

TRANSFORMACE SMRKU ZTEPILÉHO (*PICEA ABIES* (L.) KARST.)TRANSFORMATION OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST.)JANA MALÁ¹⁾ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ¹⁾ - HELENA CVRČKOVÁ¹⁾ - DANIELA PAVINGEROVÁ²⁾ - JOSEF VLASÁK²⁾¹⁾ Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady²⁾ Biologické centrum AV ČR, v. v. i., České Budějovice

ABSTRACT

Norway spruce is one of the most widespread tree species in Europe, where it plays an important role in forest ecosystems and has a broad economic use. Nevertheless, damage caused by bark beetles (*Scolytidae*) entails significant economic losses. The production of transgenic trees with increased insect resistance is one of the possibilities, which can solve this problem. The possibility of transformation of Norway spruce using modified *cry3A* (*TOX*) gene was verified and described in the article. The original vectors carrying *TOX* genes with increased expression in Norway spruce and increased specific toxicity in bark beetles were prepared for the transformation (VLASÁK et al. 2012). Stable transgenic embryogenic tissue was obtained by transformation by *Agrobacterium tumefaciens* with the selective *nptII* gene and with original constructed *TOX* gene. In all embryogenic cell lines well-growing in selective medium supplied by 100 mg.l⁻¹ kanamycin the stability of transgene integration was verified by Southern blot analysis. Stable transformed lines are stored in proliferative stage in the Forestry and Game Management Research Institute (FGMRI), Czech Republic under contained use conditions.

Klíčová slova: smrk ztepilý, somatická embryogeneze, transformace, *Agrobacterium tumefaciens*, modifikované *cry3A* geny

Key words: Norway spruce, somatic embryogenesis, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, modified *cry3A* genes

ÚVOD

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst) je naší nejproduktivnější a nejčastěji vysazovanou dřevinou. Jeho porosty jsou ale stále častěji masivně napadány několika druhy lýkožroutů, mnohdy až v kalamitním rozsahu (ZAHRADNÍK, KNÍŽEK 2000). Vyslechtění vhodných produktivních a rezistentních odrůd smrku lze dosáhnout v dohledné době pouze využitím metod genetického inženýrství, kterými lze získat kultivary smrku, produkující látky specificky toxické pro lýkožrouty. Jednou z možností je transformovat smrk *cry*-genem pocházejícím z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Tento gen řídí produkci toxického proteinu, který s velkou účinností a specifitou ničí žravý hmyz. Pro obratlovce a jiné živočichy je *cry*-protein naprosto neškodný, o čemž svědčí mnohaletá zkušenost s aplikací tunových množství bakteriálních spor v zemědělství (insekticidní preparáty jako Bathurin apod.). Pro hmyz, který nekonzumuje preparát, je také neškodný, protože kontaktní působení není žádné; u specifických *cry*-proteinů se dá vyloučit i toxicita na jiný žravý hmyz. Příímá aplikace insekticidních preparátů z *Bacillus thuringiensis* proti kůrovci je neúčinná, protože insekticid zůstává na povrchu rostlin a žír larev je pod kůrou (NOVOTNÝ, TURČÁNÍ 2000). Pomocí genetické transformace by bylo možné navodit produkci jedovatého proteinu přímo v lýku smrku. Stejný postup byl s úspěchem použit u mnoha kulturních plodin. V současné době jsou ve světě produkovány a konzumovány miliony tun kukuřice, sóji a jiných plodin transformovaných genem pro produkci *cry*-proteinu. Tyto plodiny vykazují vysokou resistenci k hmyzím škůdcům při za-

chování všech dalších užitných vlastností (MACRAE et al. 2005). Díky integrovanému *cry*-genu se ve velkém už pěstují i topoly odolné proti žravým mandelinkám a jejich plantáže nepředstavují větší ekologickou zátěž než jiné plantáže stromů pěstovaných na dřevo (LEPLÉ et al. 2000).

