

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA ZÁHRADNÍCTVA A KRAJINNÉHO INŽINIERSTVA

**Využitie genetickej transformácie na
zlepšenie tolerancie rastlín voči suchu**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae
doctor
vo vednom odbore: 41-42-9 Záhradníctvo

Ing. Jozef Gubiš

Nitra, 2008

Dizertačná práca bola vypracovaná v externej forme doktorandského štúdia na Katedre ekológie, Fakulta európskych štúdií a regionálneho rozvoja SPU v Nitre.

Doktorand: **Ing. Jozef Gubiš**
Katedra ekológie
Fakulta európskych štúdií a regionálneho
rozvoja
Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: **prof. RNDr. Zuzana Jureková, CSc.**
Katedra ekológie
Fakulta európskych štúdií a regionálneho
rozvoja
Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre

Oponenti: **prof. Ing. Štefan HRAŠKA, DrSc.**
Katedra botaniky a genetiky
Fakulta prírodných vied
Univerzita Konštantína filozofa v Nitre

prof. RNDr. Zdenka GÁLOVÁ, CSc.
Katedra biochémie a biotechnológie
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre

doc. RNDr. Anna PREŤOVÁ, DrSc.
Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV
v Nitre

Autoreferát bol odoslaný
dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra ekológie, Fakulta európskych štúdií a regionálneho rozvoja, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa 29.09.2008 o 11:00 h pred komisiou pre obhajobu dizertačných práce vedného odboru 41-42-9 Záhradníctvo na Fakulte záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Miesto konania: Fakulta európskych štúdií a
regionálneho rozvoja
Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre

Mariánska 10, 949 76 Nitra
Miestnosť: zasadačka dekanátu FEŠRR
S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte
Fakulty záhradníctva a krajinného inžinierstva.
Predseda komisie pre obhajoby vo vednom odbore 41-42-9

prof. Ing. Anna Jakábová,
CSc.
Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zefektívniť a optimalizovať regeneračný systém pre adventívnu organogézu rajčiaka jedlého, vypracovanie protokolu pre genetickú transformáciu rajčiaka a tabaku pomocou *Agrobacterium tumefaciens* za účelom zvýšenia tolerancie voči suchu a fyziologické hodnotenie transgénnych rastlín v stresových podmienkach. Optimalizácia regeneračného systému rajčiaka prebiehala prostredníctvom sledovania vplyvu rôznych modifikácií zložiek živného média alebo kultivačných podmienok, s cieľom získať maximálny možný počet výhonkov na explantát. V experimentoch boli používané kličnolistové, hypokotylové, epikotylové, internodálne, petiolové a listové explantáty rajčiaka izolované z 8-dňových asepticky kultivovaných rastlín, pričom vyššia regeneračná schopnosť bola zistená pri kličnolistových explantátoch. Najvhodnejšie médium pre regeneráciu výhonkov bolo MS médium s prídavkom 1 mg.dm^{-3} *trans*-zeatínu a $0,1 \text{ mg.dm}^{-3}$ IAA. Na genetickú transformáciu tabaku (ako modelovej plodiny) a rajčiaka bol použitý plazmid pBI-P5CSF129A, nesúci gén kódujúci kľúčový enzým biosyntézy prolínu (Δ^1 -pyrolín-5-karboxylát syntetázu, P5CS) a *nptII* markérový gén, ktoré boli najskôr vnesené do *A. tumefaciens* (kmeň LBA 4404). Transformácia prebiehala kokultiváciou explantátov, listových diskov pri tabaku a kličnolistových explantátov pri rajčiaku, so suspenziou *A. tumefaciens*. Explantáty regenerovali na živných médiách s prídavkom antibiotík na elimináciu *A. tumefaciens* (karbenicilín, cefotaxím) a kanamycínu ako selekčného antibiotika (100 mg.dm^{-3} pre tabak alebo 80 mg.dm^{-3} pre rajčiak). Pri rajčiaku bolo získaných iba 7 putatívnych transformantov. Bolo získaných 20 transformovaných rastlín tabaku, u ktorých sa overila prítomnosť vnesených génov metódou PCR a ktoré sa aklimatizovali na podmienky *ex vitro*. V transgénnych a kontrolných (wild-type) rastlinách tabaku sa porovnávali fyziologické reakcie na stres suchom. Transgénne rastliny tabaku akumulovali vysoké hladiny voľného prolínu. Presun suchej hmoty, ako aj zníženie obsahu chlorofylov sme nezaznamenali. Takisto sa v kontrolných ako aj stresových podmienkach nepozorovalo predčasné starnutie, listové nekrózy alebo morfológické zmeny (RWC poklesol o 7 – 8 %). Počas stresu suchom sa rastliny WT a transgénu navzájom odlišovali predovšetkým v rozdielnych hladinách voľných polyamínov putrescínu a spermidínu v horných listoch. Po rehydratácii bol pozorovaný u transgénnych ale aj WT rastlín v horných listových poschodiach pokles putrescínu, spermidínu a sperminu na hodnoty kontrolných rastlín bez stresu. WT a transgénne rastliny reagovali na stres vyvolaný vysokou teplotou odlišne na rozdiel od odpovedi na suchu. Transgénne rastliny so zvýšenou akumuláciou osmoprotektantov sa javili byť lepšie adaptované na stres vyvolaný suchom, sú teda perspektívne pre budúci výskum efektov stresu, ktoré majú kľúčovú úlohu vo funkčnej aktivite rastlín. Táto štúdia potvrdila, že gén *P5CSF129A* je vhodným kandidátom pre prípravu plodín s posilnenou toleranciou na stres vyvolaný suchom.

