

TRANSFORMACE HYBRIDNÍ OSIKY POMOCÍ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Transformation of hybrid aspen by means of *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

The European aspen (*Populus tremula*) represents a very modest tree species in climatic conditions and soil quality. For its regeneration ability, it is a very perspective woody species for tissue culture manipulation, genetic engineering, and genetic mapping. Stem segments and leaves discs of the hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) clone no. 5 preserved in the FGMRI Gene Bank were used for testing of genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Transformed shoots were obtained using four agrobacterial constructs bearing uidA (GUS) gene governed by various promoters. Presence of nptII and GUS genes in transgenic tissues and plants was verified using the polymerase chain reaction.

Klíčová slova: transformace, hybridní osika, *Agrobacterium tumefaciens*

Key words: transformation, hybrid aspen, *Agrobacterium tumefaciens*

ÚVOD

Topol osika (*Populus tremula*) je velmi nenáročná dřevina na klimatické podmínky i kvalitu půdy. Vyšlechtěné klony osiky a vytvořené syntetické populace jsou velmi perspektivní pro výsadby na zemědělských půdách (lignikultury), ale i na imisních holinách, případně kontaminovaných stanovištích (MOTTL, ŠTĚRBA 1988, JOACHIM 1991).

Rod *Populus* se pro své vlastnosti stal oblíbeným modelem pro genetické inženýrství především pro svoji citlivost k infekci bakteriemi z rodu *Agrobacterium*. Rostliny rodu *Populus* patří totiž do přirozeného spektra hostitelů *Agrobacterium*, přítomnost T-DNA oblasti v pletivech hlízky a kořenů potvrdili ve svých studiích PARSONS et al. (1986) a PYTHOUD et al. (1987). Topoly mají krátký vegetační cyklus a rychle rostou. Topoly se navíc vyznačují také dobrou regenerační schopností v kulturách in vitro, malou velikostí genomu (450 – 550 Mbp) a již zpracovanými kvalitními genetickými mapami. Například v poslední době byla u druhu *Populus trichocarpa* zkompletována úplná databáze genomu (TUSKAN et al. 2006).

Přenesení dalších významných vlastností do genomu osiky, jako je např. odolnost vůči salinitě, suchu nebo zvýšení remediačních schopností by rozšířilo využití této dřeviny v aridních oblastech a na kontaminovaných půdách. Cílem naší práce bylo ověřit možnost transformace vybraného hybridního klonu osiky (*Populus tremula* x *P. tremuloides*), který se vyznačuje nadprůměrným růstem na pokusných provenienčních plochách v Krušných horách.

MATERIÁL A METODA

Rostlinný materiál

Pro transformační pokusy byl vybrán mezidruhový hybrid osiky a kanadského topolu osikovitého (*P. tremula* x *P. tremuloides*), který roste v klonovém archivu v Uherském Hradišti a na provenienčních plochách v Krušných horách. Tento klon je vedený v explantátové bance pod označením OS-5. Zdrojem listů byla asepticky pěstovaná explantátová kultura na médiu MURASHIGE, SKOOG (1962) (MS) s 0,2 mg.l⁻¹ cytokininu 6-benzylaminopurinu (BAP) a 0,1 mg.l⁻¹ auxinu kyseliny β-indolylnáselné (IBA), glutaminu 10 mg.l⁻¹, glycinu 2 mg.l⁻¹, sacharóze 30 g.l⁻¹, agaru 6 g.l⁻¹, pH 5,8. Kultivace výchozího materiálu probíhala v klimatizovaných podmínkách při 24 °C, bílém fluorescenčním světle (30 μmol.m⁻².s⁻¹) a 16hodinové fotoperiodě.

Pro transformace byly použity čtyři bakteriální kmeny *Agrobacterium tumefaciens* získané z Ústavu molekulární biologie rostlin Akademie věd ČR (ÚMBR AV ČR). Tyto konstrukty nesou pracovní označení 148, 149, 150, 151. Konstrukty byly původně získány z laboratoří Dundee Institute of Technology (Scotland) ve formě plazmidů v *E. coli* HB101, jsou popsány v publikaci PHILLIPSE et al. (1992). Plazmidy byly použity k transformaci *A. tumefaciens*, kmene LBA4404.

V rámci pokusů byly pro transformaci použity konstrukty se zabudovaným genem pro neomycinfosfotransferázu typu II (NPTII), který u příjemce navozuje rezistenci k antibiotiku kanamycinu (Kn) a reportérovým genem uidA (GUS) pro syntézu b-glukuronidázy (GUS). Stručný popis konstruktů je uveden v tabulce 1.