Takto transformované linie smrku ztepilého však nebyly dosud připraveny. Pro transformaci nelze použít známé *cry*-geny, protože ty jsou upraveny pro jiné cílové rostliny a jejich exprese v nahosemenné rostlině by byla pravděpodobně velmi slabá. Kromě toho se používají jen geny pro *cry*-proteiny působící na motýly a z brouků na mandelinky, jejichž účinnost na lýkožrouta je sporná. Navíc jsou všechny patentovány, takže by pozdější praktické využití výsledků výzkumu bylo problematické. Bylo tedy nutné provést a otestovat rozsáhlé úpravy sekvence *cry*-genu, jak z hlediska exprese ve smrku, tak pro zvýšení specifické toxicity na lýkožrouty (VLASÁK et al. 2012). Upravený *cry3A* (*TOX*) gen byl použit k transformaci embryonálního pletiva smrku ztepilého pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Jedná se o nejčastěji užívanou metodu transformace rostlin, která využívá přirozené schopnosti půdní bakterie *Agrobacterium* přenášet s velkou účinností část svého Ti plasmidu, tzv. „T-DNA“ omezenou „hranicemi“, do rostlinného genomu. Přenos je v zásadě trvalý a spočívá v integraci přenášeného úseku do náhodných míst genomu. Cílem práce bylo ověřit možnost transformace embryonálního pletiva smrku ztepilého modifikovaným *cry*-genem toxickým pro kůrovcovité.

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinný materiál a transformační proces

Embryogenní buněčné linie smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) byly odvozeny ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (MALÁ 1991; MALÁ et al. 1995). Embryogenní pletiva byla kultivována na proliferačním modifikovaném E médiu (GUPTA, DURZAN 1986) doplněném o 0,2 mg.l⁻¹ BAP, 1 mg.l⁻¹ 2,4-D, 0,5 mg.l⁻¹ kinetinu, 400 mg.l⁻¹ glutaminu a hydrolyzátu kaseinu, 2 mg.l⁻¹ glycinu, 20 g.l⁻¹ sacharózy a 2 g.l⁻¹ gelritu. Kultury byly udržovány ve tmě při 23 °C. Pro transformaci smrku byla modifikována metoda transformace embryogenního pletiva podle KLIMASZEWSKÉ et al. (2001). Transformace embryogenních buněčných linií smrku ztepilého byla provedena pomocí kmenů *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 a EHA105, obsahujících binární vektory s *nptII* selektovatelným genem a zkonstruovanými syntetickými *cry3A* (*TOX*) geny (3811, 3812, 3813, 3814 a 3815) (tab. 1). Přes noc kultivovaná suspenzní kultura *A. tumefaciens* byla peletována centrifugací, suspendována v 10 mM MgSO₄ na optickou densitu OD_{600nm} 0,9, k čemuž byl přidán sterilní roztok acetosyringonu (AS) do výsledné koncentrace 50 mM AS. K 10 ml takto připravené suspenze bylo přidáno 500 mg embryogenního pletiva. Vše bylo kokultivováno 45 minut při teplotě 23 °C na třepačce (100 rpm), poté byla suspenze postupně přenesena po 2 ml na filtrační papír a odsáta pomocí Büchnerovy nálevky. Embryogenní pletivo bylo i s filtračním papírem kultivováno nejprve 2 dny na médiu E+AS (50 mM), pak 3 dny na médiu E + 300 mg.l⁻¹ timentinu a poté na selekčním médiu E + 200 mg.l⁻¹ cefotaximu + 25 mg.l⁻¹ kanamycinu.

Takto modifikovanou metodu transformace jsme použili pro vnesení připravených vektorů s *TOX* genem. Embryogenní pletivo rostoucí po transformaci na selekčním médiu bylo postupně přeneseno na médium s 25, 50 a 100 mg.l⁻¹ kanamycinu, s cílem dosáhnout v co nejkratší době homogenního transformovaného embryogenního ple-

tiva. U embryogenních linií proliferujících na nejvyšší koncentraci kanamycinu byla pomocí PCR provedena kontrola přítomnosti transgenů (obr. 1).