Kľúčové slová: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana tabacum* L., *in vitro* kultúra, organogéza, rastové hormóny, transformácia, *Agrobacterium tumefaciens*, prolín

ABSTRACT

The aim of this work was to optimize regeneration system for adventitious organogenesis of tomato; to develop a protocol for genetic transformation of tomato and tobacco plants using *Agrobacterium tumefaciens*, to prepare plants with elevated drought tolerance and to compare the physiological response of transgenic and wild type plants in stress conditions. Optimization of the regenerative system for tomato was done by comparison of the impact of the culture medium components (plant hormones, sugars, vitamins) or the cultivation conditions with the aim to obtain maximum shoot number per explant. Cotyledonary, hypocotyle, epicotyle, internodal, petiolar and leaf tomato explants were isolated from 8-day-old aseptically cultured plants. The highest regeneration ability was detected in cotyledonous explants. MS medium with the addition of 1 mg dm⁻³ *trans*-zeatin and 0.1 mg dm⁻³ IAA was found as the most suitable one. Genetic transformation of both tobacco (as a model plant) and tomato plants was performed using plasmid pBI-P5CSF129A, carrying the gene for the key enzyme of proline biosynthesis (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS) and *nptII* marker gene, which were put into *A. tumefaciens* (LBA 4404 strain) prior to the transformation. The transformation was done by co-cultivation of explants, leaf discs and cotyledonary explants of tobacco and tomato, respectively, with the suspension of *A. tumefaciens*. The explants regenerated on the culture media with the addition of antibiotics for elimination of *A. tumefaciens* (carbenicilline, cefotaxime) and kanamycine as the selective antibiotic (100 mg dm⁻³ and 80 mg dm⁻³ for tobacco and tomato, respectively). Presence of *P5CS* and *nptII* genes in transformed plants was verified by PCR. Twenty transformed tobacco lines were acclimated for the *ex vitro* conditions. Seven putative transformants were obtained in tomato. Physiological responses to water stress were compared in transgenic and wild-type tobacco plants. Transgenic plants accumulated high levels of proline. Dry mass relocation and the reduction of chlorophyll content were not recorded. Precocious senescence, leaf necrosis or morphological changes were not detected as well. During the water stress, response of wild-type and transgenic plants differed, especially at the levels of free polyamines putrescine and spermidine in upper leaves. After rehydration, decrease in putrescine, spermidine and spermine content was observed in both transgenic and wild-type plants. Wild type and transgenic plants responded to heat stress in different way than to drought. Better adaptation of transgenic plants with elevated proline content to water stress seems to represent a promising perspective for future research on the acclimation of plants to the global climate warming. This study confirmed *P5CSF129A* to be a candidate gene in the crop engineering for enhanced water stress tolerance.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana tabacum* L., *in vitro* culture, organogenesis, growth hormones, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, proline

