

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Dita Badalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Optimalizace *in vitro* systému a metod
transformace pšenice**

Bakalářská práce

Dita Badalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama a že uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala mé vedoucí Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D., za její cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Bc. Janě Vaškové za pomoc v laboratoři a prof. Ing. Jaroslavě Ehrenbergerové, CSc. za pomoc při vypracování statistické analýzy.

Souhrn

Pšenice je díky své široké škále využití jednou z nejdůležitějších pěstovaných obilovin na světě. Pšenice slouží jako zdroj potravy pro lidstvo, ale také jako krmivo pro hospodářská zvířata. Z důvodu neustále se zvětšující zalidněnosti planety stoupá i produkce pšenice a její nároky na pěstování. Zvýšení nutriční hodnoty a odolnosti vůči biotickým a abiotickým stresům jsou hlavní šlechtitelské cíle. Transgenozé je jednou z metod molekulární biologie, pomocí níž můžeme tyto cíle naplnit.

V současné době jsou využívány dvě metody transformace pšenice: metoda biolistická, umožňující přímý přenos DNA do buňky pomocí mikroprojektilů, a metoda transformace prostřednictvím půdní bakterie rodu *Agrobacterium*. Pšenice však patří mezi plodiny, u kterých je transformace velmi obtížná. Podmínkou úspěšné transformace je indukce kalusů a vysoká regenerační schopnost.

V rámci bakalářské práce byla hodnocena indukční a regenerační kapacita nezralých zygotických embryí hospodářsky významných odrůd pšenice pěstovaných na území ČR. Vybrané odrůdy pšenice byly transformovány vektorem pBRAC214 pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Bylo zjištěno, že indukční a regenerační kapacita pšenice je genotypově závislá a velmi rozdílná. Odrůda pšenice s nejvyšší indukční kapacitou byla jarní odrůda Sirael, jako odrůda s nejvyšší regenerační kapacitou byla vyhodnocena ozimá odrůda pšenice, Elly.

Summary

Wheat is due to the wide range of uses one of the most important grown cereals in the world. Wheat is used not only as a source of food for mankind, but also as a feed for farm animals. Due to the continuously increasing planet's density of population, the production of wheat and its growing demands increase. The main breeding objectives are to achieve the increase of nutritional value and the increase of resistance to biotic and abiotic stress. Transgenesis is one of the methods of molecular biology, through which we can fulfill these goals.

At present, two methods of transformation of wheat are used: biolistic method, that allows direct transfer of DNA into cells by using microprojectiles and a method of transformation, using the soil bacteria of the genus *Agrobacterium*. Wheat belongs to the crops, where the transformation is very difficult. The induction of callus and high regeneration capacity are the conditions of successful transformation.

Within the bachelor thesis the induction and regeneration capacity of immature zygotic embryos of economically important varieties of wheat grown in the Czech Republic was evaluated. The selected wheat varieties were transformed by vector pBRACT214 by *Agrobacterium tumefaciens*. It was found, that the induction and regeneration capacity depends on genotype and is very different. The spring species of wheat called Siraël was proved to have the highest inductive capacity, the winter wheat called Elly had the highest regeneration capacity.

OBSAH

1 CÍLE PRÁCE	8
2 ÚVOD.....	9
3 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY	10
3.1 Přímé vnášení DNA	11
3.1.1 Vnášení DNA pomocí mikroprojektilů	11
3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
3.2.1 Transformace pomocí <i>A. tumefaciens</i>	15
4 PŠENICE.....	17
5 REGENERACE <i>IN VITRO</i>	19
5.1 Morfogeneze – regenerace <i>in vitro</i>	20
5.1.1 Somatická embryogeneze	21
5.2 Kultivační média	22
5.2.1 Komponenty kultivačního média dle Hall, (1999).....	22
5.3 Fytohormony	23
5.3.1 Auxiny	24
5.3.2 Cytokininy	26
6 MATERIÁL A METODY.....	27
6.1 Rostlinný materiál	27
6.2 Sterilizace embryí.....	29
6.3 Izolace embryí	29
6.4 Kultivace embryí	29
6.4.1 Kultivace zygotických embryí určených k optimalizaci <i>in vitro</i> podmínek....	30
6.4.2 Kultivační média	30
6.5 Vnášený vektor.....	33
6.6 Transformace zygotických embryí bakterií <i>A. tumefaciens</i>	33
6.6.1 Kultivace <i>A. tumefaciens</i>	33
6.6.2 Transformace zygotických embryí <i>Agrobacteriem tumefaciens</i>	33
7 VÝSLEDKY.....	34
7.1 Optimalizace <i>in vitro</i> podmínek pro kultivaci pšenice.....	35
7.1.1 Hodnocení vlivu složení média a genotypu rostliny na indukční kapacitu pšenice	35
7.2 Transformace pšenice <i>A. tumefaciens</i>	42
7.2.1 Transformace zralých zygotických embryí	42
7.2.2 Transformace nezralých zygotických embryí.....	43
8 DISKUZE.....	44
9 ZÁVĚR.....	46
10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	50

1 CÍLE PRÁCE

- 1) Zhodnocení úspěšnosti transformace pšenice na základě dostupné literatury.
- 2) Ověření *in vitro* indukčního a regeneračního systému nezralých, případně zralých somatických embryí a navrhnutí vhodných kultivačních médií.
- 3) Testování hospodářsky významných odrůd pšenice a vyhodnocení jejich indukční a regenerační kapacity.
- 4) Transformace odrůdy pšenice s nejvyšší indukční a regenerační kapacitou pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

2 ÚVOD

Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou na evropském kontinentu stále poměrně kontroverzním tématem. Mnoho lidí má z GMO obavy, jako z čehokoliv neznámého. Ti, kteří jsou ovšem do problematiky zasvěcení, ví, že GMO mohou mít pro lidstvo obrovský přínos, ať už v zemědělství, farmacii či v dalších oborech.

Mezi přínosy GMO potravin patří např. vyšší nutriční hodnota a prodloužení jejich skladovací doby, dále pak výroba léků a tzv. jedlých vakcín, pěstování plodin s dodanou rezistencí vůči herbicidům, možnost výroby biodegradovatelných plastů v plodinách a další. Na druhou stranu, GMO plodiny s sebou mohou nést i jistá rizika, jako je např. tvorba toxických nebo alergenních produktů a možnost jejich škodlivého dopadu na určité živočišné druhy, pokles biodiverzity, ale také zvýšení závislosti malých farmářů na velkých agrochemických společnostech (Snustad a Simmons, 2009).

Díky velkému množství pozitiv, které nám však transgenní organismy mohou nabídnout, se objevuje snaha vnést požadované geny do kulturních plodin či laboratorních zvířat. Vlastnosti organismů, kterých bychom pomocí genetické modifikace dosáhli, bychom získávali šlechtěním velmi pomalu nebo vůbec. Význam transformace organismů do budoucna vzhledem k neustále vzrůstající početnosti lidské populace jistě poroste.

Jelikož výrobky z obilovin patří mezi nejvíce konzumované potraviny na světě, existuje snaha optimalizovat i podmínky pro jejich transformaci. Jednou z nejdůležitějších obilovin je pšenice. Pšenice je hojně využívána k výrobě pečiva, těstovin, ale taktéž jako objemné krmivo a stelivo (Drobník a kol. 2002).

3 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY

Geneticky modifikovanými organismy nazýváme organizmy, do jejichž genomu byla vnesena genetická informace z organismu jiného druhu. Tyto organizmy nazýváme též jako transgenní. Gen, který vnášíme do cizích organismů, pak označujeme jako transgen. Způsob, kterým vytvoříme takto modifikovaný organismus, se nazývá transformace. Pokud vnášíme geny do buněk rostlinných, nazýváme tento proces transgenozí. V dnešní době jsou známy způsoby, jimiž jsme schopni vnášet geny do rostlinného genomu. Nejčastěji je využíváno přímé vnášení DNA do rostlinných buněk pomocí mikroprojektilového přenosu DNA, nebo pomocí upravených půdních bakterií rodu *Agrobacterium*. Úsek DNA, jež vnášíme do rostlinného genomu, obsahuje zpravidla dva transgeny: selekční a hlavní, neboli zájmový gen. Selekční transgen umožňuje dělení pouze buňkám, v jejichž genomu se selekční transgen nachází. Zájmovým genem nazýváme gen, jehož projev je předmětem vědeckého nebo šlechtitelského zájmu. Kromě transgenů selekčního a hlavního se do inzertu vkládá také tzv. gen reportérový, jehož projev je snadno měřitelný a umožňuje nám detekovat přítomnost či nepřítomnost vneseného inzertu.

První transgenní rostliny se začaly pěstovat roku 1994 a od té doby se počet transgenních odrůd i plocha, na které jsou pěstovány, mnohonásobně zvýšili. Transgenní rostliny jsou dnes pěstovány především v USA, Kanadě, Argentině a Číně. Mezi nejhojněji hospodářsky využívané transgenní rostliny patří např. kukuřice, bavlník, brambor, rýže, řepka, sója a mnoho dalších (Drobník a kol., 2002).

První obilnina, u níž bylo dosaženo úspěšné genetické modifikace, byla kukuřice. Její transformace byla založena na přímém přenosu DNA (Sood a kol., 2011). Mechanismus přímého přenosu DNA s sebou ovšem nese řadu nevýhod. Proto vznikla snaha vyvinout jiný, efektivnější způsob transformace. Jako vhodná se jeví metoda transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Hensel a kol., 2009). Tato metoda nám umožňuje přenos dlouhých segmentů DNA za jejího minimálního přeuspořádání, vnesené geny jsou přítomny v méně kopiích a dokonce i transformační efektivita je oproti přímému vnášení genů vyšší, nemluvě o výhodnější finanční stránce této metody (Patnaik a kol., 2006).

3.1 Přímé vnášení DNA

Přirozenými hostiteli *Agrobacteria tumefaciens* jsou dvouděložné a nahosemenné rostliny. Transformace rostlin jednoděložných, mezi něž patří např. obilniny nebo cibuloviny, je proto poměrně obtížná. Nejrozšířenější metodou přímého přenosu DNA je metoda biolistická. Zatímco v prvopočátcích se využívalo přímé transgenozé prostřednictvím DNA pouze u rostlinných protoplastů, dnes lze tuto metodu aplikovat i na rostlinná pletiva, která jsou následně pěstována v podmínkách tkáňových kultur (Drobník a kol., 2002).

3.1.1 Vnášení DNA pomocí mikroprojektilů

Vnášení DNA pomocí mikroprojektilů, též microparticle bombardment, je metoda využívající DNA obalené částice wolframu, či zlata, které jsou vstřelovány do rostlinných buněk. Mikroprojektily jsou smíchány s roztokem obsahující plazmidovou DNA a další látky. Při laboratorní teplotě dochází k odpaření vody a ulpívání plazmidové DNA na mikroprojektilech. Ty jsou následně např. za pomoci vyrovnávání přetlaku hélia vstřelovány do rostlinných pletiv. Objekt vstřelování je umístěn ve vakuu. Explantát podrobený transformaci, např. embryo, je poté přemístěn na vhodné médium, zajišťující růst kalusu a současně selekci transgenních pletiv, za předpokladu, že jsme do něj vnášely gen zajišťující rezistenci vůči konkrétnímu antibiotiku. K tomu, aby došlo k zabudování transgenů do rostlinného genomu, musí mikroprojektil proniknout přes epidermis a cytoplazmu až do rostlinného jádra, zároveň je nutné, aby buňka zásah přežila (Drobník a Ondřej, 2002).