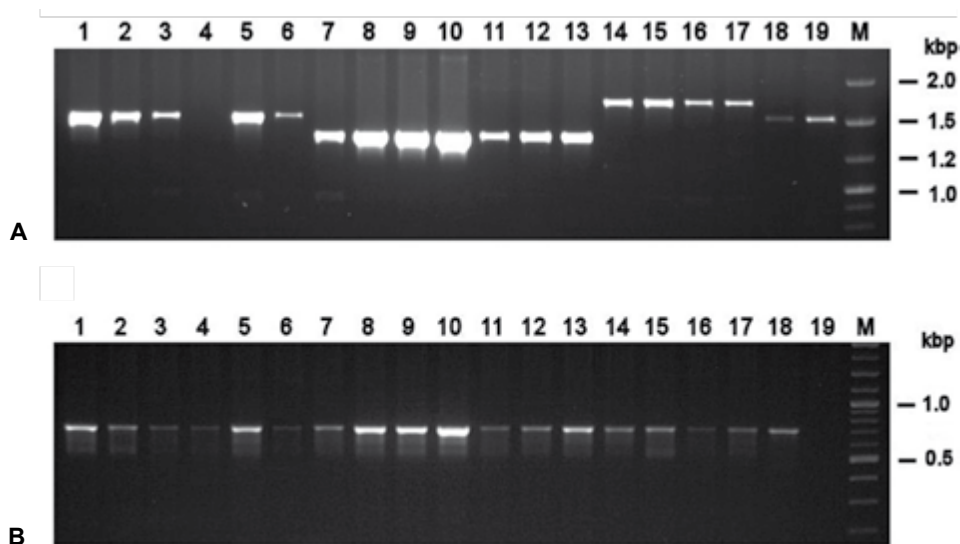
Detekce *nptII*, *TOX* a *VirA* genu v transgenních embryogenních pletivech

Přítomnost genu *nptII* byla v embryogenních pletivech rezistentních na kanamycin stanovována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Vzorčky DNA pro PCR byly připraveny s Extract-N-AmpTM rostlinným PCR kitem (Sigma - Aldrich, Seinhelm, Germany).

Tab. 1.

Transformace embryogenních linií smrku pomocí *Agrobacterium*
Transformation of embryogenic lines of Norway spruce by *Agrobacterium*

Linie/ Line	Vektor/Vector	Počet získaných transgenních embryogenních linií/Number of transformed embryogenic lines
S35	LBA4404(3811)	8
S35	LBA4404(3812)	9
S35	LBA4404(3813)	8
S35	LBA4404(3814)	9
S35	LBA4404(3815)	6
S35	EHA105(3811)	9
S35	EHA105(3812)	2
S35	EHA105(3813)	7
S35	EHA105(3814)	2
S35	EHA105(3815)	5
S116	LBA4404(3812)	5



Obr. 1.

Příklad PCR při ověřování přítomnosti *TOX* genů (A) a *nptII* genu (B) v transgenních embryogenních pletivech smrku. Vzorčky 1–5 = vektor 3811, 6 = vektor 3812, 7–13 = vektor 3813, 14–17 = vektor 3815, 18 a 19 = pozitivní kontrola (plazmid 3812 v koncentraci 10⁻⁵ a 10⁻⁶). Velikosti amplifikovaných fragmentů je pro vektory 3811 a 3812 1539 bp, pro vektor 3813 1362 bp a pro vektor 3815 1716 bp. Velikost fragmentu pro *nptII* je 699 bp.

Fig. 1.

An example of polymerase chain reaction (PCR) analyse for the detection of *TOX* genes (A) and *nptII* gene (B) in transformed embryogenic tissue of Norway spruce. Samples 1–5 = vector 3811, 6 = vector 3812, 7–13 = vector 3813, 14–17 = vector 3815, 18 and 19 = positive control (plasmid 3812 in concentration 10⁻⁵ and 10⁻⁶). The size of amplified fragments for vectors 3811 a 3812 = 1539 bp, vector 3813 = 1362 bp, vector 3815 = 1716 bp. The fragment size of *nptII* is 699 bp.

Pro amplifikaci genu *nptII* byly použity primery NPT1 5'-CGCAG-GTTCTCCGGCCGCTTG-3' a NPT2 5'-GAAGCGGTCAGCCCATT-CGCCG-3'. Amplifikovaný fragment měl velikost 699 bp. PCR reakce probíhala za následujících podmínek: vzorky byly zahřáty na 94 °C po dobu 4 min., následoval 35násobný cyklus – 94 °C po dobu 45 s, 55 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 2 min; konečný krok PCR reakce bylo zahřátí na 72 °C v délce 10 min, poté byly vzorky zchlazeny na 4 °C.

Postup pro detekci *TOX* genů je předmětem probíhajícího patentního řízení.