POUŽITÉ SKRATKY, SYMBOLY A ZNAČKY

ABA	kyselina abscisová
A.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
tumefacie ns	adenozíntrifosfatáza
ATP-áza	
BAP	6-benzylaminopurín
CaMV 35S	mozaikový vírus karfiolu pod kontrolou promótoru 35S
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DW	suchá hmotnosť
FW	čerstvá hmotnosť
GUS	beta-glukuronidáza
HSP	proteíny tvoriace sa pri tepelnom šoku
Chl a	chlorofyl a
Chl b	chlorofyl b
IAA	kyselina indolyl-3-octová
LB médium	médium Luria Broth
LEA	abudantné proteíny neskorej embryogenézy
MS	médium Murashige Skoog
NAA	kyselina α -naftyloctová
nptII	neomycíntransferáza
PCR	polymerázová reťazová reakcia
P5CS	Δ^1 -pyrolín-5-karboxylátsyntetáza
Put	putrescín
RAB	reagujúci (alebo citlivý) na ABA
RWC	relatívny obsah vody
Spd	spermidín
Spm	spermín
TDZ	tiazuron
WT	divý typ
X-GlcA	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukurónová kyselina
ZEA	trans-zeatín

OBSAH

ÚVOD	6
.....	
.....	
1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	7
.....	
1.1 Vodný stres a molekulárne reakcie rastlín	7
.....	

1.2	Metódy genetickej transformácie pri rastlinách	8
...		
2	CIEĽ PRÁCE	9
3	MATERIÁL A METODIKA	9
3.1	Charakteristika rastlinného materiálu	9
3.2	Regenerácia rastlín rajčiaka jedlého v <i>in vitro</i> podmienkach	9
3.3	Transformácia rastlín	10
3.4	Molekulárne a histologicko-chemické analýzy	11
3.5	Aklimatizácia rastlín na <i>ex vitro</i> podmienky	11
3.6	Navodenie stresových podmienok	11
3.7	Fyziologické hodnotenie transgénnych rastlín v stresových podmienkach	12
3.8	Štatistické analýzy	12
4	VÝSLEDKY PRÁCE	12
4.1	Regeneračné schopnosti rajčiaka jedlého v <i>in vitro</i> podmienkach	12
4.2	Transformácia rastlín a histologicko-chemické a molekulárne analýzy transformovaných rastlín	13
4.3	Charakteristika fyziologických odpovedí rastlín na podmienky stresu	13
5	ZÁVER	15

6	POUŽITÁ LITERATÚRA	16
7	PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU	18
8	OHLASY NA PUBLIKOVANÉ PRÁCE	21

ÚVOD

V súčasnosti sa venuje veľká pozornosť účinku faktorov vyvolávajúcich postupné otepľovanie a aridizáciu prostredia rastlín. Sucho je významným limitujúcim faktorom vonkajšieho prostredia, ktorý ovplyvňuje základné fyziologické procesy rastlín. Vyššie rastliny odpovedajú na rôzne druhy stresov využitím stratégií, ktoré zahŕňajú biochemické a fyziologické odpovede. Medzi tieto reakcie patrí zatváranie prieduchov, spomalenie rastu buniek a fotosyntézy a aktiváciu respirácie. Rastliny odpovedajú a adaptujú sa na deficit vody na bunkovej aj molekulárnej úrovni napr. akumuláciou osmolytov a špecifických proteínov sprostredkujúcich toleranciu na stres. Pochopenie mechanizmov, ktorými rastliny vnímajú a prenášajú signály o strese na spúšťanie adaptívnych odpovedí, je veľmi dôležité pre zvýšenie tolerancii rastlín na stres.