3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (*A. tumefaciens*) patří mezi půdní gramnegativní bakterie čeledi *Rhizobiaceae*. Tato bakterie je schopna vyvolat u většiny dvouděložných rostlin tvorbu nádorů typu crown-gall, zvaných krčkové nádory. Infekčnost *A. tumefaciens* je podmíněna přítomností velkého onkogenního tumor inducing (Ti) plazmidu o velikosti 200 000 párů bází, v němž se nachází oblast nukleotidů zvaná transferred DNA (T-DNA). Kromě T-DNA zde však také nalezneme geny zodpovědné za virulenci, geny zodpovědné za konjugativní přenos Ti plazmidu mezi jednotlivými buňkami *A. tumefaciens* a geny pro katabolismus opinů (Brown, 2007).

Opiny jsou látky syntetizované transformovanými rostlinnými buňkami, jimiž jsou také vylučovány do okolí a následně metabolizovány bakteriemi, které jejich tvorbu vyvolaly. Opiny slouží pro bakterie jako zdroj energie, dusíku a uhlíku. Dále se také podílí na indukci přenosu Ti plazmidu do dalších buněk *A. tumefaciens*. Na základě syntetizovaných opinů lze rozdělit *A. tumefaciens* na oktopinový nebo nopalínový typ. Na rozdíl od kompaktní T-DNA nopalínového typu je T-DNA oktopinového typu rozdělena na 2 úseky, označované jako úsek levý (TL) a úsek pravý (TR). Do genomu rostlin se mohou oba úseky začleňovat současně, ale také každý zvlášť. Geny zajišťující dediferenciaci a nádorové bujení jsou však umístěny pouze na levém úseku T-DNA, který tudíž nabývá větší důležitosti (Drobník a Ondřej, 2002).

Schopnost přenosu *A. tumefaciens* je zajištěna prostřednictvím plazmidových a chromozomálních virulentních genů. V průběhu hojení poraněných dvouděložných rostlin dochází k syntéze ligninu z fenolických prekurzorů. Tyto prekurzory jsou zároveň chemoatraktanty pro *A. tumefaciens* a induktory pro Ti-plazmidové virulentní geny, zvané vir-geny.

Mezi chromozomální bakteriální virulentní geny patří konstitutivně exprimované geny *chvA* a *chvB*. Zmíněné geny umožňují přichycení bakterie k rostlinné buňce pomocí celulózových vláken. (Procházka a kol., 1998). Dalším chromozomálním virulentním genem je *pscA*, jehož expresí vznikají bakteriální extracelulární polysacharidy. Konkrétní funkce genu *chvA* spočívá v syntéze proteinu podmiňujícího vylučování β -1,2-glukanu bakteriální buňkou do okolí. Za tvorbu β -1,2-glukanu je zodpovědný gen *chvB* (Drobník a Ondřej, 2002).

Mezi plazmidové bakteriální geny, označené jako vir-geny, patří geny *virA* až *virH*, přičemž gen *virA* a *virG* řídí transkripci ostatních vir-genů. Plazmidové virulentní geny

umožňují bakterii rozpoznat rostlinné buňky a podílí se na následném přenosu T-DNA (Procházka a kol., 1998).

Vir-geny kódují enzymy, jež jsou zapotřebí k vystřížení, přenosu a začlenění úseku T-DNA během procesu transformace. Konkrétní funkcí genu *virA* je kódování transmembránového proteinu bakterií, jež je citlivý na přítomnost fenolických látek v prostředí. Jedná se o stále aktivní gen s krátkou N-terminální periplazmatickou a dlouhou C-terminální cytoplazmatickou doménou, jež nese schopnost autofosforylace. Autofosforylací C-terminální domény genu *virA* dochází současně k aktivaci fosforylace genu *virG*, jehož expresí vzniká protein ovlivňující další vir-geny (Drobník a Ondřej, 2002).

Geny vir jsou na nízké úrovni exprimovány i v buňkách *A. tumefaciens*, žijících v půdě. Po styku bakterií s poraněnými rostlinnými buňkami, či jejich sekrety, však dochází k mnohonásobnému zvýšení exprese těchto genů. Mezi induktory vir-genů jsou řazeny fenolické látky, jako např. acetosyringon (Snustad a Simmons, 2009). Mezi látky acetosyringonového typu patří acetovanilon, vanilin, hydroxyacetofenon, kyselina sinapová, katechol, kyselina lysergová, kyselina galová, kyselina 4- hydroxybenzoová, kyselina β -resorcylová, kyselina ferulová, katechol, pyrogalol a další (Drobník a Ondřej, 2002).

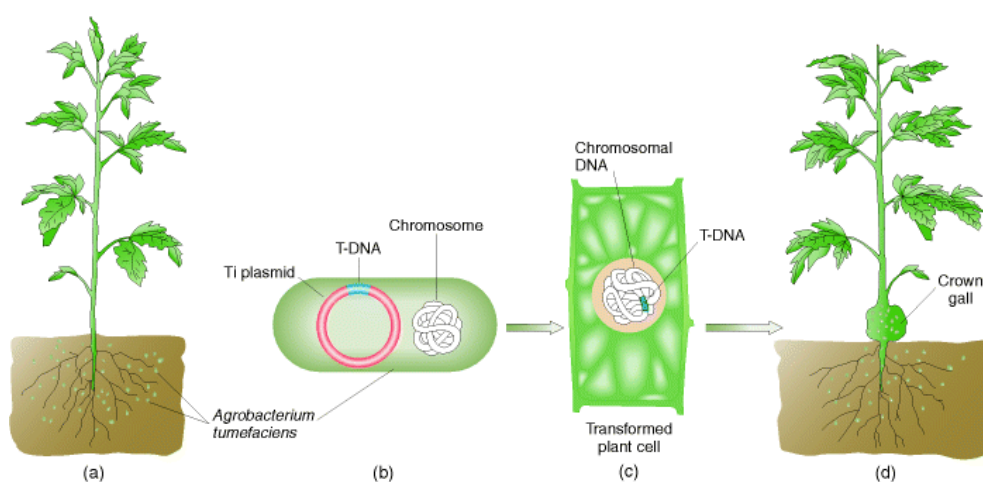
Působení acetosyringonu a jeho role při „doručení“ T-DNA byla prověřována Wu a kol., (2003). Nezralá embrya různých velikostí i odrůd byla 3 dny kultivována v přítomnosti *A. tumefaciens* na médiu s obsahem acetosyringonu o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ a na médiu, jež acetosyringon neobsahovalo. Přídavek 200 $\mu\text{mol/l}$ acetosyringonu do inokulačního a ko-kultivačního média způsobil signifikantní vzrůst efektivního doručení T-DNA. Vliv acetosyringonu na regeneraci a transformační efektivitu rostlin tvrdé pšenice, transformované *A. tumefaciens*, byl dále zkoumán ve studii He a kol., (2010). Ve výzkumu byla testována účinnost dvou koncentrací acetosyringonu, 2 mg/l a 5 mg/l, na regeneraci rostlin tvrdé pšenice a konečnou transformační efektivitu. Statisticky významný rozdíl vlivu média s acetosyringonem a bez něj na regeneraci a transformační efektivitu rostlin však nebyl pozorován.

V transformačním procesu hrají velmi důležitou roli tzv. hranice segmentu T-DNA, které jsou tvořeny přímým opakováním ne zcela shodných 25pb úseků DNA. Hlavní úlohu při transformaci plní pravá hraniční sekvence, od které přenos T-DNA začíná (Procházka a kol., 1998). Pro vyštěpení a přenos T-DNA musí být však vždy jedna z repetice přítomna ve formě cis (Snustad a Simmons, 2009).

Jakýkoliv úsek DNA vložený mezi tyto hranice může být dále transportován a integrován do rostlinného genomu. Struktura T-DNA je v rostlinné buňce stabilní a je jako nedílná součást chromozomu přenášena do dceřiných rostlinných buněk (Brown, 2007). Přenos T-DNA je nastartován zlomem na dolním vlákně T-DNA v jeho pravé, 25 párů bází dlouhé, hraniční sekvenci, a to mezi její třetí a čtvrtou bází.

Celý proces integrace T-DNA do rostlinného genomu lze shrnout následovně: *A. tumefaciens* rozpozná citlivé, poraněné rostlinné buňky, vylučující fenolické a jiné látky do prostředí. Přítomnost specifických látek následně způsobí aktivaci genů vir-oblasti Ti plazmidu, čímž dojde k vyvolání pozitivní chemotaxe *A. tumefaciens* k poraněným rostlinným buňkám. *A. tumefaciens* se díky tvorbě produktů genů *chvA*, *chvB* a *pscA* váží na rostlinné buňky. Zároveň dochází k vazbě signálních molekul na receptorové proteiny bakteriální buněčné stěny, za jejichž syntézu zodpovídá gen *virA*. Následuje přenos signálů přes bakteriální buněčnou stěnu a aktivace transkripce ostatních vir-genů (Drobník a Ondřej, 2002). Protein, vzniklý expresí *virD1*-genů, působí jako specifická nukleáza, která vyštěpí pravděpodobně jediné vlákno T-DNA (Procházka a kol., 1998). Poté dochází k uvolnění jednovláknových kopií T-DNA a vnesení za pomoci přenosového komplexu do buněčného jádra rostlinné buňky (Drobník a Ondřej, 2002). V konečné fázi dochází k integraci T-DNA do rostlinného genomu procesem náhodné (ilegitimní) rekombinace, která zajišťuje meiotickou a mitotickou stabilitu včleněné DNA.

Obrázek 1: Přenos *A. tumefaciens* do rostlin



Převzato z: www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003

3.2.1 Transformace pomocí *A. tumefaciens*

A. tumefaciens je přirozeným hostitelem dvouděložných rostlin, nikoliv však jednoděložných, mezi něž jsou řazeny také obilniny. Transformace jednoděložných rostlin je proto mnohonásobně obtížnější. Jednoděložné rostliny se od dvouděložných odlišují chemickým složením buněčných struktur (buněčná stěna), typem meristematických buněk, či schopností jejich dediferenciace. V důsledku toho procesy, jako chemotaxe, reakce a přichycení *A. tumefaciens* k poraněným buňkám, ale také přenos a integrace T-DNA do rostlinného genomu, probíhají odlišně. V současné době jsou vyvíjeny nové postupy, jejichž cílem je zvýšit efektivitu transformace jednoděložných rostlin pomocí *A. tumefaciens* (Sood a kol., 2011).

3.2.1.1 Vektory

Kointegrativní vektory:

Jako kointegrativní vektory jsou označovány kmeny *A. tumefaciens*, jejichž Ti plazmid nese modifikovanou T-DNA. Ta musí kromě konkrétního, vybraného genu obsahovat také selektovatelný gen. Prvním zkonstruovaným kointegrativním vektor nesl název pGV3850.

Binární vektory:

Jedná se o kmeny *A. tumefaciens*, u nichž byl Ti plazmid rozdělen na dva plazmidy menší. Jeden z plazmidů obsahuje pouze úsek virulence, druhý naopak nese pouze T-DNA a gen, zajišťující rezistenci vůči zvolenému antibiotiku.

K úpravám plazmidů a vnášení požadovaných genů jsou využívány bakterie *E. coli*. Pomocí specifické restriční endonukleázy dochází k vyštěpení kýženého genu z disponované DNA a jeho vložení do oblasti polylinkerové sekvence (restriční místo pro vestavění genu) T-DNA plazmidu. V T-DNA se kromě polylinkerové sekvence nachází také selektovatelný a často i reportérový gen. Plazmid je následně transformací dopraven do buněk *E. coli*. Bakterie, do nichž byl plazmid vložen, jsou vyselektovány a plazmid se v nich nechá namnožit. Poté je plazmid opětovně izolován, rozštěpen restričními enzymy a provádí se kontrola jeho struktury. Pokud je vše v pořádku, následuje jeho přenos z *E. coli* do *A. tumefaciens* transformací či bakteriální konjugací (Drobník a Ondřej, 2002).