Metodika transformace

Stonkové segmenty o velikosti 4 - 6 mm a listové disky o průměru 6 až 8 mm byly kultivovány 24 hodin na médiu MS s 1,0 mg.l⁻¹ BAP a 0,1 mg.l⁻¹ IBA. Listové disky byly umístěny adaxiální stranou na živné médium. Poté byl rostlinný materiál ponořen do suspenze bakterií *Agrobacterium* (proces kokultivace) a přenesen zpět na původní médium. Následovala 48hodinová kultivace rostlinného materiálu s *A. tumefaciens*, po které byly explantáty dvakrát promyty v tekutém médiu MS. Dále následovalo promytí v médiu MS s rozdílnými koncentracemi antibiotik a poté byl rostlinný materiál přesazen na agarové MS médium s obsahem BAP 1,0 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹ a s nižším obsahem glutaminu (10 mg.l⁻¹) doplněném o antibiotika k eliminaci vektorových bakterií, použitá v rozdílných koncentracích. Listové disky a stonkové segmenty byly kultivovány při 25 °C a 24hodinové světelné periodě. V jednom experimentálním cyklu bylo kultivováno cca 140 pokusných listových disků nebo stonkových segmentů a 10 disků nebo stonkových segmentů kontrolních. V rámci pokusů byly testovány dva druhy antibiotik na supresi bakteriální infekce a to timentin a augmentin. Každých sedm dní byly transformované explantáty přesazeny na čerstvé médium, ve kterém se postupně snižovala koncentrace antibiotik (timentin 1 500 - 0 mg.l⁻¹, augmentin 1 000 - 0 mg.l⁻¹) a zároveň se zvyšovala koncentrace selekčního agens - antibiotika kanamycinu (z 0 na 100 mg.l⁻¹).

Tab. 1.

Popis konstruktů *Agrobacterium tumefaciens*
Description of constructs *Agrobacterium tumefaciens*

Pracovní označení konstruktů/Construct	Označení kmene <i>A. t./Stem</i>	Rezistence bakterií/Resistance of bacteria	Typ promotoru/Type of promoter	Plazmid/Plasmid
148	4404-Z4.2	Kn	CaMV 35S	pBI 121
149	4404-A4	Kn	NOS (pro nopalinsyntázu/ for nopalisyntase))	pJPP1
150	4404-A1	Kn	MAN (pro manopinsyntázu/ for mannopinsynthase)	pJPP4
151	4404-Z61	Kn	RbcS – Rubisco, genu pro malou podjednotku ribulózo-bisfosfátkarboxylázy/gen for small subunit ribulosebiphosphate carboxylase	pBI 131

Selekce transformantů

V průběhu experimentů se použily dvě metody stanovení přítomnosti markerového genu GUS v transformovaných dřevinách – metoda fluorometrická a metoda založená na polymerázové řetězové reakci (PCR).

Aktivita GUS byla měřena fluorometrickou metodou podle modifikace VITHA et al. (1991). Pro zjištění exprese transgenů GUS byly z každé vícevrcholové kultury hybridní osiky získané regenerací z jednoho listového disku kokultivovaného s *Agrobacterium tumefaciens* náhodně vybrány tři výhony, jejichž střední část byla použita k analýze a apikální část byla přesazena na multiplikační médium s kanamycinem. DNA z transformovaných rostlin byla izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (Quiagen) a následně použita k detekci transgenů na základě PCR metody a specifických primerů (metoda podle RNDr. H. Niedermeirové, ÚMBR AV ČR, personální sdělení 2001).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro úspěšné zvládnutí transformačního procesu je nutná detailně propracovaná technika regenerace in vitro transformovaného materiálu. Pro transformační pokusy se jako výchozí materiál používaly explantátové kultury hybridní osiky OS-5 (juvenilní materiál) a byla použita metoda nepřímé transformace pomocí *A. tumefaciens* (MALÁ, MICHALOVÁ 1993). Úspěšnost transformace je ovlivňována typem výchozího explantátu, nejčastěji se využívají listy nebo stonkové segmenty (internodia). U druhu *P. tremuloides* byla pozorována vyšší účinnost bakteriální infekce na stonkových segmentech (KUBISIAK et al. 1993). Vyšší produkci transformovaných kalusů u explantátů z internodií hybridní osiky *P. tremula* x *P. alba* pozorovali i LEPLÉ et al. (1992).

V experimentech byly použity listové disky i stonkové segmenty hybridní osiky. Pro indukci organogeneze u obou typů výchozích explantátů se osvědčilo médium MS s vyšším obsahem cytokininu BAP (1 mg.l⁻¹), ale s nižším obsahem glutaminu (10 mg.l⁻¹). Médium se stejným složením se osvědčilo také u indukce organogeneze ze zimních pupenů dospělých jedinců hybridní osiky.

Listové disky byly umístěny adaxiální stranou na živné médium. Regenerační proces se nejvíce projevil u bazálního pólu listového disku, vždy v blízkosti cévních svazků, ve většině případů u hlavní žilky. Oproti tomu CHUN (1990) pozoroval vyšší schopnost indukce

adventivních výhonů u listových segmentů hybridu (*P. alba* x *P. grandidentata*) při kultivaci na abaxiální straně.

