

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Využitie androgenézy k získaniu transgénnych
homozygotných línii jačmeňa**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Monika Pastorková
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok:	2018

Čestne vyhlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod odborným vedením vedúcej bakalárskej práce, na základe vlastných teoretických poznatkov a s vyznačením všetkej použitej literatúry. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Pod'akovanie

Chcem sa pod'akovať vedúcej bakalárskej práce Ing. Ludmile Ohnoutkovej, Ph.D. za odborné vedenie pri vypracovaní bakalárskej práce, ako aj za čas strávený pri získavaní a spracovaní výsledkov experimentálnej časti. Taktiež chcem pod'akovať Mgr. Tomášovi Vlčkovi za pomoc a cenné rady pri práci v laboratóriu a Bc. Barbore Klčovej a Bc. Barbore Macúchovej za pomoc a prípravu materiálu v experimentálnej časti práce.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora	Monika Pastorková
Názov práce	Využitie androgenézy k získaniu transgénnych homozygotných línií jačmeňa
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Centrum regiónu Haná pre biotechnologický a poľnohospodársky výskum, Oddelenie chemickej biológie a genetiky
Vedúci práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Pomocou androgenézy bola získaná homozygotná línia transgénneho jačmeňa nesúca gén *osmotin*. Daný gén by mal v rastlinách navodzovať toleranciu voči slanému stresu a stresu zo sucha. Androgenéza bola navodená u izolovaných peľníc T₁ generácie transgénnych rastlín. Na základe prietokovej cytometrie bola určená ploidia regenerovaných rastlín. Prítomnosť transgénu u dihaploidných rastlín bola overená pomocou PCR metódy a následnej elektroforézy v agarózovom gély. Expresia transgénu bola potvrdená RT-PCR analýzou cDNA transgénnych rastlín. Bola získaná homozygotná línia generácie T₃DH₁.

Kľúčové slová	androgenéza, dihaploidné rastliny, transformácia
Počet strán	57
Počet príloh	0
Jazyk	slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Monika Pastorková
Title	Use of androgenesis to obtain homozygous lines of transgenic barley
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of region Hana for biotechnological and agricultural research, Department of chemical biology and genetics
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>By androgenesis, a homozygous lineage of the transgenic barley carrying the osmotic gene was obtained. This gene should lead to tolerance to drought and salt stress in the plants. Androgenesis was induced in isolated anthers T₁ generation of transgenic plants. Based on flow cytometry, ploidy of regenerated plants was determined. The presence of the transgene in diploid plants was verified by the PCR method followed by agarose gel electrophoresis. Expression of the transgene was confirmed by RT-PCR analysis of cDNA transgenic plants. The homozygous line of generation T₃DH₁ was obtained.</p>
Keywords	androgenesis, diploid plants, transformation
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	11
2.1	Haploidné a dihaploidné rastliny	11
2.2	Uplatnenie dihaploidných rastlín	12
2.3	Metódy indukcie haploidných a dihaploidných rastlín	13
2.3.1	Androgenéza in vitro	13
2.3.2	Gynogeneza in vitro a vzdialená hybridizácia	14
2.4	Faktory ovplyvňujúce androgenézu	15
2.4.1	Genotyp darcovských rastlín	15
2.4.2	Fyziologický stav darcovských rastlín	16
2.4.3	Vývojové štádium mikrospór	16
2.4.4	Predošetrenie	16
2.4.5	Zloženie kultivačného média	17
2.4.5.1	Sacharidy	17
2.4.5.2	Mikroprvky a makroprvky	18
2.4.5.3	Rastové regulátory	18
2.4.5.4	Stužujúce látky	18
2.4.5.5	pH média	19
2.5	Albinizmus	19
2.6	Identifikácia dihaploidných rastlín	21
2.7	Šľachtenie	21
2.8	Genetické inžinierstvo rastlín	22
2.9	Geneticky modifikované rastliny	22
2.10	Metódy transformácie	23
2.10.1	Transformácia pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24

2.10.2	Transformácia pomocou mikroprojektilového prenosu DNA	25
2.10.3	Elektroporácia	25
2.11	Detekcia transgénnych rastlín	25
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Rastlinný materiál	27
3.1.2	Použité chemikálie a roztoky	28
3.1.3	Použité prístroje	29
3.2	Metódy	30
3.2.1	Androgenéza in vitro	30
3.2.1.1	Odber a chladové predošetrenie peľníc	30
3.2.1.2	Sterilizácia klasov	30
3.2.1.3	Izolácia peľníc	32
3.2.1.4	Kultivácia peľníc	32
3.2.1.5	Dopestovanie rastlín	32
3.2.2	Stanovenie ploidie prietokovou cytometriou	34
3.2.3	Kultivácia embryí	34
3.2.4	Izolácia DNA	35
3.2.5	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	36
3.2.6	Reverzne transkripčná PCR	37
3.2.7	Elektroforéza na agarózovom gély	37
4	VÝSLEDKY	38
4.1	Detekcia transgénu v T ₁ generácií	38
4.2	Androgenéza in vitro	40
4.2.1	Kultivácia peľníc	40

4.2.2	Detekcia transgénu v T ₂ DH ₀ generácií	43
4.2.3	Stanovenie ploidie prietokovou cytometriou	44
4.2.4	Expresia transgénu	45
4.3	Kultivácia embryí	46
4.3.1	Detekcia transgénu v generácií T ₃ DH ₁	47
5	DISKUSIA	48
6	ZÁVER	50
7	LITERÁRNE ZDROJE	51
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	57

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

- Vypracovať literárnu rešerš na tému bakalárskej práce

Praktická časť

- Navrhnúť metodiku indukcie androgenézy u jačmeňa
- Získať dihaploidné rastliny u vybraných transgénnych rastlín
- Overiť prítomnosť záujmového génu pomocou PCR a stanoviť ploidiu

1 ÚVOD

Počas životného cyklu rastlín dochádza k striedaniu haploidnej fázy (gametofyt) s diploidnou (sporofyt). Toto striedanie bolo považované za tak zásadné, že ho nemožno ovplyvňovať. Keď boli v roku 1964 po prvýkrát získané homozygotné rastliny kultiváciou nezrelých peľníc, bol odštartovaný masívny výskum tohto javu nazývaného androgenéza.

Androgenéza je proces vývoja samčích buniek gametofytickej dráhy do embryí. V normálnej gametofytickej dráhe sa tieto bunky podrobia mitotickým deleniam a vznikajú peľové zrná schopné oplodnenia. V podmienkach *in vitro* dochádza za pôsobenia určitého stresového faktora k narušeniu prirodzenej vývojovej dráhy mikrospór. Podstata androgenézy teda spočíva v preprogramovaní gametofytickej cesty na sporofytickú. Získané rastliny, pochádzajúce z totipotentných peľových zrn, sú zdvojené haploidy, organizmy homozygotné na každom mieste (Makowska a Oleszczuk, 2014).

Cieľom práce bolo získať dihaploidné rastliny u vybraných transgénnych rastlín jačmeňa androgénnou technikou. Zatvorené klasy boli odobrané v určitom kritickom štádiu vývoja rastlín. Klasy boli podrobené stresu chladom na niekoľko dní a následne z nich boli asepticky izolované peľnice, ktoré boli kultivované na médiu. Po niekoľkých týždňoch sme pozorovali indukciu kalusového pletiva a po premiestnení na regeneračné médium aj celé dospelé rastliny. Následne bola pomocou flow-cytometrie stanovená ploidia a pomocou PCR a RT-PCR metódy prítomnosť a expresia záujmového génu.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Počas životného cyklu vyšších rastlín dochádza k striedaniu haplodínej fázy (gametofyt) s diploidnou (sporofyt). Sporofyt je nepohlavnou generáciou, ktorá vytvára výtrusy alebo semená. Sporofyt je síce diploidný, ale po redukčnom delení (meióze) vznikajú vo výtrusniciach haploidné výtrusy. Gametofyt je pohlavnou generáciou, ktorej funkciou je produkcia gamét.

Ku tvorbe gamét dochádza procesom zvaným gametogenéza. Prebieha v tyčinkách, kde diploidné bunky podstúpia redukčné delenie (meiózu) a vznikajú haploidné mikrospóry, ktoré sa následne mitoticky delia a postupnou diferenciáciou vznikajú mnohobunkové samčie gaméty, či peľové zrná. Mikrospóry počas svojho vývoja podliehajú rôznym druhom exogénneho stresu, a tak sa môže stať, že svoj vývoj preprogramujú (Makowska a Oleszczuk, 2014). Mikrospóra je namiesto gametofytickej „cesty“ vyslaná na sporofytickú, dochádza k procesu zvanému androgenéza (Datta, 2005). Androgenéza je proces indukcie a regenerácie haploidov a dvojitých haploidov pochádzajúcich z gametických buniek (Murovec a Bohanec, 2012). V modelovom kurze androgenézy sa mikrospóry vyvíjajú do embryí podobných zygotickým embryám, avšak v praxi sa môžu vyvinúť do rôznych štruktúr ako napríklad do koreňových a stonkových apikálnych meristémov, či koleoptile. Tieto štruktúry sa premieňajú priamo na haploidné alebo dihaploidné (DH) rastliny. Vo väčšine prípadov sa však mikrospóry vyvíjajú do štruktúry kalusu a neskôr po prenesení na regeneračné médium vytvárajú rastliny prostredníctvom organogenézy alebo embryogenézy (Makowska *et al.*, 2017).

2.1 Haploidné a dihaploidné rastliny

Haploidné rastliny sú rastliny s polovičným počtom chromozómov (n). Môžu vznikáť spontánne v prírode alebo sú výsledkom rôznych indukčných techník. Ich spontánny vývoj opísal už v roku 1922 Blakeslee v *Datura stramonium* (Novotný, 2002). Potenciál haploidných techník v šľachtení rastlín vznikol v roku 1964 s dosiahnutím tvorby haploidných embryí *in vitro* kultúry *Datura innoxia* (Guha a Maheswari, 1964). U jačmeňa (Lezin *et al.*, 1996) boli haploidné rastliny androgénneho pôvodu prvýkrát odvodené v roku 1973.

Fyziologicky aj morfológicky sú haploidné rastliny, produkované z dihaploidných druhov, podobné normálnym rastlinám, s výnimkou ich nižšieho vzhľadu a sterility (Murovec a Bohanec, 2012). V pestovaní rastlín tak haploidy nemajú priamu aplikáciu.

Do šľachtiteľských programov sú integrované po zdvojení ich chromozómov, kedy vznikajú dihaploidné rastliny, ktoré možno ďalej rozmnožovať. Získané dihaploidné rastliny sú homozygotné na všetkých lokusoch (Murovec a Bohanec, 2012).

2.2 Uplatnenie dihaploidných rastlín

Haploidné rastliny sú unikátnym systémom umožňujúcim štúdium zásadných genetických otázok týkajúcich sa dedičnosti, variability, rekombinačných možností a expresie génov (Novotný, 2002). Indukcia a regenerácia haploidov, po ktorých nasleduje spontánne alebo indukované zdvojenie chromozómov sú široko používané techniky v pokročilých šľachtiteľských programoch (Neto *et al.*, 2014). *In vitro* produkcia dvojitého haploidu prostredníctvom androgenézy je dôležitá a sľubná metóda na genetické zlepšenie plodín. Za použitia androgenézy môžu byť homozygotné rastliny vyrobené v priebehu jedného roka v porovnaní s dlhými inbrednými metódami, ktoré môžu ako uvádza Jensen (1988) trvať aj niekoľko rokov a sú veľmi nákladné. Preto majú dihaploidné techniky v porovnaní s bežnými metódami konkurenčné výhody (Kao, 1996). Ďalšou črtou, ktorú treba zvážiť, je šľachtiteľská technika. Dihaploidné rastliny môžu byť indukované hneď po generácii F1 (gaméty F1 predstavujú generáciu F2), aj keď niektorí pestovatelia dávajú prednosť indukcii DH v neskorších štádiách (Murovec a Bohanec, 2012). Stále viac agronomicky dôležitých plodín, liečivých rastlín, či aromatických rastlín sa odvoláva na androgenézu (Ferrie, 2009; Makowska a Oleszczuk, 2014). Tradične možno dosiahnuť homozygotnosť použitím samoopelenia, avšak nie v prípade autoinkompatibilných rastlín, kedy je DH systém značnou výhodou (Islam a Tuteja, 2012).

V šľachtení sú dihaploidné rastliny využívané u veľa plodín, hlavne však u samosprašných druhov. Aplikácie dihaploidných rastlín umožňujú oveľa efektívnejšiu selekciu požadovaných znakov (Hu, 1997) a taktiež slúžia ako selekčný nástroj pre elimináciu genotypov so silnou inbrednou depresiou (Murovec a Bohanec, 2012). V genetike nachádzajú haploidné aj polyploidné rastliny veľké uplatnenie. Možno ich využiť na výskum kvantitatívnych znakov, či analýzu väzby génov. Sú využívané pri selekcii dominantných a recesívnych znakov, pri štúdiách mutagenézy alebo konštrukcii genetických máp pomocou molekulárnych markerov.

2.3 Metódy indukcie haploidných a dihaploidných rastlín

Dihaploidné rastliny môžu vznikáť buď spontánne alebo je potrebná chemická indukcia. Spontánne zdvojené rastliny sú uprednostňované kvôli obavám, že proces chemického zdvojenia môže vyvolať nežiadúce mutácie (Neto *et al.*, 2014).

V jačmeni sú tri hlavné metódy k tvorbe dihaploidných rastlín: androgenéza, gynogenéza a vzdialená hybridizácia.

U androgenézy Touraev *et al.* (1997) opísali bunkový cyklus, kedy sa po asymetrickom delení vegetatívna bunka zastaví v G1 fáze bunkového cyklu, zatiaľ čo generatívna bunka prechádza do mitózy a rozdeľuje sa za vzniku dvoch spermatických buniek. Indukcia androgenézy prostredníctvom stresu je schopná prekonať zastavenie vegetatívnej bunky v G1 fáze bunkového cyklu. Vegetatívna bunka vstupuje do S fázy počas stresového ošetrovania a následne do G2 a M fázy (Islam a Tuteja, 2012). Wang *et al.* skúmali mikrospóry po stresovom ošetrovaní a navrhli, že zdvojnásobenie chromozómov prebieha v dôsledku aberácií v mitóze pri tvorbe kalusu počas jadrovej fúzie. Mechanizmy spontánneho zdvojenia sa líšia, avšak fúzia jadier je najčastejšou príčinou. Táto teória je podporovaná častým výskytom malého podielu triploidných jedincov. Ďalším mechanizmom by mohla byť endomitóza, ktorá je však v súčasnosti len veľmi málo zrozumiteľnou. V prípade rastlín, ktoré sú odvodené gynogenézou je frekvencia spontánneho zdvojenia veľmi nízka, je potrebné chemické zdvojenie. Najviac používané je ošetrovanie kolchicínom. Kolchicín je silná karcinogénna látka, ktorá spôsobuje depolymerizáciu mitotického vretienka v metafáze bunkového cyklu, pričom zabráni migrácii chromozómov na opačné póly buniek, čo vedie k zdvojeniu chromozómov. V rastlinách odvodených z peľníc sa kolchicín aplikuje v čase prvej mitózy (Nitsch, 1997). Okrem kolchicínu možno použiť aj oryzalín, trifluralín, pronamid a ďalšie (Neto *et al.*, 2014).