3.2.1.2 Selekční a reportérové geny:

Selektovatelné geny, jež jsou vkládány do rostlinných buněk, nám umožňují detekovat ty z buněk, u nichž proběhl proces transformace úspěšně. K přenosu selektovatelných genů se využívá modifikovaný Ti plazmid, z něhož byly v předchozích krocích odstraněny geny zodpovědné za zvýšenou syntézu auxinů a cytokininů. Nejčastěji jsou do Ti plazmidu vnášeny geny zajišťující rezistenci vůči antibiotikům, která jsou záměrně přidávána do kultivačních médií. Selekční geny rozkládají antibiotika, čímž umožňují buňkám přežít. Buňky, které nebyly transformovány, jsou naopak antibiotiky likvidovány. Transgeny pro rezistenci k antibiotikům patří původně k bakteriálním genům, jejichž bakteriální regulační sekvence DNA, lokalizované na počátku a konci genu, byly vyměněny za rostlinné. Jedná se tedy o tzv. chimérické geny. Tato modifikace umožňuje expresi původně bakteriálních genů v rostlinách. Mezi nejpoužívanější selekční geny patří kanamycin a hygromycin (Drobník, a kol., 2002). Jako gen, zajišťující rezistenci vůči kanamycinu je používán gen *nptII*, kódující neomycinfosfotransferázu II. Pro rezistenci vůči hygromycinu je využíván gen odvozený od *aphIV Escherichia coli* (*E. coli*), kódující hygromycinfosfotransferázu (Drobník a Ondřej, 2002).

Reportérové, čili signální geny, vytváří biochemické produkty, které lze snadno detekovat a následně kvantitativně hodnotit. I zde jsou využívány chimérické geny, obsahující jak rostlinnou, tak bakteriální či živočišnou DNA. Mezi dnes využívané reportérové geny patří transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu, β -glukuronidázu, luciferázu či pro zeleně fluoreskující protein (*GFP*). Za nejúspěšnější signální gen je v dnešní době považován transgen pro β -glukuronidázu, označovaný jako *GUS*. Vhodné substráty jsou štěpeny za vzniku modrého zbarvení nebo fluoreskujících látek. Jako substráty pro reakci jsou používány různé β -glukuronidy. Mezi metody detekující *GUS* aktivitu patří fluorescenční a histochemická metoda. Jako substrát při fluorescenční metodě slouží 4-methyl-umbelliferylgukuronid (MUG), při histochemické metodě je využíván 5-brom-4-chlor-3-indolylgukuronid (X-gluc) (Drobník, Ondřej, 2002).

4 PŠENICE

Pšenice patří beze sporu mezi nejvýznamnější kulturní plodiny na světě. Původ této významné obiloviny najdeme v Přední Asii, některé odrůdy však pochází taktéž z Etiopie. Odtud se pšenice rozšířila do Evropy a následně také do Ameriky. Jedná se o samosprašnou rostlinu, přesto může být zřídka opylena i cizím pylem za vzniku přirozených hybridů.

Z botanického hlediska řadíme pšenici mezi jednoděložné krytosemenné rostliny, spadající do čeledi lipnicovitých. Rod *Triticum* je rozdělen na 15 druhů, které jsou na základě počtu chromozómů dále členěny na 3 skupiny, a to na pšenice hexaploidní se 42 chromozómy, pšenice tetraploidní s 28 chromozómy a pšenice diploidní se 14 chromozómy. Každou z vyjmenovaných skupin lze dále dělit na pšenice nahé, čili bezpluchaté, pšenice pluchaté a pšenice plané neboli divoké. Dále dělíme pšenice podle typu vývoje na ozimé a jarní.

Veškeré obiloviny se skládají z nadzemních orgánů, zahrnujících stébla s listy a klasy a podzemních orgánů, tedy kořenů. Klíčící obilka pšenice vytváří nejprve 3 zárodečné kořínky. Ty prorůstají do hloubky, kde se rozvětvují a zprostředkovávají výživu rostlinky. Z odnožovací uzliny se poté vytváří adventivní, čili korunkové svazčité kořeny. Listy pšenice jsou tmavě zelené, povětšinou široké a holé, nebo pouze s ojedinělými chloupky, které opadávají. Květenstvím je klas, složený z článkovitého věténka, na jehož obou stranách se nachází klásky. Každý klásek tvoří dvě široké, krátké plevy a kvítky. Kvítek uzavírají dvě pluchy, a to větší vnější plucha a menší vnitřní pluška. U některých odrůd pšenice se setkáváme s pluchami prodlouženými v dlouhé štětinové osiny. Plodem pšenice je obilní zrna neboli obilka. Jedná se o jednosemennou nažku, jejíž slupka je tvořena oplodím na vnější straně a osemením na straně vnitřní.

Pšenice má ze všech obilovin největší nároky na složení půdy. Její optimální růst vyžaduje hluboké a jílovité půdy. Naopak, půdy suché, mělké, písčité, kamenité a silněji kyselé jsou pro pšenici naprosto nevyhovující. Pšenice, stejně tak jako další obiloviny, hraje významnou roli ve výživě lidské společnosti díky své vysoké výživné hodnotě. Obilné zrna obsahuje zvláště glycidy, mezi které řadíme škrob, ale také bílkoviny, minerální látky a vitamíny skupiny B, D a E. Z nutričního hlediska se klade největší důraz na přítomnost bílkovin, které jsou v obilninách tvořeny převážně gluteninem a gliadinem (Špaldon, E. a kol., 1963).

Tabulka 1: Srovnávací tabulka transformace pšenice pomocí *A. tumefaciens* za období 2005 -2011

Rok	Odrůda	Explantát	Vektor	Gen	Efektivita transformace	Citace
2005	<i>Triticum aestivum</i> (Florida, Fielder, Cadenza)	Nezralá embrya	pAL154, pAL156	<i>Bar</i> , <i>uidA</i>	±1 %	Wu a kol.
2006	<i>Triticum aestivum</i> (Shirane komugi)	„In planta“ (klas na rostlině)	pIG121-Hm, pBI-res	<i>NptII</i> , <i>Hpt</i> , <i>Gus</i>	29-38 %	Supartana a kol.
2006	<i>Triticum aestivum</i> (HD2329, CPAN1676, PBW343)	Zralá embrya	pCAMBIA 3301, pBI101	<i>NptII</i> , <i>Gus</i>	1,6-1,77 %	Patnaik a kol.
2006	<i>Triticum durum</i> (PDW215, PDW233, WH896)	Zralá embrya	pCAMBIA 3301, pBI101	<i>NptII</i> , <i>Gus</i>	1,28-1,54 %	Patnaik a kol.
2007	<i>Triticum durum</i> (Ofanto)	Nezralá embrya	pAL154, pAL156, pAL155, pSoup	<i>Bar</i> , <i>gusA</i>	0-3,1 %	Wu a kol.
2009	<i>Triticum aestivum</i> (EM12)	Zralá embrya	pBI121	<i>NptII</i> , <i>Gus</i>	0,9 %	Ding a kol.
2009	<i>Triticum aestivum</i> (Certo)	Nezralá embrya	pSB187	<i>Hpt</i> , <i>Sgfp</i>	2-10 %	Hensel a kol.
2010	<i>Triticum durum</i> (Stewart)	Nezralá embrya	pAL154, pAL156	<i>Bar</i> , <i>Gus A</i>	6,3 %	He a kol.

Tabulka 2: Časový vývoj metod transformace pšenice (Jones a Lazzen, 2009)

Rok	Typ pšenice	Způsob transformace
1992	Jarní pšenice	Particle bombardment
1993	Ozimá pšenice	Particle bombardment
1997	Jarní pšenice	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
1997	Tvrdá pšenice	Particle bombardment
2003	Ozimá pšenice	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
2007	Tvrdá pšenice	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

5 REGENERACE *IN VITRO*

K tomu, abychom získali dospělé rostliny z vyextirpovaných a následně transformovaných embryí, slouží proces regenerace. Regeneraci rostlin lze definovat jako obnovu porušené celistvosti. Pokud regenerace probíhá za tzv. normálních podmínek, hovoříme o regeneraci *in vivo*. Pokud ovšem tato regenerace probíhá v nádobách se sterilním prostředím a definovaným médiem, jedná se o regeneraci *in vitro*. Části rostlin, které izolujeme za účelem *in vitro* kultivace potom nazýváme jako explantáty. Mezi explantáty řadíme spory, nezralá a zralá embrya, semena, orgány, pletiva, jednotlivé buňky, ale také buňky zbavené buněčných stěn, tedy protoplasty. Na vývoj explantátů má vliv mnoho různých faktorů, mezi něž patří složení kultivačních médií, kvalita, intenzita a fotoperioda světla, teplota a případně i plynná složka kultivačního prostředí (Procházka a kol., 1998).

Dalšími faktory, které by potencionálně mohly ovlivňovat embryogenezi u pšenice, se zabývali León a kol., (2006). Mezi sledované faktory ovlivňující embryogenezi patřila teplota, velikost embrya a část klasu, z něhož bylo embryo odebráno.

Nejvyšších hodnot frekvence embryogeneze, regenerace a počtu regenerovaných rostlin na explantát bylo dosaženo po využití prvního ze tří možných klasů, tedy klasu z hlavního stonku, jako zdroje embryí. Embrya použitá ze druhého a třetího klasu vykazovala menší hodnoty jak v jejich regenerační kapacitě, tak v množství regenerovaných rostlin, připadajících na jeden explantát.

Druhým zkoumaným faktorem byla velikost embrya použitého k procesu regenerace. Optimální rozmezí velikosti embryí se v závislosti na genotypu vybraných odrůd lišilo. Odrůdy Anza a Perico vykazovaly nejvyšší embryogenní kapacitu při velikosti embrya, které bylo menší než 1 mm. Naopak, odrůda Bob White vykazovala nejvyšší embryogenní kapacitu při velikosti embrya až do 2 mm. Pokud však velikost embrya překročila hranici 2 mm, embryogenní kapacita ztelně poklesla.

Třetí zkoumaný parametr, ovlivňující somatickou embryogenezi, regeneraci a množství nově utvořených rostlin na explantát, byl vliv kultivační teploty. Optimální kultivační teplota je stejně jako vhodná velikost embryí, ovlivněná genotypem dané rostliny. Zatímco ideální kultivační teplotou pro většinu odrůd pšenice je 25 °C, pro odrůdy Anza a Perico odpovídá optimální kultivační teplota 21 °C.

5.1 Morfogeneze – regenerace *in vitro*

Regenerace *in vitro* je u explantátů také často nazývána morfogenezí. Morfogenezí rozumíme vytváření organizovaných struktur, tedy orgánů. Jeden ze základních předpokladů regenerace je schopnost dediferenciace, buněčného dělení a následné diferenciaci rostlinných buněk. To znamená, že jakákoliv plnohodnotná rostlinná buňka je schopná dát vzniku nové rostlině. Tuto schopnost rostlinných buněk označujeme jako totipotence. K tomu, aby vznikla celistvá rostlina je kromě schopnosti totipotence potřeba také existence apoptózy, tedy organizované buněčné smrti určitých konkrétních buněk.

