

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Alžběta Krčmarská**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



***In vitro* systém pro transformace žita  
(*Secale cereale L.*)**

**Bakalářská práce**

**Alžběta Krčmarská**

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.

Dne:

Podpis.....

## Poděkování

Děkuji všem, kteří mi pomáhali při vypracovávání bakalářské práce a vycházeli mi vstříc. Především bych chtěla poděkovat školitelce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení, prof. Ing. Jaroslavě Ehrenbergerové CSc. za pomoc při statistickém vyhodnocení a laborantce Bc. Janě Vaškové za trpělivost a ochotu při práci v laboratoři. Také bych ráda poděkovala své rodině za poskytnutí zázemí.

## Souhrn

Žito je podobně jako ostatní obiloviny obtížně transformovatelnou rostlinou. Hlavní problémy transgenozy spočívají v komplikované *in vitro* kultivaci a dále ve snížené vnímavosti vůči přirozenému patogenu dvouděložných rostlin *Agrobacterium tumefaciens*. Tato gramnegativní bakterie se běžně používá k transformaci dvouděložných rostlin. Její použití při transformaci jednoděložných rostlin, mezi které patří žito, je však komplikovanější.

Základním předpokladem pro úspěšnou transformaci rostlin je fungující *in vitro* systém. Cílem bakalářské práce bylo vypracovat a ověřit metodiku pro *in vitro* indukci kalusu a regeneraci rostlin u vybraných odrůd žita, pěstovaných na území ČR. Další součástí práce bylo testování biolistické metody transformace na vybraných odrůdách žita.

## Summary

Rye, similarly to other cereals, is a plant difficult to transform. The main problems of its transgenesis consist in complicated *in vitro* cultivation and suppressed sensitivity to *Agrobacterium tumefaciens*, the natural pathogen of dicotyledonous plants. This gram-negative bacteria is commonly used to transform dicots; however, its application in transforming monocots, to which rye belongs is more complicated.

Functional *in vitro* system is a prerequisite for successful plant transformation. The aim of this work was to develop and verify a method suitable for *in vitro* induction of callus and plant regeneration of selected rye varieties grown in the Czech Republic. The next part of this work was test of transformation by the biolistic method.

## Obsah

1	Úvod.....	6
2	Cíle práce .....	7
3	Explantátové kultury .....	8
3.1	Kultivační médium .....	8
3.1.1	Minerální živiny .....	8
3.1.2	Sacharidy .....	9
3.1.3	Další organické sloučeniny .....	9
3.1.4	Složky, umožňující tuhnutí .....	10
3.1.5	Růstové regulátory .....	10
3.2	Kalus a kalusová kultura .....	13
4	Transgenní rostliny .....	15
4.1	Metody transformace rostlin .....	15
4.1.1	Transformace pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	16
4.1.2	Biolistické metody.....	17
4.2	Vektory .....	18
4.3	Selekční a reportérové geny.....	18
5	Žito seté ( <i>Secale cereale</i> L.) .....	20
5.1	Faktory ovlivňující <i>in vitro</i> kultivaci žita .....	21
5.1.1	Typ explantátu.....	21
5.1.2	Složení kultivačního média .....	22
5.1.3	Odrůda.....	25
5.2	Problematika transformace žita.....	25
6	Materiál a metody .....	27
6.1	Rostlinný materiál.....	27
6.1.1	Pěstování rostlinného materiálu .....	28
6.2	Vypracování kultivačního protokolu .....	28
6.2.1	Kultivační média .....	29
6.2.2	Sterilizace explantátů .....	31
6.2.3	Indukce tvorby kalusu .....	32
6.2.4	Regenerace .....	32
6.3	Transformace zralých embryí biolistickou metodou .....	33
6.3.1	Plazmid pAHC25 .....	33
6.3.2	Metoda mikroprojektilového přenosu DNA - „Particle delivery“ .....	35
6.3.3	Ověření transgenní exprese genu <i>gus</i> .....	37
7	Výsledky .....	38

7.1	Optimalizace sterilizace rostlinného materiálu.....	38
7.2	Hodnocení indukční a regenerační kapacity z hlediska jednotlivých odrůd a složení kultivačního média.....	39
7.3	Hodnocení exprese transgenu <i>gus</i> .....	46
8	Diskuse.....	49
9	Závěr .....	51
10	Seznam použitých zkratk .....	52
11	Použitá literatura.....	53



# 1 Úvod

Pěstování obilnin tvoří základ zemědělské činnosti člověka po řadu tisíciletí. Již v období neolitu na území Blízkého Východu lidé začali účelově pěstovat některé druhy obilí, především pšenici a ječmen. Snaha zemědělců o co nejvyšší výnosy vedla ke vzniku a rozvoji šlechtitelství, jehož cílem je selekce rostlin s výhodnými vlastnostmi. V současné době se k produkci rostlin s požadovanými znaky využívají také techniky genetické modifikace. Organismy, které byly pozměněny touto cestou, označujeme jako geneticky modifikované neboli transgenní. Do jejich genomu byl cíleně vnesen genetický materiál cizího původu. Výhoda genetické modifikace, oproti klasickým metodám šlechtění, spočívá ve schopnosti změnit konkrétní vlastnost organismu, aniž by byly zároveň ovlivněny jiné znaky.

Pomocí procesu genetické modifikace se již podařilo vybavit celou řadu hospodářsky významných rostlin geny pro výhodné znaky. Jedná se například o rezistenci vůči škůdcům, produkci nutričně hodnotnějších plodů nebo odolnost vůči nepříznivým klimatickým podmínkám. Samostatnou kapitolou je využití geneticky modifikovaných rostlin pro farmaceutické účely, umožňující například produkci vakcín a významných proteinů.

Transgenoze jednoděložných rostlin, mezi které patří obiloviny, je poněkud obtížnější než u rostlin dvouděložných. Příčinou je zejména nižší vnímavost jednoděložných rostlin k bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, která je přirozeným patogenem dvouděložných rostlin a je běžně využívána k jejich transformaci. Další komplikace nastávají v procesu regenerace v *in vitro* podmínkách, který je nutný k získání dospělých rostlin nesoucích zájmový gen. V současné době se vyvíjejí metody, které se snaží tyto překážky překonávat, a tím produkci geneticky modifikovaných obilovin rozšiřovat.

## 2 Cíle práce

Hlavními cíli této bakalářské práce bylo:

- Na základě dostupné literatury zhodnotit možnosti pro úspěšnou transformaci žita.
- Navrhnout *in vitro* indukční a regenerační systém umožňující realizaci transformací.
- Testovat vybrané odrůdy žita a vyhodnotit jejich indukční a regenerační kapacitu.
- Praktické seznámení s metodami transformace, ověření úspěšnosti.

### 3 Explantátové kultury

Pojmem explantátové kultury či explantáty bývají označovány kultury izolovaných buněk, pletiv a orgánů. V zahraniční terminologii se tímto pojmem rozumí pouze primární rostlinné pletivo či orgán v *in vitro* kultuře.

Explantátové kultury se uplatňují jako důležitý experimentální objekt při výzkumu rostlinné fyziologie i genetiky a staly se zároveň základem rostlinných biotechnologií (Luštinec a Žárský, 2005).

Základním předpokladem pro *in vitro* kultivaci explantátů je tzv. totipotence, která umožňuje účinnou regulaci růstu a vývoje rostlinných buněk, pletiv a orgánů. Jedná se o schopnost rostlinné buňky vytvořit jakýkoliv buněčný typ, který je danému organismu vlastní, případně dát vznik kompletnímu rostlinnému organismu. Tato vlastnost je dána zachováním kompletní genetické informace a schopností ji exprimovat. Od znalosti a pochopení konceptu totipotence se odvíjí celá historie explantátových kultur (Procházka a kol., 1998).

Při zakládání explantátové kultury je nejprve část rostlinného orgánu či pletiva oddělena od rostliny v aseptických podmínkách. Dále je přenesena na kultivační médium (tekuté či tuhé), které je rovněž zbaveno mikroorganismů a je umístěno v kultivační nádobě, vyrobené ze skla či plastu. Na vývoj explantátu mají vliv kromě složení kultivačního média také další faktory, například teplota a osvětlení (Luštinec a Žárský, 2005).

#### 3.1 Kultivační médium

Kultivační neboli živné médium má poněkud odlišné složení v závislosti na typu tkáňové kultury a fázi jejího vývoje. Jeho základními složkami jsou minerální živiny, sacharidy, vitamíny, aminokyseliny a v některých případech také růstové regulátory.

##### 3.1.1 Minerální živiny

Minerální prvky můžeme podle jejich zastoupení v rostlinném organismu dělit na makroelementy a mikroelementy. Makroelementy jsou přítomny v minimálně 0,1 % sušiny, mikroelementy tvoří méně než 0,1 % rostlinného těla.

Makroelementy zahrnují šest základních prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Dusík je nejčastěji dodáván ve formě nitrátů a amonných solí, draslík ve formě dusičnanu nebo chloridu. Optimální koncentrace nitrátů se pohybuje v rozmezí 20 a 40 mmol.l<sup>-1</sup>, amonium se dodává nejčastěji v koncentraci 2 až 20 mmol.l<sup>-1</sup>. Koncentrace fosforu, hořčíku a síry v kultivačních médiích je 20 až 30 mmol.l<sup>-1</sup>.

Mezi mikroelementy významné pro růst tkáňových kultur patří železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. V některých případech se do médií dodává také kobalt, jód, sodík a chlór (Kováč, 1992).

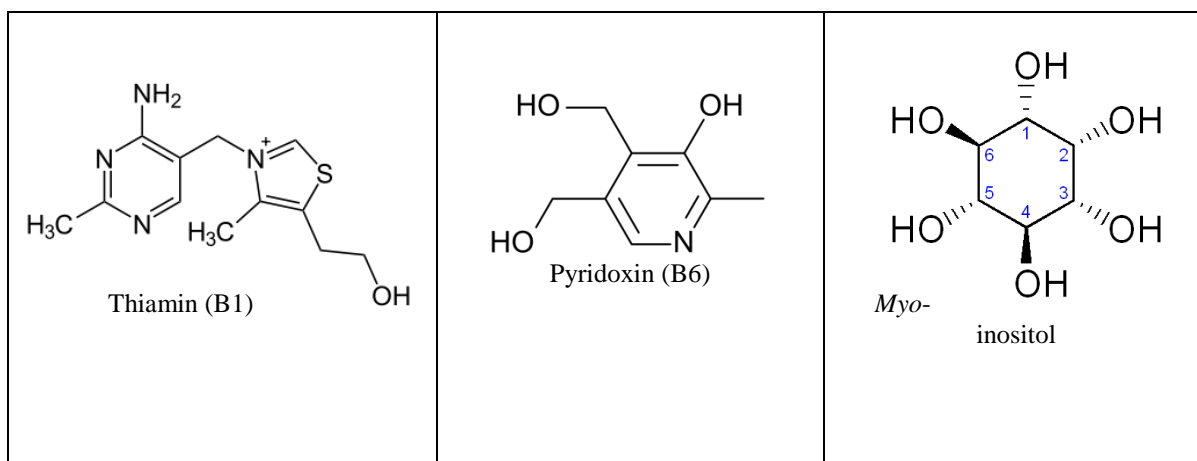
### **3.1.2 Sacharidy**

Sacharidy slouží v kultivačních médiích jako zdroj uhlíku, který je nezbytný vzhledem k převažující heterotrofní výživě explantátů. V kultivačních médiích lze použít sacharózu, glukózu, fruktózu nebo maltózu. Běžná koncentrace sacharózy se pohybuje od 2 do 3 %. Pro *in vitro* kultury obilovin se nejčastěji používá sacharóza, případně maltóza. V osmotickém médiu, které zvyšuje efektivitu transformace, je obsažen navíc manitol, případně i sorbitol (Kováč, 1992).

### **3.1.3 Další organické sloučeniny**

Mezi další organické látky přidávané do kultivačních médií patří zejména aminokyseliny a vitaminy. Přítomnost některých aminokyselin (například glutaminu, asparaginu, alaninu nebo prolinu) může stimulovat růst explantátů. Tyto látky slouží rostlinám jako rychlý zdroj dusíku.

Vitaminy jsou nezbytné pro katalýzu mnoha metabolických procesů. Pozitivní vliv na vývoj explantátových kultur byl prokázán především u thiaminu (vitaminu B1), pyridoxinu (vitaminu B6) a *myo*-inositolu (viz obr. 1). Často přidávaným vitamínem je také kyselina nikotinová (Kováč, 1992).



Obr. 1: Vitaminy, přidávané do kultivačních médií

Zdroje: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Thiamin>

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Pyridoxin>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Myo-inositol>

### 3.1.4 Složky, umožňující tuhnutí

Základní želatinizační látkou je agar. Jedná se o polysacharid získávaný z mořských řas rodu *Gelidium* a *Gracilaria*. V případě *in vitro* kultivace obilovin se nejčastěji používá jako tuhnoucí složka média syntetický agar - Agaróza nebo Phytigel, respektive Gerlit. Důležitou vlastností želatinizační složky je skutečnost, že neinteraguje s jinými komponenty média.

### 3.1.5 Růstové regulátory

Rostlinné hormony jsou nízkomolekulární sloučeniny, které při velmi nízkých účinných koncentracích ( $10^{-6}$  –  $10^{-9}$  M) regulují různé pochody odehrávající se v rostlině. Jedná se především o procesy růstu a vývoje, proto bývají často označovány jako růstové regulátory. Tento pojem je však poněkud obecnější. Kromě nativních, rostlině vlastních látek zahrnuje také jejich syntetická analoga, která rovněž mají vliv na růst a vývoj.