Nepřítomnost residuálních bakteriálních kontaminací byla ve všech testovaných embryogenních pletivech prokazována pomocí PCR reakce s primery pro *VirA* gen, který se nachází mimo T-DNA. Příprava vzorků DNA pro PCR a PCR reakce probíhaly za stejných podmínek jako pro detekci genu *nptII*. Použité primerové sekvence 5'-AATTCA-CCGACGCGGCAGGATTTTAAAGACAG-3' a 5'-AGCTTTGGTAC-GAGAGACTATTTTCGCGTAG-3' amplifikovaly DNA fragment o velikosti 1093 bp.

Southern blot analýza

Genomická DNA pro Southern blot analýzu byla získána z embryogenního pletiva rezistentního na kanamycin podle metody TAI, TANKSLEY (1991). Přibližně 15 mg DNA bylo štěpeno BamHI nebo XbaI restričními enzymy, přes noc rozpuštěno v 1% agarózovém gelu s TBE puřrem (SAMBROOK et al. 1989) a přeneseno na nylonovou membránu Hybond-N. Southernova hybridizace byla provedena dle metody CHURCH, GILBERT (1984). Membrány byly označeny sondami – fragmentem *nptII* genu a *TOX* genu. Sondy byly označeny [α -³²P] DCT P (3000 Ci.mmol⁻¹) pomocí kitu Rediprime™ II a membrány byly 5 hodin exponovány pro autoradiografii použitím Phosphorimager Typhoon systému (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Smrk ztepilý je obtížně transformovatelná dřevina a klasické metody transformace listových a stonkových explantátů u něj nefungují (ELLIS 1995). Somatická embryogeneze představuje účinný regenerační systém vhodný pro využití ve šlechtění lesních dřevin a především pro přípravu transgenních linií smrku ztepilého (KLIMASZEWSKA et al. 2005; CYR, KLIMASZEWSKA 2002). Pro účely transformace byly použity embryogenní kultury dvou linií smrku ztepilého (S35 a S116), uchovávané v proliferační fázi na pracovišti Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. Popsanou metodikou se podařilo získat celkem 70 transgenních embryogenních linií smrku dobře rostoucích na selekčním médiu, 5 od linie S116 a 65 od linie S35. Pro selekci transgenních buněk a likvidaci *Agrobacterium* jsou využívána selekční média. V předchozích experimentech bylo ověřeno, že postačující koncentrace kanamycinu pro selekci transformovaného embryogenního pletiva smrku je 25 mg.l⁻¹ a že koncentrace timentinu 400 mg.l⁻¹ a poté cefotaximu 200 mg.l⁻¹ spolehlivě zabíjí *Agrobacterium* v průběhu několika měsíců (MALÁ et al. 2009). Transgenní linie se podařilo získat od všech zkonstruovaných vektorů nesoucích originální syntetický *TOX* gen a jeho deleční mutanty (3811, 3812, 3813, 3814 a 3815), a to jak v plazmidu LBA4404, tak v plazmidu EHA105 (tab. 1). Tyto linie byly využity k dalšímu testování k potvrzení stabilní integrace transgenů. Přítomnost bakterií v embryogenním pletivu byla po 4 měsících vyloučena pomocí PCR reakce na přítomnost *VirA* genu. Na základě pozitivní PCR zkoušky na přítomnost *nptII* a *TOX* genů bylo 27 nejlépe rostoucích embryogenních linií postupně přesazeno na médium s vyšší koncentrací kanamycinu (50, 75 a 100 mg.l⁻¹) k odstranění případných netransgenních buněk. U všech embryogenních linií dobře

rostoucích na médiu s koncentrací 100 mg.l⁻¹ kanamycinu byla ověřena stabilní integrace transgenů pomocí Southern blot analýzy. Ze všech linií byla izolována DNA a byl proveden odhad počtu kopií T-DNA, resp. počtu levých a pravých hranic T-DNA, integrovaných do smrko-vého genomu. Příklad takové analýzy je uveden na obr. 2, ze kterého je patrné, že po *Agrobacterium* zprostředkovaném přenosu byla zaznamenána obvykle mnohačetná integrace vnášené T-DNA. Mnohačetná integrace může mít pozitivní vliv na sílu exprese vneseného genu. Pomocí Southernovy DNA-DNA hybridizace byla potvrzena stabilní integrace transgenů v genomu smrku. Stabilně transformované linie jsou za podmínek uzavřeného nakládání uchovávány v proliferační fázi ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (obr. 3).

ZÁVĚR

Podařila se stabilní transformace embryogenního pletiva smrku ztepilého originálně zkonstruovanými vektory nesoucími syntetický *TOX* gen a jeho deleční mutanty. Transformované kultury jsou uchovávány v režimu uzavřeného nakládání s GMO.