Regeneraci lze také rozdělit na regeneraci přímou a nepřímou. Pokud dochází k regeneraci přímo na izolovaném pletivu ze založených základů, nebo *de novo*, tím, že se dediferencované buňky začnou podílet na vytváření nových struktur, jedná se o regeneraci přímou. Pokud je nejdříve vytvořen kalus, z něhož se až po změně kultivačních podmínek vytváří zcela nové struktury, hovoříme o regeneraci nepřímé. Za nepřímou regeneraci tedy označujeme proces, kdy se mezi původní organizovanou strukturou explantátu a nově vzniklou organizovanou strukturou nachází stádium kalusu. Kalus lze definovat jako amorfní, neorganizované, dediferencované pletivo bez zjevné polarity. Na to, jakou vývojovou cestou se budou izolované explanty ubírat, hrají roli genotyp a kvalita donorové rostliny, orientace explantátu, období odběru explantátu, orgán, z něž byl explantát izolován, fyziologické a onkologické stádium explantátu, velikost explantátu, předchozí působení na donorovou rostlinu a inokulační hustota. V dnešní době se za jeden z nejdůležitějších faktorů udává genotyp donorové rostliny.

V *in vitro* podmínkách rozlišujeme dva směry, kterými se regenerace může ubírat, a to buď cestou organogeneze nebo embryogeneze. Embryogenezi dále rozlišujeme na embryogenezi zygotickou, somatickou, gametofytickou a somatickou polyembryogenezi. Embryogeneze je proces, při němž dochází k vývoji zárodku z jediné buňky (Procházka, S. a kol., 1998).

Na rozdíl od dvouděložných rostlin, obilniny, a jednoděložné rostliny všeobecně, špatně regenerují rostliny z listů. Za účelem regenerace obilnin lze ovšem využít např. nezralá embrya, embryogenetické pylové kultury, semenník či izolované buňky zárodečného vaku (Hensel a kol., 2009).

5.1.1 Somatická embryogeneze

Somatickou embryogenezi lze definovat jako proces, při němž se somatické buňky diferencují v somatická embrya. Tato proměna zahrnuje několik dílčích kroků, počínaje tvorbou proembryogenetické masy, pokračuje přes formaci somatického embrya, jeho zrání a následné vysychání a rostlinnou regeneraci konče. Somatická embrya se podobají embryím zygotickým. Nalezneme u nich bipolární strukturu nesoucí typické embryonální orgány, zahrnující kořínek, hypocotyl a dělohy. Vývoj somatického embrya může jít cestou přímé či nepřímé embryogeneze. V případě nepřímé embryogeneze je vytvářen tzv. embryogenetický kalus, složený z proembryogenetické masy.

Tvorba embryogenetických kalusů je umožněna sériemi buněčných, asymetrických dělení a zároveň kontrolovaným buněčným růstem. Za asymetrická dělení jsou zodpovědné růstové regulátory, nízké pH prostředí a elektrické pole vytvořené okolo buněk. K iniciaci proliferace proembryogenetické masy je zapotřebí přítomnosti auxinu, který vyvolá acidifikaci buněčné cytoplazmy, nebo/a buněčné stěny, čímž je umožněno polarizované dělení.

Na zrání somatických embryí se podílí přítomnost etylenu, osmotický stres, pH prostředí a fotoperioda. Pouze zralá embrya s normální morfologií, dostatkem nastřádaných zásobních látek a získanou tolerancí vůči vysušení, jsou schopná vytvářet normální rostliny.

Somatická embrya jsou využívána ke studiím regulace embryonálního vývoje, nebo se využívají pro genetické manipulace (Von Arnold a kol., 2002).

5.2 Kultivační média

Pro jednotlivé druhy rostlin a určitý typ explantátu jsou komerčně vyráběna kultivační média, která obsahují makroelementy, mikroelementy, vitamíny a ostatní látky. Podle účelu kultivace (organogeneze, embryogeneze) lze specifikovat typ a složení kultivačního média (Hall, 1999).

5.2.1 Komponenty kultivačního média dle Hall, (1999)

1. Anorganické látky

A) makroelementy – vyskytují se v mM koncentraci a zahrnují N, P, S, Ca, K, a Mg

B) mikroelementy – jsou přítomny v μ M koncentraci, patří mezi ně B, Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo a Zn, taktéž zde řadíme Ni a Al

2. Organické látky

A) aminokyseliny

B) vitamíny – nejčastěji jsou přidávány thiamin, pyridoxin, kys. nikotinová a myoinositol

C) zdroj uhlíku – řadíme zde sukrozu, glukózu a maltózu

D) fytohormony – mezi nejčastěji přidávané fytohormony patří auxiny a cytokininy, o fytohormonech budu pojednávat v následující podkapitole

E) antibiotika – nutná při transformačních experimentech

F) želírující částice – např. agar, agaróza, fytigel, geltrit

G) ostatní přídavné látky – např. kokosové mléko (kultury protoplastů)

5.3 Fytohormony

Na vývoj explantátů má vliv mnoho různých faktorů, mezi něž patří složení kultivačního média, světelná složka a další. V kultivačních médiích hraje obzvláště významnou roli přítomnost specifických rostlinných signálních látek, fytohormonů.

Fytohormony jsou nízkomolekulární signální látky, které se přirozeně nachází v rostlině v nízkých koncentracích. Jejich funkcí je přenos informací mezi rostlinnými pletivy a orgány. Fytohormony patří mezi přirozené rostlinné metabolity, které jsou rozeznávány specifickými buněčnými receptory, jejichž počet je určující pro citlivost buňky k signálu. O tom, jakou reakci fytohormony v rostlině vyvolají, rozhoduje koncentrace každého z nich i jejich vzájemná interakce (Pavlová, 2005).

Syntéza fytohormonů není vázána na konkrétní rostlinný orgán. Jejich produkce probíhá v různých pletivech různých orgánů a různou rychlostí. O času a lokalitě jejich syntézy rozhodují stimuly z vnějšího prostředí. Účinná koncentrace rostlinných hormonů je kontrolována několika pochody, zahrnujícími jejich biosyntézu, inaktivaci, degradaci a transport. Fytohormony, na rozdíl od živočišných hormonů, působí pleiotropně, čili ve více směrech. Jeden fytohormon může vyvolat kvalitativně odlišné účinky v různých pletivech, ale i v tomtéž pletivu v odlišných koncentracích. Fytohormony mohou být v rostlině transportovány mezi jednotlivými buňkami, stejně tak, jako vodivými drahami

Fytohormony jsou na základě své chemické struktury rozděleny na auxiny, cytokininy, gibereliny, etylén a kyselinu abscisovou. V posledních letech byly taktéž objeveny další látky fytohormonálního charakteru, jako kyselina jasmonová, brassinosteroidy, kyselina salicylová a další. V dnešní době jsou již běžně laboratorně připravovány syntetické látky, jejichž struktura se podobá struktuře fytohormonů. Tyto látky mohou být rostlinami přijímány a dále v rostlině fungovat jako její přirozené růstové regulátory (Luštinec a Žárský, 2005).

Fytohormony patří mezi významné složky kultivačních médií určených k indukci tvorby kalusů a regeneraci rostlin. Jedny z nejvýznamnějších a taky nejpoužívanějších fytohormonů v procesu regenerace jsou auxiny a cytokininy, o nichž budu pojednávat v následujících podkapitolách.

5.3.1 Auxiny

Auxiny jsou růstové regulátory ovlivňující řadu důležitých pochodů, odehrávajících se v rostlině. Auxiny podporují prodlužovací růst buněk, jsou zodpovědné za apikální dominanci rostlin, stimulují tvorbu laterálních a adventivních kořenů, či diferenciaci vodivých pletiv a aktivitu kambia. Syntetické auxiny jsou pro své zakořeňovací schopnosti běžně využívány v zahradnictví při vegetativním množení rostlin. Mezi další vlastnosti auxinu dále řadíme oddalování opadu listů a vliv na růst plodů. Auxiny jsou vytvářeny již v časných vývojových stádiích embrya, v nichž hrají zásadní roli při jejich polarizaci. Nejjednodušší auxin, kyselina indolyl-3-octová, se vytváří v mladých, rychle se dělících buňkách (Pavlová, 2005).

Auxiny hrají taktéž důležitou roli v aktivaci genů zapojených v buněčné dediferenciaci a dělení a zvyšují pravděpodobnost integrace cizí DNA do buněk v S fázi buněčného cyklu (He a kol., 2010).

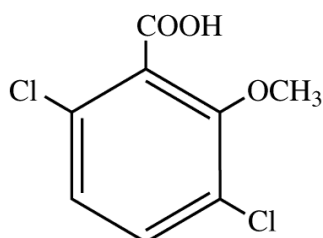
Zhruba od poloviny minulého století se začaly v zahradnictví a zemědělství hojně používat auxiny syntetické. Zabraňují časnému opadávání plodů a listů, podporují kvetení např. ananasovníku a v neposlední řadě jsou používány pro zakořeňování rostlinných řízků. Syntetické auxiny jsou taktéž v širokém měřítku využívány jako herbicidy. Efektivita syntetických auxinů spočívá v neschopnosti rostlin metabolizovat syntetické auxiny stejně rychle, jako kyselinu indolyl-3-octovou. Také transport některých syntetických auxinů je znatelně pomalejší než transport přirozené indolyl-3-octové kyseliny, díky čemuž je rostlina dlouhodobě vystavena jejich působení, které má negativní vliv na jejich viabilitu (Taiz a Zeiger, 2010).

Mezi nejčastěji používané syntetické auxiny patří picloram, kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina 3,6-dichloro-2-methoxybenzoová (dicamba). Role, kterou hrají tyto syntetické auxiny na regenerační efektivitu pšenice, byla zkoumána Przetakiewicz a kol., (2003). Ve výzkumu byly testovány 3 mg/l picloramu, 3 mg/l 2,4-D a 3 mg/l dicamby, nebo jejich vzájemné kombinace o celkové koncentraci 3 mg/l, které byly samostatně přidány do kultivačního MSB média. Regenerační efektivita byla pozorována na nezralých embryích. Nejlepší regenerační efektivita u pěti pšeničných kultivarů byla pozorována u kultivačního média obsahující syntetický auxin dicambu a taktéž na médiu s kombinací hormonů picloramu a 2,4-D. Zatímco nejnižší regenerační aktivita byla pozorována u embryí kultivaru Torca, umístěných na kultivační médium s 3 mg/l picloramu, a to pouze 25 %, nejvyšší regenerační efektivita byla pozorována u embryí pšeničné odrůdy Bob White, umístěných na kultivační médium obsahující 3 mg/l

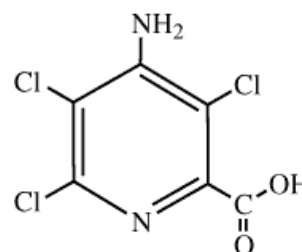
dicamby, a to 95 %. Současně bylo zjištěno, že je vliv auxinů na regeneraci pšenice genotypicky závislý. Pšeničná odrůda poskytující nejlepší regenerační efektivitu u největšího počtu kultivačních médií byl kultivar Bob White.

Ve výzkumu Bahieldin a kol., (2000), byl porovnáván účinek dicamby a 2,4-D na stonkovou regeneraci rostliny. Z prováděných testů vyplynulo, že lepší regenerační účinek z uvedených hormonů poskytuje syntetický auxin dicamba.