Růstové regulátory plní dvě základní funkce. Koordinují vztahy mezi jednotlivými buňkami a dále přenáší signál z vnějšího prostředí do vnitřního prostředí rostliny.

Na rozdíl od živočišných hormonů nejsou fytohormony produkovány v žádných specializovaných orgánech. Mohou se tvořit v různých pletivech, jejichž buňky získají k syntéze těchto látek signál z vnějšího či vnitřního prostředí. Od živočišných hormonů je

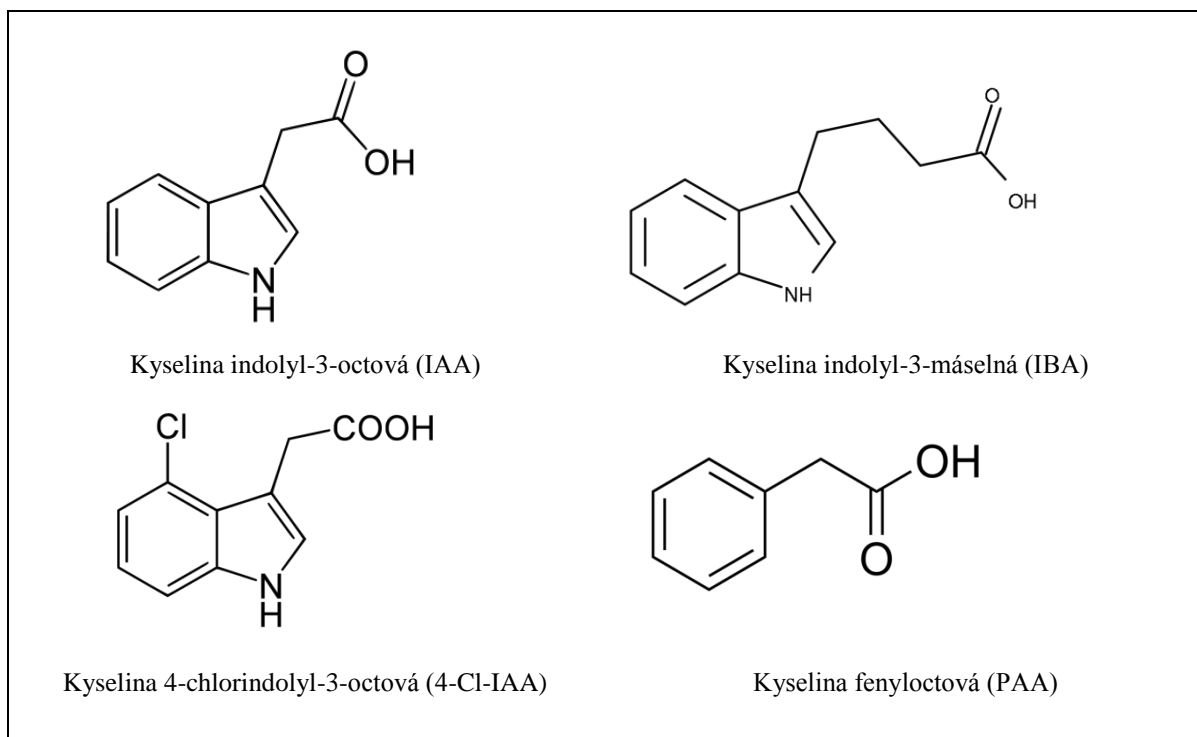
odlišuje také nižší specifická – jediný hormon může mít různé účinky, které závisí na typu pletiva, koncentraci hormonu a dalších faktorech (Pavlová, 2005).

Fytohormony klasifikujeme do pěti základních skupin: auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen. Existují ještě další látky, které se svou funkcí a strukturou fytohormonům podobají. Jedná se například o brassinosteroidy, jasmonáty, polyaminy a další sloučeniny (Procházka a kol., 1998).

V rámci kultivace žita v *in vitro* podmínkách byly použity auxiny a cytokininy, proto budou dále detailněji probrány tyto dvě skupiny fytohormonů. Velmi významný je zároveň vzájemný poměr těchto fytohormonů.

#### A) Auxiny

Mezi přirozené auxiny patří kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlorindolyl-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylloctová (PAA). Vzorce těchto látek jsou znázorněny na obr. 2.



Obr. 2: Vzorce přírodních auxinů

<http://en.wikipedia.org/wiki/Auxin>

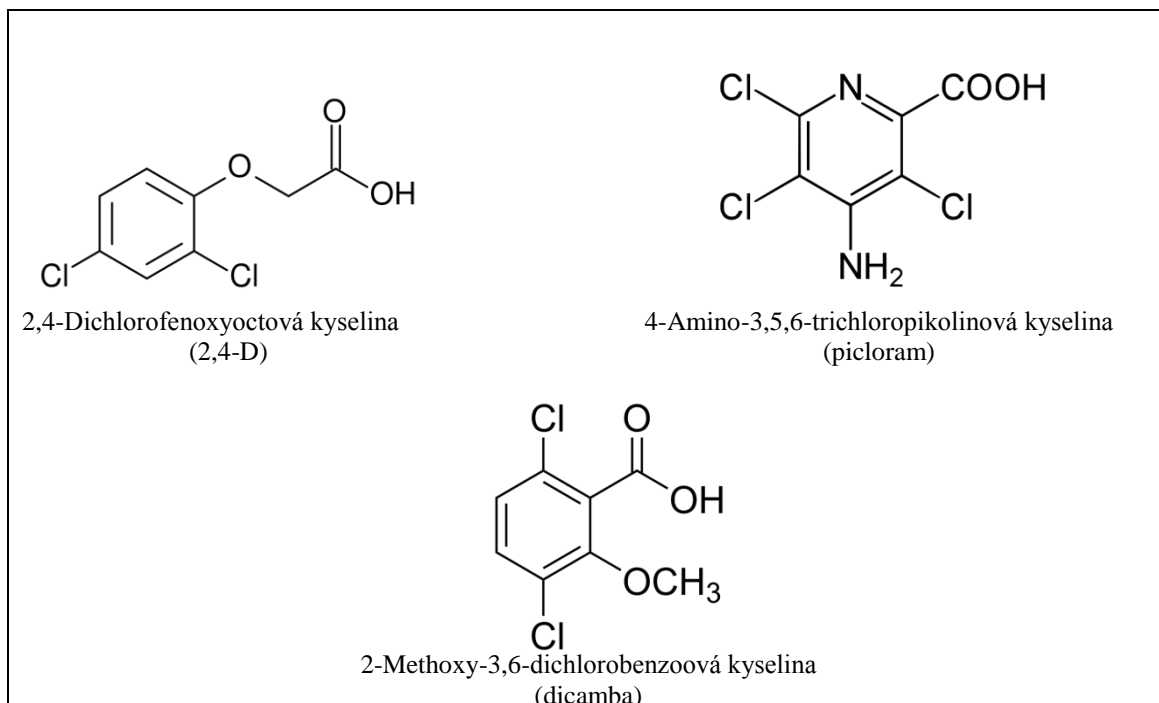
Tyto látky indukují prodlužování buněk a udržují apikální dominanci tím, že inhibují vývoj axilárních meristémů. Hrají důležitou roli v pohybových reakcích jako je

například fototropismus či gravitropismus. Mezi další účinky patří oddálení abscise listů a stimulace diferenciací vodivých pletiv. Auxiny rovněž podporují tvorbu kořenů, a to jak laterálních, tak i adventivních tím, že indukují dělení buněk pericyklu. Proto se růstové regulátory, které mají charakter auxinu, používají pro zakořeňování rostlin při vegetativním množení (Procházka a kol., 2005).

Mezi nejčastěji používané syntetické auxiny patří 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D), 4-amino-3,5,6-trichloropikolinová kyselina (picloram) a 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoová kyselina (dicamba). Ve vyšších koncentracích plní tyto sloučeniny funkci herbicidů, které indukují odumírání buněk a tím způsobují následnou smrt celé rostliny. V nižších koncentracích se přidávají do živných médií, aby zvýšily schopnost zakořeňování rostliny. Jednoděložné rostliny jsou méně citlivé k umělým auxinům, protože jsou schopny je poměrně rychle inaktivovat konjugací (Taiz a Zeiger, 2010).

Vzorce syntetických auxinů jsou znázorněny na obr. 3.

Auxiny jsou do kultivačních médií přidávány nejčastěji za účelem stimulace růstu kalusu, tvorby kořenů a ke zvýšení tvorby somatických embryí. Stimulují také růst apikálních meristémů (Kováč, 1992).



Obr. 3: Vzorce syntetických auxinů

Zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/Auxin>

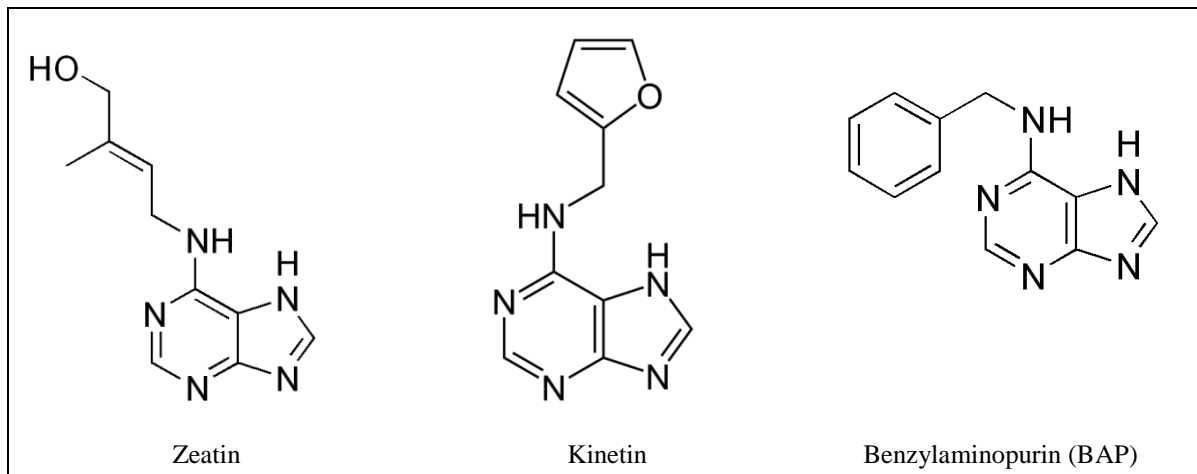
## B) Cytokininy

Tyto N<sup>6</sup> substituované aminy dělíme podle typu substituentu do dvou základních skupin. Do první skupiny patří látky s alifatickým substituentem – nejvýznamnější je zeatin, druhou skupinu tvoří aromatické cytokininy (topoliny).

Mezi nejdůležitější fyziologické účinky této skupiny látek patří stimulace buněčného dělení a tvorby pupenů, ovlivňování diferenciací pletiv kořenů a zpomalování senescence.

V praxi se využívají syntetické cytokininy jako kinetin, který obsahuje pětičlenný kruh s atomem kyslíku a benzylaminopurin (BAP). Jsou důležitou složkou živných médií pro kultivaci izolovaných rostlinných pletiv a orgánů, kde slouží zejména k indukci tvorby prýtů, stimulaci buněčného dělení a k inhibici tvorby kořenů (Luštinec a Žárský, 2008).

Vzorce přírodních a syntetických cytokininů jsou znázorněny na následujícím obrázku (obr. 4).



Obr. 4: Vzorce přírodních a syntetických cytokininů

Zdroje: <http://en.wikipedia.org/wiki/Zeatin>  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Kinetin>  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Benzylaminopurine>

## 3.2 Kalus a kalusová kultura

Kalus je histologicky neorganizované, neuspořádaně rostoucí pletivo. K jeho tvorbě dochází při vhodné koncentraci jednotlivých složek média, především růstových regulátorů. V přírodě se kalus tvoří především při hojení ran a také při infekci rostlinným patogenem *Agrobacterium tumefaciens*.

Během tvorby kalusu dochází k dediferenciaci buněk, jejímž důsledkem je zejména ztráta schopnosti fotosyntézy. Z tohoto důvodu je nutné do médií, určených ke kultivaci



kalusových kultur, přidávat především zdroj uhlíku. Kultivace kalusu probíhá za tmy, protože světlo může být příčinou diferenciaci jeho buněk, která je nežádoucí.

Přenášení celého kalusového pletiva nebo jeho části na čerstvé kultivační médium se označuje jako pasážování. Provádí se vždy v určitých pravidelných intervalech. Postupně dochází k cytogenetickým změnám v kalusové kultuře – roste podíl polyploidních a aneuploidních buněk a zmenšuje se regenerační potenciál (Taiz a Zeiger, 2010).

V kalusu lze pomocí vhodného složení média indukovat procesy, které vedou k diferenciaci orgánů nebo tzv. embryoidů neboli somatických embryí procesem nepřímé embryogeneze. Lze je získat z malých, dělicích se buněk přidáním auxinu o vysoké koncentraci do živného média. Pro tvorbu embryogenního kalusu jsou vhodná zejména mladá pletiva. Somatická embrya procházejí stejnými stupni vývoje jako zygotická embrya a často je možné z nich regenerovat celé rostliny. Kalusové kultury jsou vhodným biologickým materiálem pro transformaci rostlin (Kováč, 1992).



Obr. 5: Kalus kultivovaný z nezralého somatického embrya žita (odrůda Selgo)  
(Foto: autor)

## 4 Transgenní rostliny

Rostliny, do jejichž genomu byl vnesen jeden nebo více genů pocházejících z jiných organismů, označujeme jako transgenní. Proces integrace cizího genetického materiálu se nazývá transformace. Jedná se o cílené zásahy do dědičného materiálu organismu. Různé metody transformace umožnily rekombinaci DNA u druhů, které jsou zcela nepříbuzné, což by bylo při použití klasického šlechtitelství nemožné.