Výšlechtění vhodných produktivních a rezistentních odrůd dřevin lze dosáhnout v dohledné době pouze využitím biotechnologických přístupů, které umožňují rychlé klonové množení vyselektovaných genotypů, překonání fyziologických bariér (např. dlouhověkost, prodlužující se mnohaleté intervaly mezi semennými roky nebo pozdní nástup reprodukce) a vytváření produktivnějších a odolnějších transgenních druhů metodami genetického inženýrství.

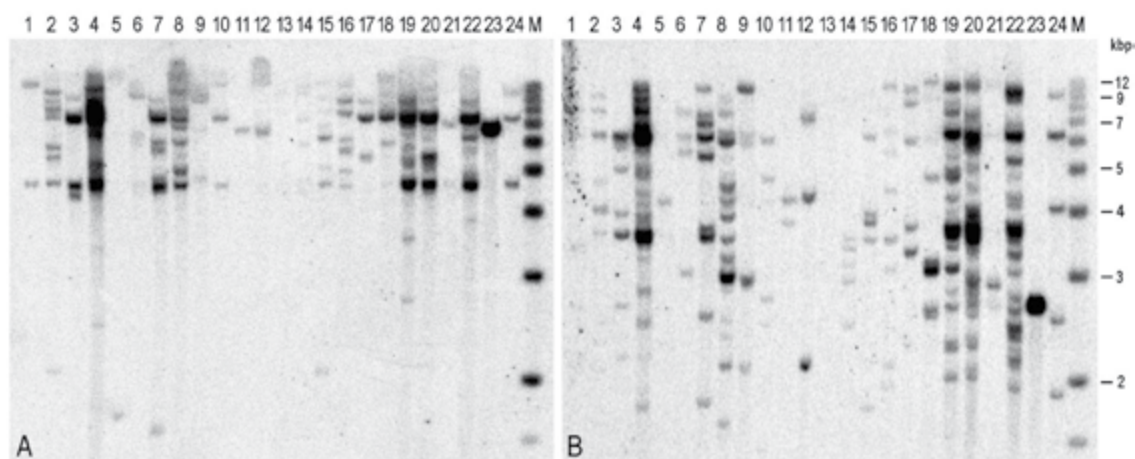
Užití geneticky modifikovaných dřevin může v budoucnosti výrazně přispět ke snížení zátěže životního prostředí, ať již jde o navození rezistence vůči patogenům či v důsledku zkvalitnění technologických vlastností stromů (snížení stupně lignifikace, zlepšení kvality podílu a proporcionality užitečných částí), lepšího využití živin nebo zvýšení produkčního indexu lesa. Může přispět i ke zdokonalení odstraňování toxických látek z prostředí (fytoremediace). Při využívání těchto moderních biotechnologií je však třeba dodržovat pravidla bezpečného zacházení, daná mezinárodními předpisy a doporučeními.

Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci řešení projektu LD 13008, podpory poskytnuté Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v programu COST.