2.3.1 Androgenéza *in vitro*

Androgenéza je proces, pri ktorom sa rastliny formujú z embryí alebo kalusov, ktoré pochádzajú z peľníc alebo mikrospór (Islam a Tuteja, 2012). Pri zmene alebo blokácii asymetrického delenia mikrospór, tieto prechádzajú z gymetofytickej cesty vývinu na sporofytickú za vzniku embrya, či kalusových pletív, z ktorých sa ďalej vyvíjajú haploidné rastliny (Procházka *et al.*, 1998). Vývoj embryí z mikrospór je podobný zygotickej embryogenéze avšak u týchto embryí absentuje suspenzor. Pri

vývoji mikrosporiálnych embryí sa môžu spolu s embryami v torpedovitom štádiu vyskytovať súčasne aj globulárne embryá, vývoj týchto embryí je v porovnaní so zygotickým vývojom viac asynchrónny (Sangwan a Sangwan-Norrel, 1996).

Podľa delenia jadier možno rozlíšiť tri rôzne vývojové cesty mikrospóry. Prvou z možností je symetrické delenie jednojadrovej mikrospóry za vzniku dvoch buniek podobných vegetatívnej bunke, ktoré sa ďalej delia a vzniká viacbunková štruktúra alebo syncytium. Druhou možnosťou je asymetrická mitóza, ktorá vedie k vzniku generatívnej a vegetatívnej bunky. Embryo sa následne väčšinou vyvíja z vegetatívnej bunky. Poslednou možnosťou je fúzia jadier, ktoré vznikli v prvej mitóze, následkom čoho vznikajú spontánne dihaploidné rastliny (Touraev *et al.*, 1997).

Dihaploidné rastliny výrazne skrátia šľachtiteľský cyklus plodín, odstránia poľnohospodársky nevýhodne znaky pomocou homozygotného stavu a taktiež sú elegantným systémom genetickej transformácie v druhoch, v ktorých je regenerácia zo somatických buniek obzvlášť ťažká (Datta, 2005; Touraev *et al.*, 1996). Použitie rôznych postupov genetického inžinierstva by mohlo priniesť zlepšenie tolerance plodín voči abiotickým stresom. Systém dihaploidných rastlín ďalej možno použiť pri mapovaní genómu, v biochemických a fyziologických štúdiách a taktiež na selekciu mutácií (Islam a Tuteja, 2012; Murovec a Bohanec, 2012).

2.3.2 Gynogeneza *in vitro* a vzdialená hybridizácia

Gynogenéza je najmenej používaná metóda na produkciu haploidných rastlín jačmeňa, ale využíva sa u tých plodín, ktoré preukázali nízku alebo žiadnu odpoveď na vzdialenú hybridizáciu alebo androgenézu. Gynogenézu možno charakterizovať ako vznik haploidných rastlín z haploidných buniek zárodočného vaku, vaječnej bunky, synergíd alebo tiež z antipód. Ako explantáty využíva piestiky, ich časti, či samotné vajíčka. Efektivita gynogenézy je pomerne nízka a nevýhodou tejto metódy je možnosť vzniku rastlín aj zo somatických buniek (Attansov *et al.*, 1995).

Vzdialená hybridizácia je založená na skrížení dvoch nepríbuzných druhov (Jensen, 1983). Spočíva v opelení donorovej rastliny cudzím peľom a následnej eliminácii chromozómov rastliny, ktorej peľ bol použitý. Haploidné rastliny sú následne získavané kultiváciou extirpovaných embryí. Jarný jačmeň (*Hordeum vulgare* L.) je najčastejšie krížením s *Hordeum bulbosum*. Metóda vzdialenej hybridizácie sa používa

ako alternatíva pri nízkej efektívnosti použitia androgenézy. Jej výhoda spočíva v absencii albinotických regenerovaných rastlín (Hu, 1997).

2.4 Faktory ovplyvňujúce androgenézu

V *in vitro* podmienkach môžu byť kultivované ako celé peľnice, tak aj izolované mikrospóry. Účelom metódy je spôsobiť zmenu vývojovej dráhy nezrelého peľu, mikrospóry. Úspešnosť tejto metódy je do značnej miery ovplyvňovaná rôznymi faktormi (Kahrizi *et al.*, 2011). Medzi hlavné faktory, ktoré ovplyvňujú frekvenciu zelených rastlín regenerovaných cestou *in vitro* androgenézy patria:

- I. genotyp darcovských rastlín
- II. fyziologický stav darcovských rastlín
- III. vývojové štádium mikrospór
- IV. predošetrenie (ošetrenie klasov chladom, vyššia teplota pri kultivácii mikrospór)
- V. zloženie kultivačného média
- VI. fyzikálne faktory počas pestovania kultúry (svetlo, teplota) (Murovec a Bohanec, 2012).

Androgenéza *in vitro* môže byť ovplyvňovaná napríklad aj hustotou, množstvom a orientáciou kultivovaných peľníc. Kultivačné podmienky môže zhoršiť aj prítomnosť iných orgánov, pletív alebo zle zvolená fotoperiódna počas kultivácie (Ohnoutková *et al.*, 2000).

2.4.1 Genotyp darcovských rastlín

Závislosť genotypu je rozhodujúcim faktorom ovplyvňujúcim variabilitu reakcie v rastlinnej pletivovej kultúre a účinnosť androgenézy. Androgénna schopnosť môže slúžiť ako ukazovateľ intragenetickej rôznorodosti alebo nestability tzn., že peľnicová kultúra nemusí byť účinná vo všetkých genotypoch (de Buyser *et al.*, 1985). Torp a Andersen (2009) zistili, že genetická povaha darcovskej rastliny ovplyvňuje tvorbu embryoidov o 20 až 40 %. Úspech regenerácie peľnicových kultúr je silne genotypovo závislý a pod genetickou kontrolou (Bullock *et al.*, 1982). Holme *et al.* (1999) uvádzajú, že materiál z rôznych geografických oblastí sa môžu líšiť v odpovedi na androgenézu.

U obilnín je androgenéza pomerne často aplikovaná v jačmeňi a pšenici, medzi jednotlivými genotypmi sú však výrazné rozdiely v ich reakciách (Novotný, 2002).

Schopnosť regenerácie jednotlivých rastlinných druhov je teda dedičnou vlastnosťou, ktorá sa predáva z generácie na generáciu. Počet génov, ktoré sa podieľajú na androgenéze je veľmi malý. Tieto gény sú súčasťou zložitého komplexu, do ktorého zasahuje cytoplazmatická dedičnosť a repetitívna DNA (Datta, 2005; Zur *et al.*, 2008).

2.4.2 Fyziologický stav darcovských rastlín

Fyziologické podmienky darcovských rastlín môžu drasticky ovplyvniť vývoj peľnic (Olmedilla, 2010). Shtereva *et al.* (1998) publikovali, že peľnice izolované z rastlín rajčiakov pestovaných v skleníku počas zimy, pri vysokej vlhkosti a krátkych dňoch, dosahovali vyššiu androgénnu schopnosť, ako tie pestované v poľných podmienkach.

Úspešnosť androgenézy je závislá aj na vývojovom štádiu rastliny. Najlepšie je použiť peľnice pochádzajúce z kvetov na začiatku kvitnutia - jednojadrového štádia mikrospóry. So starnutím rastliny klesá úspešnosť androgenézy (Sopory a Munshi, 1996).

2.4.3 Vývojové štádium mikrospór

Peľové zrná reagujú na indukciu androgenézy len v určitom vývojovom štádiu mikrospóry. Najvhodnejším vývojovým štádiom je stredné až neskoré jednojadrové štádium mikrospór (Hu, 1997). Podľa Chen (1977) kalusy získané v tomto štádiu ukázali vynikajúcu schopnosť regenerácie zelených rastlín a malý počet albínov. Vývojová fáza nám môže pomôcť pri určovaní doby izolácie a kultivácie (Preťová *et al.*, 2006).

2.4.4 Predošetrenie

Prechod z normálneho gametofytického vývoja na sporofytický môže byť vyvolaný predošetrením (Kahrizi *et al.*, 2009). Pôsobiaci stres účinkuje ako spúšťač signál pre iniciáciu sporofytického vývoja tým, že mení vývoj mikrospór na embryogénnu vývojovú cestu (Touraev *et al.*, 1997).

Medzi najčastejšie používané metódy patrí predošetrenie chladom, sacharózové „hladovanie“ alebo predošetrenie manitolom (Kruczkowska *et al.*, 2002). Niektoré z ďalších metód, ako ožiarenie, kolchicín, či auxín sa používajú na preprogramovanie v obmedzenom rozsahu (Murovec a Bohanec, 2012). Postupy predošetrenia sa líšia

v daných laboratóriách. Pre chladové ošetrenie Huang a Sunderland (1982) odporučili obdobie 21-35 dní, Ohnoutková *et al.* (2000) dosiahli pozitívne výsledky krátkodobým chladením do 14 dní. Ritala *et al.* (2000) uvádzajú, že regeneračná kapacita sa chladením viac ako 4 týždne výrazne znížila. Tieto rozdielne výsledky možno pripísať vplyvom genotypu, fyziologického stavu rastlín a podmienkach rastu, ktoré ovplyvňujú obsah endogénneho hormónu (Ohnoutková *et al.*, 2000).

Manitolové predošetrenie sa používa ako alternatíva k chladovému ošetreniu u rastlín s nízkou odozvou (Cistué *et al.*, 1998). Manitolové predošetrenie malo v experimentoch Kruczkowska *et al.* (2002) v porovnaní s chladovým predošetrením negatívny vplyv na životaschopnosť peľu a jeho vývoj. Súčasnú aplikáciu oboch týchto predošetrení uviedli ako neúčinnú. Hoekstra *et al.* (1993) naopak uviedli, že predošetrenie pozostávajúca z osmotického (manitolového) a chladového predošetrenia (4°C) malo pozitívny vplyv na izolovanú kultúru mikrospór.

Efektívna androgénnosť je zvyčajne vyvolaná úspešnou aplikáciou rôzneho predošetrenia (Islam a Tuteja, 2012). U jačmeňa je predošetrenie považované za jednu z hlavných požiadaviek úspešnej produkcie dihaploidov (Hoekstra *et al.*, 1997).

2.4.5 Zloženie kultivačného média

Úspešnosť kultivácie rastlinných explantátov je značne ovplyvnená správnym zložením kultivačného média. Kultivačné médium poskytuje výživové hodnoty, ale taktiež reguluje vývoj mikrospór. Najčastejšie používané média pre peľnicové kultúry sú MS médium (Murashige a Skoog, 1962) a N6 médium (Chu *et al.*, 1978). V zložení média majú dôležitú úlohu sacharidy ako zdroj energie pre vyvíjajúce sa embrya. Významnú rolu v zložení média majú tiež mikro- a makroprvky, dusík, rastové regulátory, vitamíny, aminokyseliny a ióny niektorých kovov.

Aj napriek početným pokusom o vytvorenie jednotnej metódy kultivácie peľnic, existuje aj naďalej niekoľko publikovaných protokolov, ktoré sa značne líšia (Sopory a Munshi, 1996).

2.4.5.1 Sacharidy

Sacharid použitý v indukčnom a regeneračnom médiu má významný vplyv na úspešnosť androgenézy. Sacharidy sú nie len zdrojom uhlíka a energie, majú taktiež aj osmotickú funkciu. Vysoké koncentrácie sacharózy sú považované za kľúčové pre

indukciu androgenézy. U genotypov, ktoré neregenerovali po použití sacharózy sa ako ekvivalent používa maltóza. Použitie maltózy zvyšuje produkciu zelených rastlín u jačmeňa a pšenice. Maltóza sa pravdepodobne pomalšie hydrolyzuje než sacharóza, čo zabraňuje výskytu glukózy vo vyšších koncentráciách, ktoré by mohli inhibovať indukciu mikrosporiálnych embryí (Atanassov *et al.*, 1995).

2.4.5.2 Mikroprvky a makroprvky

Pre správny a intenzívny rast explantátov na médiách musia byť v médiu prítomné relatívne veľké množstvá anorganických prvkov. Úspešnosť androgenézy je ovplyvnená koncentráciou týchto prvkov v indukčnom a regeneračnom médiu. Prvky, ktoré sú v médiu vždy potrebné nazývame makroprvky a nachádzajú sa v médiách vo výraznom množstve. Naopak väčšina mikroprvkov sa v médiu vyskytuje len v stopovom množstve, často prítomné ako nečistoty iných zložiek média (Novotný, 2002).

2.4.5.3 Rastové regulátory

Indukčné aj regeneračné média by vo svojom zložení mali obsahovať určitý pomer rastlinných hormónov, auxínov a cytokinínov. Vhodná koncentrácia týchto hormónov má rozhodujúci vplyv na tvorbu kalusu alebo embryí. Pre jačmeň sa väčšinou využíva 2,4-D (2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina), BAP (6-benzylaminopurin) a IAA (kyselina indolyl-3-octová) (Kruczkowska *et al.*, 2002).

2.4.5.4 Stužujúce látky

Dôležitým aspektom peľnicovej kultúry je použité stužujúce činidlo pre dosiahnutie viskozity média (Cistué *et al.*, 1998). Najčastejšie sa používajú média stužené Phytigelom, agarom, či gelritom. Agar je získavaný z rias a má dve hlavné zložky: agaróza a agaropektin. Agar je najpoužívanejším stužujúcim činidlom používaným v pletivových kultúrach (Kacar *et al.*, 2010) avšak kvôli jeho vysokej cene sa používajú aj iné alternatívy. Gelrit je hydrokoloidná látka, ktorá tvorí pevné, číre gély v prítomnosti rozpustných solí. Avšak niektoré kalusy vykazujú na médiu s gelritom vodnatosť (Bhojwani a Razdan, 1997).