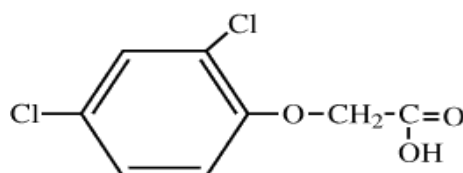
Ve výzkumu, pod vedením He a kol., (2010) se zabývali efektem vzrůstající koncentrace picloramu v ko-kultivačním médiu na embryogenezi, regeneraci a finální transformační efektivitu tvrdé pšenice transformované *A. tumefaciens*. Testované koncentrace picloramu byly 2, 4 a 10 mg/l. Výsledky pozorování ukázaly, že nejvyšších hodnot u všech tří sledovaných kritérií, bylo dosaženo při koncentraci picloramu 10 mg/l. Velmi podobných výsledků však bylo dosaženo také po použití picloramu o koncentraci 4 mg/l. Jelikož se však s vysokou koncentrací zvýšila i pravděpodobnost výskytu somaklonálních mutací, došli vědci k názoru, že nejlepší koncentrace picloramu pro embryogenezi, regeneraci a výslednou transformační efektivitu tvrdé pšenice transformované *A. tumefaciens*, je 4 mg/l. Přesto výsledky ukázaly, že konečná transformační efektivita proporčně neodpovídá frekvenci embryogeneze a regenerace.



Obrázek 2: Dicamba
www.farmchemicalsinternational.com



Obrázek 3: Picloram
www.farmchemicalsinternational.com



Obrázek 4: 2,4-D
www.farmchemicalsinternational.com

5.3.2 Cytokininy

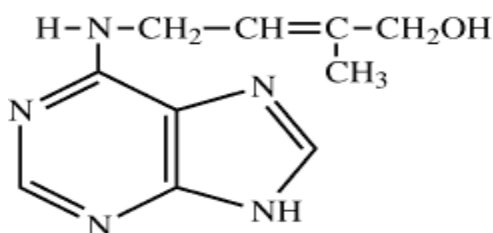
V dnešní době je známo více než 30 přirozených cytokininů a zhruba 200 látek s cytokininovou aktivitou. Jedná se o N-6 substituované deriváty adeninu. Substituenty mohou být pětiuhlíkatý řetězec nebo aromatické jádro, jehož modifikací vzniká cytokinin zvaný topolin.

Syntéza cytokininů probíhá v mladých listech, kořenech, embryích a plodech. Hlavním místem produkce cytokininů je apikální kořenový meristém. Z něj se prostřednictvím xylému dostávají do nadzemních částí rostliny v podobě inaktivních sacharidových konjugátů. Hormonálně aktivní jsou pouze cytokininy volné.

Cytokininy se podílí na regulaci buněčného dělení, stimulují vývoj axilárních pupenů, snižují apikální dominanci, ovlivňují transportní procesy v rostlině, působí na diferenciaci vodivých pletiv v kořenu, urychlují diferenciaci chloroplastů při deetiolaci, oddalují senescenci listu a zvětšují jeho objem. (Pavlová, 2005).

Cytokininy jsou díky svým účinkům důležitou komponentou živných médií pro kultivaci izolovaných rostlinných buněk, pletiv a orgánů. Cytokininy jsou společně s auxiny velmi důležitým faktorem pro regeneraci rostlin. Jejich poměr je určující pro směr, jímž se bude regenerace ubírat. Vyvážený poměr auxinů a cytokininů vyvolává tvorbu amorfního, dediferenciovaného pletiva, tedy kalusů. Přidáním cytokininů dochází k regeneraci nadzemní části rostliny, naopak, nadbytek auxinu indukuje regeneraci kořenů (Procházka a kol., 1998). V zahradnictví jsou cytokininy využívány ke stimulaci větvení stonků okrasných rostlin (Taiz a Zeiger, 2010).

Nejjednodušším přírodním cytokininem je zeatin, který se vyskytuje jak ve formě *cis*, tak *trans*, přičemž forma *trans* je fyziologicky efektivnější. Mezi přírodní cytokininy patří také dihydrozeatin a izopentenyladenin. Mezi syntetické cytokininy patří např. kinetin, tedy furfuryladenin a benzylaminopurin (BAP) (Luštinec a Žárský, 2005).



Obrázek 5: Zeatin
www.farmchemicalsinternational.com

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty v rámci bakalářské práce byly použity odrůdy jarní i ozimí pšenice. Charakteristika jednotlivých odrůd:

Odrůda Elly

Jedná se o velmi ranou odrůdu kompenzačního typu se střední intenzitou odnožování a vysokou mrazuvzdorností. Elly se vyznačuje vysokým obsahem dusíkatých látek a také vysokou objemovou hmotností. Délka stébla dosahuje střední délky (95 cm) a je charakterizováno střední odolností poléhání. Je vhodná pro pekařské zpracování. Odrůda vyniká dobrým zdravotním stavem. V experimentu byla použita zralá i nezralá zygotická embrya. U nezralých zygotických embryí byla testována regenerační kapacita. Zralá zygotická embrya byla použita za účelem transformace (www.selgen.cz).

Odrůda Granny

Granny je středně raná osinatá odrůda se střední až nižší odnožovací schopností. Vyznačuje se vysokou objemovou hmotností, avšak nízkým obsahem dusíkatých látek. Má krátké stéblo s dobrou odolností k poléhání. Odrůda je vhodná pro pekařské zpracování. Odrůda se vyznačuje dobrým zdravotním stavem. V experimentu byla použita nezralá zygotická embrya za účelem transformace (Horáková a kol., 2009).

Odrůda Jindra

Jindra je velmi raná, osinatá, dobře odnožující odrůda se středním obsahem dusíkatých látek. Vyznačuje se vysokou objemovou hmotností a vysokým výnosem. Rostliny mají středně dlouhá stébla se střední odolností vůči poléhání. Je vhodná pro pekařské zpracování. Odrůda vyniká dobrým zdravotním stavem. V experimentu byla použita nezralá zygotická embrya, u nichž byla testována regenerační kapacita (www.selgen.cz).

Odrůda Sirael

Sirael je poloraná odrůda s vysokým obsahem dusíkatých látek, avšak nevhodná pro využití v pekařství. Rostliny mají středně vysoká až nízká stébla se střední odolností proti poléhání. Odrůda se vyznačuje vysokým výnosem zrna, ale také nízkou objemovou hmotností. Zdravotní stav odrůdy je hodnocen jako středně dobrý. V experimentu byla použita nezralá zygotická embrya, u nichž byla testována regenerační kapacita a následně provedena transformace (www.selgen.cz).

Odrůda Matylda

Jedná se o velmi ranou odrůdu se střední intenzitou odnožování a vysokou mrazuvzdorností. Matylda se vyznačuje vysokým obsahem dusíkatých látek a vysokou objemovou hmotností. Délka stébla dosahuje střední délky a je charakterizováno střední odolností poléhání. Je vhodná pro pekařské zpracování. Odrůda vyniká dobrým zdravotním stavem. V experimentu byla použita zralá zygotická embrya za účelem transformace (www.selgen.cz).

Odrůda Bob White

Jedná se o jarní odrůdu, jež byla vyšlechtěna roku 1970 centrem CIMMYT v Mexiku. Jedná se o linii odvozenou z mezidruhového hybridu CM 33203, který vznikl křížením odrůd Aurora, Kalyan, Bluebird/3 a odrůdy Woodpecker. V experimentu byla použita nezralá a zralá zygotická embrya za účelem transformace.

Všechny odrůdy pšenice byly pěstovány ve skleníku s fotoperiodou 16/8 h (světlo/tma), při teplotě 18 – 20 °C den, 10 – 14 °C noc. Ozimé odrůdy pšenic odrůd byly jarovizovány po dobu 8 týdnů při teplotě 4 – 5 °C s 12 hodinovou fotoperiodou. Z nezralých a zralých semen byly po sterilizaci ve flowboxu izolována embrya. V rámci experimentu byly vyzkoušeny různé způsoby sterilizace. Testovány byly různé sterilizační roztoky, délka jejich působení a počet opakování (Tabulka 3, Tabulka 4).

6.2 Sterilizace embryí

Tabulka 3: Postup sterilizace nezralých zygotických embryí

Použitý roztok	Objem [ml]	Doba působení [min]	Počet opakování
Etanol (70 %)	100	3	1
Hypochlorid sodný (6 %)	100	4	1
Destilovaná voda	100	5	5

Tabulka 4: Postup sterilizace zralých zygotických embryí

Den	Použitý roztok	Objem [ml]	Doba působení [min]	Počet opakování
1	Etanol (70 %)	100	3	1
	Hypochlorid sodný (7 %)	100	10	1
	Destilovaná voda	100	5	4
2	Hypochlorid sodný (7 %)	100	5	1
	Destilovaná voda	100	5	4

6.3 Izolace embryí

Z vysterilizovaných semen byla v aseptických podmínkách izolována nezralá/zralá zygotická embrya za použití stereomikroskopu, skalpele a pinzety. Před jejich přemístěním na indukční kultivační média byla embrya zbavena koleoptile a následně po třiceti kusech a třech opakováních rozmístěna na kultivační média v 10 cm Petriho miskách.

6.4 Kultivace embryí

Zygotická embrya byla kultivována na různých kultivačních médiích. Složení kultivačních médií je uvedeno v tabulce 6. Postup kultivace u netransformovaných zygotických embryí a embryí transformovaných *A. tumefaciens* byl shodný.

6.4.1 Kultivace zygotických embryí určených k optimalizaci *in vitro* podmínek

Izolovaná zygotická embrya, určená pro *in vitro* kultivaci, byla přemístěna na indukční médium ICPŠ/CI a pasážována 3krát po 14 dnech na čerstvé médium.

Po 6 týdnech kultivace na indukčním médiu, byly kalusy přeneseny na "přechodné" médium označené transitní. Explantáty byly kultivovány v pološeru a pasážovány 2krát po 14 dnech. Regenerované mladé rostlinky a kalusy se zelenými centry byly přeneseny na regenerační médium, na kterém byly opět kultivovány po dobu 4 týdnů. Kultivační podmínky jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Kultivace zygotických embryí v *in vitro* podmínkách

Podmínky	Indukční médium	Transitní médium	Regenerační médium
Světelné podmínky	tma	Pološero	Světlo
Teplota [°C]	26	23	23
Doba kultivace	6 týdnů	2 týdny	4 týdny

6.4.2 Kultivační média

Složení kultivačního média zásadně ovlivňuje další vývojové pochody v explantátu. Proto je nutné zvolit správné látky a jejich poměry.

6.4.2.1 Příprava kultivačních médií:

Složky kultivačního média byly naváženy na analytických váhách a rozpuštěny v destilované vodě mícháním na magnetické míchačce. Fytigel byl rozpuštěn v destilované vodě a vysterilizován v autoklávu při 120 °C po dobu 20 min. Pomocí NaOH bylo upraveno pH média na 5,8. Poté bylo kultivační médium vysterilizováno filtrací a ve vodní lázni, společně s vyautoklávovaným fytagelem, zahřáto na teplotu 56 °C. Kultivační médium bylo v aseptických podmínkách smícháno s fytagelem a rozlito do 10 cm Petriho misek.

6.4.2.2 Složení kultivačních médií:

Složení kultivačních médií pro jednotlivé experimenty je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6: Složení kultivačních médií v experimentu optimalizace *in vitro* systému

TYP MÉDIA	NÁZEV MÉDIA	HORMONY	SLOŽENÍ
INDUKČNÍ	ICPŠ	[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
	CI	[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]

TYP MÉDIA	NÁZEV MÉDIA	HORMONY	SLOŽENÍ
TRANSITNÍ A REGENERAČNÍ	ICPŠ	[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
	CI	[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]
		[REDACTED]	[REDACTED]

* (Murashige a Skoog, 1962)

Ke kultivaci transformovaných zygotických embryí bylo vybráno indukční médium ICPŠ (2,5 mg/l dicamba) a transitní/regenerační RPŠ médium (5 mg/l zeatin, 0,1 mg/l 2,4-D). Složení médií je uvedeno v tabulce 6. Do všech typů médií, určených ke kultivaci transformovaných zygotických embryí, byla přidána antibiotika hygromycin (50 mg/l) a timentin (160 mg/l).