LITERATURA

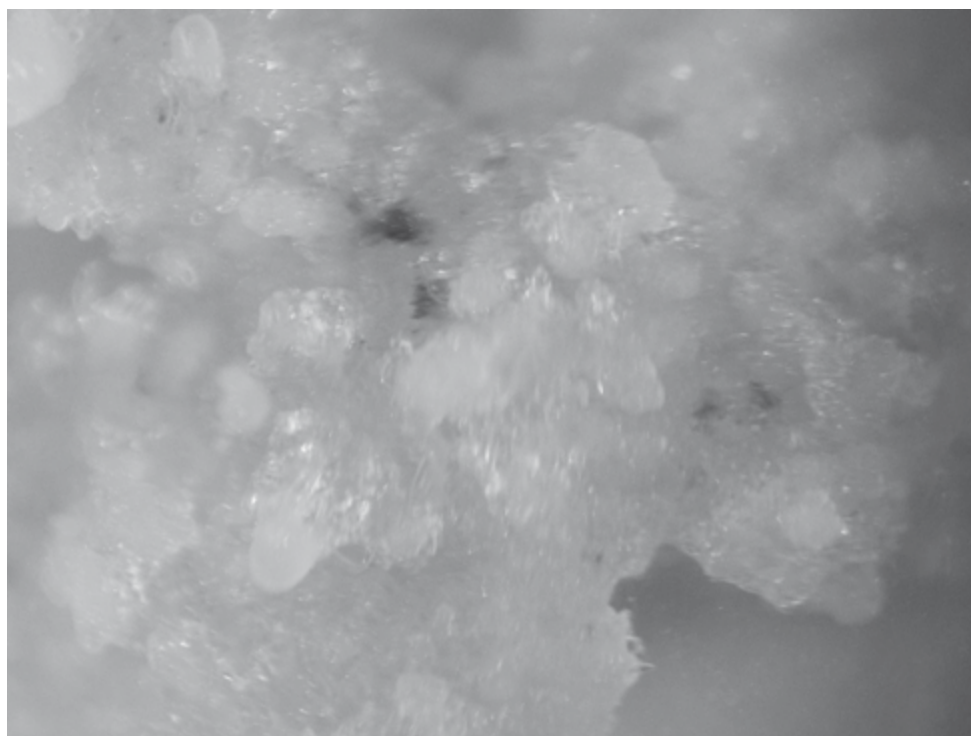
- CYR D.R., KLIMASZEWSKA K. 2002. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. *Dendrobiology*, 48: 41–49.
- ELLIS D.D. 1995. Transformation of gymnosperms. In: Jain S.M. et al. (eds.): *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher: 227–249.
- GUPTA P.K., DURZAN D.J. 1986. Somatic polyembryogenesis from cyclus of mature sugar pine embryo. *Bio/Technik*, 4: 643–645.
- CHURCH G.M., GILBERT W. 1984. Genomic sequencing, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81: 1991–1995.
- KLIMASZEWSKA K., LACHANCE D., PELLETIER G., LELU M.A., SÉGUIN A. 2001. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryonic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37: 748–755.
- KLIMASZEWSKA K., RUTLEDGE R.G., SÉGUIN A. 2005. Genetic transformation of conifers utilizing somatic embryogenesis. In: Peña L. (ed.): *Methods in molecular biology*. Totowa, Humana Press: 151–164.

**Obr. 2.**

Příklad analýzy transgenního embryogenního pletiva (EM) pomocí Southernovy hybridizace. Izolovaná DNA byla štěpena BamHI (panel A) nebo XbaI (panel B) a hybridizována se sondou odvozenou od genu *nptIII* (panel A) nebo genu *TOX* (panel B). Takovéto uspořádání znamená, že na panelu A je možné analyzovat počet pravých hranic vnášené T-DNA a genu *nptIII*, zatímco na panelu B počet levých hranic, resp. genu *TOX*. Dráhy 1–7, DNA z EM transformované vektorem 3813 nesoucím delecii v oblasti 3' konce *TOX*; dráhy 8–18, DNA z EM transformované vektorem 3814 nesoucím delecii v oblasti jak 5', tak 3' konce *TOX*; dráhy 19–24, DNA z EM transformované vektorem 3815 nesoucím delecii v oblasti 5' konce a duplikaci u 3' konce *TOX*; M, DNA velikostní standard (1 kb DNA Ladder, Gibco BRL)

Fig. 2.

An example of transgenic embryogenic tissue analyse by Southern hybridization. Isolated DNA was digested by BamHI (panel A) or XbaI (panel B) and hybridized with probe derived from gene *nptIII* (panel A) or gene *TOX* (panel B). On the panel A it is possible to analyse number of right boards of insert T-DNA and gene *nptIII*, on the panel B it is possible to analyse the number of left boards or gene *TOX*. The lines 1–7, DNA from transformed embryogenetic tissue by vector 3813 with deletion in the part of 3' end of *TOX*; the lines 8–18, DNA from transformed embryogenetic tissue by vector 3814 with deletion in the part of 5' end and 3' end of *TOX*; the lines 19–24, DNA from transformed embryogenetic tissue by vector 3815 with deletion in the part of 5' end and duplication at 3' end of *TOX*; line M, identifies the molecular weight markers (1 kb DNA Ladder, Gibco BRL)

**Obr. 3.**

Transformované embryogenní linie smrku ztepilého

Fig. 3.