2.4.5.5 pH média

pH média je dôležitým faktorom počas androgenézy *in vitro*. Najvhodnejšia hodnota pre úspešnú androgenézu je obvykle v slabo kyslej oblasti (5,0-6,0) (Sopory a Munshi, 1996). Hodnota pH má vplyv na dostupnosť iónov v kultivačných médiách a taktiež značne ovplyvňuje stuhnutie média. Hodnota pH nižšia ako 5,0 neumožňuje dostatočné stuhnutie kultivačného média (Bhojwani a Razdan, 1997).

2.5 Albinizmus

Jeden z problémov spojených so znižovaním účinnosti androgenézy je albinizmus. V mnohých prípadoch môže ich výskyt dosiahnuť až 100 % (Labhani *et al.*, 2005). Albinizmus je definovaný ako neschopnosť rastliny tvoriť chloroplasty a tak uskutočňovať proces fotosyntézy. Často sa vyskytuje v rastlinách odvodených pomocou androgenézy, vrátane väčšiny obilnín, ako je pšenica (Liu *et al.*, 2002), raž (Immonen a Anttila, 2000), oves (Kiviharju *et al.*, 2000) a jačmeň (Caredda *et al.*, 2004).

Albinotické rastliny sú sterilné, aj keď *in vitro* sú schopné zahájiť štádium formovania klasov, ale ďalej sa už nevyvíjajú (Šesek a Kondić, 1996). Tieto rastliny nemôžu prežiť v prírode a nemajú hodnotné agronomické vlastnosti (Muñoz-Amatriaín *et al.*, 2009).

Zvláštny záujem je o osud plastidov počas androgenézy. Priama príčina albinizmu je neschopnosť proplastidov premeniť sa na chloroplasty, aj keď biologický mechanizmus zatiaľ nebol objasnený. Systematické štúdie tohto problému by mali tiež prispieť k pochopeniu genetiky, fyziológie, a cytologie vývoja chloroplastov. Vysoké frekvencie albínov medzi regenerovanými rastlinami sú naďalej podstatnou nevýhodou, ktorá bráni rozšírenému používaniu peľnicovej kultúry. Teplota kultúry, predošetrenie v počiatocnom štádiu rozdelenia mikrospór a genotyp samotnej darcovskej rastliny môžu ovplyvniť napr. produkciu albínov v ryži (Islam, 2010). Molekulová analýza chloroplastovej DNA (ptDNA) poukazuje na prítomnosť mnoho deléčných sekvencií v genóme albinotických rastlín (Wang *et al.*, 1973). Podobné zistenia potvrdili aj Harada *et al.* (1992), ktorý uvideli že tieto chyby sú spôsobené deléciami segmentov DNA v rozsahu 10-100 kbp. Naopak Cistué *et al.* (1995) na základe Southern-blot analýzy mikrosporiálnej DNA naznačili, že delécie a zmeny v plastidovom genóme sa dejú primárne počas regenerácie rastlín. Ďalej uviedli, že plastidový genóm je počas

mikrosporiálnej embryogenézy inaktný a zmeny sa objavujú so začínajúcim procesom regenerácie rastlín. Najnovšie výskumy ukazujú, že delécie v plastidovom genóme sú pravdepodobne len sekundárnym javom a nie primárnou príčinou vzniku albinotických rastlín. Samotný mechanizmus vedúci k deléciám v plastidovom genóme však zatiaľ nie je známy.

Rozdiely v úrovni regenerácie rastlinných albínov medzi genotypmi jačmeňa naznačujú, že tendencia k tvorbe rastlín s nedostatkom chlorofylu je do určitej miery geneticky podmienená (Makowska a Oleszczuk, 2014). V rámci toho istého druhu sú nachádzajú často kultivary, ktoré sú viac náchylné na albinizmus než iné. V jačmeňoch sa podiel albínových rastlín pohybuje v rozmedzí od 1 do 99,7 % vzhľadom na genotypy (Caredda *et al.* 2000; Castillo *et al.*, 2000). Jarné odrody jačmeňa poskytujú vyšší podiel albinotických rastlín než u zimných odrôd (Cistue *et al.*, 1998). Výskum Careddy *et al.* (2000) zameraný na výskum dvoch odrôd jačmeňa, zimného „Igrí“ a jarného „Cork“ významne prispel k pochopeniu plastidovej fyziológie v mikrospórach pred ich prechodom na sporofytický vývoj. Tieto dve odrody sa v androgenéze podstatne líšia vzhľadom na pomer zelených a albinotických rastlín. Autori zistili ešte pred naprogramovaním stresu, že medzi týmito kultivarmi existujú štrukturálne rozdiely plastidov vo vakuolovaných mikrospórach. V „Cork“ boli plastidy trikrát menšie ako v „Igrí“ a nachádzalo sa tam oveľa viac tylakoidných membrán, škrobových zŕn a podstatne nižšie množstvo ptDNA (plastidová DNA). Tieto plastidy boli naprogramované na gametofytickú dráhu vývoja, čo za normálnych podmienok vedie k eliminácií plastidov, a tak nemohli podstúpiť preprogramovanie na sporofytickú cestu.

Vzhľadom na veľké množstvo mikrospór prítomných v jednej peľnici a veľkého množstva peľníc na klase sa očakáva, že počet androgénnych rastlín vytvorených z jedného klasu by mal byť desiatky tisíc. Avšak počet regenerovaných rastlín sa môže pohybovať od nuly do niekoľko stoviek (Jacquard *et al.*, 2009; Li a Devaux 2003). Tieto odchýlky môžu byť okrem iného ovplyvnené genotypom, zložením kultivačného média, dobou kultivácie alebo zvoleným predošetrným (Islam a Tuteja, 2012; Makowska *et al.*, 2017).

Schopnosť produkovať haploidné (H) a spontánne dihaploidné (DH) rastliny za použitia peľnicovej alebo mikrosporiálnej kultúry je obrovským plusom v genetických štúdiách a praktickom pestovaní rastlín, nakoľko sú v krátkom čase generované homozygotné rastliny. Táto technika je prístupná pre mnohé rastlinné druhy na výrobu životaschopných embryí a celých rastlín. Najmä však pre obilniny, albinizmus je stále

vážnou prekážkou pri realizácii týchto techník (Larsen *et.al.*, 1991; Immonen, 1999; Jacquard *et al.*, 2003; Szarejko, 2003; Kiviharju *et al.*, 2005; Cistué *et al.*, 2009; Makowska a Oleszczuk, 2014). Preto je potrebné naďalej zlepšovať protokoly a metódy na prekonanie tohto problému.

2.6 Identifikácia dihaploidných rastlín

Existuje niekoľko priamych i nepriamych prístupov slúžiacich k určeniu ploidie regenerovaných rastlín. Nepriame metódy sú založené na porovnaní darcovských a regenerovaných rastlín z hľadiska morfológie, počtu a veľkosti chloroplastov, či plodnosti rastlín. Priame metódy sú spoľahlivejšie a zahŕňajú konvenčné cytologické techniky, ako napríklad počítanie počtu chromozómov v koreňových špičkách a meranie obsahu jadrovej DNA pomocou prietokovej cytometrie (Neto *et al.*, 2014).

2.7 Šľachtenie

Šľachtenie je vedomá, praktická činnosť, ktorá využíva vedecké poznatky genetického pozmeňovania rastlín za účelom zlepšenia plodín. Primárne ciele šľachtenia poľnohospodárskych plodín sa zameriavajú na zlepšenie výnosov, odolnosť voči biotickému a abiotickému stresu, zlepšenie výživových ukazovateľov a iných znakov. Šľachtenie spočíva v krížení rastlín s dobrými znakmi za účelom získania potomstva s lepšími, žiadanými vlastnosťami. Hlavnou šľachtiteľskou metódou zostáva výber, ale v súčasnej dobe sú vo veľkej miere využívané aj nové metódy na identifikáciu genómu, molekulárne markery zahrňujúce rozdielne metódy a typy markerov.

Pestovanie rastlín má dlhú históriu integrácie najnovších inovácií v oblasti biológie a genetiky s cieľom zlepšiť vlastnosti plodín. Selekcia na základe fenotypového prejavu, ktorá uľahčila zber a zvýšila produktivitu, viedla k domestikácii prvých plodín. Tradičná schéma šľachtenia môže byť podľa Scaboo *et al.* (2010) zhrnutá do troch základných krokov:

1. Výber (selekcia) a vzájomné kríženie rodičov s požadovanými vlastnosťami.
2. Získavanie hybridnej populácie počas štyroch až piatich generácií, pre dosiahnutie segregácie a rekombinácie alel, kým nenastane u jedincov alelická homozygotnosť.
3. Výber a hodnotenie čistých línií z každého kríženia nesúcich požadované znaky.

Toto je cyklický a simultánný proces, v ktorom existujú veľké rozdiely v metodike a stratégiách pre jednotlivé plodiny (Scaboo *et al.*, 2010). Možnosť tvorby geneticky modifikovaných plodín umožňuje presnejšie úpravy v genóme rastlín.

2.8 Genetické inžinierstvo rastlín

Genetické inžinierstvo je súbor poznatkov a metód, ktoré slúžia k úprave a prenosu genetického materiálu za účelom jeho genetickej modifikácie. Využíva poznatky z viacerých vedných odborov napr. biológie, biochémie, organickej chémie. Genetické inžinierstvo prispelo k lepšiemu pochopeniu mnohých teoretických a praktických aspektov fungovania génov a ich organizácie. Schopnosť zaviesť cudzorodé gény do rastlinných buniek a pletív a regenerovať životaschopné rastliny poskytlo jedinečnú príležitosť na modifikáciu a zlepšenie plodín. Genetické inžinierstvo má značné využitie pri spracovaní potravín, pri výrobe osiva, chemických a farmaceutických odvetviach (Gasser a Fraley, 1989). Prostredníctvom techniky rekombinantnej DNA boli vytvorené baktérie schopné syntetizovať ľudský inzulín, interferón a ďalšie užitočné látky. Miera do akej budú mať geneticky modifikované rastliny vplyv na kľúčové odvetvia je závislá na technických pokrokoch, schvaľovacích procesoch, či vnímaní verejnosti (Gasser a Fraley, 1989).

2.9 Geneticky modifikované rastliny

Geneticky modifikovaný organizmus (GMO) je organizmus (okrem človeka) schopný rozmnožovania, ktorého dedičný materiál bol zmenený genetickej modifikáciou uskutočnenou niektorým z technických postupov stanovených zákonom 78/2004 Sb., o nakladaní s geneticky modifikovanými organizmami a genetickými produktami, v znení neskorších predpisov a vyhláškou 209/2004, o bližších podmienkach nakladania s geneticky modifikovanými organizmami a genetickými produktami, v znení neskorších predpisov. Nakladať s GMO a genetickými produktami možno len na základe oprávnenia podľa týchto právnych predpisov tak, aby bola zaistená ochrana zdravia človeka, zvierat, životného prostredia a biologickej rozmanitosti.

Prvou geneticky modifikovanou rastlinou bol tabak v roku 1983 (Bevan *et al.*, 1983) s rezistenciou voči antibiotiku kanamycínu (Bombale *et al.*, 2010). Genetická modifikácia znamená cielené a umelé vnášanie cudzej DNA do buniek iných

organizmov pomocou metód genetického inžinierstva za účelom získania rastlín s lepšími vlastnosťami. Takýto spôsob zmeny genetickej informácie sa označuje ako transgenóza a organizmy týmto spôsobom modifikované sa nazývajú transgénne. Zavedený gén môže transgenným rastlinám poskytnúť rôzne užitočné vlastnosti, ako je odolnosť voči herbicídom, chorobám, vysoký výnosový potenciál, odolnosť voči abiotickému stresu, hmyzu, či produkcia liečiv (Mrízová *et al.*, 2014). Na druhej strane je potrebné si uvedomiť riziká, ktoré so sebou prinášajú GMO plodiny, či už ide o tvorbu toxických, či alergénnych látok alebo zvýšenie závislosti malých farmárov na veľkých agrochemických spoločnostiach (Snustad a Simmons, 2009).

2.10 Metódy transformácie

Z každého organizmu možno izolovať jeho DNA, ktorá je nositeľkou genetickej informácie. Transgenóza alebo tiež transformácia je proces cieleného vnášania génov z jedného organizmu do druhého alebo neprirodzených druhov.

Podľa zdroja vkladajúceho génu rozlišujeme rastliny na transgénne, cisgénne a intragénne (Bradshaw, 2016). Pri transgenóze je záujmový gén vnesený do genómu organizmu iného druhu, napr. gén z baktérie do rastliny. Cisgenné organizmy obsahujú gény rovnakého alebo blízko príbuzného druhu, intragénne organizmy sú také, do ktorých sú vnesené gény z rovnakého druhu.

Metódy transformácie možno podľa prenosu DNA do buniek rozdeliť na priame a nepriame. Priame techniky sú založené na priamom vnášaní transgénu do genómu cieľových buniek. Medzi metódy priameho prenosu DNA sa zaraďuje elektroporácia, mikroprojekcia, mikroprojektilový prenos DNA, prenos organelového genómu a silikon uhlíkové vlákna. Nepriame metódy používajú na prenos DNA z jedného organizmu do druhého vektory. Vektormi môžu byť vírusy alebo plazmidy. Najpoužívanejšou nepriamou metódou sa ukázala byť transformácia pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* (Hensel *et al.*, 2009).

Za počiatok transformácií možno považovať rok 1977 (Chilton *et al.*, 1977), kedy bola objavená schopnosť pôdnej baktérie *Agrobacterium tumefaciens* prenášať pomocou tzv. Ti plazmidu cudzorodú DNA do rastlinného genómu (Ondřej, 2002). Prvé fertílne transgénne rastliny jačmeňa vznikli transformáciou nezrelých embryí metódou mikroprojektilového prenosu (Wan a Lemaux, 1994), nasledovali správy o transformácií embryí jačmeňa pomocou *A. tumefaciens* (Tingay *et al.*, 1997). Ukázalo

sa, že transformácia pomocou Agrobakteria mala v porovnaní s mikroprojektilovou metódou vyššiu účinnosť.

2.10.1 Transformácia pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je patogénna, pôdna baktéria, ktorá sa prirodzene vyskytuje v koreňovom systéme bôbových rastlín, jej prítomnosť sa prejavuje v podobe nádorov, ktoré vytvára na rastline. Pomocou svojho Ti-plazmidu (tumor inducing) umožňuje prenos určitého úseku DNA, označovaného ako T-DNA (transferová DNA), z baktérie do genómu buniek rastlín, kde je náhodne integrovaný (Binns a Thomashow, 1988). Prenos DNA, ktorú chceme integrovať do genómu rastlín, je založený na Ti-plazmidu, z ktorého boli odstránené gény pre tvorbu fytohormónov a opinov a na ich miesto bola vložená cudzorodá DNA. Ďalšou časťou plazmidu je oblasť génov *vir* (virulentných), ktorá obsahuje gény dôležité k prenosu T-DNA do rastlinných buniek a ich integráciu v genóme.