### 4.1 Metody transformace rostlin

Transformace některých rostlin je v mnoha laboratořích po celém světě již rutinní technikou. Na rozvoj transformačních metod má vliv velmi rychlý pokrok v základních a aplikovaných disciplínách jako je biochemie, rostlinná fyziologie, vývojová biologie, šlechtění, potravinářství nebo biotechnologie.

Po letech neúspěšných experimentů se genový transfer zrealizoval krátce po objevu plazmidu, který je součástí půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Bylo zjištěno, že dochází k integraci části tohoto plazmidu do genomu hostitelské buňky. Omezený okruh hostitelských rostlin podnítl hledání nových metod transformace v čele s přímou transformací protoplastů. Další limitace těchto dvou možných metod transformace byly příčinou rozvoje nových, specifických metod, mezi které patří například elektroporace, mikrolaser, liposomální fúze nebo mikroinjekce. Následný přelomový krok spočíval v objevu biolistických metod transformace, jejichž principem je obalení kovových mikročástic nukleovou kyselinou a jejich nastřelení do rostlinných pletiv.

Genový transfer založený na využití bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, přímá transformace protoplastů a biolistické metody jsou nejčastější rutinně využívané techniky transformace modelových i hospodářsky významných rostlin (Potrykus a Spangenberg, 1995).

Metody transformace je možné dělit na přímé a nepřímé. Nepřímé metody jsou založeny na využití přenašečů (virů nebo bakterií), které jsou schopny vnést část své genetické informace do hostitelské buňky. Patří mezi ně především transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. V případě přímých metod se do rostlinného genomu vkládá DNA přímo, bez využití přenašeče, a to nejčastěji plazmidy s požadovanými geny. Mezi přímé metody řadíme přímou transformaci protoplastů a biolistické metody (Příbylová, 2008).

Stěžejními metodami, používanými pro transgenozu obilovin, jsou mikroprojektilový přenos DNA a transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Nevýhodou transgenozy pomocí mikroprojektilového přenosu DNA je skutečnost, že v mnoha případech vede k začlenění více kopií vnášeného genu a tím se zvyšuje riziko inaktivace transgenu.

#### 4.1.1 Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je půdní gramnegativní bakterie, která je přirozeným patogenem dvouděložných rostlin, na jejichž kořenech vytváří nádorovité útvary. Bakterie proniká do rostlinných pletiv v místě poranění a vyvolává onemocnění označované jako „crown gall“. Po vniknutí patogenu do rostliny dochází ke dvěma specifickým po sobě následujícím událostem – k proliferaci rostlinných buněk a k syntéze opinu (Snustad a Simmons, 2009).

Tvorba nádorů je založena na schopnosti vložit segment onkogenní DNA (T-DNA – transferred DNA) do genomu hostitelské buňky. Tento úsek je součástí Ti (tumor-inducing) plazmidu. Geny T-DNA kódují enzymy, které jsou zapojeny v procesech produkce auxinů, cytokininů a dalších sloučenin nezbytných pro růst a vývoj rostliny. T-DNA také obsahuje geny pro syntézu opinů – látek specifických pro tumor. Tyto sloučeniny jsou detekovatelné v rostlinných pletivech a mohou být využity jako markery transformace. Různé druhy rodu *Agrobacterium* produkují odlišné typy opinů – například nopalín, octopin, leucopin a succinamopin.

Rostlinné buňky obsahující T-DNA nemohou být regenerovány, protože se jedná o buňky nádorové. Delece onkogenních genů z T-DNA regionu nemá vliv na transfer tohoto úseku do hostitelské buňky. Pro vložení DNA do hostitelské buňky mají zásadní význam pouze koncové oblasti T-regionu. Rostlinné buňky, které jsou transformovány T-DNA bez onkogenních genů, se chovají stejně jako netransformované buňky a mohou být tedy využity k regeneraci. Tímto způsobem lze získat fertilní transgenní rostliny. K selekci transgenních rostlin se využívají specifické selekční markery, které transformovaným buňkám udělují rezistenci vůči antibiotikům a herbicidům (Potrykus a Spangenberg, 1995).

Byly vyvinuty dvě základní metody umožňující úpravu T-DNA regionu – intermediální vektory a binární vektory.

Intermediální vektory jsou malé plazmidy, které nesou klonovaný úsek T-DNA, do něhož je pomocí restriční štěpení a ligace vložen požadovaný gen. V bakterii dojde po vložení plazmidu k procesu homologní rekombinace mezi úseky bakteriálního Ti-plazmidu a intermediálního plazmidu.

Principem binárních vektorů je rozdělení Ti-plazmidu na dvě části. Vznikají tak dva různě velké plazmidy. Větší z nich nese geny virulence, menší obsahuje restriční místa a jeho dostatečně malá velikost umožňuje vkládání genů přímo do T-DNA (Ondřej a Drobník, 2002).

Prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* lze transformovat mnoho různých rostlinných druhů. Efektivita přenosu T-DNA u jednotlivých druhů, kultivarů i cílových kultur však značně kolísá (Potrykus a Spangenberg, 1995).

Problém transformace obilovin pomocí této metody spočívá ve skutečnosti, že jednoděložné rostliny, na rozdíl od dvouděložných, nevylučují při poranění sloučeniny typu syringonu nebo acetosyringonu. Tyto fenolické látky aktivují *vir*-oblast genomu, což umožní infekci rostliny (Procházka a kol., 1998). Přídavek acetosyringonu může usnadnit proniknutí *Agrobacteria* do transformované rostlinné buňky. Transformaci obilovin výrazně usnadňuje také použití supervirulentních kmenů.

#### 4.1.2 Biolistická metoda

Biolistické metody transformace jsou založeny na ostřelování buněk vysokorychlostními mikroprojektily ze zlata nebo wolframu, které jsou pokryty DNA. Tato technika se využívá u mnoha typů rostlinných i živočišných buněk (Brown, 2007).

Biologický materiál podrobovaný této transformační metodě musí být umístěn ve vakuu. Mikroprojektily během biolistického procesu urazí dráhu přibližně 10 cm a dosáhnou rozptylu o průměru 2 cm. Po aplikaci metody je rostlinný materiál umístěn na vhodné médium, které indukuje tvorbu kalusu a zároveň působí selektivně. Konstrukt často obsahuje kromě genů rezistence vůči herbicidům a jiným látkám také reportérový gen *gus*. Díky tomuto genu lze studovat tranzientní expresi, která se po histochemické reakci projeví v podobě modrých skvrn na rostlinném materiálu (Ondřej a Drobník, 2002).

Biolistika umožnila transformaci některých druhů rostlin, u nichž jsou jiné metody transformace obtížně použitelné nebo zcela nevhodné. Lze ji aplikovat na široké spektrum buněčných kultur a explantátů. Například kukuřice může být transformována vnášením

DNA do embryogenních buněčných kultur DNA, zatímco v případě pšenice a ječmene jsou transformována zygotická embrya (Potrykus a Spangenberg, 1995).

Hlavní nevýhodou snižující účinnost biolistických metod je neschopnost velké části projektilů proniknout do rostlinného pletiva. Bylo zjištěno, že pouze 7 – 10 % z nich proniká alespoň do epidermis. Pokud jsou buňky zasaženy, pak v naprosté většině případů se mikročástice dostane pouze do cytoplazmy, kde nemůže dojít k expresi vneseného genu. Aby byla transformace účinná, musí být zasaženo jádro buňky a zároveň jeho poškození nesmí být natolik rozsáhlé, aby buňka odumřela (Ondřej a Drobník, 2002).

Sanford a kol., 1993 popsal faktory, které mohou významně ovlivnit úspěšnost transformace biolistickými metodami. Jedná se především o hybnost částic, jejich rozptyl při dopadu a kapacitu pro přenos DNA. Mezi biologické faktory pak patří vývojové stadium rostlinného materiálu a složení kultivačního média.

## **4.2 Vektory**

Molekuly DNA, které se využívají ke vnesení segmentu DNA do genomu hostitelské buňky, označujeme souhrnně jako vektory. Patří mezi ně kromě plazmidů, které jsou bakteriálního původu, také nukleové kyseliny bakteriofágů, kosmidy a umělé chromozómy. Podle způsobu použití rozlišujeme vektory klonovací a expresní.

Klonovací vektory slouží primárně k vytvoření mnoha kopií vloženého segmentu DNA. Po pomnožení lze vektor izolovat a využít ho k dalším manipulačním technikám. Jejich důležitou součástí je především replikační počátek a jedno či více restričních míst. Většinou také obsahují alespoň jeden markerový gen, nejčastěji pro rezistenci k antibiotikům.

Expresní vektory slouží k produkci proteinu kódovaného inzertovaným genem hostitelskými buňkami. Kromě sekvencí, které jsou obsaženy v klonovacích vektorech, je jejich součástí také promotor, terminátor, sekvence regulující expresi, RBS (ribosome-binding site) sekvence a úsek usnadňující izolaci rekombinantního proteinu (Rosypal a kol., 2002).

## **4.3 Selekční a reportérové geny**

K odlišení transformovaných buněk od netransformovaných se využívají specifické geny, které jsou obvykle součástí vektorů. Jedná se o selekční a reportérové geny.

Produktem selekčních genů jsou často enzymy zodpovědné za rezistenci transformovaných explantátů vůči látkám, které jsou pro netransgenní rostliny toxické. Jedná se především o antibiotika a herbicidy. Výsledkem je úspěšné přežívání a množení transgenních buněk, zatímco netransgenní díky přítomnosti toxické látky hynou. Často používaným genem pro selekci je například gen *bar*, který byl izolován z bakterie rodu *Streptomyces*. Jeho produktem je acetyltransferáza. Tento enzym uděluje transgenním buňkám a rostlinám rezistenci vůči fosfotricinu a herbicidu bialaphos. Dalšími používanými geny jsou gen *nptII* (Neomycin phosphotransferase II), který uděluje rezistenci vůči antibiotikům kanamycin, neomycin a geneticin a gen *hpt* (Hygromycin phosphotransferase), zodpovědný za odolnost vůči antibiotiku hygromycin.

Reportérové geny se využívají k hodnocení genové exprese v pletivech či tkáních. Jejich nejdůležitějšími vlastnostmi jsou jednak snadná detekovatelnost a dále minimální negativní vliv na buňky, v nichž jsou exprimovány. V transgenozí rostlin se velmi často jako reportérový gen používá gen *gus* (resp. *uidA*) kódující enzym  $\beta$ -glukuronidázu. Aktivita tohoto enzymu vede k tvorbě modré sraženiny, umožňující lokalizaci genové exprese. Dalšími reporterovými markery jsou gen pro zeleně fluoreskující protein (*gfp*), izolovaný z medúzy, nebo gen pro enzym luciferázu (*luc*) (Ondřej a Drobník, 2002).

## 5 Žito seté (*Secale cereale* L.)

Žito má původ v oblasti Přední Asie a Kavkazu, kde se vyskytovalo jako plevel. Je obilninou typickou pro severní části mírného zeměpisného pásu. Pěstuje se především na chudších půdách ve vyšších polohách. Je významnou zemědělskou plodinou v mnoha evropských státech, mezi něž patří Polsko, Německo, Rusko nebo Ukrajina (Popelka, 2002).

V rámci rodu Žito (*Secale*) existuje pět různých druhů: *Secale silvestre*, *Secale vavilovii*, *Secale montanum*, *Secale africanum* a *Secale cereale*. Poslední zmíněný druh zahrnuje zemědělsky významné kultivary, které byly v průběhu staletí vyšlechtěny. Somatický počet chromozómů u *Secale cereale* je  $2n = 14$  (Rod, 1982).

Žito patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jeho květenství má podobu klasu, který se skládá z dvoukvětých klásků a má obvykle hranolovitý tvar. Jedná se o cizosprašnou, větrosnubnou rostlinu. Má suché, nepukavé plody – obilky, které jsou nahé a mají šedozelenou až modrozelenou barvu. Obilné zrna se skládá ze dvou obalových vrstev, dále endospermu a klíčku (zárodka, embrya). Obalové vrstvy jsou tvořeny tenkým vnějším oplodím a vnitřním osemením. Endosperm je živné pletivo, které je představováno jednou vrstvou aleuronových buněk a moučným jádrem, obsahujícím převážně škrob. Klíček (zárodek, embryo) zaujímá nejmenší část zrna, ve kterém jsou vytvořeny základy budoucí rostliny (Tichá a Vyzínová, 2006).

Žitné zrna obsahuje pouze okolo 9 % dusíkatých látek, z nichž většinu představují zásobní bílkoviny gliadin a gluteniny. Z polysacharidů je zastoupen především škrob, ale také xylany a arboxylany.

Žito je využíváno pro potravinářské, krmivářské, technické a farmaceutické účely. V potravinářství se ze žita vyrábí některé druhy chleba, kávové náhražky a líh – v Kanadě a USA například žitná whisky. Ke krmným účelům je žito využíváno jen omezeně, a to díky nižší výživné hodnotě, hořké chuti a obsahu antinutričních látek. Mezi ně patří například inhibitory proteáz, alkylresorcinol a antinutriční polysacharidy arboxylany, které zvyšují viskozitu střevního obsahu a tím omezují pohyblivost substrátů, trávicích enzymů i emulgujících žlučových kyselin. Zhoršují také kontakt živin se střevní mukózou. Především odrůdy s vysokým výnosem zelené píče a s pomalým stárnutím se využívají jako tzv. časné jarní zelené krmení. Ve farmakologii se tato obilovina využívá k získávání námelových alkaloidů, které jsou produkovány paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*) po umělé infekci rostlin (Tichá a Vyzínová, 2006).

