, vol. 35 [cit. 10. 10. 2009].  
Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2561278>.

[34] Product Catalog QIAGEN: DNeasy Plant Mini Kit. Prague (CZ): BIO-CONSULT spol. s.r.o., 2009.

[35] *National Center for Biotechnological Information (NCBI)* [online database]. Rockville Pike (Bethesda, USA): U. S. National Library of Medicine, 2010. Dostupné z URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[36] Fior, S., Gerola, P. D.: Impact of ubiquitous inhibitors on the GUS gene reporter system: evidence from the model plants *Arabidopsis*, tobacco and rice and correction methods for quantitative assays of transgenic and endogenous GUS. *Plant Methods*, 2009, vol. 5, no. 19 [cit. 10. 2. 2010].  
Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2805642/?tool=pmcentrez>  
ISSN 1746-4811.

[37] Neumann, P., Lysák, M., Doležel, J.: Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. *Plant Science*, 1998, vol. 137 [cit. 2. 12. 2009].  
Dostupný na www: [http://w3lamc.umbr.cas.cz/lamc/publ/Neumann\\_PlantSci\\_98.pdf](http://w3lamc.umbr.cas.cz/lamc/publ/Neumann_PlantSci_98.pdf)  
ISSN 0168-9452.



[38] Suzuki, K., Yamashita, I., Tanaka, N.: Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *The Plant Journal*, 2002, vol. 32 [cit. 17. 1. 2010]. Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12472692>  
ISSN 1365-313X.

[39] Negrutiu, I., Vyskot, B., Barbacar, N.: Dioecious plants. A Key to the Early Events of Sex Chromosome Evolution. *Plant Physiology*, 2001, vol. 127 [cit. 17. 11. 2009].  
Dostupný na www: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/127/4/1418>  
ISSN 1532-2548.

[40] Knecht, J. A., Dillen, M., Koevoets, P. L. M.: Phytochelatins in Cadmium-Sensitive and Cadmium-Tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology*, 1994, vol. 104 [cit. 17. 11. 2009].  
Dostupný na www: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/104/1/255.pdf>  
ISSN 1532-2548.

[41] Nováková, M., Macková, M., Antošová, Z.: Preparation and study of transgenic tobacco plants with bacterial genes for dioxygenases applicable in phytoremediation. In *The Student Scientific Conference on Genetically Modified Organisms, Brno 8th and 9th April 2010*. Ed. Jiří Doškař et al. Brno: Masarykova univerzita, 2010, p. 50-51.  
ISBN 978-80-210-5160-7.

[42] Oono, Y., Handa, T., Kanaya, K.: The TL-DNA gene of Ri plasmid responsible for dwarfness of tobacco plants. *Japanese Journal of Genetics*, 1987, vol. 62 [cit. 17. 11. 2009]. Dostupný na www:  
<http://rms1.agsearch.agropedia.affrc.go.jp/contents/JASI/pdf/society/39-0538.pdf>  
ISSN 0021-504X.

[43] McCormac, A. C., Fowler, M. R., Chen, D. F.: Efficient co-transformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implication for genetic separation. *Transgenic Research*, 2001, vol. 10 [cit. 22. 1. 2009].  
Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11305361>  
ISSN 0962-8819.

[44] Šafářová, D., Kopecký, D., Vagera, J.: The effect of a short heat treatment on the *in vitro* induced androgenesis in *Silene latifolia* ssp. *alba*. *Biologica plantarum*, 2005, vol. 49, no. 2 [cit. 17. 11. 2009]. Dostupný na www:  
<http://www.springerlink.com/content/kvr11030631g5713/>  
ISSN 1573-8264.

[45] Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S.: In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) – Problems and progress. *Scientia Horticulturae*, 2005, vol. 107 [cit. 20. 3. 2010]. Dostupný na www:  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TC3-4H3YB55-1&\\_user=10&\\_coverDate=12%2F01%2F2005&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TC3-4H3YB55-1&_user=10&_coverDate=12%2F01%2F2005&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d)

[&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1324310301&\\_rerunOrigin=scholar.google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=dacd9605f51d4731d7fe896f6ca9752f](http://www.springerlink.com/content/kl0tg12415518535/)

ISSN 0304-4238.