Agrobacterium prevažne napadá dvojkľúčolistové rastliny. V mieste poranenia, tieto rastliny vylučujú do okolia fenolické látky napr. acetosyringon, ktorý je chemoatraktantom pre Agrobakterium a následnú indukciu *vir* génov. Pre transformáciu sa používajú kmene Agrobakteria s upraveným Ti-plazmidom (Taiz *et al.*, 2015). Pre rozpoznanie transformovaných buniek od netransformovaných sa do plazmidu vkladá selekčný gén, ktorý poskytuje rezistenciu k určitému antibiotiku (Ondřej, 2002).

Vektor môže obsahovať aj reportérový gén, ktorý umožní zviditeľnenie a meranie expresie génu vďaka farebnej reakcii alebo fluorescencii. Najčastejšie sa používa gén pre β -glukuronidázu (GUS) alebo zelený fluoreskujúci proteín (GFP) (Ondřej, 2002).

Transformácia T-DNA sa dá využiť i ako inzertná mutagenéza, kedy T-DNA preruší určitý dôležitý gén a túto mutáciu následne možno detegovať pomocou markerov. Napriek všeobecnému predpokladu, že Agrobakterium je schopné infikovať len dvojkľúčolistové rastliny, v polovici 90. rokov 20. storočia boli získané supervirulentné kmene, ktoré sú využiteľné pre jednokľúčolistové rastliny (Mrízová *et al.*, 2014). Tingay *et al.* v roku 1997 uviedol prvú úspešnú transformáciu nezrelých embryí jačmeňa pomocou *A. tumefaciens*.

2.10.2 Transformácia pomocou mikroprojektilového prenosu DNA

Metóda transformácie pomocou mikroprojektilového prenosu bola objavená koncom osemdesiatych rokov, ako alternatíva transformácie u jednoklíčnolistových rastlín (Klein *et al.*, 1987; Sanford *et al.*, 1987). Metódou mikroprojektilového prenosu DNA môžu byť transformované takmer všetky časti rastliny (Klein *et al.*, 1987). Hoci bolo nastreľovanie častíc považované za nezávislé od pletiva, najvyšší úspech bol dosiahnutý, ak boli použité nezrelé embryá (Cho *et al.*, 1998; Harwood *et al.*, 2000; Kartha *et al.*, 1989; McElroy *et al.*, 1997; Ritala *et al.*, 2008; Travella *et al.*, 2005; Wan a Lemaux, 1994). Transformácia pomocou tejto metódy je založená na priamom vnášaní plazmidovej DNA do pletív rastlín pomocou vysokofrekvenčných mikroprojektilov. Mikroprojektily sú malé zlaté, wolfrámové alebo platinové častice s veľkosťou 0,5 až 1,2 μm , ktoré sú obalené plazmidovou DNA. Najčastejšie sa používajú častice zlata, pretože majú menej škodlivé účinky na živé bunky, než napr. volfrám (Knudsen a Muller, 1991). Pod vákuom, pomocou hélia sa častice nastreľujú do prvej a druhej bunkovej vrstvy rastlinného pletiva. Hlavnou nevýhodou tejto metódy je poškodenie pletiva alebo buniek v dôsledku mechanického poškodenia, či možná integrácia viacerých kópií transgénu, čo môže viesť k umlčaniu alebo zmene v expresii záujmových génov (Travella *et al.*, 2005).

2.10.3 Elektroporácia

Do rastlinných buniek a protoplastov môže byť DNA vnášaná taktiež pomocou elektroporácie. Po aplikácii elektrického pulzu sa vytvoria dočasné póry v membránach, ktoré umožnia prienik DNA. Najúčinnější je aplikácia tejto metódy na protoplasty (Rhodes *et al.*, 1988), avšak regenerácia rastlín z protoplastov je veľmi obtiažná. Účinnosť tejto metódy je vysoko variabilná a závislá na fyziologickom stave rastlinného materiálu, a preto je pomerne málo využívaná.

2.11 Detekcia transgénnych rastlín

Transformované bunky, pletivá a následne regenerované rastliny sú po celú dobu kultivácie v *in vitro* podmienkach kultivované na médiu, do ktorého je pridávaná selekčná látka, spravidla antibiotikum alebo účinná látka herbicídu. Výber a stabilizácia transgénnych rastlín sú vo väčšine prípadov sprevádzané trvalou produkciou selekčných

markerových proteínov, ktorých gény sú úzko spojené so záujmovým génom. Na odstránenie selekčného markera bolo v rastlinách vyvinutých niekoľko techník, ako stratégie využívajúce transpozónový systém alebo miestne špecifickú rekombináciu. Obe sú založené na odstránení oblastí, ktoré kódujú selekčný marker za použitia hraničných miest (Mrízová *et al.*, 2014). Ďalšou možnosťou je ko-transformácia dvoch nezávislých sekvencií pre marker a gén (Coronado *et al.*, 2005; Matthews *et al.*, 2001).

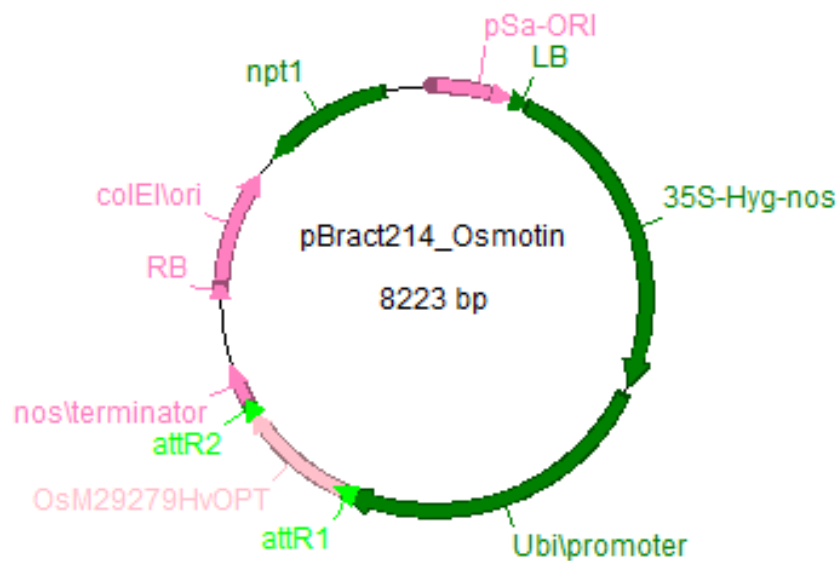
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Rastlinný materiál

Jačmeň (*Hordeum vulgare* L.) je dihaploidným druhom ($2n = 2x = 14$) s genómom HH. Pre experiment boli použité transgénne rastliny sladovníckeho jačmeňa odrody Golden Promise, do ktorých bol metódou transformácie sprostredkovanou *Agrobacterium tumefaciens* vnesený gén *osmotin* (*osm*) pomocou destinačného vektora pBRACT214 (Obr. 1). Gén *osm* zvyšuje toleranciu rastlín na abiotický i biotický stres.

Golden Promise je staršia odroda jarného jačmeňa vyšľachtená v roku 1956 v Anglicku. Má vysokú indukčnú a regeneračnú schopnosť v *in vitro* podmienkach a veľmi často sa používa na transformáciu. V našom experimente sme potvrdili využitie tejto odrody pri androgenéze.



Obr. 1 Expresný vektor pBRACT214.

RB-pravá hraničná sekvencia, LB-ľavá hraničná sekvencia, 35S-Hyg-nos-gén rezistencie na hygromycín pre rastlinnú selekciu s promotorom a terminátorom, Ubi-promoter génu osmotin, attR1 a attR2–rekombinačné miesta, OsM29279HvOPT-gén záujmu osmotin, nos-terminátor génu osmotin, colEI/ori–počiatok replikácie plazmidu v baktériách *E. coli*, npt1-gén pre syntézu enzýmu neomycín fosfotransferáza pre bakteriálnu rezistenciu na kanamycín, pSa-ORI-počiatok replikácie plazmidu v baktériách *A. tumefaciens*.

3.1.2 Použité chemikálie a roztoky

2,4-D (Duchefa)

Agaróza (SERVA, kat. č. 11404)

Aktívne uhlie (Penta, kat. č. 10230-30250)

Biotín (Sigma, kat. č. B4639)

Destilovaná voda

Dusičnan amónny (Lachema)

Etanol (Selico)

Etídium bromid (Invitrogen, kat. č. 15585-011)

FeEDTA (Calbiochem)

Bázický fuchsín (Serva, kat. č. 21915)

Glukóza (Sigma, kat. č. 158968)

Glutamín (Sigma, kat. č. 056K0149)

Glycín (Sigma, kat. č. 120H0010)

Hydroxid draselný (Lachema)

Hydroxid sodný (Lachema)

HyperLadder II (Bioline, kat. č. BIO-33039)

Chlorid draselný (Sigma, kat. č. P5405)

Chlórnan sodný 10 % (Fluka)

Izopropanol (Lach-Ner)

Kaseín hydrolyzát (Duchefa)

Kinetín (Sigma, kat. č. K0753)

Kvapalný dusík

Kyselina chlorovodíková (Lachema)

Kyselina naftalénoctová (Sigma, kat. č. 105H1003)

Kyselina octová (EMSURE)

L-glutámová kyselina (Sigma, kat. č. G5667)

Maltóza (Duchefa)

Manitol (Sigma, kat. č. M1902)

Murashige and Skoog (MS) (Duchefa, kat. č. Z0242862)

Myo-inositol (Sigma, kat. č. I7508)

N6 médium (Duchefa, kat. č. C0204)

PCR H₂O (Sigma)
Phytigel (Sigma, kat. č. P8169)
Sterilná voda DNA/RNA free (Sigma)
Tiamín (Sigma, kat. č. 55H0530)

3.1.3 Použité prístroje

Analytická váha (A200S, Sartorius)
Autokláv (PS20A, BMT)
Binokulárna lupa (PZO)
Centrifúgy (BR4, Jouan, Prism, Labnet)
Digestor (Merci)
DS-11 Spektrofotometer (DeNovix)
Elektroforetická komora (BioRad)
Elektroporačné kyvety (Thermo)
Kultivačná komora (Adaptis 1000)
Laminárny box (Thermo Scientific)
Magnetická miešačka (Variomag)
pH meter (pH526, WTV)
PCR termocykler (PTC-200, MS Research)
Termostat (BT120)
Vodný kúpeľ (SUB6, Grant)
Vortex (Heidolph)
Zdroj napätia pri elektroforéze (BioRad)

3.2 Metódy

Cieľom bakalárskej práce bolo pripraviť transgénne dihaploidné rastliny jačmeňa androgénnou technikou. Schéma experimentu je znázornená na Obr. 2.

Vybrané transgénne rastliny obsahovali záujmový gén *osmotin*, pôvodom z *Nicotiana tabacum*. Záujmový gén bol vpravený do rastlín jačmeňa prostredníctvom *A. tumefaciens*. Transformácia bola uskutočnená v rámci bakalárskej práce Bc. Barbory Klčovej (2017). Z transgénnych rastlín generácie T₁ boli odobraté peľnice, ktoré boli postupne kultivované na indukčnom a regeneračnom médiu. Regenerovali transgénne rastliny generácie T₂DH₀. Regenerované rastliny boli podrobené prietokovej cytometrii s cieľom zistenia ploidie. Z transgénnych dihaploidných rastlín boli odobraté a kultivované embryá. Z listov rastlín bola extrahovaná DNA podľa Edwards *et al.* (1991). Následne pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a separácie v 1,5 % agarózovom gély bola detegovaná prítomnosť transgénu *osm* v príslušných generáciách. Expresia transgénu bola overená na základe reverzne transkripčnej PCR (RT-PCR).

3.2.1 Androgenéza in vitro

3.2.1.1 Odber a chladové predošetrenie peľníc

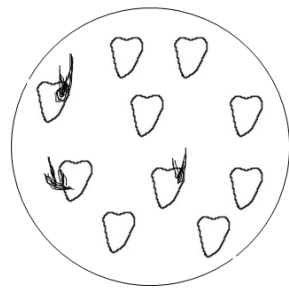
Transgénne rastliny generácie T₁, nesúce gén *osmotin*, boli pestované v kontajneroch 10x10 cm v skleníku v režime svetlo 16 hod., tma 8 hod., pri teplote 16°C. Klasy z primárnych odnoží bolo odoberané v rastovej fáze jačmeňa 45. Štádium mikrospór bolo stredné až neskoré jednojadrové štádium. Klas je v tomto štádiu vývoja mikrospór ešte úplne obalený listovou pošvou posledného listu. Takto odobraté klasy boli umiestnené do kadičky s vodou a prenesené do chladničky (4°C), kde prebiehalo stresové predošetrenie počas dvoch týždňov.

3.2.1.2 Sterilizácia klasov

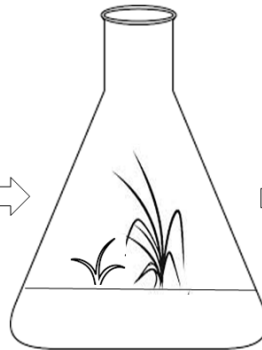
Po stresovom predošetrení bolo steblo klasu odstrihnuté pod posledným kolienkom a prebiehala následná sterilizácia.

1. Odstrihnuté klasy boli položené na papierový obrúsok v laminárnom boxe a postriekané 70 % etanolom počas 5 minút. Po sterilizácii etanolom boli klasy premiestnené do sterilného valca.