V průběhu transformačních pokusů s rozdílným rostlinným materiálem byly testovány různé doby přímé kokultivace (kultivace rostlinného materiálu v suspensi *Agrobacterium*). U listových disků se jako nejvýhodnější jevila 15 až 20minutová doba kokultivace, stonkové segmenty hybridní osiky byly ponořeny do suspence *A. tumefaciens* na 30 minut.

Jedním z důležitých faktorů ovlivňujících úspěšnost transformace pomocí rodu *Agrobacterium* je výběr vhodných antibiotik pro eliminaci vektorových bakterií použitých při transformačním procesu. Eliminace infekčního agens (*Agrobacterium*) z transformovaných kultur je velmi důležitá, protože další přítomnost bakterií negativně ovlivňuje růst a vývoj transformovaných rostlin a může vést až k úhynu kultur.

Jako nejúčinnější pro supresi použitých bakterií se jevílo použití antibiotika timentinu (účinné látky ticarcillin a kyselina klavulanová) v koncentraci 2 500 mg.l⁻¹ po dobu 10 minut u listových disků hybridní osiky, u stonkových segmentů hybridní osiky se osvědčilo zvýšení koncentrace timentinu (3 500 mg.l⁻¹) po dobu 30 minut. Poté byly listové disky i stonkové segmenty přesazeny na čerstvé MS médium s různými koncentracemi antibiotik. V případě listových disků se osvědčila výchozí kombinace augmentinu v koncentraci 500 mg.l⁻¹ a timentinu 1 000 mg.l⁻¹, u stonkových segmentů byla vhodná zvýšená koncentrace augmentinu (1 000 mg.l⁻¹) v kombinaci s 1 000 mg.l⁻¹ timentinu. Tyto výsledky korespondují s pracemi CONFALONIERIHO, BALESTRAZZIHO a BISOFFIHO (1994) a WANGA, TUSKANA a TSCHAPLINSKEHO (1994), kteří získali nejlepší výsledky po ponoření výchozího rostlinného materiálu do bakteriální suspenze v časovém intervalu 20 minut až 4 hodin a poté provedli kokultivaci v délce od 24 do 72 hodin v tekutém nebo polotuhém regeneračním médiu obsahujícím fytohormony, jako 6-benzylaminopurin (BAP), 2,4-dichlorofenoxyoctovou kyselinu (2,4 D), α -naftyloctovou kyselinu (NAA) nebo thidiazuron (TDZ). Naopak někteří autoři dosáhli vyšší frekvence transformace při počáteční kultivaci explantátů v délce 2 až 14 dnů na médiu bez selekční látky a následně přenesení transformantů na selekční médium (CHAREST, STEWART, BUDICKY 1992, WANG, TUSKAN, TSCHAPLINSKI 1994, DINUS, STEPHENS, CHANG 1995, TUOMINEN et al. 1995). Zvýšení frekvence úspěšnosti transformace uvádějí DE BLOCK (1990), LEPLÉ et al. (1992), CONFALONIERI, BALESTRAZZI, BISOFFI (1994), SCHWARTZEN-



Obr. 1.
Regenerace výhonů z listových disků hybridní osiky s konstruktem *A. tumefaciens* 149
Shoot regeneration of leaf disc of hybrid aspen transformed by *A. tumefaciens* construct no. 149



Obr. 2.
Regenerace listových disků hybridní osiky s konstruktem *A. tumefaciens* 151
Regeneration of leaf discs of hybrid aspen transformed by *A. tumefaciens* construct no. 151

BERG et al. (1994), TSAI, PODILA, CHIANG (1994), CONFALONIERI et al. (1995) při přenosu explantátů na světlo po dekontaminaci pomocí cefotaximu ($250 - 500 \text{ mg.l}^{-1}$) a/nebo karbenicilinu ($250 - 500 \text{ mg.l}^{-1}$), dále v případě prodloužení doby infekce bakteriemi rodu *Agrobacterium* či v případě kultivace výchozího rostlinného materiálu před vlastním transformačním procesem na indukčním médiu s obsahem BAP, 2,4-D, NAA nebo TDZ.

V našich experimentech byly listové disky i stonkové segmenty kultivovány při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a 24hodinové světelné periodě. Každých sedm dní byly přesázeny na čerstvé médium, ve kterém se postupně snižovala koncentrace antibiotik [timentin $1\ 000 - 0 \text{ mg.l}^{-1}$, augmentin $500 (1\ 000) - 0 \text{ mg.l}^{-1}$] a zároveň se zvyšovala koncentrace selekčního agens - antibiotika kanamycinu (z 0 na 100 mg.l^{-1}). Jako nejúčinnější antibiotikum při transformačních pokusech byl vyhodnocen timentin nebo použití kombinace antibiotik timentinu a augmentinu. LING et al. (1998) také vyhodnotili timentin v porovnání s karbenicilinem a cefotaximem jako nejvýhodnější z ekonomického hlediska i z hlediska vlivu na regeneraci transformovaných rostlin a na supresi bakteriální infekce. Timentin jako antibiotikum s nejvyšší účinností proti bakteriální infekci při transformaci *Picea glauca* vyhodnotili i LE et al. (2001).