V porovnání s ostatními obilovinami je žito velmi odolné vůči biotickým i abiotickým stresům. Existuje ozimá i jarní forma, v České republice je pěstováno pouze ozimé žito. Tato rostlina snáší díky dobře vyvinutému kořenovému systému i chudší půdy. (Tichá a Vyzínová, 2006). Je rezistentní i vůči nízkým teplotám, což umožňuje jeho pěstování ve vyšších nadmořských výškách a v severnějších oblastech, kde jsou pro jiné obiloviny již nevhodné podmínky (Popelka, 2002).

## **5.1 Faktory ovlivňující *in vitro* kultivaci žita**

Žito je, podobně jako ostatní obiloviny, obtížně transformovatelnou rostlinou. Ve srovnání s jinými obilovinami, zejména pšenicí a ječmenem není mnoho publikovaných prací, které se zabývají *in vitro* systémem a zejména transformací.

Základním předpokladem pro úspěšnou transformaci je právě vypracování efektivního kultivačního protokolu pro regeneraci rostlin z explantátových kultur. V posledních desetiletích bylo provedeno několik studií zabývajících se jednotlivými faktory, které mají vliv na úspěšnost indukce tvorby kalusu a následné regenerace kompletních rostlin. Jedná se především o typ explantátu – nejčastěji jsou používána zralá nebo nezralá zygotická embrya, dále pak o jejich velikost a stáří (respektive dobu uplynulou od opylení v okamžiku sklizně klasů). Efektivitu kultivace významně ovlivňuje také složení kultivačního média – především typ použitých sacharidů a syntetických hormonů a jejich koncentrace. Velmi podstatnou roli hraje u žita stejně, jako u jiných obilovin, odrůda.

### **5.1.1 Typ explantátu**

První studie zabývající se kalusovými kulturami žita byly provedeny v roce 1958 a pracovaly se zralými embryi. Později byla jako explantáty využívána také nezralá embrya, nezralá květenství, mladé listy nebo prášničky (Birsin a Ozgen, 2008).

Pro *in vitro* kultivaci žita se jako explantát používají v současné době především embrya. Nejčastěji se jedná o embrya zralá nebo nezralá, méně často endospermem vyživovaná embrya.

Nezralá embrya jsou extirpována ze zrna klasů, které byly sklizeny 10. – 18. den po opylení (Birsin a Ozgen, 2008; Ward a Jordan, 2001). Nevýhodou jejich použití je



především časová náročnost, jelikož je nutné udržovat rostliny až do tvorby mladých embryí. Extirpace musí být provedena ihned po sklizení klasů.

Zralá embrya jsou extirpována ze zralých zrn, jejichž výhodou je možnost dlouhodobého uchování. Birsin a Ozgen (2008) použili ve svém výzkumu také endospermem vyživovaná embrya. Jedná se o zralá embrya, která jsou na indukční médium umístěna i se zrnem, od něhož nejsou zcela oddělena.

Většina publikací vyhodnotila jako nejvhodnější explantát pro *in vitro* regeneraci obilovin nezralá embrya. Zralá embrya se vyznačovala vysokou schopností tvorby kalusu (80 – 90 %), ale regenerační schopnost byla velmi nízká (Ward a Jordan, 2001). Výhodou použití endospermem vyživovaných embryí je poměrně vysoká regenerační kapacita vzniklých kalusů, naproti tomu schopnost indukce tvorby kalusu je zde nižší (Birsin a Ozgen, 2008).

V případě použití nezralých embryí je důležitým parametrem rovněž jejich velikost, respektive stáří (doba uplynulá od opylení). Podle Lu a kol. (1984) je optimální velikost 0,5 – 2,0 mm, Bebeli a kol. (1988) stanovil ideální velikost nezralého embrya 1 mm. Ward a Jordan (2001) označili jako vhodná pro *in vitro* kultivaci žita nezralá embrya o velikosti 1 – 3,5 mm, která byla extirpována ze zrn sklizených 13. den po opylení. Přesné parametry jsou však vždy závislé na konkrétní odrůdě. Obdobné výzkumy byly prováděny také na jiných obilovinách a bylo zjištěno, že úspěšnost regenerace závisí na individuálním fyziologickém vývoji embrya. Ten je specifický nejen pro druh, ale často i pro varietu.

Předčasné klíčení, které je častým problémem *in vitro* kultivace, bylo sníženo kultivací štítku embrya, který byl oddělen od ostatních částí. Vzhledem k časové náročnosti optimalizace médií je právě kultivace vyextirpovaného štítku preferovanou strategií, která brání nežádoucímu klíčení a vede ke stejnému efektu (Ward a Jordan, 2001).

### **5.1.2 Složení kultivačního média**

Komponenty, obsažené v kultivačních médiích, hrají významnou roli v indukci tvorby kalusů i regeneraci rostlin. Existují dva základní typy média, využívané v *in vitro* kultivaci – indukční a regenerační médium. Indukční médium stimuluje tvorbu kalusu z explantátů, které jsou na něj umístěny ihned po jejich izolaci od rostliny. Vytvořené kalusy jsou po určité době kultivace přeneseny na regenerační médium, které indukuje tvorbu kořenů a prýtů. Složení indukčního a regeneračního média se v základních

komponentech shoduje. Liší se pouze některými doplňkovými složkami, především růstovými regulátory. V některých případech se při kultivaci používá také transitní médium, které je určeno pro kultivaci kalusů před jejich umístěním na médium regenerační. V různých studiích byl zkoumán především vliv růstových regulátorů a sacharidů, ale i dalších složek, o které je kultivační médium možné obohatit.

### *Růstové regulátory*

Při kultivaci obilovin se využívají z rostlinných hormonů především syntetické auxiny (picloram, dicamba, 2,4 – D) a dále syntetické cytokininy (BAP, kinetin, benzyladenin).

Vliv růstových regulátorů na tkáňové kultury obilovin byl zkoumán v mnoha studiích. Bylo zjištěno, že auxiny (nejčastěji 2,4-D) jsou nezbytné pro založení embryonálních kalusů i pro jejich regeneraci. U indukčního média určeného pro obiloviny byla shledána jako optimální koncentrace auxinů  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ , regenerační médium by mělo obsahovat podstatně nižší koncentraci auxinů. Konkrétně v případě žita by měla být optimální koncentrace auxinů v indukčním médiu poněkud nižší –  $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$  (Ward a Jordan, 2001).

Przetakiewicz a kol. (2002) použili ve své studii zabývající se vlivem auxinů na regeneraci některých obilovin také syntetické auxiny picloram a dicamba. Například pro kultivaci triticales je nejvhodnější použití indukčního média, obsahujícího picloram samotný nebo v kombinaci s dicambou.

Dicamba způsobovala nežádoucí předčasnou regeneraci u některých odrůd žita, zatímco použití 2,4-D u těchto odrůd předčasnou regeneraci úspěšně potlačovalo (Popelka a Altpeter, 2001).

Cytokininy stimulují regeneraci somatických embryoidů, proto byly některými autory přidávány do regeneračního média. Ward a Jordan (2001) nepozorovali žádný významný účinek po přidavku cytokininů do regeneračního média, pouze kinetin a benzyladenin regeneraci mírně potlačoval. V experimentu, který provedli Popelka a Altpeter (2001), byly kalusy jedné ze tří použitých odrůd regenerovány na médiu obsahujícím BAP. U těchto kalusů byla zaznamenána rychlejší elongace regenerovaných výhonků, ale na množství regenerujících kalusů tento fytohormon vliv neměl.

### *Sacharidy*

Sacharidy obsažené v kultivačním médiu slouží jako zdroj uhlíku pro explantátové kultury. Ward a Jordan (2001) použili ve svých studiích jako zdroj uhlíku maltózu a sacharózu. Explantáty, které byly kultivovány na médiích s maltózou, vykazovaly vyšší somatickou embryogenezi. Na regeneraci rostlin typ sacharidu významný vliv neměl. Podobný výzkum provedli také Popelka a Altpeter (2001), kteří pozorovali rovněž vyšší schopnost indukce kalusu u médií s maltózou. Rychlost regenerace i počet rostlin regenerovaných z jednoho kalusu však byly u všech odrůd žita podstatně vyšší při použití indukčního média se sacharózou.

Bylo zjištěno, že kultury, rostoucí na médiu se sacharózou, mají rychlejší metabolické pochody oproti kulturám, které rostou na médiu s maltózou. V důsledku rychlého metabolismu dochází u kultur, rostoucích na sacharózovém médiu, k rychlejšímu hromadění metabolických zplodin, jako je například ethanol. Maltóza je metabolizována pomaleji a díky tomu si buněčné kultury kultivované na maltózovém médiu zachovávají déle svou identitu (Popelka a Altpeter, 2001).

### *Složka umožňující tuhnutí*

V *in vitro* kultivacích žita byl jako tuhnoucí složka použit phytigel nebo agaróza. Média, ve kterých byla místo phytagelu použita agaróza, redukovala frekvenci indukce kalusu u některých odrůd. Rovněž regenerace na agarózových médiích byla značně zpomalena (Popelka a Altpeter, 2001).

### *Další složky*

Kultivační média lze obohatit kromě růstových regulátorů a sacharidů také o další složky. Jedná se především o některé vitaminy (thiamin, *myo*-inositol), aminokyseliny (prolin, glutamin, asparagin), proteiny (casein hydrolyzát) a soli ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ).

Ward a Jordan (2001) ve svém výzkumu zjistili, že thiamin, glutamin a asparagin mohou být při kultivaci prospěšné. V případě *myo*-inositolu, casein hydrolyzátu, prolinu a mědi nebyl prokázán v této studii žádný prospěšný účinek. To bylo částečně v rozporu s výsledky experimentu, který provedli Popelka a Altpeter (2001). V jejich studii byl

prokázán genotypově specifický účinek síranu měďnatého. U jedné ze tří odrůd výrazně zvyšoval počet regenerovaných rostlin. Vliv mědi na regeneraci byl studován již v minulosti na kulturách pšenice, ječmene, triticales a tabáku a byl potvrzen pozitivní vliv na regeneraci u mnoha odrůd těchto obilovin.

### 5.1.3 Odrůda

Bylo vyšlechtěno mnoho jarních i ozimých odrůd žita, z nichž každá má poněkud odlišné požadavky na *in vitro* kultivaci. Některé odrůdy jsou kultivovatelné jen velmi obtížně. Proto je zapotřebí nalézt vhodné genotypy žita a vyvinout pro konkrétní odrůdu specifický kultivační protokol zahrnující nejen vhodné složení média, ale také typ použitého explantátu a další parametry, jako je například postup sterilizace.

Autoři jednotlivých studií se zabývali odrůdami a liniemi zahrnutými ve šlechtitelských programech daného státu a oblasti. Například Ward a Jordan (2001), kteří svůj výzkum prováděli v Kanadě, se zaměřili na tři odrůdy ozimého žita (AC Rifle, RT188LV a Prima) a jednu odrůdu jarního žita (Gazelle). Varieta AC Rifle vykazovala nejvyšší schopnost indukce kalusu, nejlépe regenerovaly kalusy variety RT188LV.

Jiným příkladem může být experiment Popelky a Altpetera (2001), který probíhal v Německu. Zde byly použity celkově 3 odrůdy – jedna jarní (L 22) a dvě ozimé (L 20 a L 318). Byl zaznamenán významný rozdíl v reakci na přídavek síranu měďnatého u jednotlivých odrůd. Kalusy kultivaru L 22 vykazovaly vyšší schopnost regenerace při kultivaci na médiu obohaceném o síran měďnatý. Naproti tomu u odrůdy L 20 nebyl pozorován žádný významný vliv a v případě kultivaru L 318 byla regenerační schopnost přídavkem síranu měďnatého do média dokonce snižována.

V práci Popelky (2001) bylo kultivováno v *in vitro* podmínkách 23 různých genotypů žita včetně 11 kříženců. Byla pozorována poměrně vysoká indukční kapacita u všech použitých odrůd. Nejvyšší regenerační kapacitu vykazovaly genotypy L 15 (91,65 %) a L 22 (86,87 %) a jejich kříženec L22 x L15 (85,80 %).

## 5.2 Problematika transformace žita

Transgenoze obilovin, které jsou významnými zemědělskými plodinami, zajišťujícími obživu pro lidstvo, je poměrně obtížná. Příčinami jsou jednak nižší vnímavost k bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, která je přirozeným patogenem dvouděložných

rostlin a jednak obtížná *in vitro* regenerace. O problematice *in vitro* kultivace žita bylo pojednáno v předchozí kapitole.

První úspěšnou transformaci žita provedli Castillo a kol. (1994). Tito autoři získali 6 transgenních kalusových linií, z nichž byly regenerovány 2 rostliny žita. Efektivita a reprodukovatelnost však byla velmi nízká. V jejich studii byla použita biolistická metoda transformace aplikovaná na mladé embryogenní kalusy. Jako reportérový marker byl zvolen gen *uidA* pro glukuronidázu, selekčním genem byl gen *bar*.

Transformací žita se dále zabýval ve své disertační práci Popelka (2002). Cílem projektu bylo vyvinout efektivní a reprodukovatelný systém pro produkci transgenních rostlin žita. Jako explantát byla zvolena nezralá zygotická embrya. V této práci byla použita kromě biolistické metody také transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.