Selekcia transformovaných embryí T1 generácie *in vitro*



Kultivácia embryí generácia T1,
50 mg hygromycín

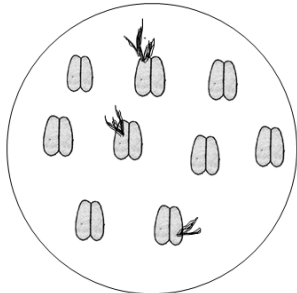


Regenerácia embryí generácie
T1



- Stanovenie prítomnosti transgénu *osm* pomocou PCR metódy v regenerovaných rastlinách T1 generácie
- Odber peľníc v jednojadrovom štádiu mikrosfér

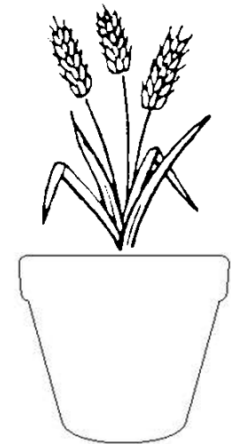
Kultivácia peľníc generácie T2DH0



Kultivácia peľníc generácie
T2DH0 na N6 médiu

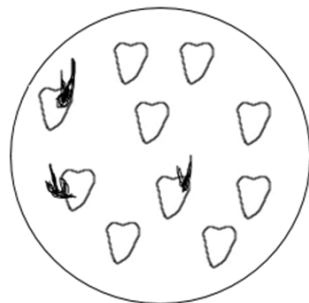


Regenerácia peľníc na
regeneračnom 190-2 médiu



- Stanovenie prítomnosti transgénu *osm* (PCR +/-)
- Stanovenie ploidity ($n/2n$)
- Izolácia embryí 21 dní po opelení

Kultivácia embryí PCR+ rastlín generácie T3DH1



Kultivácia embryí generácie
T3DH1 na 1/2 MS médiu



- Stanovenie prítomnosti transgénu *osm* (PCR +/-)
- Odvodenie homozygotnej línie
- Stanovenie expresie transgénu (RT-PCR)

Obr. 2 Schéma experimentu bakalárskej práce

2. Vo valci boli sterilizované 6 % chlórnanom sodným počas 7 minút a päťkrát premyté sterilnou vodou, vždy 2 minúty. Sterilizované klasy boli ponechané vo valci a zakryté alobalom.

3.2.1.3 Izolácia peľníc

Peľnice boli v laminárnom boxe, za aseptických podmienok, izolované z vysterilizovaných klasov. Izolácia prebiehala na sterilnej Petriho miske za použitia sterilnej pinzety a skalpela pod stereomikroskopom (Obr. 3). Peľnice boli následne zbavené nitky a uložené po 50 až 80 kusoch na Petriho misky s N6 médiom (Duchefa).

3.2.1.4 Kultivácia peľníc

Peľnice boli kultivované v termostate (pri teplote 25°C) počas niekoľkých týždňov, do vytvorenia kalusového pletiva. V prípade kontaminácie bola peľnicová kultúra premiestnená na nové médium alebo bola úplne odstránená.

Približne po 6 týždňoch od založenia peľnicových kultúr dochádzalo ku tvorbe embryonálneho kalusu. Po indukcii kalusu prebiehala kultivácia na regeneračnom médiu 190-2 (Tab. 1) s koncentráciou rastových hormónov NAA (0,5 mg/ml) a KI (0,5 mg/ml). Kalusy, ktoré neregenerovali boli premiestnené na médium s odlišnou koncentráciou rastových regulátorov NAA (0,5 mg/ml) a KI (1,5 mg/ml). Boli tak použité dve rôzne varianty média. Embryonálne kalusy boli kultivované v Adaptise pri režime osvetlenia 16/8 a teplote 23°C. Približne po 5 týždňoch bola pozorovaná regenerácia transgénnych rastlín jačmeňa, generácie T₂DH₀. Okrem zelených regenerovaných rastlín vznikalo aj množstvo albinotických rastlín, ktorých frekvencia bola zaznamenaná.

3.2.1.5 Dopestovanie rastlín

Regenerované zelené rastliny, s minimálnou veľkosťou 5 cm, boli z regeneračného média premiestnené do rašelinových bločkov (Jiffy). Rastliny boli riadne označené a umiestnené vo fytotrone a následne v skleníku.



Obr. 3 Izolácia peľníc z klasov transgénneho jačmeňa nesúceho gén *osm* za použitia sterilnej pinzety a skalpela

Tab. 1 Zloženie regeneračného média 190-2

	Zložka	(mg/L)
Makroprvky	(NH ₄) ₂ SO ₄	200
	KNO ₃	1000
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100
	KH ₂ PO ₄	300
	Mg(SO ₄)·7H ₂ O	200
	KCl	40
Mikroprvky	H ₃ BO ₃	3
	KI	0,5
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	8
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3
Železo	Na ₂ EDTA	37,3
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Aminokyseliny	Glycín	2
Vitamíny	Pyridoxín HCl	0,5
	Kyselina nikotínová	0,5
Cukry	myo-Inositol	100
	Sacharóza	30
Hormóny	Kinetin	rôzne
	NAA	rôzne
pH = 6,5		

3.2.2 Stanovenie ploidie prietokovou cytometriou

Stanovenie ploidie prebiehalo za použitia prietokového cytometra (Bio-RAD). Z každej analyzovanej rastliny boli odobraté neporušené listy. Listy transgénnych rastlín a listy kontrolnej rastliny boli nadrobno nasekané v roztoku Otto II (Doležel *et al.*, 2007) (Tab. 2) ostrou žiletkou. Vzniknutá suspenzia bola prefiltrovaná cez nylónovú sieťovinu do sklenenej skúmavky kvôli odstráneniu zvyškov pletív. Prefiltrovaná suspenzia bola zmiešaná s fluorescencnou farbičkou DAPI. Pomocou prietokového cytometra pripojeného k počítaču, so špecifickým programom, bol vyhodnotený stupeň ploidie u transgénneho potomstva rastlín na základe intenzity fluorescencného signálu v porovnaní s kontrolnou rastlinou.

3.2.3 Kultivácia embryí

Nezrelé zrná rastlín regenerovaných z peľníc, ktoré boli prietokovou cytometriou, stanovené ako jednoznačné dihaploidy, boli použité na odber embryí podľa nasledovného postupu.

1. Sterilizácia semien 70 % etanolom v Erlenmayerovej banke počas 3 minút.
2. Premývanie semien sterilnou vodou 5 minút.
3. Sterilizácia 7 % chlórnanom sodným 7 minút. Premytie sterilnou vodou trikrát, vždy 5 minút. Semená boli po celý čas umiestnené v Erlenmayerovej banke na trepačke, v laminárnom boxe.
4. Aseptická izolácia nezrelých embryí zo semien za použitia sterilného skalpela, pinzety pod stereomikroskopom.
5. Embryá boli zbavené koleoptily a uložené po dvadsiatich kusoch na $\frac{1}{2}$ MS médium v Petriho miskách. Kultivácia prebiehala v termostate pri teplote 25°C.
6. Regenerované rastliny boli premiestnené do kvetináčov s hlinou a umiestnené vo fytotrone.
7. Z listov transgénnych rastlín, v rastovej fáze jačmeňa 13, bola izolovaná genómová DNA použitá pre detekciu transgénu.

Tab. 2 Zloženie roztoku Otto II

Otto II	na 200 ml
0,4 M Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	28,65 g
Redestilovaná voda	doplniť do 200 ml
Filtrácia cez 0,22 µm filter	

3.2.4 Izolácia DNA

Izolácia DNA bola vykonaná vo všetkých troch generáciách transgénnych rastlín (T₁, T₂DH₀ i T₃DH₁). Izolácia genómovej DNA bola prevedená podľa Edwards *et al.* (1991) s určitými úpravami.

1. Mladé listy jačmeňa boli pomocou sterilných nožníc odstrihnuté do mikroskúmaviek a homogenizované v kvapalnom dusíku.
2. K rozdrveným listom bolo pridaných 400 µl extrakčného pufu (Tab. 3), listy boli niekoľkokrát premiešané a krátko zvortexované (5 s).
3. Extrakcia pri laboratórnej teplote počas 30-60 minút.
4. Centrifugácia extraktu 13 000 rpm počas 1 minúty.
5. 300 µl supernatantu bolo prepipetovaných do novej mikroskúmavky a k supernatantu sa pridalo 300 µl vychladeného izopropanolu. Zmes bola niekoľkokrát jemne premiešaná prevracaním a ponechaná 20 minút v chladničke.
6. Centrifugácia 14 000 rpm po dobu 10 minút a odliatie supernatantu.
7. K peletu bolo pridaných 300 µl 75 % etanolu a zmes bola opäť jemne premiešaná.
8. Centrifugácia 5 000 rpm 5 minút.
9. Odstránenie supernatantu, sušenie peletu v laminárnom boxe po dobu 30 minút.
10. Po vysušení v laminárnom boxe bolo k peletu pridaných 30-50 µl sterilnej vody (DNA/RNA free) podľa veľkosti peletu a vzorky boli ponechané do ďalšieho dňa v chladničke pri 4 °C.
11. Na druhý deň boli vzorky krátko centrifugované a supernatant obsahujúci izolovanú DNA bol prepipetovaný do novej mikroskúmavky, v ktorej bola izolovaná DNA skladovaná pri -20°C.

Tab. 3 Zloženie extrakčného pufu

Látka	Množstvo na 100 ml
200 mM Tris HCl (pH = 7,5)	20 ml 1M
250 mM NaCl	5 ml 5M
25 mM EDTA	5 ml 0,5 M
0,5 % SDS	500 µl
Sterilná destilovaná H ₂ O	doplniť do 100 ml

3.2.5 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Pre prípravu reakčnej zmesi bol použitý premix (REDTaq Ready Mix). Na detekciu transgénu v transformovaných rastlinách generácie T₁, T₂DH₀ a T₃DH₁ boli použité dva páry primerov produkujúce amplikony o určitej veľkosti (Tab. 4). Teplota počas nasadenia primerov bola 55°C pre oba páry použitých primerov. Objem reakcie bol 10 µl (Tab. 5).

Reakčná zmes bola rozdelená do PCR skúmaviek, vždy 8 µl reakčnej zmesi a 2 µl templátovej DNA 250-300 ng·µl⁻¹ (izolovanej z rastlín). Amplifikácia génu *osm* prebehla v termocyklery podľa programu (Tab. 6).

Tab. 4 Použité primery pre gén *osmotin*

Názov primeru	Sekvencia	Veľkosť amplikonu [bp]
OSM opt F 1	5'-CTCCTCGACGGCTTCAACAT-3'	341
OSM opt R 1	5'-TCGAGTGGGAAGTTTGGGRG-3'	341
OSM opt F 2	5'-GCCCTGCCTTCATACGCTAT-3'	222
OSM opt R 2	5'-TACGGGCAGTTGTTCTCAC-3'	222

Tab. 5 Reakčná zmes pre jednu PCR reakciu (*osmotin*)

Reakčná zmes	Objem pre 1 reakciu [µl]
ddH ₂ O	2,50
Ready Mix	5,00
Primer F	0,25
Primer R	0,25

Tab. 6 Priebeh PCR reakcie

Názov procesu	Teplota	Počet cyklov	Čas
Aktivačná denaturácia	95°C	1	4 minúty
Denaturácia	95°C	↘	30 sekúnd
Nasadenie primerov	55°C	→ 37	30 sekúnd
Extenzia	72°C	↗	40 sekúnd
Záverečná extenzia	72°C	1	2 minúty

3.2.6 Reverzne transkripčná PCR

Pre overenie expresie vneseného transgénu *osm* bola najskôr izolovaná RNA podľa kitu Ambion (Invitrogen, kat. č. AM1912). Prepis RNA do cDNA (komplementárnej DNA) bola vykonaná podľa protokolu SuperScript™ IV VILO™ Master Mix¹ za použitia reverznej transkriptázy. Prepísaná cDNA sa stala templátom pre PCR reakciu, ktorá danú cDNA namnožila.

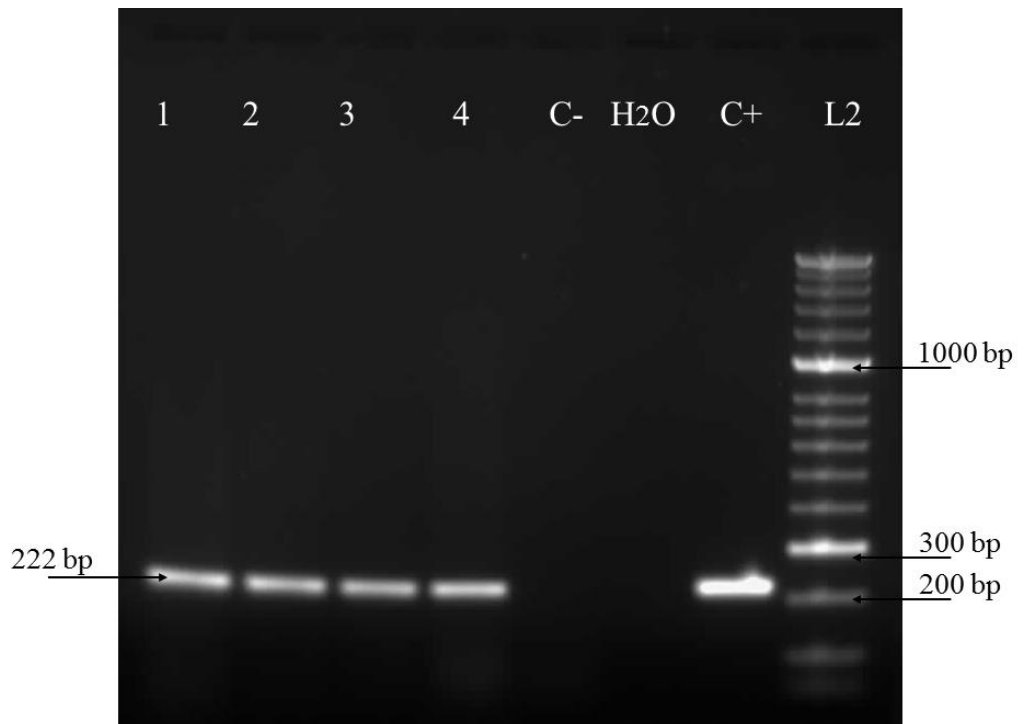
3.2.7 Elektroforéza na agarózovom gély

1. Agarózový gél bol pripravený zmiešaním určitého pomeru agarózy a 10 % TAE pufru (Tab. 7) podľa požadovanej tuhosti (1,5 %) a objemu (40 ml, 80 ml).
2. Do pripraveného gélu bol pridaný etídium bromid v množstve 1 µl na 40 ml gélu.
3. Bola pripravená aparátúra na elektroforézu a po stuhnutí agarózového gélu boli vzorky napipetované do jamiek a separované v jednosmernom elektrickom poli. Spolu so vzorkami bola na gél nanosená aj sterilná DNA/RNA free voda, negatívna a pozitívna kontrola a marker molekulových hmotností – Ladder II.
4. Po ukončení separácie bol gél premiestnený do UV transiluminátora (G:BOX, program GeneSnap, SYNGENE), ktorý pomocou UV žiarenia detegoval separované fragmenty. Prirovnaním k markeru bola zistená prítomnosť transgénu *osmotin* vo vzorkách.