6.5 Vnášený vektor

V rámci experimentu byl použit supervirulentní kmen půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen AGL1

Vnášený vektor pBRACT 214 obsahující zájmový gen pro plášťový protein (CP) zakrslosti pšenice (Wheat Dwarf Virus - WDV). Transformace ječmene a pšenice tímto vektorem je řešena v rámci spolupráce s Výzkumným ústavem rostlinné výroby, v.v.i, Praha – Ruzyně.

6.6 Transformace zygotických embryí bakterií *A. tumefaciens*

6.6.1 Kultivace *A. tumefaciens*

1. Do 10 ml sterilního MG/L média s kanamycinem (50 mg/l) bylo napipetováno 50 µl *A. tumefaciens* (57/2)
2. Zkumavky byly přemístěny na třepačku a bakterie byly kultivovány přes noc při 28 °C.
3. Koncentrace bakterií byla ověřena měřením absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Ideální absorbance by měla být vyšší než 0,6.
4. MGL médium s buňkami byly 20 min centrifugovány při 5000 ot. (g =2500) a 4 °C.
5. Supernatant byl ze zkumavky slit do GMO odpadu.
6. Pelet bakterií byl ve zkumavce rozpuštěn ve stejném objemu MG/L.

6.6.2 Transformace zygotických embryí *Agrobacterium tumefaciens*



7 VÝSLEDKY

V rámci bakalářské práce byla testována indukční a regenerační kapacita pšenice, odrůd Sirael, Jindra a Elly. Pro indukci kalusu byla použita nezralá zygotická embrya. Každá odrůda byla kultivována na všech variantách indukčního a transitního/regeneračního kultivačního média. Složení kultivačních médií je uvedeno v tabulce 6.

Dalším cílem bakalářské práce byla transformace pšenice pomocí půdní bakterie *A. tumefaciens*, kmen AGL1. Transformována byla zralá zygotická embrya pšeničné odrůdy Elly, Matylda a Bob White a nezralá zygotická embrya odrůdy Sirael, Granny a Bob White. Jako vektor byl použit pBRAC214, nesoucí gen pro CP protein WDV.

Výsledky bakalářské práce byly statisticky zpracovány programem UNISTAT. Experimentální údaje byly hodnoceny dvoufaktoriální analýzou variance (ANOVA). Statisticky vysoce průkazné rozdíly ($P \leq 0,05$) jsou označeny *, statisticky vysoce průkazné rozdíly ($P \leq 0,01$) jsou označeny **, statisticky velmi vysoce průkazné rozdíly ($P \leq 0,001$) jsou označeny ***.

Indukční kapacita byla počítána jako počet embryí vytvářejících kalus / počet kultivovaných embryí x 100. Hodnota indukční kapacity je uvedena v procentech. Regenerační kapacita je udávána jako počet regenerovaných rostlin na jedné Petriho misce, tj. na 30 embryí.

7.1 Optimalizace *in vitro* podmínek pro kultivaci pšenice

7.1.1 Hodnocení vlivu složení média a genotypu rostliny na indukční kapacitu pšenice

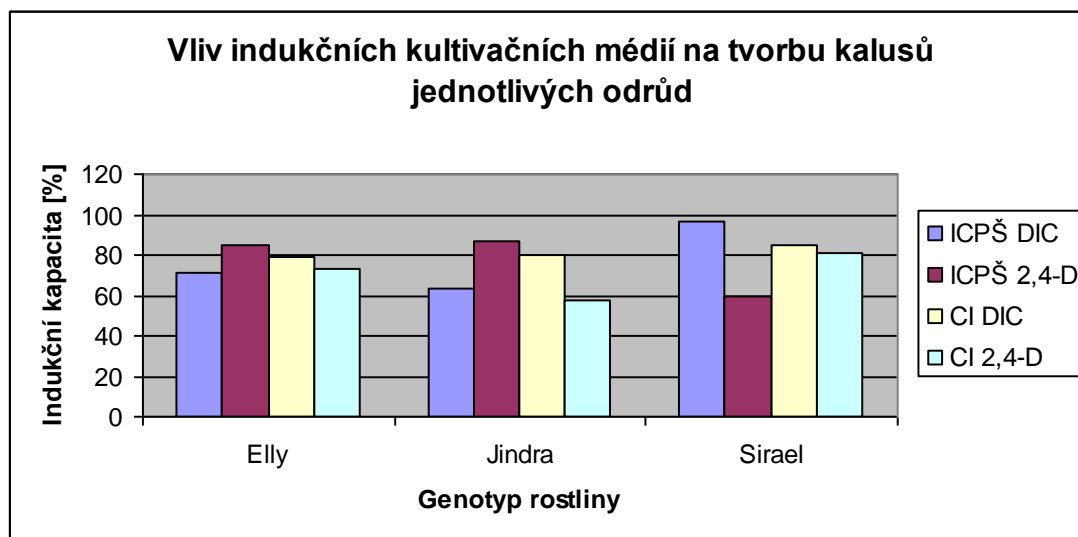
Tabulka 7: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – Vliv odrůdy a média na indukci kalusu.

Zdroje variability	SČ	Stupně volnosti	PČ
Odrůdy	269,39	2	134,69*
Média	66,33	3	22,11
Odrůdy*média	140,17	6	23,36
Chyba	917,33	24	38,22

SČ – součet čtverců, PČ – průměr čtverců

7.1.1.1 Vliv složení indukčního média na tvorbu kalusů

Graf 1: Porovnání vlivu použitých kultivačních médií na tvorbu kalusů u jednotlivých odrůd



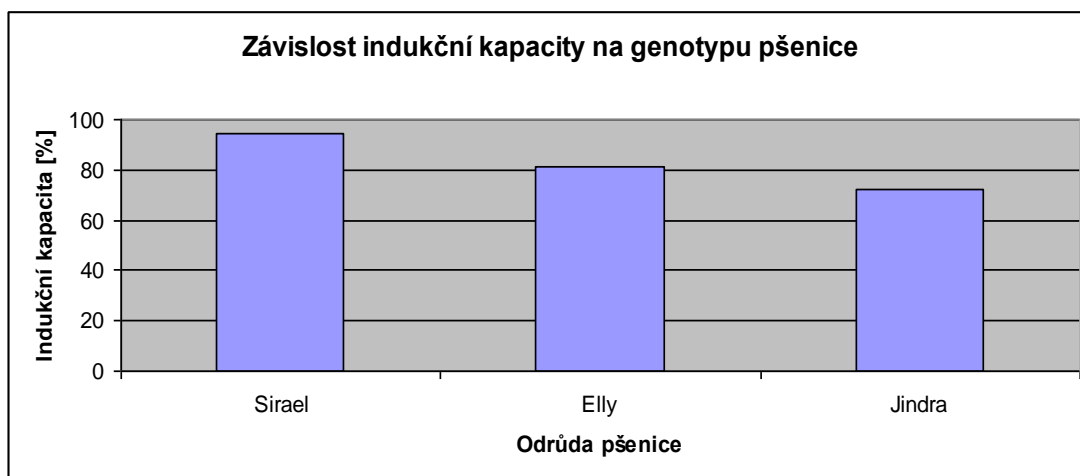
Z grafu 1 vyplývá, že výběr indukčního kultivačního média nemá signifikantní vliv na tvorbu kalusů. Nejvyšší počet kalusů ze všech testovaných odrůd vytvářela odrůda Sirael, s maximální výtěžností po kultivaci na kultivačním médiu ICPŠ (2,5 mg/l dicamba). Ostatní odrůdy vykazovaly podobnou indukční kapacitu na všech použitých médiích. Výsledky statistického hodnocení vlivu média na indukci kalusů je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – Vliv média na indukci kalusu.

Média	Průměrný počet kalusů	Diference
ICPŠ (2,4-D)	22,66	a
CI (DIC)	24,33	a
ICPŠ (DIC)	25,88	a
CI (2,4-D)	26,00	a

7.1.1.2 Vliv genotypu pšenice na tvorbu kalusů

Graf 2: Porovnání vlivu genotypu pšenice na tvorbu kalusů



Z grafu 2 lze usoudit, že největší vliv na tvorbu kalusů u pšenice má genotyp rostliny, což potvrzuje i statistické vyhodnocení výsledků (viz tabulka 9). Odrůda s největším počtem utvořených kalusů je odrůda jarní pšenice Siracl, jejíž indukční kapacita dosahovala 94,2 %. Nejmenší počet indukovaných kalusů z jednoho embrya poskytovala odrůda ozimé pšenice Jindra, jejíž indukční kapacita byla 71,9 %. Mezi odrůdami Siracl a Jindra lze ve tvorbě kalusů pozorovat statisticky významný rozdíl (viz tabulka 9).

Tabulka 9: Dvofaktoriální analýza ANOVA – Vliv odrůdy na indukci kalusu.

Odrůda	Průměrný počet kalusů	Diference
Jindra	21,58	a
Elly	24,33	ab
Siracl	28,25	b

7.1.2 Hodnocení vlivu složení média a genotypu rostliny na regenerační kapacitu pšenice

Tabulka 10: Dvofaktoriální analýza ANOVA – Vliv indukčního média, odrůdy a jejich vzájemné interakce na regeneraci rostlin.

Zdroj variability	SČ	Stupně volnosti	PČ
Odrůdy	19,8246	2	9,912**
Média	3,0903	3	1,0301
Odrůdy*média	29,9117	6	4,98**
Chyba	30,0057	24	1,2502

SČ – součet čtverců, PČ – průměr čtverců

Tabulka 11: Dvofaktoriální analýza ANOVA – Vliv regeneračního média, odrůdy a jejich vzájemné interakce na regeneraci rostlin.

Zdroj variability	SČ	Stupně volnosti	PČ
Odrůdy	19,8246	2	9,9123*
Média	2,9285	5	0,5857
Odrůda*Médium	25,3124	10	2,5312
Chyba	34,7667	18	1,9315

SČ – součet čtverců, PČ – průměr čtverců

Tabulka 12: Dvofaktoriální analýza ANOVA – Souhrnná tabulka vlivu indukčního média, odrůdy a jejich vzájemné interakce na regeneraci rostlin.

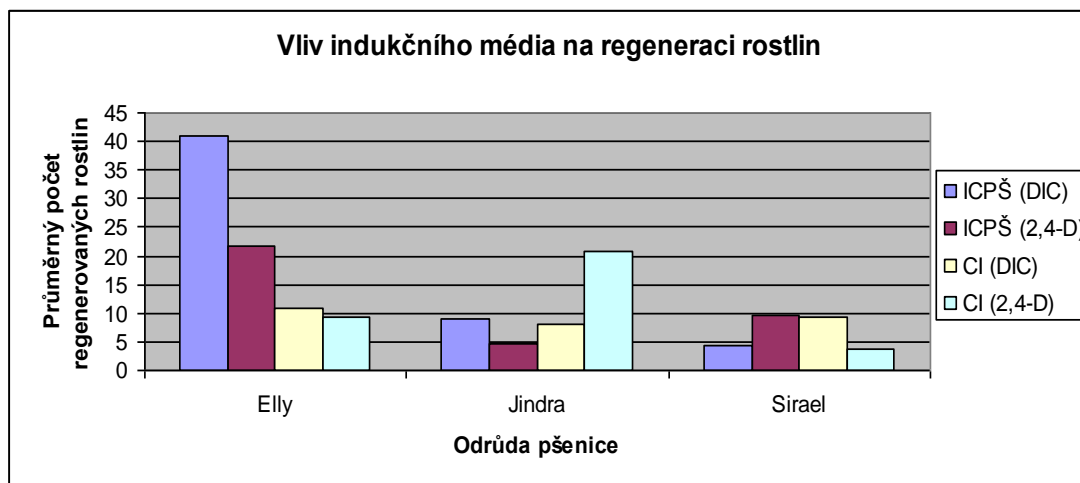
Odrůdy	Média	Průměrný počet mladých regenerovaných rostlin	Diference
Sirael	CI (2,4-D)	3,65	a
Sirael	ICPŠ (DIC)	4,42	a
Jindra	ICPŠ (2,4-D)	4,69	a
Jindra	CI (DIC)	8,16	ab
Jindra	ICPŠ (DIC)	8,97	ab
Sirael	CI (DIC)	9,21	ab
Elly	CI (2,4-D)	9,29	ab
Sirael	ICPŠ (2,4-D)	9,58	ab
Elly	CI (DIC)	10,87	ab
Jindra	CI (2,4-D)	20,84	bc
Elly	ICPŠ (2,4-D)	21,76	bc
Elly	ICPŠ (DIC)	40,89	c

Tabulka 13: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – Souhrnná tabulka vlivu regeneračního média, odrůdy a jejich vzájemné interakce na regeneraci rostlin.