Technikou mikroprojektilového přenosu DNA bylo v této studii získáno 21 transgenních rostlin. Úspěšnost transformace byla vyšší než 2,2 %. Jako selekční marker byl použit gen *bar*. Hlavním problémem biolistické metody bylo výrazné snížení regeneračního potenciálu, které bylo patrné především u explantátů, pro jejichž transformaci bylo použito větší množství zlatých mikročástic (150 $\mu$ g). Naproti tomu při aplikaci menšího množství částic (25  $\mu$ g) nebyl detekován výraznější vliv na schopnost regenerace. V tomto případě však byla transformace málo úspěšná. Nejvyšší efektivita byla zaznamenána při aplikaci 50  $\mu$ g mikročástic a zároveň při pre-kultivaci explantátů 4 – 5 dní před transformací.

Transgenoze prostřednictvím agrobakterií měla efektivitu 3,87 % a bylo pomocí ní vyprodukováno 35 transgenních rostlin. Jako selekční marker byl použit gen *nptII*, který je zodpovědný za rezistenci ke kanamycinu. Exprimovaný protein NPTII byl detekován pomocí metody ELISA.

Biolistickou metodou pomocí přístroje PDS – 1000 / He, který byl použit v bakalářské práci, již bylo úspěšně transformováno mnoho druhů rostlin. Jedná se například o kukuřici, některé odrůdy rýže, pšenici, cukrovou třtinu, sóju, bavlník, topol, brusinku, tabák nebo známou modelovou rostlinu huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Ostřelovány byly embryogenní kultury (kukuřice, pšenice, sója), nezralá embrya (rýže), kalusové kultury (topol, tabák), kořenové kultury (*Arabidopsis thaliana*), případně meristémy (bavlník, sója). U některých rostlin je možné použít také pletiva stonku, listu či květu.

## 6 Materiál a metody

Kultivace žita v *in vitro* podmínkách i jeho transformace je poměrně komplikovaná. Každá odrůda vyžaduje poněkud odlišné kultivační podmínky. V rámci experimentální části bakalářské práce byla provedena selekce odrůd s vysokou indukční a regenerační schopností a pro tyto odrůdy byl vypracován kultivační protokol. Vybrané variety byly následně transformovány metodou „Particle delivery“.

### 6.1 Rostlinný materiál

V experimentech byla jako explantát použita zralá a nezralá zygotická embrya ozimého žita těchto odrůd: Kapitan, Selgo, Aventino, Visello, Evolo a Gonelo.

#### AVENTINO

Tato středně pozdní odrůda žita je určena pro potravinářské účely. Středně dlouhé až dlouhé rostliny se vyznačují střední odolností k poléhání. Jsou velmi odolné vůči napadení plísní sněžnou, padlím travním, skvrnitostem a rzím. Dalšími výhodnými vlastnostmi jsou nízká náročnost na stanovištní podmínky a vysoká výnosnost i v méně příznivých oblastech.

#### SELGO

Selgo patří mezi ranější odrůdy žita. Je vhodné pro všechny produkční oblasti žita v ČR, zvláště pak pro chladnější a vlhčí klima. Vyznačuje se vysokým a stabilním výnosem zrna a dobrou odolností k poléhání.

#### KAPITAN

Jedná se o středně ranou odrůdu žita, která je adaptabilnější a odolnější než hybridní typy. Je vhodná i do méně úrodných a příznivých podmínek. Středně vysoké rostliny se vyznačují dobrou vitalitou, střední odolností k poléhání. Tato odrůda je odolná vůči padlí a rhynchosporiu. Je určena pro potravinářské účely, ale i k produkci biomasy.

Zdroj: <http://www.selgen.cz/katalog/zito-14/>

## VISELLO

Středně pozdní hybridní odrůda Visello je charakteristická velmi dobrým zdravotním stavem a rezistencí vůči napadení rzí travní. Vyznačuje se rovněž vysokými výnosy, dobrou potravinářskou i krmnou kvalitou. Lze ji využít také pro výrobu bioethanolu.

## EVOLO

Jedná se o středně pozdního hybrida s vysokým výnosovým potenciálem a zvýšenou odolností vůči poléhání. Vyznačuje se velmi dobrým zdravotním stavem.

## GONELLO

Toto hybridní žito nižšího vzrůstu lze použít v potravinářském a krmivářském průmyslu stejně jako v biotechnologiích pro výrobu ethanolu a bioplynu.

Zdroj: <http://kws-lochow.de>

### **6.1.1 Pěstování rostlinného materiálu**

Vybrané odrůdy byly pěstovány v průběhu let 2010 – 2011 v řízených podmínkách ve skleníku Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci. Rostliny byly umístěny v květináčích o průměru 25 cm. V zimním období byly přisvětlovány 4 až 6 hodin tak, aby celková doba osvětlení včetně denního světla byla 16 hodin. Teplota během dne byla 15 – 18 °C, v noci 10 – 12°C. Během vegetace byly pravidelně jedenkrát za 14 dní přihnojovány hnojivem Hydrokomplex (12,4 % dusíku; 11,4 % fosforu; 17,7 % draslíku). Klasy byly odstřiženy v období 14 – 18 dní po opylení, kdy nezralá zygotycká embrya dosahovala velikosti v rozmezí 1 – 2,5 mm.

### **6.2 Vypracování kultivačního protokolu**

Kultivační protokol pro jednotlivé odrůdy zahrnoval jednak optimalizaci sterilizace explantátů a dále testování jednotlivých typů kultivačních médií.

## 6.2.1 Kultivační média

Příprava kultivačních médií spočívala v navážení jednotlivých složek na analytických vahách a jejich rozpuštění v destilované vodě za průběžného míchání na magnetické míchače. Po rozpuštění všech látek s výjimkou tuhnoucí složky – phytagelu, bylo upraveno pH pomocí přidavku 1M NaOH na hodnotu 5,8. phytagel byl rozpuštěn v destilované vodě umístěné v samostatné lahvi a autoklávován. Médium bylo poté přefiltrováno za sterilních podmínek a umístěno spolu s roztokem Phytagelu o odpovídající koncentraci na 30 minut do vodní lázně o teplotě 56 °C. Po zahřátí byl roztok Phytagelu smíchán s roztokem obsahujícím ostatní složky a za aseptických podmínek rozlit do sterilních plastových Petriho misek o průměru 10 cm (resp. 5 cm – v případě osmotického média). Po ztuhnutí bylo takto připravené médium skladováno v ledničce za teploty 3 – 5 °C.

Kultivační média pro indukci kalusu a regeneraci rostlin byla sestavena na základě dostupné literatury a zkušeností laboratoře rostlinných biotechnologií s *in vitro* kultivací ječmene a pšenice. Všechna média jsou modifikována a toto jejich složení nebylo publikováno.

Složení jednotlivých médií je uvedeno v následujících tabulkách (tab. 1 – 4):

Tab.1: Složení indukčních médií

[REDACTED]	[REDACTED]		
	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]



Tab. 2: Složení transitního média

[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

Tab. 3: Složení regeneračních médií

[REDACTED]	[REDACTED]		
	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Tab. 4: Složení osmotického média

■	■
	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■
■	■

\* Murashige a Skooge (1962)

### 6.2.2 Sterilizace explantátů

Sterilizace zrna je nutná pro eliminaci patogenů, které se přirozeně vyskytují na jeho povrchu. Především v případě nezralých embryí je zrno kontaminováno velkým množstvím mikroorganismů, které mohou způsobit znehodnocení explantátových kultur.

Sterilizace nezralých zygotických embryí byla provedena podle Harwood a Smedley (2009). Zrna byla promyta v 70% roztoku ethanolu pod dobu 3 minut a následně v 6% roztoku NaClO po dobu 6 minut. Na závěr byla propláchnuta 5krát ve sterilní destilované vodě.

Zralá embrya jsou z časových důvodů výhodnějším explantátovým materiálem. Nevyžadují pěstování rostlin a jsou vždy k dispozici díky možnosti dlouhodobého skladování. Sterilizace zralých zygotických embryí je však poněkud náročnější. Příčinou je vyšší výskyt přirozených patogenů na jejich povrchu.

Na základě zkušeností z předešlých experimentů byly testovány tyto postupy sterilizace zralých embryí:

1. 70% ethanol – 3 minuty, 0,1 % HgCl<sub>2</sub> – 20 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou;

2. 70% ethanol – 3 minuty, 1 % HgCl<sub>2</sub> - 10 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou;
3. 70% ethanol – 3 minuty, 7 % NaClO – 10 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou;
4. 70% ethanol – 3 minuty, 7 % NaClO – 5 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou.

### **6.2.3 Indukce tvorby kalusu**

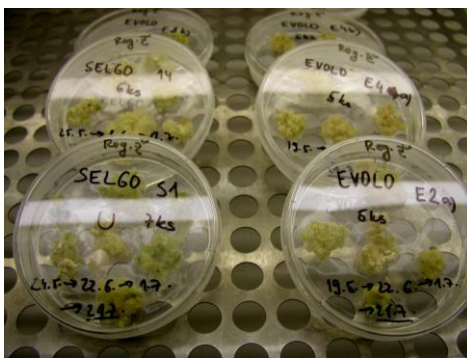
Po sterilizaci zrn byla provedena izolace zralých a nezralých embryí. Za použití preparační lupy (MSt 130 9522, Poland), skalpelu a pinzety byla za sterilních podmínek embrya oddělena od ostatních částí zrna a následně bylo odstraněno koleoptile a kořenová část. Pro indukci kalusu byl kultivován štítek, který byl na indukční médium umístěn skutečnými částí dolů. Byly použity 3 typy indukčního média, jejichž složení je uvedeno v tabulce 1.

Embrya byla na indukčním médiu kultivována celkově 6 týdnů s dvěma průběžnými pasážemi na čerstvé médium se stejným složením po 2 týdnech. Kultivace probíhala v termostatu za tmy při teplotě 26 °C. Po 14 dnech od počátku kultivace se začaly vytvářet kalusy se somatickými embryi.

### **6.2.4 Regenerace**

Po 6 týdnech kultivace na indukčním médiu byly vytvořené kalusy přeneseny na transitní médium (viz tab. 2), kde byly ponechány 2 týdny za teploty 23 °C v pološeru.

Poté byly přeneseny jeden ze tří typů regeneračního média (viz tabulka 3), na kterém byly kultivovány celkem 6 týdnů s 2 průběžnými pasážemi na čerstvé médium o stejném složení. Regenerace rostlin probíhala za podmínek osvětlení 16 hodin denně a teploty 23 °C. Po 2-3 týdnech od přenesení na regenerační médium byla pozorována tvorba zelených výhonků a kořenů (viz obr. 6).



Obr. 6: Kalusy různých odrůd, klutivované na regeneračním médiu.

Snímek zhotoven 3 týdny po přenesení na regenerační médium.

(Foto: autor)

### 6.3 Transformace zralých embryí biolistickou metodou

Zralá zygotická embrya byla po sterilizaci zrn (viz kapitola 4.2.2 Sterilizace explantátů) izolována za aseptických podmínek a umístěna skutelární stranou štítku dolů na indukční médium CIR 2 (viz tab. 1). Následující den byla přemístěna skutelární stranou štítku nahoru na osmotické médium (viz tab. 4), kde byla ponechána 4 hodiny před transformací a 12 hodin po ní. Metodou mikroprojektilového transferu byl do cílových buněk vnesen plazmid pAHC25 se selekčním genem *bar* a reportérovým genem *gus*. Tento plazmid byl použit pro ověření účinnosti transformační techniky. Po 48 hodinách od transformace bylo u vybraných embryí provedeno ověření exprese transgenů.

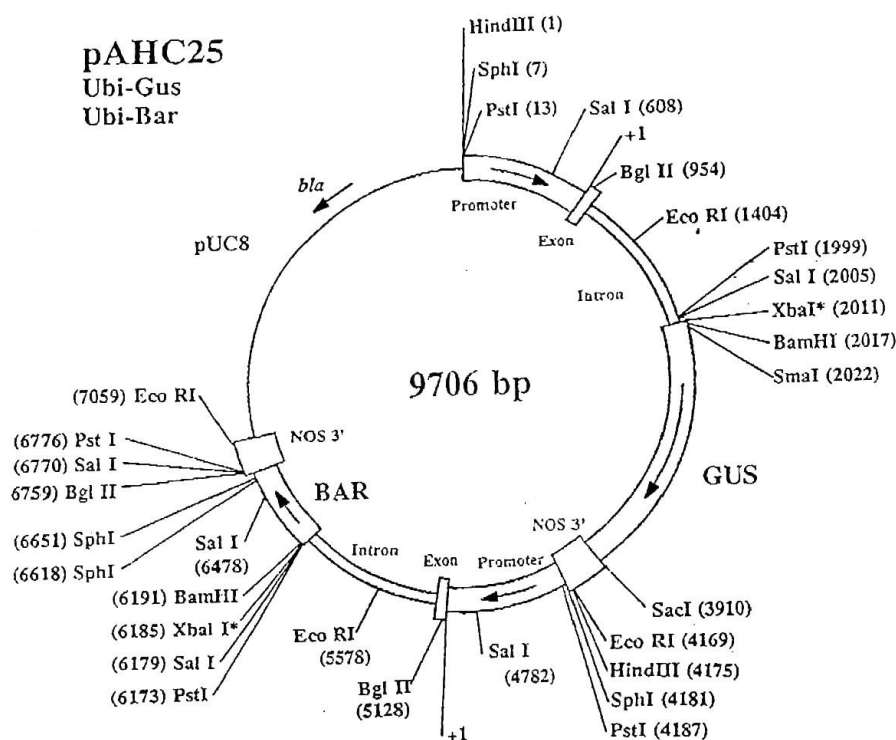
Ostatní embrya byla kultivována skutelární stranou štítku dolů 6 týdnů na indukčním médiu CIR 2 s přidavkem herbicidu Bialaphos jako selekčního činidla. V průběhu těchto 6 týdnů byla provedena 2krát průběžná pasáž na čerstvé médium o stejném složení. Následně byly vytvořené kalusy přeneseny na transitní médium TR (viz tab. 2) doplněné o stejné selekční činidlo, kde byly kultivovány 2 týdny. Další kultivace probíhala 6 týdnů na regeneračním médiu CIR 2 s herbicidem Bialaphos s 2 průběžnými pasážemi.