Tab. 7 Zloženie TAE pufru

Látka	Množstvo na 1 l gélu
Tris báza	242 g
Kyselina octová	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
Sterilná destilovaná voda	doplniť do 1 l

¹ <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription/cdna-synthesis-kits/rt-real-time-pcr/superscript-iv-vilo-master-mix.html>



Obr. 5 PCR analýza regenerovaných rastlín generácie T₁, použité primery: OSM R 2 a OSM F 2.

1 – 4-vzorky genómovej DNA rastlín, C- -negatívna kontrola (jačmeň odroda Golden Promise, bez transgénu *osm*), H₂O-sterilná voda, C+-pozitívna kontrolná rastlina (plazmid pBRACT214::*Osm*), L2-HyperLader II, 222 bp-očakávaný fragment.

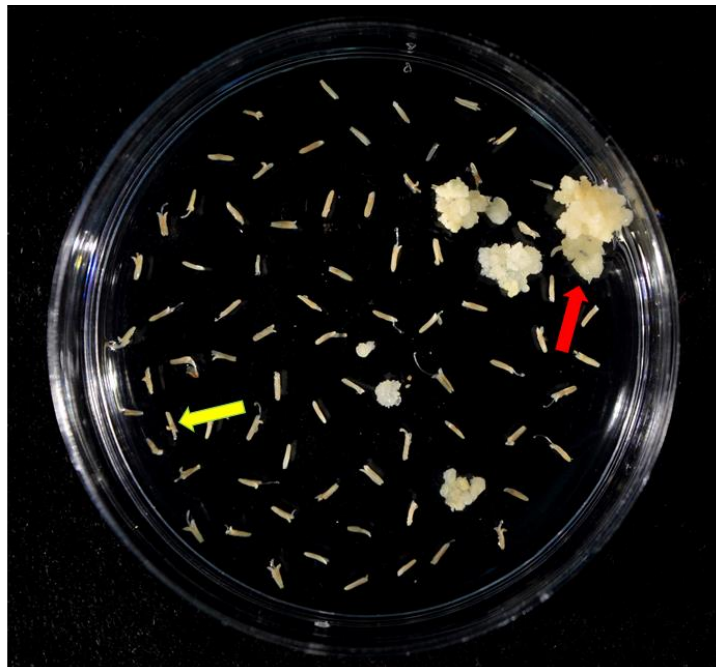
4.2 Androgenéza *in vitro*

4.2.1 Kultivácia peľníc

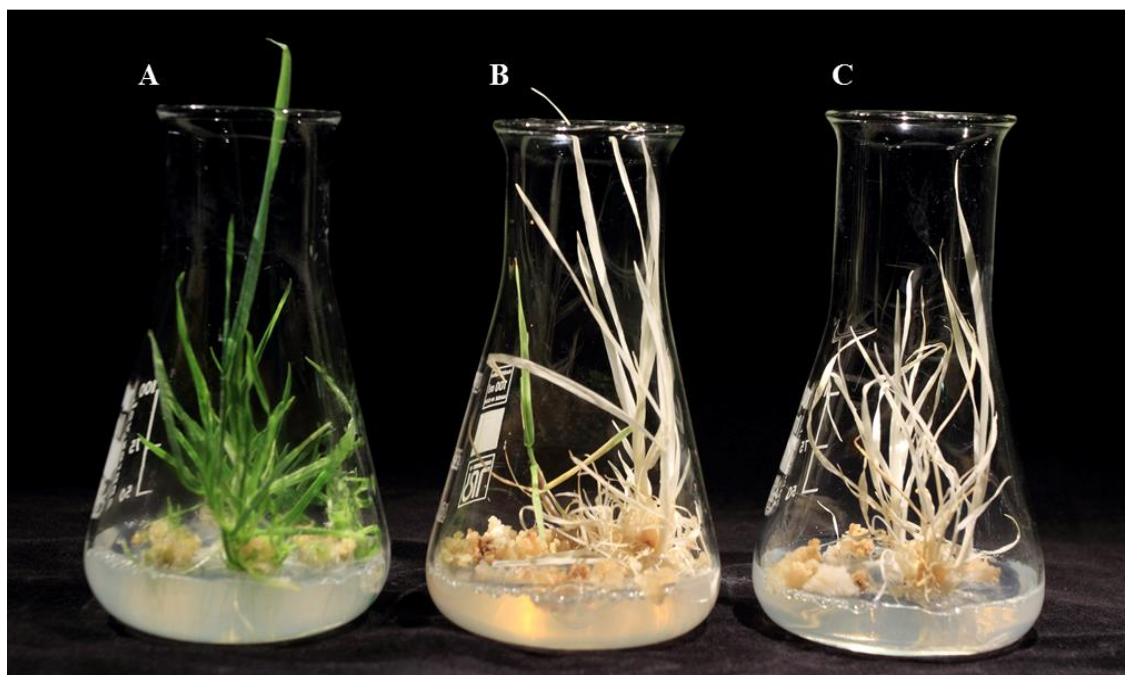
Boli získané dihaploidné transgénne rastliny jačmeňa nesúce gén *osmotin* androgénnou technikou. Klasy boli odoberané v jednojadrovom štádiu mikrospór, kedy je klas celý zabalený pošvou posledného listu (Obr. 6). V *in vitro* podmienkach, za pôsobenia stresového faktora (chladu pri 4°C), došlo k preprogramovaniu vývoja mikrospór a následnej indukcii kalusového pletiva na Petriho miskách s N6 médiom, s prídavkom rastového regulátoru KI (Obr. 7). Indukované kalusy a peľové embryá boli následne prepasážované a kultivované na médiu 190-2 s prídavkom rastových regulátorov NAA a KI v Erlenmayerových bankách. Po dvoch týždňoch kultivácie došlo k regenerácii rastlín (Obr. 8). Boli počítané množstvá regenerovaných zelených a albinotických rastlín. Celkom bolo na androgenézu použitých osem nezávislých transgénnych línií jačmeňa, peľnice boli izolované zo 14 rastlín. Celkový počet založených peľníc bol 2525, z ktorých 76 indukovalo kalus. Bolo získaných 31 zelených regenerovaných rastlín. Najviac zelených rastlín regenerovalo z rastliny OSM 3B a OSM 5B, z ktorých boli získané tri dihaploidné transgénne rastliny, ktoré boli ďalej použité na získanie homozygotnej línie. Naopak z izolovaných peľníc u šiestich rastlín nedošlo ani k indukcii kalusového pletiva.



Obr. 6 Transgénne rastliny generácie T_1 nesúce gén *osm*, čierna šípka znázorňuje klas v jednojadrovom štádiu mikrospráv



Obr. 7 Kultivácia izolovaných peľníc po štyroch týždňoch. Žltá šípka znázorňuje životaschopnú peľnicu, červená šípka znázorňuje kalus regenerovaný z peľníc.



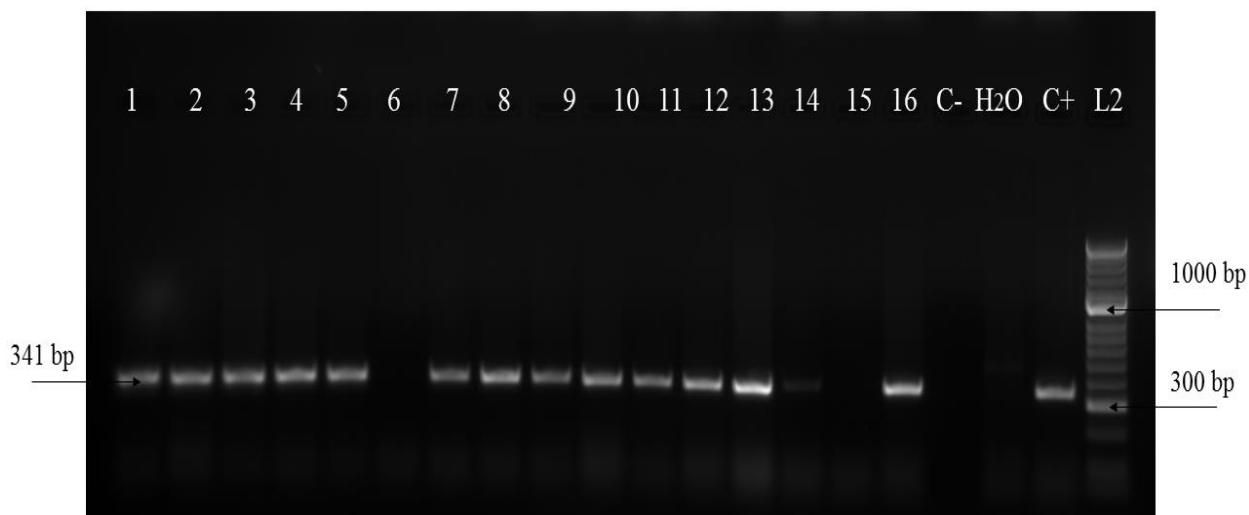
Obr. 8 Regenerácia rastlín po 5 týždňoch kultivácie v Erlenmayerových bankách na médiu 190-2. **A**- regenerovaná zelená rastlina, **B** a **C**-regenerované albinotické rastliny.

Tab. 8 Množstvo regenerovaných rastlín generácie T2

Číslo rastliny	Počet založených peľníc	Indukcia kalusu		Regenerované albinotické rastliny		Regenerované zelené rastliny		Ploidia	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%	n	2n
OSM 1	78	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 2	189	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 3A	124	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 3B	345	15	4,4	33	9,6	13	3,8	12	1
OSM 4A	140	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 4B	80	5	6,3	10	12,5	-	-	-	-
OSM 4C	175	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 5A	306	10	3,3	6	2	-	-	-	-
OSM 5B	170	8	4,7	-	-	12	7,1	10	2
OSM 5C	60	10	16,6	13	21,6	5	8,3	5	-
OSM 6	68	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 7	132	-	-	-	-	-	-	-	-
OSM 8	378	24	6,4	2	0,5	1	0,3	1	-
OSM 9	280	4	1,4	-	-	-	-	-	-
Spolu	2525	76	3,0	64	2,5	31	1,2	28	3

4.2.2 Detekcia transgénu v T₂DH₀ generácií

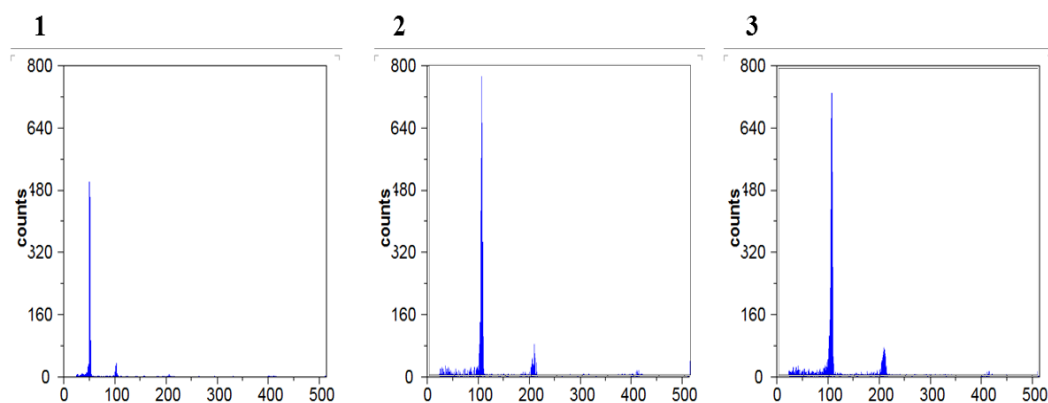
Z rastlín regenerovaných z peľníc vo veľkosti 5 cm (rastová fáza jačmeňa 13) bola izolovaná genómová DNA podľa Edwards *et al.* (1991). K overeniu priebehu PCR reakcie a k vyhodnoteniu prítomnosti transgénu *osm* bola prevedená elektroforéza na 1,5 % agarózovom géle (Obr. 9). Rastliny obsahujúce transgén boli podrobené prietokovej cytometrii pre stanovenie ploidie.



Obr. 9 Rastliny regenerované z peľníc generácie T₂DH₀, použité primery OSM R 1 a OSM F 2. 1 – 16-vzorky genómovej DNA rastlín, C- -negatívna kontrola (jačmeň odroda Golden Promise, bez transgénu *osm*), H₂O-sterilná voda, C+-pozitívna kontrolná rastlina, L2-HyperLader II, 341 bp-očakávaný fragment.

4.2.3 Stanovenie ploidiu prietokovou cytometriou

Zelené aj albinotické rastliny regenerované z peľníc boli podrobené prietokovej cytometrii kvôli zisteniu stavu ploidiu. Albinotické rastliny boli všetky detegované ako haploidy. Zo všetkých 31 zelených regenerovaných rastlín boli tri stanovené ako dihaploidné. Rastliny pochádzali z dvoch nezávislých línií, dvoch rôznych rastlín (OSM 3B a OSM 5B). Ploidia bola stanovená na základe fluorescenčného signálu transgénnych rastlín voči dihaploidnej kontrole (Obr. 10). Haploidné aj dihaploidné zelené regenerované rastliny boli následne presadené do rašelinových bločkov a pestované vo fytotrone. Neskôr boli presadené do kvetináčov a dopestované v skleníku (Obr. 11).



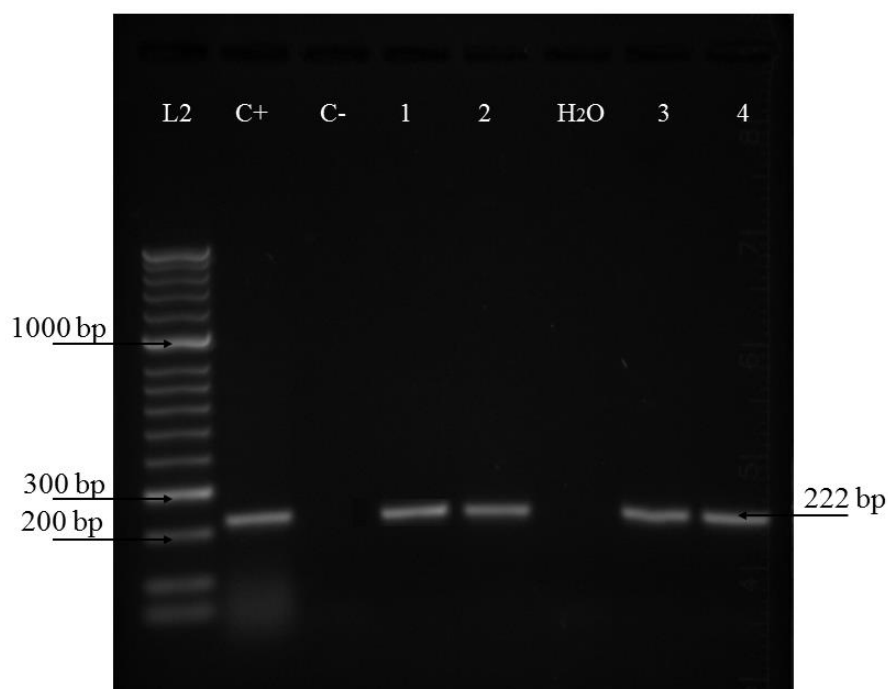
Obr. 10 Histogramy relatívneho obsahu DNA u vybraných analyzovaných rastlín získaných pomocou prietokovej cytometrie. 1-haploidná rastlina, 2-dihaploidná rastlina, 3-kontrolná rastlina (Golden Promise).