Výběr vhodného selekčního systému je další podmínkou úspěšné transformace. Pro rod *Populus* byly použity jako selekční markerové geny HPT (rezistence k hygromycinu), NPTII (rezistence ke kanamycinu), bar (rezistence k glufosinátu) a *crs1*⁻¹ (rezistence k chlorsulfuronu). Nejčastěji používaný selekční systém je v případě transformací u rodu *Populus* založen na využití antibiotika kanamycinu. Kanamycin již v koncentraci 10 mg.l^{-1} inhiboval regeneraci u explantátových kultur netransformovaných hybridů topolů (*P. alba* x *P. grandidentata*) (CHUNG et al. 1989). CSEKE et al. (2007) porovnávali účinnost selekčních systémů HPT (rezistence k hygromycinu) a NPTII (rezistence ke kanamycinu) při transformaci klíčnicích rostlin *Populus tremuloides* pomocí *A. tumefaciens*. Při inokulaci klíčnicích rostlin konstrukty s NPTII se tvořilo větší množství zelených kalusů

a regenerovalo až 34 % výhonů, ale schopnost kořenit na selekčním médiu byla pozorována pouze u 50 % transformovaných výhonů, u konstruktů s HPT regenerovalo pouze 20 % výhonů, ale následně všechny transformované výhony kořenily na selekčním médiu.

U pokusů s listovými disky hybridní osiky prováděných v naší laboratoři se vícevrcholové kultury o 20 – 40 výhonech vytvořily po čtvrté a páté pasáži (obr. 1, 2). U stonkových segmentů se vícevrcholové kultury o 2 – 10 výhonech začaly vytvářet po 3 – 4 pasážích (obr. 3, 4). Procentické zastoupení regenerace u listových disků i stonkových segmentů v závislosti na použitém bakteriálním konstruktu udává tabulka 2, ve které je též uvedeno procentické zastoupení rostoucích transgenních rostlin osiky z listových segmentů při dlouhodobé kultivaci.

V průběhu dlouhodobé kultivace docházelo k postupnému snížení exprese markerového genu u transformovaných kultur, což mohlo mít dva hlavní důvody. Prvním důvodem mohly být molekulární změny na T-DNA integrované do rostlinného genomu, jako jsou methylace, spontánní bodové mutace, chromozomální aberace zasahující oblasti s integrovanou T-DNA, apod. Druhým důvodem mohl být v případě hybridní osiky chimérismus vzniklých výhonů, v tomto případě tedy skutečnost, že výhony byly složeny z transformovaných i netransformovaných buněk. Při multiplikaci tedy může vzniknout výhon obsahující převážně či pouze netransformované buňky. Protože při pozdějších pasážích už nebyla na čerstvé médium přenášena celá kultura, mohlo dojít k náhodné eliminaci transformovaných sektorů.

Počty transgenních kultur hybridní osiky, z nichž každá byla získána regenerací z jednoho výchozího listového disku a následným pasážováním, se po dlouhodobé kultivaci pro jednotlivé použité konstrukty výrazně lišily. Vzhledem k tomu, že pro transformaci byly použity rostliny jednoho klonu (rostliny geneticky shodné), byly pozorované rozdíly způsobeny rozdílnou účinností transformace různými konstrukty.

Tab. 2.

Regenerace výhonů hybridní osiky v závislosti na použitém typu explantátů a bakteriálním konstrukturu
Regeneration of hybrid aspen shoots in dependence on explant type and bacterial construct

Použitý konstrukt <i>A. t.</i> / Used construct	Regenerace u listových disků po 5. pasáži/ Regeneration of leaf discs after the 5th passage [%]	Regenerace po dlouhodobé kultivaci u listových segmentů/ Regeneration after long-term cultivation of leaf segments [%]	Regenerace u stonkových segmentů po 3. pasáži/ Regeneration of stem segments after the 3rd passage [%]
148	47	27	68
149	32	5	26
150	30	4	45
151	52	23	50
Kontrola/Control	1,5	0	0



Obr. 3.

Regenerace stonkových segmentů hybridní osiky s konstrukturu *A. tumefaciens* 148

Regeneration of stem segment of hybrid aspen transformed by *A. tumefaciens* construct no. 148



Obr. 4.