#### 6.3.1 Plazmid pAHC25

Plazmid pAHC25 (Christensen a Quail, 1996) byl v našich experimentech použit pro ověření transformace zralých a nezralých zygotických embryí žita. Obsahuje selekční gen *bar* a reportérový gen *gus*, oba tyto geny jsou pod konstitutivním promotorem – maize ubiquitin (*ubi-1*) a jsou zakončeny terminační sekvencí *nos* (nopalín syntasa) (viz obr. 7).

Gen *gus* je jedním z nejčastěji používaných reportérových genů v transformačních vektorech, které jsou určeny pro rostliny. Je používán ke kvantitativním i kvalitativním analýzám exprese genu v rostlinných pletivech. Kóduje enzym  $\beta$ -glukuronidázu, k vyhodnocení exprese se používá roztok X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylglukuronid). Aktivita *gus* vede k vytvoření modrých skvrn, díky nimž jsme schopni lokalizovat buňku nebo skupinu buněk, v nichž dochází k expresi. Byl původně izolován z genomu bakterie *Escherichia coli*.

Gen *bar* produkuje enzym PAT (fosfotricinacetyltransferázu), který je zodpovědný za detoxifikaci fosfotricinu. Uděluje transgenní rostlině rezistenci vůči tomuto herbicidu. Může být použit pro selekci rostlin v prvních generacích. Rostliny mohou být v růstové fázi 25 (hlavní odnožování) ošetřeny herbicidem Basta, což umožní rychlé vyhledání transgenních rostlin v generacích T0 a T1. Gen *bar* pochází z bakterie *Streptomyces hygroscopicus*.



Obr. 7: Plazmid pAHC25

(Christensen a Quail, 1996)

### 6.3.2 Metoda mikroprojektilového přenosu DNA - „Particle delivery“

[Redacted text block]

[Redacted text block]



Obr. 8: Přístroj PDS-1000/He  
(Foto: autor)

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



### 6.3.3 Ověření transgenní exprese genu *gus*

Histochemická zkouška, ověřující transgenní expresi genu pro glukuronidázu, byla provedena 48 hodin po transformaci. Embrya určená k tomuto testu byla inkubována přes noc v roztoku X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylglukuronid) při teplotě 37°C. V případě přítomnosti transgenních buněk byla na explantátech pod binokulární lupou pozorována modrá sloučenina v podobě skvrn. Tato látka vzniká štěpením substrátu X-gluc enzymem  $\beta$ -glukuronidázu, kódovaným genem *gus*.



## 7 Výsledky

V rámci bakalářské práce bylo testováno šest odrůd ozimého žita: Aventino, Evolo, Gonelo, Kapitan, Selgo a Vinsello. Nejdříve byl proveden předběžný výběr vhodných odrůd. Bylo kultivováno vždy 30 embryí ve dvou opakováních s dvěma hladinami syntetického auxinu 2,4-D (2,5 mg.l<sup>-1</sup>, 5,0 mg.l<sup>-1</sup>). Na základě těchto předběžných experimentů byly k dalšímu studiu vybrány tři odrůdy, které vykazovaly nejvyšší indukci kalusu: Aventino, Kapitan a Selgo. U těchto tří odrůd byla testována indukce kalusu a počet regenerovaných rostlin u jednotlivých typů kultivačních médií. Bylo kultivováno 30 embryí každé odrůdy ve třech opakováních s použitím různých syntetických fytohormonů.

Součástí experimentu bylo ověření možnosti transformace pomocí metody mikroprojektilového přenosu DNA. Expres genů *gus*, který byl součástí plazmidu pAHC25, byla ověřena histochemicky.

### 7.1 Optimalizace sterilizace rostlinného materiálu

Nezralé obilky (14 – 21 dní po opylení), které byly sterilizovány NaClO, nevykazovaly žádný stupeň kontaminace. Taktéž jejich vitalita nebyla omezena a indukce kalusu byla pozorována za 7 dní od počátku jejich kultivace.

Sterilizace zralých semen však byla velmi problematická. Příčinou je větší množství přirozených patogenů vyskytujících se na povrchu zralých zrn. Proto byly testovány čtyři postupy sterilizace:

1. 70% ethanol – 3 minuty, 0,1 % HgCl<sub>2</sub> – 20 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou;
2. 70% ethanol – 3 minuty, 1 % HgCl<sub>2</sub> - 10 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou;
3. 70% ethanol – 3 minuty, 7 % NaClO – 10 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou;
4. 70% ethanol – 3 minuty, 7 % NaClO – 5 minut, 5krát promytí sterilní destilovanou vodou.

Při aplikaci obou postupů používajících HgCl<sub>2</sub> (postup 1. a 2.) došlo u většiny explantátů k odumření většiny buněk a nebyla pozorována schopnost tvorby kalusu.

U embryí sterilizovaných 5 minut 7% NaClO (postup 4.) byla vysoká míra kontaminací. Tento problém byl v nepatrně nižší míře pozorován také u embryí sterilizovaných 7 % NaClO po dobu 10 minut.

## **7.2 Hodnocení indukční a regenerační kapacity z hlediska jednotlivých odrůd a složení kultivačního média**

Indukční a regenerační kapacita jsou základním předpokladem úspěšné transformace. Schopnost indukce kalusu byla sledována u nezralých a zralých embryí s cílem transformovat hospodářsky významné geny. Vizuálně byla hodnocena indukce kalusu u odrůd Aventino, Kapitan a Selgo u embryí, která byla kultivována na médiích s odlišným obsahem fytohormonů (auxinů a cytokininů). V rámci jednotlivých pasáží byla posuzována struktura kalusu (výskyt somatických embryí), barva kalusu a velikost kalusu. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých faktorů (genotyp, typ použitého fytohormonu) na tvorbu kalusu a regeneraci rostlin je shrnuto v následujících tabulkách (tab. 5 – 13) a grafech (graf 1 – 5).

U explantátů jednotlivých odrůd byla zjišťována indukční a regenerační kapacita. Indukční kapacita byla počítána jako počet embryí tvořících kalus / počet kultivovaných embryí x 100 a její hodnota je udávána v procentech. Regenerační kapacita je udávána jako počet regenerovaných rostlin na jedné Petriho misce, tj. z 30 embryí.

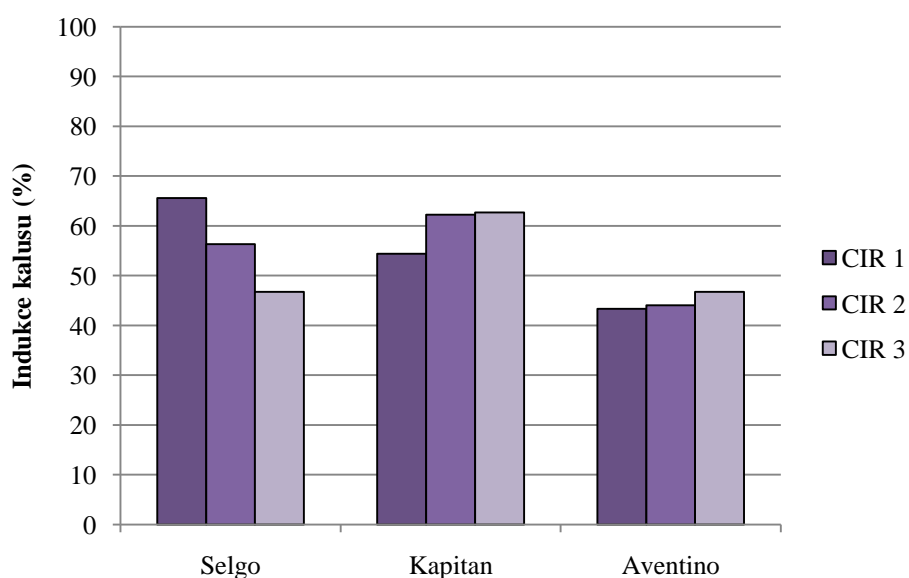
Pro statistickou analýzu byl použit program UNISTAT. Experimentální údaje byly hodnoceny dvoufaktorovou analýzou variance (ANOVA). Rozdíly mezi průměrnými hodnotami byly zjišťovány Tuckeyovým testem. Statisticky významné rozdíly na hladině  $\alpha \leq 0,001$  jsou značeny \*\*\*.

Z tabulky 6 je zřejmé, že ve vztahu k tvorbě kalusu jsou zdrojem variability pouze odrůdy. Vliv auxinů obsažených v indukčním médiu stejně jako vliv interakce mezi odrůdou a indukčním médiem nebyl statisticky prokázán. Z grafu 1 a tabulky 5 je patrné, že odrůda Selgo vykazovala nejvyšší tvorbu kalusů při kultivaci na médiu CIR 1 (2,4–D), variety Kapitan a Aventino při použití média CIR 3 (Picloram)

**Tabulka 5:** Vliv složení indukčního média na tvorbu kalusu u jednotlivých odrůd

Odrůda	Indukční ódium	Počet explantátů/Petriho miska	Průměrný počet kalusů/Petriho miska	Indukce kalusu (%)
Selgo	CIR 1 (2,4-D)	30	19,7	65,6
	CIR 2 (Dicamba)	30	17,2	56,3
	CIR 3 (Picloram)	30	14,0	46,7
Kapitan	CIR 1 (2,4-D)	30	16,3	54,4
	CIR 2 (Dicamba)	30	18,7	62,2
	CIR 3 (Picloram)	30	18,8	62,7
Aventino	CIR 1 (2,4-D)	30	13,0	43,4
	CIR 2 (Dicamba)	30	13,2	44,0
	CIR 3 (Picloram)	30	14,0	46,7

\* Hodnota zjišťována po šesti týdnech kultivace na indukčním médiu



**Graf 1:** Vliv složení indukčního média na tvorbu kalusu u jednotlivých odrůd

Tab. 6: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv odrůdy a indukčního média na indukci kalusu

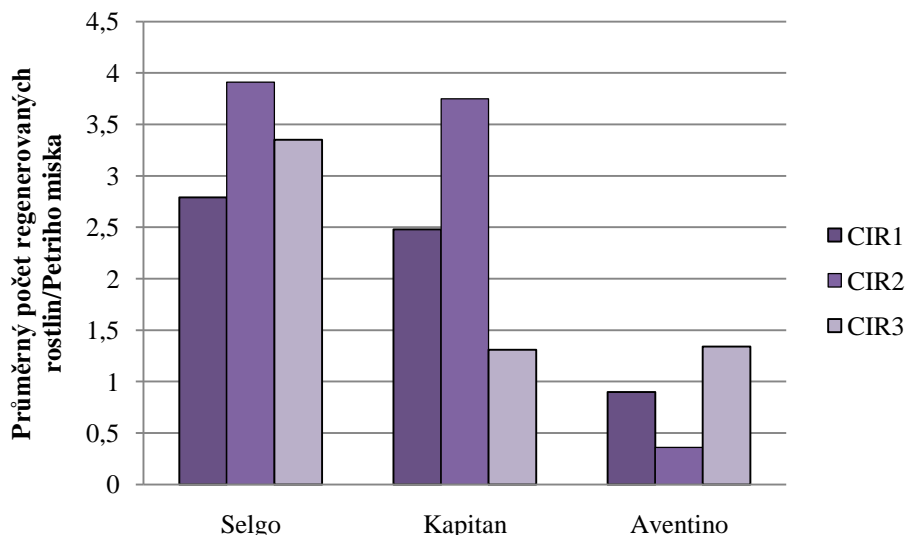
	SČ	Stupně volnosti	PČ
Odrůda	298,84	2	149,41***
Indukční médium	8,91	2	4,46
Odrůda*Indukční médium	176,57	4	44,14
Chyba	348,89	72	4,85

SČ – součet čtverců, PČ – průměrný čtverec

Interakce mezi odrůdou a indukčním médiem je statisticky významná pro regenerační kapacitu. Různý typ použitého indukčního média ovlivnil regeneraci rostlin u různých odrůd odlišným způsobem. Genotypy Selgo a Kapitan nejlépe regenerovaly při použití média CIR 2 (Dicamba), odrůda Aventino při kultivaci na médiu CIR 3 (Picloram), (viz graf 2). Vliv složení indukčního média na počet regenerovaných rostlin bez ohledu na jednotlivé odrůdy nebyl statisticky prokázán (viz tab. 8). Výsledky statistického hodnocení vlivu odrůdy a indukčního média na počet regenerovaných rostlin jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv odrůdy a indukčního média na počet regenerovaných rostlin

Odrůda	Indukční médium	Průměrný počet regenerovaných rostlin/Petriho miska	Diference
Aventino	CIR2 (dicamba)	0,36	a
Aventino	CIR1 (2,4-D)	0,90	ab
Kapitan	CIR 3 (picloram)	1,31	bc
Aventino	CIR 3 (picloram)	1,34	bd
Kapitan	CIR1 (2,4-D)	2,48	de
Selgo	CIR1 (2,4-D)	2,79	ef
Selgo	CIR 3 (picloram)	3,35	ef
Kapitan	CIR2 (dicamba)	3,75	g
Selgo	CIR2 (dicamba)	3,91	g