Obr. 11 Regenerované rastliny v pôde, A-haploidná rastlina, B a C- dihaploidné rastliny

4.2.4 Expresia transgénu

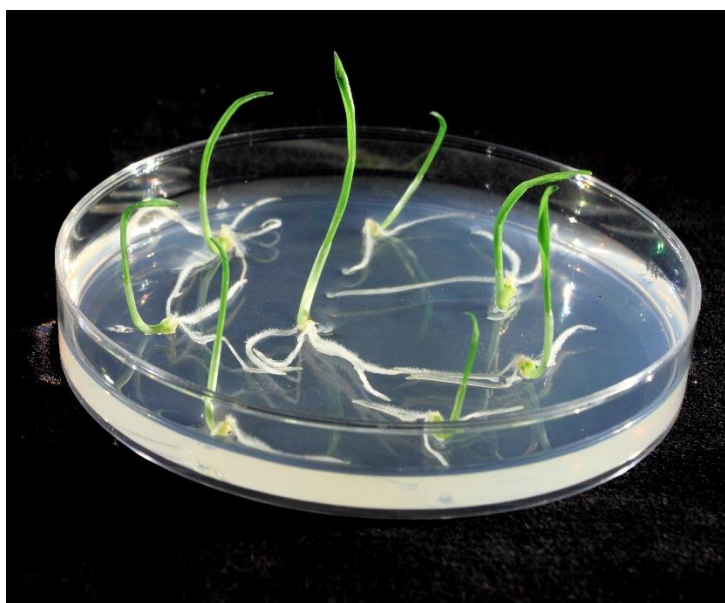
Expresia transgénu *osm* bola overená RT-PCR metódou. Analýze boli podrobené dve dihaploidné (OSM 3B a OSM 5B) a dve haploidné (OSM 5C a OSM 8) rastliny (Obr. 12). Expresia bola potvrdená u všetkých štyroch analyzovaných rastlín.



Obr. 12 RT-PCR analýza regenerovaných haploidných (OSM 5C a OSM 8) a dihaploidných (OSM 3B a OSM 5B) rastlín, použité primery OSM R 2 a OSM F 2. 1 – 2-vorky cDNA haploidných rastlín, 3 – 4-vzorky cDNA dihaploidných rastlín, C- -negatívna kontrola (jačmeň odroda Golden Promise, bez transgénu *osm*), H₂O-sterilná voda, C+-pozitívna kontrolná rastlina, L2-HyperLader II, 222 bp-očakávaný fragment.

4.3 Kultivácia embryí

Z troch získaných transgénnych dihaploidných rastlín generácie T₂DH₀ boli odobraté a sterilizované nezrelé zrná. Z nezrelých zŕn týchto rastlín boli extirpované embryá za účelom skrátenia zisku ďalšej generácie T₃DH₁. Embryá boli kultivované na ½ MS médiu v Petriho miskách (Obr. 13). Z každej rastliny bolo kultivovaných 20 embryí, celkom teda 60 embryí. U všetkých došlo k regenerácii. Po dvoch týždňoch kultivácie v kultivačnej komore boli presadené do zemi na dopestovanie (Obr. 14).



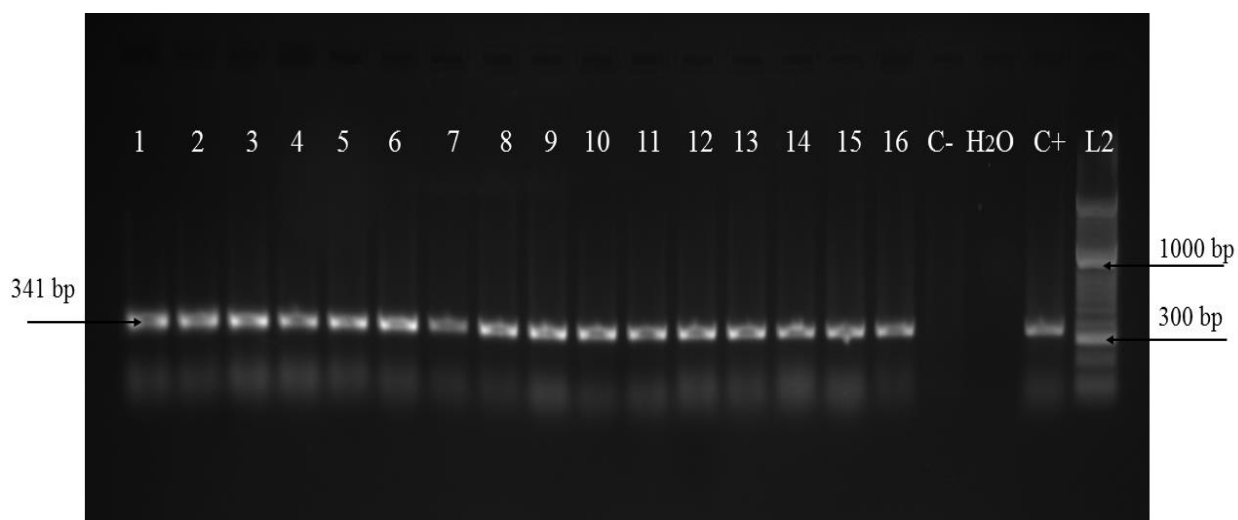
Obr. 13 Embryá generácie T₃DH₁ po dvoch týždňoch kultivácie na ½ MS médiu.



Obr. 14 Dihaploidné rastliny generácie T₃DH₁ presadené do zemi.

4.3.1 Detekcia transgénu v generácií T₃DH₁

Z regenerovaných rastlín, ktoré obsahovali aspoň dva klíčne listy (rastová fáza jačmeňa 13) bola izolovaná genómová DNA podľa Edwards *et al.* (1991). Bola vykonaná PCR analýza a následná elektroforéza v 1,5 % agarózovom gély pre potvrdenie prítomnosti transgénu *osm*. U všetkých 60 rastlín bola potvrdená prítomnosť transgénu. Bola odvodená homozygotná línia transgénneho jačmeňa nesúceho transgén *osm* (Obr. 15).



Obr. 15 PCR analýza rastlín regenerovaných z embryí generácie T₃DH₁-homozygotná línia, použité primery: OSM R 1 a OSM F 2.

1 – 16-vzorky genómovej DNA rastlín, C- -negatívna kontrola (jačmeň odroda Golden Promise bez transgénu *osm*), H₂O-sterilná voda, C+-pozitívna kontrolná rastlina, L2-HyperLader II, 341 bp-očakávaný fragment.

5 DISKUSIA

Androgenéza je jedným z *in vitro* procesov vedúcim k rýchlemu získaniu dihaploidných rastlín, homozygotných línií. Produkcia dihaploidných rastlín pomocou androgenézy je sľubnou metódou k získaniu čistých línií v šľachtiteľských programoch (Seguí-Simarro a Nuez, 2008). Vhodný materiál sa javí použitie peľnicových kultúr izolovaných mikrospór (Jacquard *et al.*, 2009).

V našich experimentoch sme použili peľnicové kultúry získané z ôsmich nezávislých línií, štrnástich transgénnych rastlín nesúcich gén *osmotin*. Transgénne rastliny boli získané transformáciou prostredníctvom *A. tumefaciens*. Bola použitá odroda jačmeňa jarného Golden Promise, ktorá má vysokú schopnosť regenerácie v *in vitro* podmienkach.

Úspešnosť procesu androgenézy je citlivý na radu faktorov. Predošetrenie je dôležitým stimulom pre prechod z normálneho gametofytického vývoja na sporofytický (Kahrizi a Mohammadi, 2009). Možno použiť niekoľko typov predošetrenia. Pre chladové ošetrenie Huang a Sunderland (1982) odporučili obdobie 21-35 dní, Ohnoutková *et al.* (2000) dosiahli pozitívne výsledky krátkodobým chladením do 14 dní. Manitolové predošetrenie malo v experimentoch Kruczkowska *et al.* (2002) v porovnaní s chladovým predošetrením negatívny vplyv na životaschopnosť peľu. Preto bolo v našich experimentoch aplikované predošetrenie chladom (4°C) počas 14 dní. Okrem predošetrenia dôležitými faktormi vplyvajúcimi na androgenézu sú genotyp darcovských rastlín, podmienky pestovania, či kultivačné médium (Kasha *et al.*, 1997).

Tvorbu dihaploidných rastlín pomocou androgenézy v transgénnom jačmeni využili vo svojich experimentoch Müllerová *et al.* (2000). Získali 1,31 % zelených regenerovaných rastlín pochádzajúcich z transgéennej línie HB1A, obsahujúcej gény *bar* a *gus*, ktorá bola kultivovaná v rastovej komore za presne určených podmienok. V prípade transgénnych rastlín pestovaných na lúke neregenerovala žiadna zelená rastlina. Podobné výsledky sme dosiahli aj v našich experimentoch, získali sme 1,2 % zelených regenerovaných rastlín, ktorých donorové rastliny boli pestované v skleníku.

Albinizmus je jedným z hlavných problémov pri procese androgenézy. Stále nie je úplne jasné, čo vedie k zmene naprogramovania mikrospór na sporofytickú cestu a ktoré gény sú zato zodpovedné. Ešte závatnejšie sú poruchy androgenézy, ktoré vedú k tvorbe albinotických rastlín (Makowska a Oleszczuk, 2014). Správanie plastidov počas androgenézy už bolo popísané. Müllerová *et al.* (2000) získali vo svojich

experimentoch s transgennou líniou HB1A 5,24 % albinotických rastlín, čo značí pomer albínov ku zeleným rastlinám približne 5 : 1. V našom experimente sme získali 2,5 % albinotických rastlín, to značí pomer 2 : 1. V experimentoch Caredda *et al.* (2000) a Cistué *et. al.* (2004) s netransgenným jačmeňom uviedli 100 % pomer albinotických rastlín voči zeleným rastlinám. Je známe, že gény, ktoré sú zodpovedné za pomery zelených regenerovaných rastlín ku albínom sú kódované jadrovým genómom. Avšak len málo lokusov bolo zatiaľ identifikovaných. Úplné pochopenie príčiny albinizmu by mohlo viesť k lepšej manipulácii *in vitro* podmienkach (Makowska a Oleszczuk, 2014).

Jačmeň je dôležitý ako globálna plodina, aj ako vedúca modelová rastlina pre izolovanú kultúru mikrospór. Vytvorenie transgénnej plne homozygotnej línie si tradičnej schéme šľachtenia vyžaduje podľa Kahrizi a Mohammadi (2009) vyžaduje až sedem rokov. Použitím *in vitro* techník to možno dosiahnuť v priebehu jedného roka. Dihaploidné rastliny jačmeňa môžu vzniknúť buď pôsobením kolchicínu alebo spontánne. Avšak ako uvádza Hansen a Anderson (1998) kolchicín je toxický, karcinogénny a drahý. Spontánne zdvojenie sa môže vyskytnúť prostredníctvom jadrovej fúzie alebo endomitózy. Spontánne zdvojenie v jačmeni podľa Tiwari a Rahimbaves (1992) dosahuje 70 až 80 % regenerovanej populácie v netransgenných rastlinách. V našom experimente 9,6 % regenerovanej populácie transgénneho jačmeňa tvorili dihaploidné rastliny.

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo vytvoriť homozygotnú líniu transgénneho jarného jačmeňa pomocou androgenézy. Podarilo sa získať tri dihaploidné transgénne rastliny, z ktorých boli odvodené transgénne homozygotné línie, ktoré budú využité k testovaniu účinku transgénu *osmotin*.

6 ZÁVER

V rámci bakalárskej práce bola na základe dostupných literárnych zdrojov vypracovaná literárna rešerš na tému indukcie dihaploidných rastlín pomocou metódy kultivácie peľníc. Hlavným cieľom práce bolo získať dihaploidné transgénne rastliny nesúce gén *osmotin* a overiť použitie tejto metódy k rýchlemu získaniu homozygotných línií. U rastlín generácie T₁, T₂DH₀ a T₃DH₁ bola prítomnosť transgénu *osm* detegovaná pomocou PCR. Expresia transgénu u haploidných a dihaploidných bola stanovená metódou RT-PCR. Experimenty v rámci bakalárskej práce preukázali, že metódu androgenézy možno využiť na rýchly zisk čistých homozygotných transgénnych línií. Kultivácia nezrelých zygotických embryí izolovaných z dihaploidných transgénnych línií výrazným spôsobom skrátí proces ich množenia. Získané homozygotné línie budú využité na stresové testovanie rastlín voči suchému a soľnému stresu.