Odrůda	Médium	Průměrný počet mladých regenerovaných rostlin	Diference
Sirael	R3	3,76	a
Jindra	R0	4,47	a
Sirael	R2	4,95	a
Sirael	R1	5,40	ab
Jindra	R3	6,27	ab
Sirael	R4	6,42	ab
Elly	R	7,08	ab
Sirael	R	8,28	abc
Elly	R1	8,28	abc
Jindra	R2	8,55	abc
Jindra	R4	9,75	abc
Sirael	R0	11,06	abc
Jindra	R1	13,17	abc
Elly	R2	15,79	abc
Jindra	R	21,01	abc
Elly	R0	27,32	bc
Elly	R3	31,85	c
Elly	R4	32,73	c

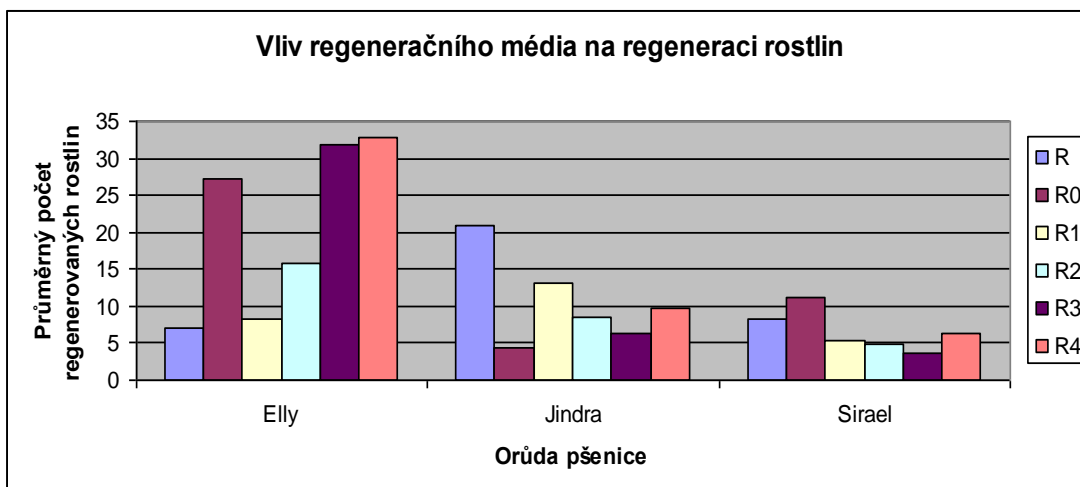
7.1.2.1 Vliv složení indukčního média na počet regenerovaných rostlin

Graf 3: Porovnání vlivu indukčního média na počet regenerovaných mladých rostlin jednotlivých odrůd.



Z grafu 3 lze vyvodit, že nejvyšší počet regenerovaných mladých rostlin byl vytvořen ozimou odrůdou Elly na indukčním médiu ICPŠ 2,5 mg/l dicamba. Největší vliv složení indukčního média na regeneraci rostlin byl zaznamenán u odrůdy Elly, naopak nejnižší vliv u odrůdy Sirael. Ze statistiky vyplývá (tabulka 10), že vysoce významný vliv na tvorbu kalusů má jak genotyp rostliny, tak interakce mezi genotypem a indukčním kultivačním médiem ale nikoliv médiem samotné.

Graf 4: Srovnání vlivu složení regeneračních médií na počet regenerovaných mladých rostlin jednotlivých odrůd.

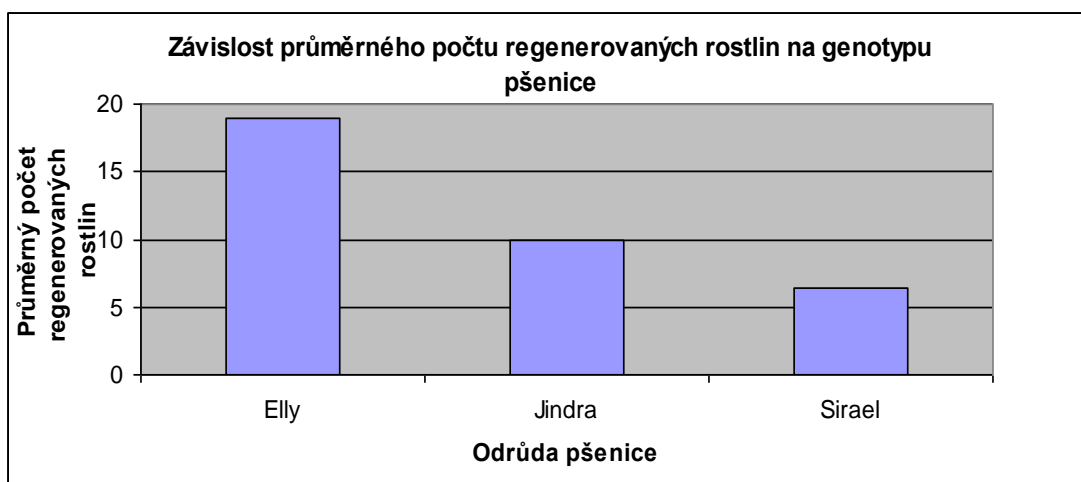


Z grafu 4 je zřejmé, že nejvyšší počet regenerovaných mladých rostlin byl vytvořen ozimou odrůdou Elly na regeneračním médiu R3, obsahujícím 5 mg/l zeatinu a 0,1 mg/l 2,4-D a R4, obsahujícím 0,1 mg/l NAA a 0,1 mg/l kinetinu. Nejnižší vliv složení regeneračního média na regeneraci pšenice byl zaznamenán u odrůdy Sirael. Ze statistiky (tabulka 14) vyplývá, že složení regeneračního média nemá vliv na regeneraci rostlin.

Tabulka 14: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – Vliv regeneračního média na tvorbu mladých rostlin.

Regenerační médium	Průměrný počet regenerovaných rostlin	Diference
R1	8,68	a
R2	9,27	a
R3	11,38	a
R	11,40	a
R0	12,69	a
R4	14,43	a

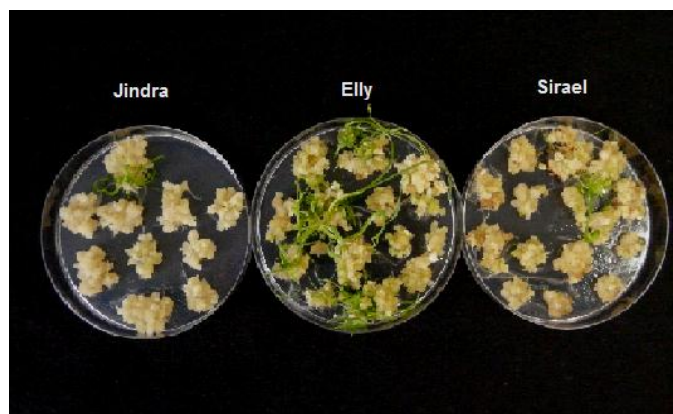
Graf 5: Porovnání vlivu genotypu pšenice na tvorbu mladých rostlin



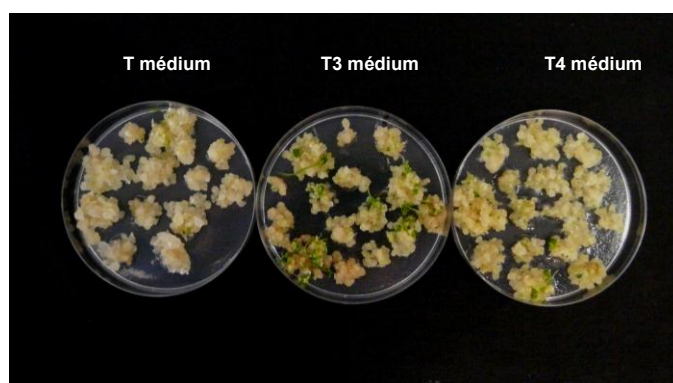
Grafické znázornění vlivu genotypu pšenice na počet regenerovaných rostlin (graf 5) koresponduje se statistickými výsledky (tabulka 15). Vybraná odrůda hraje významnou roli v regeneraci rostlin.

Tabulka 15: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – Vliv odrůdy na regenerační kapacitu rostlin.

Odrůda	Průměrný počet regenerovaných rostlin	Diference
Sirael	6,45	a
Jindra	9,92	ab
Elly	18,96	b



Obrázek 6: Srovnání regenerační kapacity odrůdy Elly, Jindra a Siraël po 2 týdnech kultivace na T3 médiu (foto: autor).



Obrázek 7: Srovnání regenerační kapacity odrůdy Elly na různých transičních médiích (foto: autor).



Obrázek 8: Srovnání regenerační kapacity odrůdy Elly, Siraël a Jindra na kultivačním médiu R3 (foto: autor).

Obrázek 6, 7 a 8 potvrzuje výsledky, získané statistickým zhodnocením vstupních dat. Nejvyšší regenerační kapacity bylo dosaženo při kultivaci odrůdy Elly na indukčním médiu ICPŠ 2,5 dicamba s následným přesunem na transitní T3 a regenerační médium R3.

7.2 Transformace pšenice *A. tumefaciens*

7.2.1 Transformace zralých zygotických embryí

Cílem bakalářské práce bylo také ověřit možnost transformace pšenice vektorem pBRACT214::CP, který byl vyvinut pro transformaci ječmene. Vektor pBRACT214 je určený pro transformaci pomocí *A. tumefaciens*. Zájmový gen (plášťový protein WDV) je pod ubiquitinovým promotorem (*ubi*). Vektor dále obsahuje hygromycinfosfotransferázu (*hpt*), selekční gen, který vykazuje vysokou úroveň selekce u transformantů ječmene.

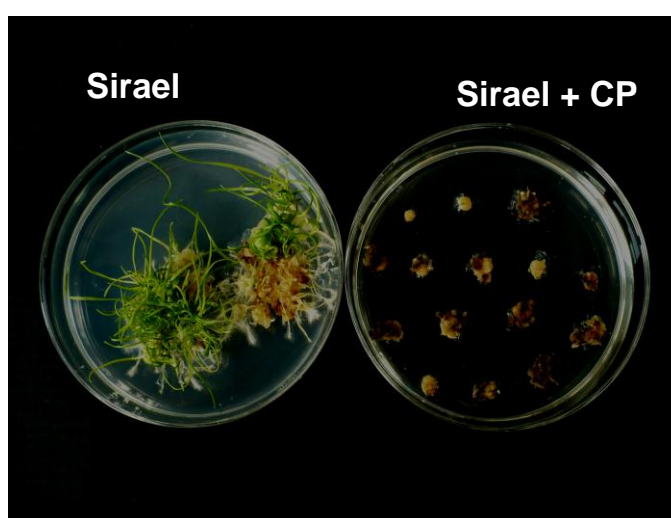
V rámci experimentu byla použita zralá zygotická embrya pšeničné odrůdy Bob White, Elly a Matylda. Z každé odrůdy bylo získáno 30 embryí ve třech opakováních. Ani u jedné odrůdy nedošlo k indukci tvorby kalusů. Z výsledků vyplývá, že transformace pomocí *A. tumefaciens* nebyla úspěšná ani u jediné z testovaných odrůd.