Graf 2: Vliv složení indukčního média na regenerační kapacitu jednotlivých odrůd

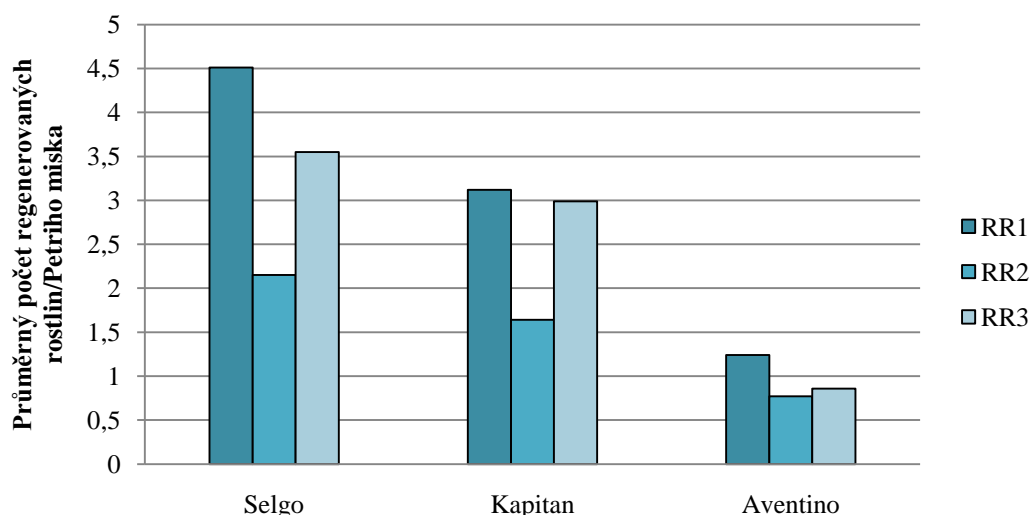
Tab. 8: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv složení indukčního média na počet regenerovaných rostlin

Indukční médium	Průměrný počet regenerovaných rostlin / Petriho miska	Diference
CIR1 (2,4-D)	1,97	a
CIR2 (Dicamba)	2,01	a
CIR3 (Picloram)	2,35	a

Regenerační médium bez fytohormonů (RR2) poskytlo u všech sledovaných odrůd výrazně méně regenerovaných rostlin než regenerační média s obsahem 2,4-D a Kinetinu (RR1 a RR3). Mezi účinkem média RR1 a RR3 nebyl pozorován statisticky významný rozdíl (viz tab. 9, tab. 10, graf 3).

Tab. 9: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv odrůdy a regeneračního média na počet regenerovaných rostlin

Odrůda	Regenerační médium	Průměrný počet regenerovaných rostlin/Petriho miska	Diference
Aventino	RR2	0,77	a
Aventino	RR3	0,86	ab
Aventino	RR1	1,24	ab
Kapitan	RR2	1,64	bc
Selgo	RR2	2,15	cd
Kapitan	RR3	2,99	de
Kapitan	RR1	3,12	de
Selgo	RR3	3,55	ef
Selgo	RR1	4,51	f



Graf 3: Vliv složení regeneračního média na regenerační kapacitu jednotlivých odrůd

Tab. 10: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv složení regeneračního média na počet regenerovaných rostlin

Regenerační médium	Průměrný počet regenerovaných rostlin / Petriho miska	Diference
RR2	1,48	a***
RR3	2,22	b
RR1	2,79	b

Výsledky statistického hodnocení vlivu odrůdy, indukčního média, regeneračního média a jejich interakcí na regeneraci rostlin jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv odrůdy, indukčního média, regeneračního média a jejich interakcí na regeneraci rostlin

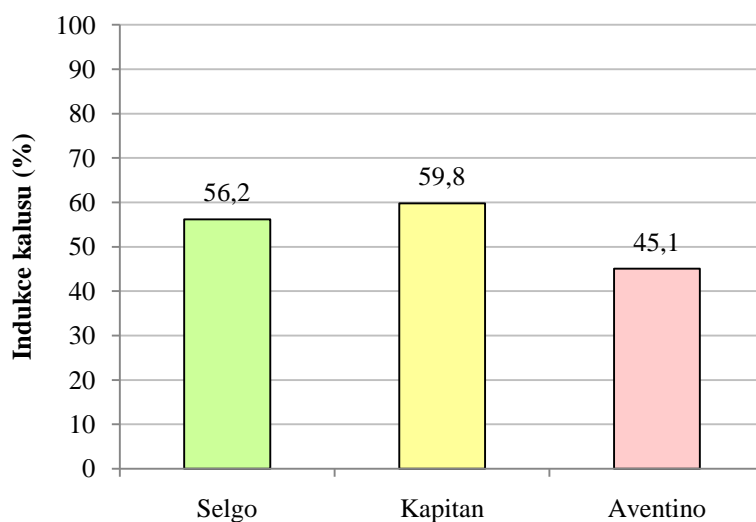
	SČ	Stupně volnosti	PČ
Odrůda	8,51	2	4,25***
Indukční médium	0,21	2	0,11
Regenerační médium	2,44	2	1,22***
Odrůda*Indukční médium	4,07	4	1,01***
Odrůda*Regenerační médium	0,49	4	0,12
Indukční médium*Regenerační médium	0,14	4	0,03
Odrůdy*Indukční médium	0,65	8	0,08
Chyba	5,93	54	0,11

SČ – součet čtverců, PČ – průměrný čtverec

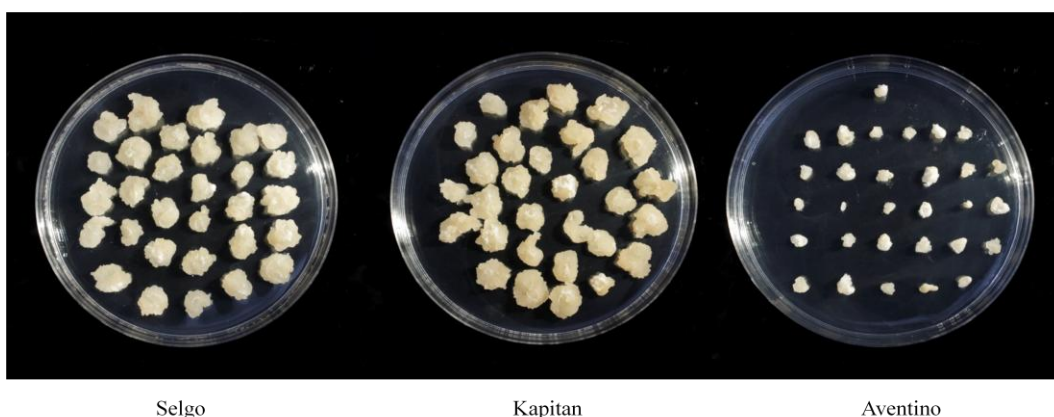
Odrůdy byly významným faktorem, ovlivňujícím schopnost tvorby kalusu. Nejvyšší indukční kapacita byla zjištěna u odrůdy Kapitan (59,8 %), embrya variety Aventino byla schopna tvorby kalusu pouze ve 45,1 % případů (viz graf 4). Srovnání indukce kalusu u jednotlivých odrůd za použití média CIR2 (Dicamba) je patrné na obr. 9. Výsledky statistického hodnocení vlivu odrůdy na tvorbu kalusu jsou uvedeny v tabulce 12.

Tab. 12: Dvoufaktoriální analýza ANOVA – vliv odrůdy na tvorbu kalusu

Odrůda	Průměrný počet kalusů	Indukce kalusu (%)	Diference
Aventino	13,44	45,1	a
Selgo	16,92	56,2	b
Kapitan	17,93	59,8	b



Graf 4: Indukční kapacita jednotlivých odrůd



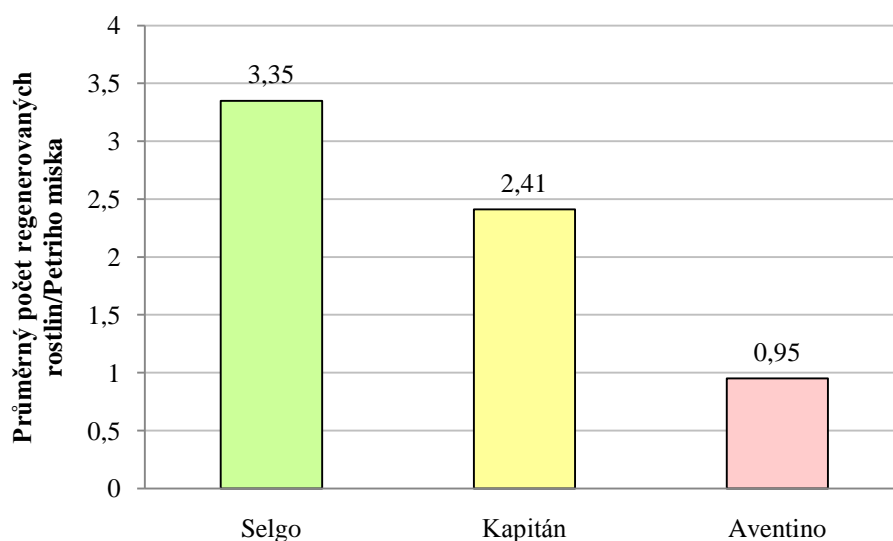
Obr. 9: Nezralá embrya odrůd Selgo, Kapitan a Aventino, kultivovaná na indukčním médiu CIR 2 (Dicamba). Explantáty foceny po 6 týdnech kultivace.

(Foto: autor)

Odrůda Selgo poskytla statisticky významně vyšší počet regenerovaných rostlin než odrůdy Kapitan a Aventino. Zároveň genotyp Kapitan regeneroval podstatně lépe než Aventino. Počet regenerovaných rostlin na jednu Petriho misku (30 embryí) se pohyboval v rozmezí 0,95 až 3,35 tj. 0,032 až 0,112 rostlin na jedno kultivované embryo (viz graf 5). Hlavním problémem při regeneraci především u odrůdy Selgo byla nadměrná tvorba kořenů, která byla částečně redukována při použití kultivačních médií s fytohormony BAP a 2,4-D (médiá RR1 a RR3). Výsledky statistického hodnocení vlivu odrůdy na počet regenerovaných rostlin jsou v tabulce 13. Regenerující rostliny variety Kapitan jsou na obr. 10.

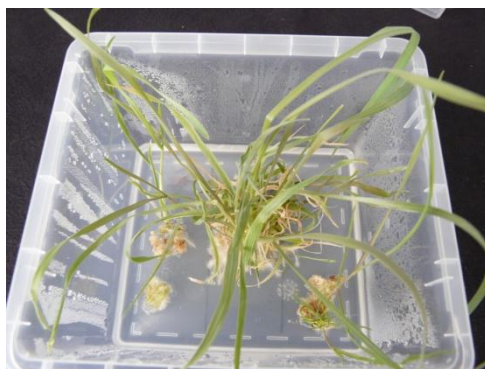
Tab. 13: Dvofaktoriální analýza ANOVA – vliv odrůdy na počet regenerovaných rostlin

	Průměrný počet regenerovaných rostlin/Petriho miska	Diference
Aventino	0,95	a
Kapitan	2,41	b***
Selgo	3,35	c***



Graf 5: Regenerační kapacita jednotlivých odrůd

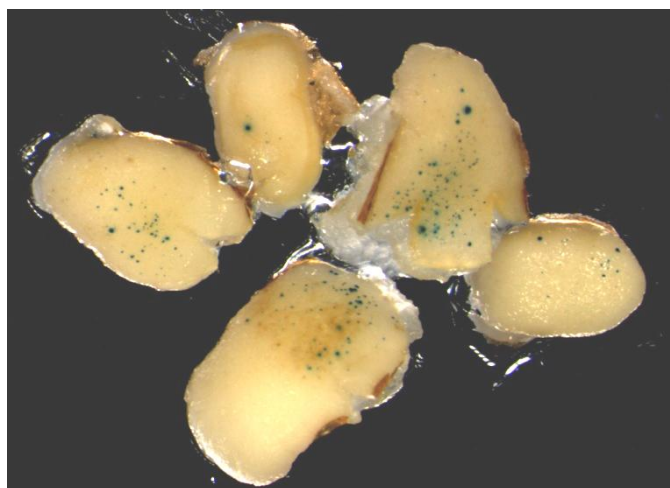




Obr. 10: Regenerující rostliny odrůdy Kapitan po čtyřech týdnech kultivace na regeneračním médiu  
(Foto: autor)

### 7.3 Hodnocení exprese transgenu *gus*

Expres transgenu *gus* u zralých embryí byla hodnocena na základě počtu modrých skvrn, vzniklých na transformovaných embryích po provedení histochemické zkoušky pomocí roztoku X-gluc. Zjištěné počty skvrn u jednotlivých odrůd jsou uvedeny v tabulce 14 (odrůda Aventino), tabulce 15 (odrůda Kapitan) a tabulce 16 (odrůda Selgo). Graficky jsou výsledky znázorněny na grafu 6. Zralá embrya s vytvořenými skvrnami po histochemické zkoušce jsou na obr. 12.



Obr. 12: Pozitivní GUS analýza (modré skvrny) – zralá embrya odrůdy Aventino  
(Foto: autor)

Nejvyšší transgenová exprese byla pozorována u variety Kapitan. Na embryích této odrůdy se po histochemické zkoušce vytvořilo v průměru 15,3 skvrn. Nejnižší hladina exprese

trans genu *gus* byla zjištěna u odrůdy Selgo, u níž bylo pozorováno pouze 13,7 skvrn na jedno embryo.