V nedávnej minulosti sa uskutočnili viaceré úspešné pokusy s cieľom vnieŕ gény zvyšujúce odolnosť rastlín proti stresu. Výsledné transgénne rastliny vykazovali zvýšenú toleranciu proti stresu spôsobeného suchom, zasolením, či vysokou teplotou. Informácie o fyziologických reakciách modifikovaných rastlín sú neúplné. Vzhľadom na aktuálnosť prebiehajúcich klimatických zmien a zlepšenie poznania odpovedí transgénnych rastlín na stresy, sme sa pokúsili transformovať listové disky modelových rastlín génom kódujúcim Δ^1 -pyrolín-5-karboxylátsyntetázou (P5CS), kľúčový enzým biosyntézy prolínu, ktorého zvýšená expresia vedie ku zlepšeniu tolerancie na sucho, a u vzniknutých transformovaných rastlín zhodnotiť ich odpovede na stres a schopnosť adaptácie.

Doktorandská dizertačná práca bola súčasťou riešenia vedeckého projektu VEGA č. 1/9675/02 „Modelovanie vodného režimu záhradných rastlín v podmienkach sucha“ riešeného v rokoch 2002–2004 a Výskumnej úlohy VaV „Ekologizácia a ekonomická racionalizácia primárnej rastlinnej produkcie“ 2003 SP 27/028 OD 01/028 OD 01/03/03/03 riešenej v rokoch 2003–2005.

1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1.1 Vodný stres a molekulárne reakcie rastlín

Rastliny reagujú na sucho fyziologickými zmenami. Vo fyziologických mechanizmoch tolerancie sa uplatňuje súbor génov, ktoré majú úlohu v niekoľkých možných cestách a sú regulované rôznymi extrémnymi faktormi (BRAY, 1997). Genetické zlepšenie tolerancie rastlín na sucho sa ukazuje ako významný problém poľnohospodárstva v budúcnosti. Potenciálni kandidáti génov, ktoré sú prakticky aplikovateľné v génovom inžinierstve tolerancie rastlín na sucho a zasolenie, boli rozdelené do 3 základných skupín (HAYASHI, MURATA, 1998):

- gény kódujúce všeobecne sa vyskytujúce proteíny (LEA, HSP, RAB proteíny, dehydríny, osmotín, a pod.),
- gény kódujúce proteíny, ktoré sú potrebné pre transport iónov a iónovú homeostázu (iónové kanály, kanály pre vodu, Ca²⁺ ATP-áza a pod.),
- gény kódujúce enzýmy, ktoré regulujú syntézu osmoticky aktívnych komponentov (enzýmy pre syntézu sorbitolu, pinitolu, glycínbetaínu, prolínu alebo kľúčové enzýmy CAM metabolizmu).

Niektoré primárne a sekundárne metabolické reakcie môžu byť ovplyvňované redukciami rastu, zatvorením prieduchov, prípadne môžu byť riadené priamo vodným stavom rastliny a pod. Okrem ABA sa tiež v bunkách akumulujú osmolity, ako sú prolín, kyselina asparágová a glutamánová, betaín, kvartérne amóniové soli, karbohydráty a cukry alkoholu (napr. D-pinitol, manitol) (CHAVES et al., 2003). Ich syntéza a akumulácia je súčasťou osmotického prispôsobenia (adjustácie) rastlín k nedostatku vody.

Akumulácia prolínu je takmer univerzálnou reakciou rastlín na vodný deficit, zatiaľ čo schopnosť akumulovať iné skupiny komponentov je viac menej druhovo špecifická. Prolín počas stresu môže plniť niekoľko funkcií: ako napr. osmotické prispôsobovanie (VOETBERG, SHARP, 1991), osmoprotekciu (KAVI KISHOR et al., 2005), antioxidačné pôsobenie a odstraňovanie voľných radikálov (SHARMA, DIETZ, 2006), ochrana makromolekúl pred denaturáciou (VANRENSBURG et al., 1993), regulácia cytozolickej kyslosti (SIVAKUMAR et al., 2000), ďalej plní prolín funkciu zásoby uhlíka a dusíka po pôsobení stresu (DÍAZ et al., 1999). Reguláciu

biosyntézy prolínu, degradáciu a transport vo vyšších rastlinách popísali KAVI KISHOR et al. (2005).