7 LITERÁRNE ZDROJE

- Attansov A., Zagorska N., Boyadjiev P., Djilianov D. (1995): *In vitro* production of haploid plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 400-408.
- Bevan M. W., Flavell, R. B., Chilton, M. D. (1983): A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**, 184-187.
- Bhojwani S.S. a Razdan M.K. (1997): Plant Tissue Culture: Theory and Practice. *Biologia Plantarum* **39(4)**, 542.
- Binns A.N. a Thomashow M.F. (1988): Cell biology of Agrobacterium infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiology* **42**, 575-606.
- Bisognin D. A., Douches D. S., Buszka L., Bryan G., Wang D. (2005): Mapping late blight resistance in *Solanum microdontum* bitter. *Crop Science* **45**, 340-345.
- Bombale S.L., Gowda P.H.R., Gunnaiah R., Malatheshaiah N.T., Salome T., Swamidatta S.H. (2010): In vitro regeneration and transformation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) with alternative Atwbc19 marker gene. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **6 (1)**, 1-12.
- Bradshaw J.E. (2016): Genetically Modified Crops. In: *Plant Breeding: Past, Present and Future*. (Bradshaw J.E., ed.), Springer, Cham, 561-590.
- Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaeffer P.J., Bottino G.W. (1982): Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses. *Theoretical and Applied Genetics* **62**, 155-159.
- Caredda S., Devaux P., Sangwan R.S., Proult I., Clément C. (2004): Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, 35-43.
- Caredda S., Doncoeur C., Devaux P., Sangwan R.S., Clément C. (2000): Plastid differentiation during androgenesis in albino and nonalbino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction* **13**, 95-104.
- Castillo A.M., Valles M.P., Cistué L. (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* **113**, 1-8.
- Cistué L., Ramos A., Castillo A.M. (1998): Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **55**, 159-166.
- Cistué L., Valles M.P., Echavarrri B., Sanz J.M., Castillo A.M. (2004): Production of barley doubled haploids by anther and microspore culture In: *In-vitro application in crop improvement Science Publishers*. (Mujib A., Cho M.J., Predieri S., Banerjee S., eds.), Springer, Plymouth, 1-17.
- Cistué, L., Batlle R.F., Echavarrri B. (2009): Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports* **28**, 727-735.
- Cistué, L., Ziauddin A., Simion E., Kasha K.J. (1995): Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**, 163-169.
- Coronado M.J., Hensel G., Broeders S., Otto I., Kumlehn J. (2001): Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**, 591-599.
- Czembor J. H. (2000): Resistance to powdery mildew in barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces from Egypt. *Plant Genetics Resource Newsletter* **123**, 52-60.
- Datta S. K. (2005): Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science* **89**, 1870-1878.
- de Buyser J., Henry Y., Taleb G. (1985): Wheat androgenesis: cytogenetical analysis and agronomic performance of doubled haploids. *Pflanzenzücht* **95**, 23-33.
- Dwivedi S.L., Britt A.B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. (2005): Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances* **1(33)**, 812-29.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19**, 1349.

- F., Saraffi A., Alibert G. (1996): The effects of genotype, ploidy level and cold pretreatment on barley anther culture responsiveness. *Cereal Research Communications* **24**(1), 7-13.
- Ferrie A.M.R. (2009): Current status of doubled haploids in medicinal plants. In: *Advances in haploid production in higher plants*. (Touraev A., Forster B.P., Jain S.M., eds.), Springer, Heidelberg, 209–217.
- Gasser C.S. a Fraley R.T. (1989): Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*, **244**, 1293-1299.
- Guha S. a Maheswari S. (1964): In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* **204**, 497.
- Harada T., Ishikawa R., Niizeki M., Saito K.M. (1992): Pollen-derived rice calli that have large deletions in plastidDNA do not require protein synthesis in plastids for growth. *Molecular Genetics and Genomics* **233**, 145-150.
- Harwood W.A., Ross S.M., Cilento P., Snape J.W. (2000): The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica*, **111**, 67-76.
- 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*, 9.
- Hoekstra S., van Bergen S., van Brouwershaven I.R., Schilperoort R.A., Wang M. (1997): Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Science* **126**, 211-218.
- Hoekstra S., van Zijderveld M.H., Heidekamp F., van der Mark F. (1993): Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Report* **12**, 661-665.
- Holme I. B., Olesen A., Hansen N. J. P., Andersen S. B. (1999): Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breeding* **118**, 111-117.
- Hu H. (1997): In vitro induced haploids in wheat. In: *In vitro Haploid Production in Higher Plants* vol. 4, (Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E., eds.), Kluwer Academic Publishers, London, 73-97.
- Huang B. a Sunderland N. (1982): Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. *Annals of Botany* **49**, 77-88.
- Chen C.C. (1977): *In vitro* development of plants from microspores of rice. *In vitro*. *In vitro* **13**, 484-489.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merio D.J., Sciaky D., Montova A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11** (2), 263-271.
- Cho M.J., Jiang W., Lemaux P.G. (1998): Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Science* **138**, 229-244.
- Chu C.C. (1978): The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. (Hu H., Xu Z.H., Zhu Z.Q., eds.), Science Press, Beijing, 45-50.
- Immonen S. (1999): Androgenetic green plants from winter rye, *Secale cereale* L., of diverse origin. *Plant Breeding* **118**, 319-322.
- Immonen S. a Anttila H. (2000): Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *Plant Physiology* **156**, 204-210.
- Islam S. M. S. and Tuteja N. (2012): Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science* **182** (1), 134-144.
- Islam S.M.S. (2010): The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Australian Journal of Crop Science* **4**, 660-665.
- Jacquard C., Nolin F., Hecart C., Grauda D., Rashal I., Dhondt-Cordelier S., Sangwan R.S., Devaux P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clément C. (2009): Microspore embryogenesis and

- programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Reports* **28**, 1329-1339.
- Jacquard C., Wojnarowicz G., Clement C. (2003): Anther culture in barley. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual.* (Maluszynski M., Kasha K., Forster B.P., Szarejko I., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 21-27.
- Jensen C.J. (1983): Producing haploid plants by chromosome elimination. In: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement.* (Pollard L. a Lee X.W., eds.), Science Press, Beijing, China., 55-79.
- Jensen N. (1988): Breeding and selection methods, doublehaploid method. *Plant breeding methodology* 15-62.
- Kacar A., Biçen B., Varol I., Mendi, Y.Y., Serce S., Çetiner S. (2010): Gelling agents and culture vessels affect in vitro multiplication of banana plantlets. *Genetics and molecular research* **9**, 416-24.
- Kahrizi D. a Mohammadi R. (2009): Study of androgenesis and spontaneous chromosome doubling in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using isolated microspore culture. *Acta Agronomica Hungarica* **57(2)**, 155–164.
- Kahrizi D., Mahmoodi S., Khaniki B.G., Mirzaei M. (2011): Effect of genotype on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biharean Biologist* **5(2)**, 132-134.
- Kao K.N. (1996): Future prospects for crop improvement through anther and microspore culture. In: *In-vitro haploid production in higher plants.* (Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E., eds.), Kluwer Academic Publishers, London, 367-373.
- Kartha K.K., Chibbar R.N., Georges F., Leung N., Caswell K., Kendall E., Qureshi J. (1989): Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (Cat) gene in barley cell-cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* **8**, 429-432.
- Kasha K. J., Ziauddin, A., Cho, U., Simion, E., Petroski, R., Cistué, L. (1997): Anther and microspore cultures of barley and wheat. *Journal of Applied Genetics* **38**, 373-380.
- Kiviharju E., Moisander S., Laurila J. (2005): Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **8**, 1-9.
- Kiviharju E., Puolimatka M., Saastamoinen M., Pehu E. (2000): Extension of anther culture to several genotypes of cultivated oats. *Plant Cell Reports* **19**, 674-679.
- Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Sanford J. C. (1987): High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Kleinhofs A. a Graner A. (2001): An integrated map of the barley genome. *Advances. Cellular and Molecular Biology of Plants* **6**, 187-200.
- Knudsen S. a Muller M. (1991): Transformation of the developing barley endosperm by particle bombardment. *Planta* **185**, 330-336.
- Kruczkowska H., Pawłowska H., Skucińska B. (2002): Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *Journal of applied genetics* **43(3)**, 287-296.
- Labrani Z., De Buyser J., Picard E. (2007): Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. *Plant Breedin* **126**, 565-568.
- Labrani Z., Richard N., De Buyser J., Picard E. (2005): Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées: importance des prétraitements. *Comptes Rendus Biologie*, **328**, 713-723.
- Larsen E.T., Tuveesson I.K.D., Andersen S.B. (1991): Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* **82**, 417-420.
- Li H., Devaux P. (2003): High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science* **164**, 379-386.
- Liu W., Zheng M.Y., Polle E.A., Konzak C.F. (2002): Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Science* **42**, 686-692.

- Makowska K. a Oleszczuk S. (2014): Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Reports* **33(3)**, 385-392.
- Makowska K., Kałużniak M., Oleszczuk S., Zimny J., Czaplicki A., Konieczny R. (2017): Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **131(2)**, 247-257.
- Matthews P.R., Wang M.B., Waterhouse P.M., Thornton S., Fieg S.J., Gubler F., Jacobsen J.V. (2001): Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard Agrobacterium transformation vector. *Molecular Breeding* **7**, 195-202.
- McElroy D., Louwse J.D., McElroy S.M., Lemaux P.G. (1997): Development of a simple transient assay for Ac/Ds activity in cells of intact barley tissue. *Plant Journal*, **11**, 157-165.
- Mrízová K., Holasková E., Tufan Öz M., Jiskrová E., Frébort I., Galuszka P. (2014): Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology advances* **32**, 137-157.
- Mrízová K., Jiskrová E., Vyroubalová Š., Novák O., Ohnoutková L., Pospíšilová H., Frébort I., Harwood W.A., Galuszka P. (2013): Overexpression of Cytokinin Dehydrogenase Genes in Barley (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise) Fundamentally Affects Morphology and Fertility. *PLOS ONE* **8**.
- Muñoz-Amatriain M., Svensson J.T., Castillo A.M., Cistué L., Close T.J., Vallés M.P. (2009): Expression Profiles in Barley Microspore Embryogenesis. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. (Touraev A., Forster B.P., Jain S.M., eds.), Springer, Dodrecht, 127-134.
- Murashige T. a Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Murovec J. a Bohanec, B. (2012): Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: *Plant Breeding*, (Abdurakhmonov I. Y., ed.), InTech., Rijeka, 87-101.
- Neto R.F., Garbuglio D.D., Borém A. (2014): Double haploid. In: *Biotechnology and Plant Breeding. Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. (Borém A. a Neto R.F., eds.), Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 203-222.
- Nitsch C. (1977): Culture of isolated microspores. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (Reinert J. a Bajaj Y.P.S., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 268.
- Nitsch, C. (1977): Culture of isolated microspores. In: *Plant cell, tissue and organ culture*. (Reinert J. a Bajaj P.S., eds.), Springer, Berlin Heidelberg New York, 268-278.
- Novotný J. (2002): *Vliv vybraných faktorů na androgenezi in vitro u obilovin*. Dizertační práce, UPOL Olomouc, Česká republika.
- Ohnoutková L., Novotný J., Müllerová E., Vagera J., Kučera L. (2000): Is a cold pretreatment really needed for induction of in vitro androgenesis in barley and wheat? In: *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*. (Bohanec B., ed.), Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 33-37.
- Olmedilla A. (2010): Microspore embryogenesis. In: *Plant Development Biology – Biotechnological Perspectives* vol. 2, (Pua E., Davey M., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 27-44.
- Ondřej M. (2002): Vektory, mechanismy a metody transgenozy. In: *Transgenozy rostlin* (Ondřej M. a Drobník J., eds.), Academia, Praha, 73-108.
- Preťová A., Obert B., Bartošová Z. (2006): Haploid formation in maize, barley, flax, and potato. *Protoplasma* **228**, 107-114.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kolektiv. (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 484 strán. [ISBN: 80-200-0586-2].
- Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Demeter J. J. (1988): Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* **240**, 204-207.
- Ritala A., Salmenkalli-Martilla M., Kurtén U., Mannonen L., Oksman-Candeltay K.M. (2000): Research on microspore culture of malting barley et VTT Biotechnology. In:

- Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells.* (Bohanec B., ed.), Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 23-27.
- Ritala A., Wahlstrom E.H., Holkeri H., Hafren A., Makelainen K., Baez J., Mäkinen K., Nuutila A.M. (2008): Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures. *Protein Expression and Purification* **59**, 274-281.
- Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D., Allen N. (1987): Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Science and Technology* **5**, 27-37.
- Sangwan R.S. a Sangwan-Norreel B.S. (1996): Cytological and biochemical aspects of *in vitro* androgenesis in higher plants. In: *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, (Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E., eds.), Kluwer Academic Publishers, London, 95-109.
- Scaboo A. M., Chen P., Slepser D. A., Clark K. M. (2010): Classical breeding and genetics of soybean. In: *Genetics, genomics and breeding of soybean*. (Bilyeu K., Ratnaparkhe M. B., Kole Ch., eds.), CRC Press, U.S.A., 19-54.
- Seguí-Simarro J.M., Nuez F. (2008): Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenic and. Genome Research*, **120**, 358-369.
- Shtereva L.A., Zagorska N.A., Dimitrov B.D., Kruleva M.M., Oanh H.K. (1998): Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Reports* **18**, 312-317.
- Snustad D. P. a Simmons, M. J. (2009): *Genetika*. Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 871 strán. ISBN 978-80-210-4852-2.
- Sopory S.K. a Munshi M. (1996): Anther Culture. In: *In vitro Haploid Production in Higher Plants* vol. 1, (Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E., eds.), Kluwer Academic Publishers, London, 145-176.
- Szarejko I. (2003): Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. (Maluszynski M., Kasha K., Forster B.P., Szarejko I., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 35-42.
- Šesek S. a Kondić A. (1996): The effect of the genotype on the occurrence of albino regenerants in wheat anther culture. *Genetika* **28(1)**, 37-42.
- Špunar J., Vaculová K., Špunarová M., Nesvadba Z. (2002): Comparison of important parameters of spring and winter barley cultivated in sugar beet production area of Czech Republic. *Rostlinná výroba* **6**, 237-242.
- Taiz L., Zeiger E., Moller I.M., Murphy A. (2015): Genome structure and gene expression. In: *Plant Physiology and Development*. (Taiz, L. a Zeiger, E., eds.), Sinauer Associates, Sunderland, U.S.A **6**, 51-79.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* **11**, 1369-1376.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* **11**, 1369-1376.
- Torp A.M. a Andersen S.B. (2009): Albinism in Microspore Culture. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. (Touraev A., Forster B.P., Jain S.M., eds.), Springer, The Netherlands, 155-160.
- Touraev A., Ilham A., Vicente O., Heberle-Bors E. (1996): Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports* **15**, 561-565.
- Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. (1997): Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* **2(8)**, 297-302.
- Travella S., Ross S.M., Harden J., Everett C., Snape J.W., Harwood W.A. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports* **23**, 780-789.
- Wan Y. a Lemaux P.G. (1994): Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* **104**, 37-48.
- Tiwari, S., Rahimbaves, I. (1992): Comparison of glucose, sucrose and maltose for *Hordeum vulgare* L. isolated microspore culture using different methods. *Indian Journal of Experimental. Biology* **30**, 624-627.

Hansen, N. J. P., Anderson, S. B. (1998): *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzaline, trifuralin and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica* **88**, 159-164.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

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

a.i.- a iné

BAP- 6-benzylaminopurin

DH- dihaploid

F1- prvá filiálna generácia

GFP- zelený fluoreskujúci proteín

GMO- geneticky modifikovaný organizmus

GUS- β -glukoronidáza

IAA kyselina indolyl-3-octová

KI- kinetin

NAA- kyselina naftalénoctová

napr.- napríklad

PCR- polymerázová reťazová reakcia

RT-PCR- reverzne transkripčná polymerázová reťazová reakcia

T-DNA- transférová DNA

Ti- tumor indukujúci

tzn.- to znamená

UV- ultrafialové žiarenie