Tab. 14: Histochemická zkouška u odrůdy Aventino

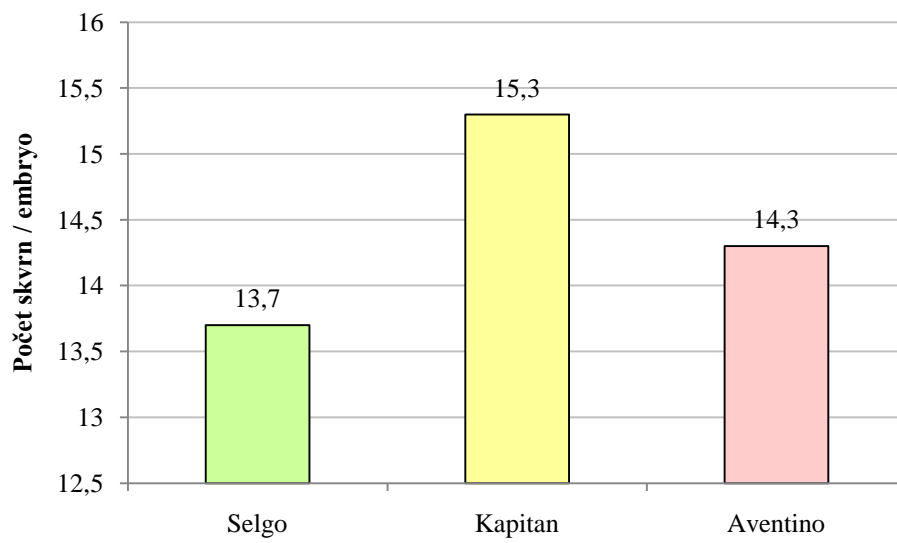
Označení Petriho misky	Počet testovaných embryí	Počet skvrn na jednotlivých embryích	Průměrný počet skvrn / embryo
A1	5	0, 12, 13, 15, 24,	12,8
A2	5	0, 10, 11, 22, 30	14,6
A3	5	0, 0, 10, 12, 30	10,4
A4	5	0, 12, 15, 20, 27	14,8
A5	5	9, 11, 11, 20, 29	16,0

Tab. 15: Histochemická zkouška u odrůdy Kapitan

Označení Petriho misky	Počet testovaných embryí	Počet skvrn na jednotlivých embryích	Průměrný počet skvrn / embryo
K1	5	0, 9, 17, 27, 29	16,4
K2	5	0, 15, 20, 20, 30	17,0
K3	5	10, 13, 13, 17, 26	15,8
K4	5	8, 10, 13, 19, 21	14,2
K5	5	0, 0, 11, 20, 35	13,2

Tab. 16: Histochemická zkouška u odrůdy Selgo

Označení Petriho misky	Počet testovaných embryí	Počet skvrn na jednotlivých embryích	Průměrný počet skvrn / embryo
S1	5	0, 6, 15, 20, 31	14,3
S2	5	7, 17, 18, 20, 20	16,4
S3	5	0, 0, 0, 31, 32	12,6
S4	5	0, 10, 16, 24, 25	15,0
S5	5	7, 7, 13, 13, 25	13,0



Graf 6: Tvorba skvrn při histochemické zkoušce exprese genu *gus*

## 8 Diskuse

Žito je podobně jako ostatní obiloviny z hlediska *in vitro* kultivace a transgenozy považováno za rekalcitrantní (problematickou) rostlinu. V důsledku nízké vnímavosti k přirozenému patogenu dvouděložných rostlin *A. tumefaciens* je tato metoda transformace u obilovin poněkud obtížněji aplikovatelná. Hlavní problém při *in vitro* kultivaci spočívá ve skutečnosti, že indukční a regenerační kapacita obilovin je celkově nižší než u dvouděložných rostlin. Podmínky *in vitro* kultivace je zároveň zapotřebí navrhnout a optimalizovat vždy pro konkrétní odrůdu, neboť indukční i regenerační odpověď na jednotlivé složky kultivačních médií se u různých genotypů liší.

V minulosti se již *in vitro* kultivací žita zabývalo několik autorů, ale jejich studie byly zaměřeny na odrůdy a linie zahrnuté ve šlechtitelských programech daného státu, ve kterém výzkum probíhal. Cílem této bakalářské práce bylo navrhnout optimální kultivační podmínky pro odrůdy žita, vhodné k pěstování na území ČR. Efektivní protokol pro *in vitro* kultivaci je základním předpokladem pro úspěšnou a efektivní transformaci.

Ward a Jordan (2001) ve své práci doporučují koncentraci auxinů v indukčním médiu pro žito  $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Experimenty v rámci této bakalářské práce však ukázaly, že odrůdy Aventino, Kapitan i Selgo lépe tvoří kalusy při koncentraci syntetického auxinu (2,4-D, Picloram, Dicamba)  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Jak se ukazuje, není statisticky významný rozdíl mezi indukcí kalusu a regenerací rostlin a typem syntetického auxinu, který je obsažen v indukčním médiu. Významnou roli však hraje genotyp, který má výrazný vliv na indukční i regenerační kapacitu.

Statisticky významný rozdíl byl prokázán také v interakci genotypu a indukčního média ve vztahu k regenerační kapacitě. Explantáty odlišné odrůdy reagují na stejné kultivační podmínky různým způsobem. Například genotyp Aventino vykazoval nejvyšší schopnost regenerace při kultivaci na indukčním médiu CIR 3 (Picloram), zatímco odrůdy Kapitan a Selgo měly na tomto médiu regenerační kapacitu nižší a nejlépe regenerovaly při použití média CIR 2 (Dicamba).

Przetakiewicz, A. a kol (2003) se zabýval vlivem fytohormonů na indukční a regenerační schopnost obilovin a ve své studii zjistil, že účinek jednotlivých typů syntetických auxinů je specifický nejen pro druh, ale také pro varietu. Jeho tvrzení je v souladu s výsledky bakalářské práce, kde byl rovněž prokázán významný vliv auxinu v interakci s odrůdou na schopnost tvorby kalusu i na regeneraci rostlin.

Problematikou transgenozy žita se doposud zabývalo jen velmi málo studií. První transformaci žita provedl v roce 1994 Castillo a kol. Za použití biolistickej metody se v této studii podařilo získat několik transgenních rostlin, efektivita a reprodukovatelnost však byla nízká. Popelka (2002) se zabýval transformací žita pomocí biolistickej metody i za použití *A. tumefaciens*. Efektivita transformace se v jeho studii pohybovala u obou metod v rozmezí 2 – 4 % (2,2 % při aplikaci biolistickej metody, 3,83 % v případě transformace *Agrobacteriem*).

V rámci bakalářské práce byla testována biolistickej metoda na zralých embryích vybraných variet žita a pomocí histochemické zkoušky byla prokázána transgenní exprese genu *gus* u explantátů všech testovaných odrůd.

Výběr odrůd a optimalizace *in vitro* systémů byla provedena s cílem uskutečnit transformace významných genů. Navazujícím experimentem bude realizace vnesení genu pro sterilitu (*barnase*). Projekt je uskutečňován ve spolupráci s firmou Ivex, která používá sterilní žito k umělé infekci stopkovýmtrusnou houbou paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*). Z vytvořeného námělu jsou získávány alkaloidy, které slouží k výrobě léčiv.

## 9 Závěr

V rámci bakalářské práce byla sledována indukční a regenerační kapacita vybraných odrůd ozimého žita pěstovaných na území ČR. Byla kultivována zralá a nezralá embrya těchto variet a sledován vliv složení kultivačních médií a genotypu na schopnost tvorby kalusu a regenerace rostlin. Byly testovány různé postupy sterilizace zralých embryí. Zároveň byly vybrány nejvhodnější odrůdy pro transformaci a optimalizovány podmínky pro kultivaci těchto odrůd. Na zralých embryích vybraných odrůd byla testována biolistická metoda transformace.

Bylo zjištěno, že na schopnost tvorby kalusu má vliv pouze odrůda. U složení indukčního média stejně jako u interakce mezi odrůdou a indukčním médiem nebyl prokázán významný vliv na indukci kalusu.

Genotyp i interakce mezi genotypem a složením indukčního média hrají výraznou roli ve vztahu k regeneraci. Významný vliv na tvorbu dospělých rostlin má také složení regeneračního média. V případě přidavku fytohormonů 2,4-D a BAP do regeneračního média byla zaznamenána vyšší regenerační schopnost než při kultivaci explantátů na regeneračním médiu bez fytohormonů. Jako odrůdy vhodné k transformaci při dalších studiích byly zvoleny genotypy Kapitan a Selgo.

Zralá embrya vybraných genotypů byla transformována metodou mikroprojektilového přenosu DNA. Pomocí této techniky byl do buněk těchto explantátů vnesen plazmid pAHC25. Pomocí histochemické zkoušky byla stanovena transgenetní exprese genu *gus*, který je součástí použitého plazmidu. Pozitivní reakce byla prokázána u embryí všech odrůd, nejvýraznější transgenetní expresi vykazovala transformovaná embrya odrůdy Selgo.

Jak je zřejmé, schopnost tvorby kalusu i regenerace rostlin je významně ovlivněna především genotypem a také interakcí genotypu a typu auxinu, obsaženém v indukčním médiu. Významnou roli hrají také růstové regulátory, které jsou součástí regeneračního média. Vliv typu auxinu obsaženého v indukčním médiu na indukci a regeneraci rostlin prokázán nebyl.

## 10 Seznam použitých zkratek

2,4 – D - 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina

4-Cl-IAA - Kyselina 4-chlorindolyl-3-octová

*A. tumefaciens* – *Agrobacterium tumefaciens*

BAP – benzylaminopurin

*bar* - gen kódující fosfotricin acetyltransferázu

*gfp* - gen kódující green fluorescent protein (zeleně fluoreskující protein)

*gus* - gen kódující  $\beta$ -glukuronidázu (jiný název *uidA*)

*hpt* – hygromycin phosphotransferase

IAA - kyselina indolyl-3-octová

IBA - kyselina indolyl-3-máselná

*luc* - luciferáza

MS médium – Murashige and Skooge médium

*nos* - nopalín syntáza

*nptII* – neomycin phosphotransferase II

PAA - kyselina fenylacetová

PAT – fosfotricinacetyltransferázu

RBS – ribosome binding site

resp. - respektive

T-DNA – přenášená (transferred) DNA

Ti-plazmid – tumor indukující plazmid

*ubi-1* – maize ubiquitin promotor

*uidA* - gen kódující  $\beta$ -glukuronidázu (jiný název *gus*)

X-gluc - 5-bromo-4-chloro-3-indolylglukuronid

## 11 Použitá literatura

Bebeli, P., Karp, A., Kaltsikes, P. J. (1988): Plant regeneration and somaclonal variation from cultured immature embryos of sister lines of rye and triticales differing in their content of heterochromatin. 1. Morphogenetic response. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 929 – 936.

Birsin, M. O., Özgen, M. (2008): Callus Formation and Plant Regeneration from Cultured Embryos of Diploid and Tetraploid Winter Ryes (*Secale cereale L.*). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 17: 81 – 84.

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

Castillo A. M., Vasil V., Vasil, I. K. (1994): Rapid production of fertile transgenic plants of rye (*Secale cereale L.*). *Bio/Technology* 12: 1366 – 1371.

Christensen, A. H., Quail P. H. (1996): Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5: 213 – 218.

Harwood, W. A., Smedley, M. A. (2009): Byrley transformation using biolistic techniques. In Jones, H. D., Shewry, P. R. (ed.): *Transgenic wheat, barley and oats*, s. 125 – 173, Humana Press, New York, ISBN: 978-1-58829-961-1.

Kováč, J. (1992): *Explantátové kultury rostlin*, 142 s. Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, ISBN 80-7044-036-8.

Lessard, P. A., Kulaveerasingam, H., York, G. M., Strong, A., Sinskey, A. J. (2002): Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *Metabolic Engineering* 4: 67 - 79.

Lu, C. – Y., Chandler, S. F., Vasil, I. K. (1984): Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature embryos of rye (*Secale cereale*). *J. Plant Physiol.* 114: 237 – 244.

Luštinec, J., Žárský, V. (2005): *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*, 261 s. Nakladatelství Karolinum, Praha, ISBN 80-246-0563-3.



Murashige, T. a Skooge, F. (1962): A revised medium for rapid grow and bio assai with Tobago tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473 – 497.

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

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

Popelka, J. C, Altpeter, F. (2001): Interactions between genotypes and culture media components for improved *in vitro* response of rye (*Secale cereale L.*) inbred lines. *Plant cells reports* 20: 575 – 582.

Popelka, J. C. (2002): Development of a genetic transformation protocol for rye (*Secale cereale L.*) and characterisation of transgene expression after biolistic or *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Der Landwirtschaftlichen Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.

Potrykus, I. a Spanenberg, G. (1995): *Gene Transfer to Plants*, 361 s. Springer, Berlín, ISBN 3-540-58406-4.

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

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

Příbylová, M. (2008): *Porovnání účinnosti přímé a nepřímé metody genetické transformace u bramboru (*Solanum tuberosum L.*)*. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Rod, J. a kolektiv (1982): *Šlechtění rostlin*, 354 s. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Rosypal, S., Doškař, J., Petrzik, K., Růžičková, V. (2002): *Úvod do molekulární biologie – čtvrtý díl, třetí přepracované vydání*, 294 s. Brno: Stanislav Rosypal, Brno, ISBN 80-902562-4-4.

Sanford, J. C., Smith F. D., Russell J. A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications, *Methods in Enzymology* 217:483-509.

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

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

Tichá, M., Vyzínová, P. (2006) [cit. 2011-2-23]: Polní plodiny. Dostupné na <http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/index.htm>

Ward, K. A., Jordan, M. C. (2001): Callus formation and plant regeneration from immature and mature embryos of rye (*Secale cereale L.*). *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37: 361 – 368.