Regenerace stonkových segmentů hybridní osiky s konstrukturu *A. tumefaciens* 151

Regeneration of stem segment of hybrid aspen transformed by *A. tumefaciens* construct no. 151

Účinnost transformace je podmíněna také použitým kmenem bakterií *Agrobacterium*, obecně se projevuje vyšší účinnost u nopalínových typů v porovnání s oktopinovými typy *A. tumefaciens*. Většina transgenních rostlin rodu *Populus* byla získána pomocí nopalínového typu *Agrobacterium* (HAN, GORDON, STRAUSS 1996). Nejvyšší transformační účinnost projevily kmeny *A. tumefaciens* C58, A281, EHA101 a LBA4404, které lze obecně označit jako nejvhodnější pro transformaci většiny druhů rodu *Populus* (DE BLOCK 1990, BRASILEIRO et al. 1991, 1992, KLOPFENSTEIN et al. 1991, 1993, 1997, LEPLÉ et al. 1992, 1995, NILSSON et al. 1992, CONFALONIERI, BALESTRAZZI, BISOFFI 1994, HOWE, GOLDFARB, STRAUSS 1994, KAJITA et al. 1994, SCHWARTZENBERG et al. 1994, TUOMINEN et al. 1995, EBINUMA et al. 1992). V našich pokusech byl použit kmen *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 a jako nejúčinnější ve vztahu k počtu získaných kultur se jevíly konstrukty 148 (35S) a 151 (rbcS) (viz tab. 1). Stejně konstrukty se ukázaly jako nejúčinnější i u stonkových segmentů hybridní osiky a regenerační schopnost explantátů se v tomto případě zdála být vyšší.

Pro hodnocení úspěšnosti genetické transformace lze využít mnoho metod. Růst transformované rostliny na půdě obsahující selekční látku (např. kanamycin) je možné považovat za předběžné potvrzení, že došlo ke vnesení požadovaného genu. Pro detekci transformovaných jedinců se využívá např. fluorimetrická metoda pro stanovení aktivity enzymu GUS (JEFFERSON 1987). Prokázání GUS aktivity je možné i histochemickou GUS analýzou (VITHA et al. 1999). Nejvyšší výpovědní hodnotu ale mají detekční metody založené na DNA/DNA hybridizaci a analýzách DNA. Fyzickou přítomnost transgenů a jejich počet kopií v rostlinném genomu je možné ověřovat např. Southernovou hybridizací nebo technikami PCR. Jako příklad užívaných molekulárních metod pro detekci transgenů u rodu *Populus* lze uvést RFLP, RAPD, AFLP, STS a mikrosatelity (CONFALONIERI et al. 2003).

V našich pokusech byl jako reportérový gen pro transformaci hybridní osiky použit GUS gen. Aktivita jím kódovaného enzymu β -glukuronidázy byla zjišťována v kulturách hybridní osiky transformované vektory nesoucími konstrukty s geny GUS a NPTII

a promotory 35S (148) a rbcS (151) pomocí fluorimetrické metody podle modifikace VITHA et al. (1991). Nejvyšší exprese genu GUS byla zjištěna v transformovaných explantátech, modifikovaných vektorem, v nichž je příslušný gen pod kontrolou vysoce účinného promotoru 35S. V explantátových kulturách s rbcS (151) bylo nalezeno nejvíce GUS-aktivních výhonů, ale maximální hodnota stanovení GUS-aktivity byla výrazně nižší než u explantátů s 35S promotorem (148). Variabilita GUS-aktivity u netransformovaných kontrol je tvořena vždy více než z 50 % rozdíly mezi jednotlivými výhony, z menší části pak rozdíly mezi jednotlivými kulturami. U transformovaných osik je tento poměr obrácený, což znamená, že jsou si z hlediska exprese transgenů podobnější výhony z jedné kultury než kultury transformované stejným vektorem mezi sebou. To svědčí o různé účinnosti přenosu konstruktů do jednotlivých buněk výchozího rostlinného materiálu.

Pomocí metody PCR byla u kultur hybridní osiky transformované vektorem nesoucím konstrukt s genem GUS a NPTII a promotor 35S (148) prokázána přítomnost transgenů GUS.

ZÁVĚR

Standardizace regeneračního systému, metod přenosu modelových genů a zjištění vhodných promotorů k zabezpečení spolehlivé exprese vložených transgenů jsou předpokladem pro další výzkum, který naváže na dosažené výsledky a umožní cílené zavádění žádaných vlastností do genomu studovaných dřevin. Dosažené výsledky budou dále použity ve výzkumu možnosti přenosu konkrétních genů s požadovanými vlastnostmi, jako je např. zvýšení fytoředičních schopností.