[46] Leopold, A. C.: *Plant Growth and Development*. 1<sup>st</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1964, 466 pp. ISBN 64-21071.

[47] Glazebrook, J., Weigel, D.: *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Woodbury: CSHL Press, 2002, 354 pp. ISBN 0-87969-572-2.

[48] Tabe, L. M., Wardley-Richardson, T., Ceriotti, A.: A Biotechnological Approach to Improving the Nutritive Value of Alfalfa. *Journal of Animal Science*, 1995, vol. 73, no. 9 [cit. 7. 4. 2010]. Dostupný na www: <http://jas.fass.org/cgi/reprint/73/9/2752.pdf>  
ISSN 1525-3163.

[49] Jordan, M. C., McHughen, A.: Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Reports*, 1988, vol. 7, no. 4 [cit. 22. 12. 2009]. Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/g2710xu416610t85/>  
ISSN 1432-203X.

[50] Sangwan, R. S., Bourgeois, Y., Brown, S.: Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 1992, vol. 188, no. 3 [cit. 20. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/kl0tg12415518535/>  
ISSN 1432-2048.

[51] Clause-Coupel, H., Chateau, S., Ducrocq, C.: Role of vitronectin-like protein in *Agrobacterium* attachment and transformation of *Arabidopsis* cells. *Protoplasma*, 2008, vol. 234, no. 1-4 [cit. 22. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.springerlink.com/content/rl4625m6677n104l/>  
ISSN 1615-6102.

[52] Shrawat, A. K. <ashrawat@ualberta.ca> *Genetic Transformation of Cereals Mediated by Agrobacterium: Potential and problems*. [PDF document]. Edmonton (Canada): ISB News Report, Laboratory of Molecular Genetics, University of Alberta, February 2007 [cit. 16. 3. 2010]. Dostupný z: <http://www.isb.vt.edu/news/2007/artspdf/feb0703.pdf>.

[53] Panopoulos, N. J.: *Genetic Engineering in the Plant Science*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Praeger Publishing a Division of CBS Inc., 1981, 271 pp. ISBN 0-03-057026-3.

[54] Márton, L., Wullems, G. J., Molendijk, L.: *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 1979, vol. 277 [cit. 22. 10. 2009]. Dostupný na www: <http://www.nature.com/nature/journal/v277/n5692/abs/277129a0.html>  
ISSN 0028-0836.

[55] Black, R. C., Binns, A. N., Chang, Ch. F.: Cell-Autonomous Cytokinin-Independent Growth of Tobacco Cells Transformed by *Agrobacterium tumefaciens* Strains Lacking the Cytokinin Biosynthesis Gene. *Plant Physiology*, 1994, vol. 105 [cit. 27. 10. 2010]. Dostupný na www: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/105/3/989.pdf>  
ISSN 1532-2548.

[56] Intieri, M. C., Buiatti, M.: The Horizontal Transfer of *Agrobacterium rhizogenes* Genes and the Evolution of the Genus *Nicotiana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, vol. 20, no. 1 [cit. 7. 3. 2010]. Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11421651>  
ISSN 1055-7903.

## 10. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

|                 |  |
|-----------------|--|
| Acyl HSL        | acylovaný homoserínový lakton  |
| AMT             | <i>A. tumafaciens</i> sprostredkovaná transformácia  |
| AMTS            | Agrobacterium-mediated transformation system ( <i>A. tumafaciens</i> sprostredkovaný transformáčny systém) |
| bp              | párov báz  |
| BAP             | 6-benzylaminopurín   |
| CGD             | Crown gall disease (doslovný slovenský preklad neexistuje, užíva sa pojem krčkovitosť rastlín)             |
| 2,4-D           | kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová   |
| DNA             | deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)   |
| GA <sub>3</sub> | kyselina giberelínová  |
| GM              | geneticky modifikovaný   |
| GMO             | geneticky modifikovaný organizmus  |
| GUS             | β-glukuronidáza  |
| IBA             | kyselina indol-3-maslová   |
| mg/l            | miligram látky na liter roztoku  |
| MU              | 4-metylbelferón  |
| MUG             | 4-metylbelferyl-β-D-glukuronid   |
| NAA             | α-naftyl octová kyselina (naphtyl acetic acid)   |
| NHR             | nehomologická rekombinácia   |
| NOS             | gén pre syntézu nopalínu   |
| ORF             | čítací rámec (open ring frame)   |
| ORI             | replikačný počiatok  |
| PPM             | parts per million (jedna miliontina)   |
| ssDNA           | jednovláknová molekula DNA (single strand DNA)   |
| T <sub>C</sub>  | centrálny úsek oktopínovej T-DNA   |
| T <sub>i</sub>  | tumor indukujúci   |
| T <sub>L</sub>  | ľavý segment oktopínovej T-DNA   |
| T <sub>R</sub>  | pravý segment oktopínovej T-DNA  |
| TDZ             | tiazuron   |