Obrázek 9: Srovnání regenerační kapacity různých odrůd pšenice na T3 médiu po transformaci (foto: autor).

7.2.2 Transformace nezralých zygotických embryí

V rámci experimentu byla použita nezralá zygotická embrya pšeničné odrůdy Bob White, Granny a Sirael. Z každé odrůdy bylo získáno 30 embryí ve třech opakováních. Odrůda Sirael vytvářela na indukčním kultivačním médiu ICPŠ (2,5 mg/l dicamba), obsahující antibiotika hygromycin a timentin, kalusy. Po přemístění kalusů na transitní kultivační médium však došlo ke změně jejich zbarvení a následnému odumírání kalusů (viz obrázek 10). Příčinou je nejspíše nedostatečná rezistence vůči antibiotiku hygromycinu či přílišná agresivita bakterie *A. tumefaciens*.



Obrázek 10: Srovnání regenerační kapacity transformovaných nezralých zygotických embryí odrůdy Sirael na T3 médiu (foto: autor).

8 DISKUZE

Pšenice patří mezi nejdůležitější hospodářské plodiny na světě. Z pšenice je využíváno zrno, stébla a otruby. Zrno lze využít v potravinářském průmyslu, zvláště pro výrobu pečiva a těstovin, v zemědělství jako krmivo pro hospodářská zvířata, ale také v průmyslu k výrobě škrobu či lihu. Pšenice má vysokou výživnou hodnotu a v Evropě je řazena mezi základní potravinářské suroviny. V dnešní době se též uvažuje o využití pšenice na tvorbu biomasy, jako zdroje obnovitelné energie. Vzhledem ke vzrůstající zalidněnosti planety je proto potřeba zvýšení jejího výnosu a nutriční hodnoty. Toho můžeme dosáhnout vnesením potřebných genů procesem transgenozy.

Jednoděložné rostliny, mezi něž patří i obiloviny, jsou označovány jako rekalitrantní rostliny, tedy velmi špatně transformovatelné. Proto je snaha vyvinout protokol, který by transformaci obilovin znatelně usnadnil a zvýšil její efektivitu. Experimenty v bakalářské práci byly zaměřeny na testování indukční a regenerační kapacity hospodářsky významných odrůd pšenice a výběr vhodných kultivačních médií. Dalším cílem bakalářské práce bylo transformovat vybrané odrůdy pšenice *A. tumefaciens*. Vnášeným vektorem byl pBRAC214, nesoucí gen pro CP protein pro WDV.

V prvním experimentu byla hodnocena indukční a regenerační kapacita nezralých zygotických embryí pšenice, odrůdy Elly, Jindra a Sirael na různých typech médií.

Nejvyšší indukční kapacity bylo dosaženo u jarní odrůdy Sirael, a to na indukčním médiu ICPŠ 2,5 mg/l dicamba. Její indukční kapacita byla 94,2 %. Odrůda Elly a Jindra vykazovaly podobnou indukční kapacitu na všech typech použitých indukčních médií. Výsledky, získané z experimentů v rámci mé bakalářské práce, jsou v souladu s výsledky Przetakiewicz a kol.,(2003). Jako jeden z nejlepších auxinů pro indukci kalusů u pšenice vyhodnotili syntetický auxin dicamba, ale také kombinaci picloramu a 2,4-D. V rámci mého experimentu měl nejvyšší vliv na tvorbu kalusů genotyp použité odrůdy pšenice, což se opět shoduje s výsledky studie Przetakiewicz a kol.,(2003), kteří uvádí, že nejvyšší vliv na reakci explantátů vůči auxinům má genotyp dané odrůdy.

Nejvyšší regenerační kapacita však byla zjištěna u odrůdy ozimé pšenice Elly, a to na R3 médiu, obsahujícím 5mg/l zeatinu a 0,1 mg/l 2,4-D a R4 médiu, obsahujícím 0,1 mg/l NAA a 0,1 mg/l kinetinu. Naproti tomu, odrůda Sirael, která vykazovala nejvyšší indukční kapacitu, měla regenerační kapacitu ze všech odrůd nejnižší.

Druhým cílem mé bakalářské práce byla transformace zralých a nezralých zygotických embryí půdní bakterie *A. tumefaciens*.

Transformace zralých zygotických embryí byla v rámci mé bakalářské práce neúspěšná, jelikož se z izolovaných embryí nevytvářely kalusy. Dle Raziuddin a kol., (2010) hraje největší roli na tvorbu kalusů genotyp použité odrůdy pšenice. Indukce kalusů se v závislosti na typu média a použité odrůdy pohybovalo v rozmezí 49,75 % – 65 %. Tyto vysoké hodnoty nekorespondují s výsledky získanými experimenty v rámci mé bakalářské práce. Důvodem může být nevyhovující postup sterilizace, nedostatečná rezistence vůči antibiotiku hygromycinu či přílišná agresivita bakterie *A. tumefaciens* nevhodně zvolená odrůda pšenice nebo typ použitého auxinu. Syntetickým auxinem použitým pro indukci kalusů u Raziuddin a kol., (2010) byl 2,4-D, zatímco v rámci mé bakalářské práce byl použit syntetický auxin dicamba, který vyvolal nejvyšší indukci kalusů a regeneraci rostlin.

Transformovaná nezralá zygotická embrya jsou nadále kultivována. U odrůdy Sirael byla transformace *A. tumefaciens* neúspěšná. Po vytvoření kalusů a následném přenesení na transitní médium došlo k jejich odumírání. Důležitým faktorem, ovlivňujícím transformaci pšenice, je genotyp rostliny. V současné době je jednou z mála odrůd, které jsou úspěšně transformovány, odrůda jarní pšenice, Bob White.

Na základě výsledků získaných v bakalářské práci, navrhuji testovat jiné typy vektorů a dále také vyzkoušet jiné selekční geny. Nejčastěji používaným selekčním genem pšenice je gen *nptII*, tedy gen rezistence vůči kanamycinu. Dále navrhuji testovat jiné kmeny *A. tumefaciens*, např. kmen LBA 4404, který byl použit ve studii Supartana a kol., (2006). Obecně lze konstatovat, že transformační systémy, které jsou vyvinuty pro konkrétní druh rostliny, nefungují u jiného příbuzného druhu.

9 ZÁVĚR

Na základě dostupné literatury byla navržena a testována indukční a regenerační média. Dále byla testována tvorba kalusu a regenerace rostlin u třech hospodářsky významných odrůd pšenice, testovaných na území České republiky. Následně byla hodnocena úspěšnost transformace vybraných odrůd pšenice půdní bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Zvoleným vektorem byl pBRAC214::CP, který byl připraven pro transformaci ječmene. Bylo zjištěno, že největší vliv na tvorbu kalusů a regeneraci rostlin má vybraná odrůda pšenice. Odrůda pšenice, s vysokou indukční a regenerační kapacitou, bude dále transformována *A. tumefaciens*, za použití navrhovaného kmenu LBA 4404.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bahieldin, A., Dyer, W. E., Qu, R. (2000): Concentration effects of dicamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breeding* 119: 437 – 439.

Brown, T. A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. 389 s. Univerzita Palackého, Olomouc, ISBN 978-80-244-1719-6.

Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G., He, G. (2009): Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryo of elite wheat. *Mol Biol Rep* 36: 29 – 36.

Drobník, J., Ondřej, M. (2002): Transgenozé rostlin. 316 s. Akademia, Praha, ISBN 80-200-0958-2.

Drobník, J., Ondřej, M., Petr, J. (2002): Geneticky modifikované organismy v zemědělství. 71 s. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. ISBN 80-7271-107-5.

Hall, R. D. (1999): Plant cell culture protocols. 1-17 s. Humana Press Inc, ISBN 0-89603-549-2.

He, Y., Jones, H. D., Chen, S., Chen, X. M., Wang, D. W., Li, K. X., Wang, D. S., Xia, L. Q. (2010): *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. *Journal of Experimental Botany* 61: 1567 – 1581.

Hensel, G., Kastner, Ch., Oleszcuk, S., Riechen, J., Kumlehn, J. (2009): *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. *International Journal of Plant Genomics*, doi: 10.1155/2009/835608.

Horáková, V., Dvořáčková, O., Mezlík, T. (2009): Seznam doporučených odrůd 2009, Přehled odrůd 2009. 214 s. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno. ISBN 978-80-7401-016-3.

Patnaik, D., Vishnudasana, D., Khurana, P. (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science* 91: 307 – 316.

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*, 484 s. Academia, Praha, ISBN 80-200-0586-2.

Pavlová, L. (2005): *Fyziologie rostlin*, 253 s. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-0985-1.

Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2003): The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 245 – 256.

Jones, H. D., Lazzen, P., A. (2009): *Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization*. V: Jones, H. D., Shewry, P., R. (ed.): *Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization Protocols*. 345 s. Humana Press. Vol. 478. ISBN 978-1-58829-961-1

Luštinec, J., Žárský, V. (2005): *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 261 s. Nakladatelství Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0563-5.

León, E., Marín, S., Barro, F. (2006): Improvement of in vitro culture response of elite wheat cultivars by selecting the source spike, the scutellum size and temperature for the induction of embryogenesis. *Plant Breeding* 125: 580 – 583.

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

Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2009): *Genetika*. 871s. Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno. ISBN 978-80-210-4852-2.

Sood, P., Bhattacharya, A., Sood, A. (2011): Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum* 55: 1 – 15.

Špaldon, E. a kol. (1963): Rostlinná výroba. 676 s. Státní zemědělské nakladatelství v Praze a Slovenské vydavateľstvo poľnohospodárskej literatúry v Bratislave.

Taiz, L., Zeiger, E. (2010): Plant Physiology, Fifth Edition. 782 s. Sinauer Associates, Inc., USA. ISBN 978-0-87893-866-7.

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002): Developmental pathways of static embryogenesis. Plant cell. Tissue and Organ Culture 69: 233 – 249.

Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., Jones, H. D. (2003): Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. Plant Cell Rep.

Wu, H., Doherty, A., Jones, H. D. (2005): Review of methodologies and protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. Plant Methods 1:5. doi: 10.1186/1746-4811-1-5.

Wu, H., Doherty, A., Jones, H. D. (2007): Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes. Springer Science, Business Media B.V. doi: 10.1007/s11248-007-9116-9.

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D kyselina	2,4-dichlorfenoxyoctová
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	Benzylaminopurin
Bp	Base pair
CI	Calus induction
CIMMYT	International Maize and Wheat Improvement Center
CP	Coat protein
Dicamba	Kyselina 3,6-dichloro-2-methoxybenzoová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GMO	Geneticky modifikované organismy
ICPŠ	Indukce kalusů pšenice
Kinetin	Furfuryladenin
MS	Murashige and Skoog médium
NAA	Kyselina 1-naftalenoctová
RPŠ	Regenerace pšenice
Ti plazmid	Tumor inducing plazmid
T-DNA	Transferred DNA
WDV	Wheat Dwarf Virus