Užití geneticky modifikovaných dřevin v blízké budoucnosti výrazně přispěje ke snižování zátěže životního prostředí, ať již jde o navození rezistence vůči patogenům a pesticidům, o zkvalitnění technologických vlastností stromů (snížení stupně lignifikace, zlepšení kvality podílu a proporcionality užitečných částí), lepší využití živin a zvýšení produkčního indexu lesa, napomůže i při zdokonalení odstraňování toxických látek z prostředí (fytořediace). Aktuální stav, možné perspektivy a směry rozvoje genových manipulací u dřevin shrnuje řada přehledů, kde lze nalézt podrobnější informace o jednotlivých otázkách (JOUANIN et al. 1993, STOMP 1994, STRAUSS et al. 1995, DEAN et al. 1997, STRAUSS, KNOWE, JENKINS 1997, WHETTEN, MACKAY, SEDEROFF 1998, HERSCHBACH, KOPRIVA 2002, TANG, NEWTON 2003, GIRI, SHYAMKUMAR, ANJANEYULU 2004). U dřevin jsou již rozpracovány další progresivní techniky manipulace genomu, např. potlačení funkce genu a jeho produktů na základě kosuprese (DWIVEDI et al. 1994, BAUCHER et al. 1996). Jde zejména o práce zaměřené na zlepšení technologických vlastností dřeva, např. snížení lignifikace pletiv pro výrobu celulózy a papíru nebo změny zbarvení dřeva.

Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci projektu MŠMT č. 2B06187 a výzkumného záměru MZe č. 0002070202.

LITERATURA

- BAUCHER, M., CHABBERT, B., PILATE, G., VANDOORSSELAERE, J., TOLLIER, M. T., PETITCONIL, M., CORNU, D., MONTIES, B., VANMONTAGU, M., INZE, D., JOUANIN, L., BOERJAN, W.: Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol.*, 112, 1996, č. 4, s. 1479-1490.
- BRASILEIRO, A. C. M., LEPLE, J. C., MUZZIN, J., OUNNOUGH, D., MICHELM M. F., JOUANIN, L.: An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. *Plant Mol. Biol.*, 17, 1991, č. 3, s. 441-452.
- BRASILEIRO, A. C. M., TOURNEUR, C., LEPLÉ, J. C., COMBES, V., JOUANIN, L.: Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. *Transgenic Res.*, 1, 1992, s. 133-141.
- CONFALONIERI, M., BALESTRAZZI, A., BISOFFI, S.: Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 13, 1994, s. 256-261.
- CONFALONIERI, M., BALESTRAZZI, A., BISOFFI, S., CELLA, R.: Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation in several black poplar clones. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 43, 1995, s. 215-222.
- CONFALONIERI, M., BALESTRAZZI, A., BISOFFI, S., CARBONERA, D.: In vitro culture and genetic engineering of *Populus* ssp: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 72, 2003, s. 109-138.
- CSEKE, L. J., CSEKE, B. C., PODILA, G. K.: High efficiency poplar transformation. *Plant Cell Rep.*, 26, 2007, č. 9, s. 1529-1538.
- DINUS, R. J., STEPHENS, C. J., CHANG, S.: *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of eastern cottonwood (*Populus deltoides*). In: Proceedings of the international poplar symposium: Poplar biology and its implications for management and conservation, 1995 August 20 - 25, Seattle, WA, USA, University of Washington: 42. Abstrakt
- DE BLOCK, M.: Factors influencing the affecting *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiol.*, 93, 1990, s. 1110-1116.
- DEAN, J. F., LAFAYETTE, P. R., ERIKSSON, K. E., MERKLE, S. A.: Forest tree biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 57, 1997, s. 1-44.
- DWIVEDI, U. N., CAMPBELL, W. H., YU, J., DATLA, R. S., BUGOS, R. C., CHIANG, V. L., PODILA, G. K.: Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol. Biol.*, 26, 1994, č. 1, s. 61-71.
- EBINUMA, H., WABIKO, H., OHSHIMA, K., HATA, K., SANO, H.: The genetic engineering of poplar trees – A first practical application of a homology - based interaction (Matzke effect) for protection against the plant disease. In: Proceedings, 1992 Fifth international conference on biotechnology in the pulp and paper industry, Tokyo, Uni Publishers Co., LTD. 1992, s. 467-472.
- GIRI, C. C., SHYAMKUMAR, B., ANJANEYULU, C.: Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18, 2004, s. 115-135.