V rámci osmotického prispôsobenia rastlín k stresom zo sucha a zasolenia dochádza v rastlinách okrem akumulácie osmolytov aj k zmenám hladín polyamínov. Polyamíny, najmä putrescín, spermidín a spermin, sú polykationové zlúčeniny nízkej molekulárnej hmotnosti, vyskytujúce sa vo všetkých žijúcich organizmoch. Považujú sa za novú kategóriu regulátorov rastu rastliny, ktoré sú pravdepodobne zahrnuté v širokom spektre fyziologických procesov, ako sú embryogenéza, bunkové delenie, morfogénéza a vývin (LIU et al., 2006). Okrem toho sa zistilo, že sú integrálnou súčasťou odpovede rastliny na stres (ALCÁZAR et al., 2006). Napriek tomu, že význam polyamínov pri strese nie je úplne preštudovaný, urobil sa v tejto oblasti výrazný pokrok. Počas poslednej dekády sa klonovalo mnoho génov zahrnutých v metabolizme polyamínov a analyzovali sa profily ich expresie pri rôznych podmienkach stresu a rôznych vývojových štádiách (KAKKAR, SAWHNEY, 2002). Pre pochopenie funkcie polyamínov v tolerancii stresu je nutné vykonať molekulárne štúdie.

1.2 Metódy genetickej transformácie pri rastlinách

Génové inžinierstvo predstavuje najmodernejší spôsob šľachtenia kultúrnych rastlín. V porovnaní s klasickým šľachtením mu konkuruje v čase i nekonečnom a neobmedzenom množstve kombinácií génov a genotypov. V súčasnej dobe sa využívajú najmä gény zabezpečujúce toleranciu k herbicídum i rezistenciu k chorobám a škodcom, čo umožňuje znížiť zaťaženie prostredia chemickými látkami. Vzhľadom na neustále zvyšovanie teploty klímy, môžu v budúcnosti nadobudnúť význam i transgénne rastliny so zvýšenou rezistenciou na suchu, ale i ďalšie abiotické stresy.

V mnohých prácach na zlepšenie tolerancie rastlín voči stresom sa využíva klasické šľachtenie. Progres vo vývoji tolerantných genotypov však stojí pred niekoľkými ťažkosťami spôsobenými nízkou dedičnosťou týchto charakteristík, testovaním neuniformných podmienok a vysokou interakciou genotyp x prostredie v procese selekcie (KIRIGWI et al., 2004). Z tohto dôvodu môžu byť transformácie rastlín dôležitým nástrojom pri vývoji tolerantných genotypov (JONES, 2005).

Metódy genetickej transformácie pri rastlinách sa rozdeľujú na dve základné skupiny: priamy prenos génov

a prenos génov s využitím biologických vektorov. Efektívne transformačné systémy závisia od niekoľkých kritérií (HANSEN, WRIGHT, 1999): vhodné pletivo kompetentné pre regeneráciu a mikropropagáciu, efektívna metóda prenosu DNA, vhodné činidlo pre selekciu transgénnych pletív, získanie fertílých transgénnych rastlín. Systém má byť efektívny, reprodukovateľný, genotypovo nezávislý, čo najmenej finančne nenáročný a rýchly, aby sa minimalizovalo riziko somaklonálnej variability a prípadnej sterility. Prenos génov prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* je za posledných 30 rokov najčastejšie používaná metóda (VAIN, 2007) vzhľadom na jej jednoduchosť, efektívnosť a aplikovateľnosť pri mnohých rastlinných druhoch a systémoch.