## 11. ZOZNAM PRÍLOH

Príloha č. 1: Sekvencia génu *gusA* [35]

## SEKVENCIA GÉNU *GUSA*

### ORIGIN

1 tcattgtttg cctccctget geggttttc accgaagttc atgccagtcc agcgttttg  
61 cagcagaaaa gccgccgact tcggtttgcg gtcgcgagtg aagatccctt tctgttacc  
121 gccaacgcgc aatatgcctt gcgaggtcgc aaaatcggcg aaattccata cctgttcacc  
181 gacgacggcg ctgacgcgat caaagacgcg gtgatacata tccagccatg cacactgata  
241 ctcttcactc cacatgtcgg tgtacattga gtcagccccg gctaactat ccacgccga  
301 ttcggtgatg ataatcggct gatgcagttt ctctgccag gccagaagtt cttttccag  
361 taccttctet gccgtttcca aatcgcgcgt ttggacatac catccgtaat aacggttcag  
421 gcacagcaca tcaaagagat cgctgatggt atcgggtgta gcgtcgcaga acattacatt  
481 gacgcaggtg atcggacgcg tcgggtcga **g ttacgcgtt gttccgccca** gtggcgcgaa  
541 atattcccgt gcacctgcg gacgggtatc cggttcgttg gcaatactcc acatcaccac  
601 gcttgggtgg tttttgtcac gcgctatcag ctctttaate gcctgtaagt gcgcttgctg  
661 agtttccccg ttgactgcct ctgcctgta cagttcttc ggcttgttgc ccgcttcgaa  
721 accaatgcct aaagagaggt taaagccgac agcagcagtt tcatcaatca ccacgatgcc  
781 atgttcatct gccagtcga gcactcttc agcgttaaggg taatgcgagg tacggttaga  
841 gttggcccca atccagtcca ttaatgcgtg gtcgtgcacc atcagcacgt tategaatc  
901 tttgccacgc aagtccgat ctctatgacg accaaagcca gtaaagtaga acggtttgtg  
961 gttaatcagg aactgttcgc ctttactgc cactgaccgg atgccgacgc gaagcgggta  
1021 gatatacac tctgtctg **gc tttggctgt gacgcacagt** tcatagagat aaccttcacc  
1081 cggttgccag aggtgcggat tcaccactg caaagtcccg ctagtgcctt gtccagttgc  
1141 aaccacctgt tgetcgcgat cacgcagttc aacgctgaca tcaccattgg ccaccacctg  
1201 ccagtcaaca gacgcgtggt tacagtcttgc cgcgacatgc gtcaccacgg tgatctgc  
1261 caccaggtg ttcggcgtgg tgtagagcat tacgctgcga tggatcccgg catagttaa  
1321 gaaatcatgg aagtaagact gcttttctt gccgttttcg tcggtaatca ccattcccgg  
1381 cgggatagtc tgccagtca gttcgttgtt cacacaaacg gtgatacgtta cacttttccc  
1441 ggcaataaca tacggcgtga catcggttc aaatggcgta tagccgcct gatgtccat  
1501 cacttctga ttattgacc acactttgcc gtaatgagt accgcatcga aacgcagcac  
1561 gatacgtg cctgcccaac ctttcggtat aaagacttcg cgctgatacc agacgttgc  
1621 cgcataatta cgaatatctg catcggcgaa ctgatcgtta aaactgcctg gcacagcaat  
1681 tccccggtt tcttgaacg cgttttcca ccaacgctga tcaattccac agttttcgcg  
1741 atccagactg aatgccaca ggccgtcgag tttttgatt tcacgggttg gggtttctac  
1801 aggacgtaac at

//