- HAN, K.-H., GORDON, M. P., STRAUSS, S. H.: Cellular and molecular biology of *Agrobacterium* - mediated transformation of plants and its application to genetic transformation of *Populus*. In: Stettler, R. F., Bradshaw, H. D., Jr., Heilman, P. E., Hinckley, T. M. (eds.): Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Ottawa, Ontario, Canada: NRC Research Press: Chapter 9, 1996, s. 221-222.
- HERSCHBACH, C., KOPRIVA, S.: Transgenic trees as tools in tree and plant physiology. *Trees*, 16, 2002, s. 250-261.
- HOWE, G. T., GOLDFARB, B., STRAUSS, S. H.: *Agrobacterium* - mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 36, 1994, s. 59-71.
- CHAREST, P. J., STEWART, D., BUDICKY, P. L.: Root induction in hybrid poplar by *Agrobacterium* genetic transformation. *Can. J. For. Res.*, 22, 1992, s. 1832-1837.
- CHUNG, K. H., PARK, Y. G., NOH, E. R., CHUN, Y. W.: Transformation of *Populus alba* x *P. glandulosa* by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Kor. Forest Soc.*, 78, 1989, s. 372-380.
- CHUN, Y. W.: Morphogenic potential of leaf, internode, and root explants from *Populus alba* x *P. grandidentata*. *Forest and Humanity*, 3, 1990, s. 31-44.
- JEFFERSON, R. A.: Assaying chimeric genes in plants. The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 1987, s. 378-405.
- JOACHIM, H. F.: Hybrid Aspen – schnellwuchsig, leitungsfähige und vielseitig eisentbare Baumarten. IFE-Berichte aus Forschung und Entwicklung, Institut für Forstwissenschaften Eberswalde, 1991.
- JOUANIN, L., BRASILIERO, A. C. M., LEPLÉ, J. C., PILATE, G., CORNU, D.: Genetic transformation: a short review of methods and their applications, result and perspectives for forest trees. *Ann. Sci. For.*, 50, 1993, s. 325-336.
- KAJITA, S., OSAKABE, K., KATAYAMA, Y., KAWAI, S., MATSUMOTO, Y., HATA, K., MOROHOSHI, N.: *Agrobacterium* - mediated transformation of poplar using a disarmed binary vector and the overexpression of a specific member of a family of a poplar peroxidase genes in transgenic poplar cell. *Plant Sci.*, 103, 1994, s. 231-239.
- KLOPFENSTEIN, N. B., SHI, N. Q., KERNAN, A., MCNABB, H. S., JR., HALL, R. B., HART, E. R., THORNBURG, R. W.: Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound - inducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. *Can. J. For. Res.*, 21, 1991, s. 1321-1328.
- KLOPFENSTEIN, N. B., MCNABB, H. S., JR., HART, E. R., HALL, R. B., HANNA, R. D., HEUCHELIN, S. A., ALLEN, K., SHI, N. Q., THORNBURG, R. W.: Transformation of *Populus* hybrid to study and improve pest resistance. *Silvae Genetica*, 42, 1993, s. 86-90.
- KLOPFENSTEIN, N. B., CHUN, Y. W., KIM, M.-S., AHUJA, M. R., DILLON, M. C., CARMAN, R. C., ESKEW, L. G.: Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of *Populus*. Gen. Tech. Rep. RM-GTR-297. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 1997, 326 s.
- KUBISIAK, T. L., MOHN, C. A., FURNIER, G. R., HACKETT, W. P., RIU, K.-Z.: Increasing the frequency of *Agrobacterium* mediated transformation of *Populus tremuloides*. In: Mohn, C. A. (ed.): Proceedings of the second Northern Forest Genetics Association conference, 1993, July 29 - 30, Roseville, MN, U.S.A., Dept. of Forest Resources, University of Minnesota, St. Paul, Northern Forest Genetics Association, 1993, s. 189-198.
- LE, V. Q., BELLES-ISLESS, J., DUSABENYAGASANI, M., TREMBLAY, F. M.: An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.*, 52, 2001, s. 2089-2095.
- LEPLÉ, J. C., BRASILIERO, A. C. M., MICHEL, M. F., DELMOTTE, F., JOUANIN, L.: Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep.*, 11, 1992, s. 137-141.
- LEPLÉ, J. C., BONADÉ-BITTINO, M., AUGUSTINO, S., PILATE, G., DUMANOIS LÊ TÂN, V., DELPLANQUE, A., CORNU, D., JOUANIN, L.: Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed.*, 1, 1995, s. 319-328.
- LING, H.-Q., KRISELEIT, D., GANAL, M. W.: Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium* - mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* MILL.). *Plant Cell Rep.*, 17, 1998, s. 843-847.
- MALÁ, J., MICHALOVÁ, M.: Transformace hybridní osiky (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) *Agrobacterium tumefaciens*. *Práce VÚLHM*, 78, 1993, s. 56-60.
- MOTTL, J., ŠTĚRBA, S.: Metodické pokyny pro pěstování osiky. Lesnický průvodce, 1998, č. 1. 92 s.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plants.*, 15, 1962, s. 473-479.
- NILSSON, O., ALDÉN, T., SITBON, F., LITTLE, C. H. A., CHALUPA, V., SANDBERG, G., OLSSON, O.: Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promotor-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. *Transgenic Res.*, 1, 1992, s. 209-220.
- PARSONS, T. J., SINKAR, V. P., STETTLER, R. F., NESTER, E. W., GORDON, M. P.: Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol.*, 4, 1986, s. 533-536.
- PHILLIPS, J. P., XING, T., GARTLAND, J. S., ELLIOT, M. C., GARTLAND, K. M. A.: Variation in b-glucuronidase activity in transgenic sugar beet roots. *Plant Growth Res.*, 11, 1992, s. 319-325.
- PYTHOUD, F., SINKAR, V. P., NESTER, E. W., GORDON, M. P.: Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. *Biotechnol.*, 5, 1987, s. 1323-1327.
- SCHWARTZENBERG, K., DOUMAS, P., JOUANIN, L., PILATE, G.: Enhancement of the endogenous cytokinin concentration in poplar by transformation with *Agrobacterium* T-DNA gene ipt. *Tree Physiol.*, 14, 1994, s. 27-35.
- STRAUSS, S. H., ROTTMANN, W. H., BRUNNER, A. M., SHEPPARD, L. A.: Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Mol. Breed.*, 1, 1995, s. 5-26.
- STRAUSS, S. H., KNOWE, S. A., JENKINS, J.: Benefits and risks of transgenic. *J. Forestry*, 95, 1997, č. 5, s. 12-19.
- STOMP, A. M.: Genetic strategies for enhancing phytoremediation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 721, 1994, s. 481-491.
- TANG, W., NEWTON, R. J.: Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Rep.*, 22, 2003, s. 1-15.
- TSAI, C.-J., PODILA, G. K., CHIANG, V. L.: *Agrobacterium* - mediated transformation of quaking aspen (*Populus tremuloides*) and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 14, 1994, s. 94-97.