Transformed embryogenic lines of Norway spruce

- LEPLÉ J.C., PILATE G., JOUANIN L. 2000. Transgenic poplar trees (*Populus* species). In: Bajaj Y.P.S. (ed.): Transgenic trees. Berlin, Springer: 221–244.
- MALÁ J. 1991. Organogenesis and somatic embryogenesis in spruce. *Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca*, 17: 16–23.
- MALÁ J., DUJÍČKOVÁ M., KÁLAL J. 1995. The development of encapsulated somatic embryo of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae*, 18: 59–73.
- MALÁ J., PAVINGEROVÁ D., CVRČKOVÁ H., BŘÍZA J., DOSTÁL J., ŠÍMA P. 2009. Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) embryogenic tissue tolerance to penicilin, carbapenem and aminoglycoside antibiotics. *Journal of Forest Science*, 55: 156–161.
- MACRAE T.C., BAUR M.E., BOETHEL D.J., FITZPATRICK B.J., GAO A.G., GAMUNDI J.C., HARRISON L.A., KABUYE V.T., MC PHERSON R.M., MIKLOS J.A., PARADISE M.S., TOEDEBUSCH A.S., VIEGAS A. 2005. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* gene for control of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology*, 98: 577–587.
- NOVOTNÝ J., TURČÁNI M. 2000. Výsledky experimentálnej aplikácie biopreparátu na báze *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* BERL. proti lykožrútovi smrekovému *Ips typographus* L. (Col. Scolytidae). *Lesnícky časopis*, 46: 303–310.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATES T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 3 v.
- TAI T.H., TANKSLEY S.D. 1991. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Report*, 8: 297–303.
- VLASÁK J., BŘÍZA J., PAVINGEROVÁ D., MODLINGER R., KNÍŽEK M., MALÁ J. 2012. Cry 3A σ -endotoxin gene mutagenized for enhanced toxicity to spruce bark beetle in a receptor binding loop. *African Journal of Biotechnology*, 11: 15236–15240.
- ZAHRADNÍK P., KNÍŽEK M. 2000. Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L.). *Lesnická práce*, 79: 8 s. (příloha).

TRANSFORMATION OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST.)

SUMMARY

Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) is the most productive and the most commonly planted tree species in the Czech Republic. Spruce stands are still more heavily infested by several species of bark beetle, sometimes to the calamity extent (ZAHRADNÍK, KNÍŽEK 2000).

The possibility of cultivation of resistant clones to spruce bark beetle by means of genetic engineering, and transformation of Norway spruce using modified *cry3A* (*TOX*) gene was verified. The original vectors carrying *TOX* genes with increased expression in Norway spruce and increased specific toxicity in bark beetles (*Scolytidae*) were prepared for the transformation (VLASÁK et al. 2012). Norway spruce embryogenic cell lines were grown in the Forestry and Game Management Research Institute (FGMRI), Strnady, Czech Republic (MALÁ 1991; MALÁ et al. 1995).

Embryogenic tissues were cultured in the modified E proliferation medium (GUPTA, DURZAN 1986) supplemented with 0.2 mg.l⁻¹ BAP, 1 mg⁻¹ 2,4-D, 0.5 mg.l⁻¹ kinetin, 400 mg.l⁻¹ glutamine and casein hydrolysate, 2 mg.l⁻¹ glycine, 20 g.l⁻¹ of sucrose and 2 g.l⁻¹ gelrit (E medium). Cultures were maintained in the dark at 23°C. The modified method of embryogenic tissue transformation according to KLIMASZEWSKA (2001) was used for spruce transformation.

Transformation of Norway spruce embryogenic cell lines was performed using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 and LBA4404 containing binary vectors with selectable *nptII* gene and engineered synthetic *cry3A* (*TOX*) genes (3811, 3812, 3813, 3814 and 3815). Transgenic cell lines were obtained from all constructed vectors carrying the original synthetic *TOX* gene and its deletion mutants (Tab. 1). Kanamycin – resistant embryogenic tissues were screened for the presence of *nptII* gene by polymerase chain reaction (PCR). The absence of residual bacterial contaminants was demonstrated in all tested embryogenic tissues by PCR using primers for *VirA* gene, located outside of the T-DNA (Fig. 1). In all embryogenic cell lines well-growing in selective medium supplied by 100 mg.l⁻¹ kanamycin the stability of transgene integration was verified by Southern blot analysis (Fig. 2). Stable transformed embryogenic lines are stored in proliferative stage under contained use conditions in the FGMRI (Fig. 3).

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

RNDr. Jana Malá, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Česká Republika
tel.: +420 257 892 257; e-mail: mala@vulhm.cz