- TUOMINEN, H., SITBON, F., JACOBSSON, C., SANDGERG G., OLSSON, O., SUNDBERG, B.: Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indolacetic acid – biosynthetic genes. *Plant Physiol.*, 109, 1995, s. 1179-1189.
- TUSKAN, G. A. et al.: The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (TORR & GRAY). *Science*, 313, 2006, č. 5793, s. 1596-1604.
- VITHA, S., BENEŠ, K., MICHALOVÁ, M., ONDŘEJ, M.: Methodical aspects of the detection of glucuronidase marker gene expression in plant tissues. *Progress in basic, applied and diagnostic histochemistry*. Czechosl. Soc. Histo-Cytochem., Olomouc 1991.
- VITHA, S., BENEŠ, K., PHILLIPS, J. P., GARTLAND, K. M. A.: Histochemical GUS analysis. *Methods in Molecular Biology 44: Agrobacterium Protocols*, 1999, s. 185-193.
- WANG, Y. C., TUSKAN, G. A., TSCHAPLINSKI, T. J.: *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation and regeneration of *Populus*. In: Michler, C. H. et al. (eds.): *Application of biotechnology to tree culture. Protection, and utilization, 1994 October 2 - 6*, Bloomington, MN, USA. Gen. Tech. Rep. NC-175. St. Paul, MN, USA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station: 22. Abstract.
- WHETTEN, R. W., MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R.: Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 1998, s. 585-609.

Transformation of hybrid aspen by means of *Agrobacterium tumefaciens*

Summary

Research aim of this work was to verify the possibility of genetic transformation of the hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) by a bacterial vector *Agrobacterium tumefaciens*. Stem segments and leaves discs of the hybrid aspen clone no. 5 from FGMRI Gene Bank were used for transformation experiments by the modified transformation method (MALÁ, MICHALOVÁ 1993) by means of *A. tumefaciens* LBA4404 using different gene constructs with four types of promoters:

148 – comprising the reporter gene GUS controlled by 35S promoter

149 – comprising the reporter gene GUS controlled by NOS (nopalinsynthase) promoter

150 – comprising the reporter gene GUS controlled by MAN (mannopinsynthase) promoter

151 – comprising the reporter gene GUS controlled by the *rbcS* (ribulosebiphosphate carboxylase) promoter

These constructs code for a resistance of transformants to kanamycin. Several factors should be considered to improve transformation efficiency such as *Agrobacterium* strain, selectable marker system, using a suitable antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation.

As controls for each construct 30-35 leaf discs or stem segments from aseptic cultures of the hybrid aspen and 10 other ones were used. Plant material was immersed into the suspension of *A. tumefaciens* in MS medium (108 ml⁻¹) and cultured in MS medium (1.0 mg.l⁻¹ BAP; 0.1 mg.l⁻¹ IBA). After two days the segments were transferred onto fresh medium with the same concentration of phytohormones, but with different contents of augmentin or timentin, and with kanamycin. The cultures were transferred onto media with gradually decreasing concentrations of augmentin and/or timentin, and increasing concentrations of kanamycin every seven days. Timentin showed to be of the highest efficiency for suppression of *A. tumefaciens*. The 148 (35S) and 151 (*rbcS*) constructs were proved as the most successful for the transfer of genetic information in a plant model system used.

Formation and growth of transformed adventitious shoots on kanamycin-containing media showed their possible resistance to kanamycin. Evaluation of transformants was performed by histochemical assay of GUS activity or by polymerase chain reaction (PCR) test. Histochemical assay was performed according to JEFFERSON (1987) in modification of VITHA et al. (1991). It could be concluded that the highest expression of gene GUS was in transformed shoots of hybrid aspen gene construct 148 (35S). PCR revealed the presence of a fragment of the GUS gene in the genomic DNA of the transformed aspen shoots by gene construct 148 (35S).

Recenzováno