Tabak je dôležitou modelovou rastlinou, ktorá sa intenzívne využíva pri štúdiu genetických, fyziologických a metabolických procesov. Prvé genetické transformácie tabaku boli uskutočnené priamou exogénnou aplikáciou DNA, prostredníctvom *A. tumefaciens*, elektroporáciou, prostredníctvom lipozómov, mikroinjekciou a bombardovaním časticami (TEIXEIRA da SILVA, 2005). Tabak ako experimentálny systém bol využitý aj pri prenose žiadaných génov, napr. pri rezistencii voči hmyzu (ZHANG et al., 2007), tolerancii voči herbicídom (SUGIYAMA, SEKIYA, 2005), rezistencii voči stresu (KAVI KISHOR et al., 1995) a chorobám (DANA et al., 2006). Prvú genetickú transformáciu rajčiaka prostredníctvom *A. tumefaciens* popísali Mc CORMICK et al. (1986), neskôr boli publikované protokoly (FILLATTI et al., 1987), ktoré sa používajú aj v súčasnosti (FRARY, EARLE, 1996; ARRILLAGA et al., 2001; **WU et al., 2006**).

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom doktorandskej dizertačnej práce je využitie postupov genetickej transformácie na zlepšenie tolerancie modelových rastlín voči suchu a určenie podmienenosti tolerancie rastlín na podmienky stresu.

Čiastkové ciele sú nasledovné:

1. Vypracovanie efektívneho regeneračného postupu rajčiaka jedlého v *in vitro* kultúre.
2. Genetická transformácia modelovej rastliny tabaku za účelom zvýšenia tolerancie voči suchu.
3. Genetická transformácia rajčiaka jedlého za účelom

zvýšenia tolerancie voči suchu.

4. Fyziologické hodnotenie transgénných rastlín v stresových podmienkach.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Charakteristika rastlinného materiálu

Semená 12 odrôd (Moldy-SK, Istria-SK, Orbit-CZ, Aneta-CZ, Denár-CZ, Robura-SK, Titan-CZ, Premium-SK, Hana-CZ, Opál-CZ, Red Hunter-NLD a UC 82-USA) rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) použitých v experimentoch pochádzali z Výskumného ústavu zeleninárskeho v Nových Zámkoch a odroda Money Maker (NLD) pochádzala z Génovej banky VÚRV v Prahe. Semená vybraných genotypov tabaku M 51 a Bel B pochádzali z Génovej banky VÚRV Piešťany. Ako východiskový materiál v experimentoch boli použité 8-dňové *in vitro* rastúce klíčence a z nich odvodené hypokotylové, klíčnolistové, petiolové, epikotylové, internodálne a listové explantáty.

3.2 Regenerácia rastlín rajčiaka jedlého v *in vitro* podmienkach

Povrchová sterilizácia semien rajčiaka bola uskutočnená v roztoku 4 % chlórnanu sodného počas 15-tich minút a následným päťnásobným prepláchnutím v sterilnej redestilovanej vode. Klíčenie semien bolo uskutočnené v *in vitro* podmienkach v kultivačných nádobách s 25 cm³ polovičného (½) MS média (MURASHIGE, SKOOG, 1962). Hodnota pH (5,8) média bola upravovaná pred autoklávaním (čas 30 min., teplota 120 °C a tlak 0,1 kPa). Rastliny boli prvé 2 dni kultivované v tme pri teplote 27 ± 1°C, a potom boli prenesené do kultivačnej miestnosti s fotoperiódou 16 h svetlo s intenzitou 50 μmol.m⁻².s⁻¹ (25 °C) a 8 h tma (20 °C).

V prvej etape experimentu boli *in vitro* rastúce klíčence 12 genotypov rajčiaka jedlého (8 dní po nakličovaní) použité ako základ pre hypokotylové, klíčnolistové, epikotylové, listové, petiolové, internodiálne a nodálne explantáty. Explantáty nodálnych uzlov s rastovým vrcholom boli umiestnené do bakteriologických skúmaviek na zakoreňovacie modifikované MS médium (MSOm) podľa FRARY, EARLE (1996). Všetky typy explantátov boli umiestnené na regeneračné médium obsahujúce: MS médium s prídavkom 1 mg.dm⁻³ ZEA + 0,1 mg.dm⁻³ IAA (ICHIMURA, ODA, 1995), do Petriho misiek, pričom epikotily, petioly a internodiá sa umiestnili horizontálne a listy abaxiálnou stranou v kontakte s médiom.

V druhej etape experimentu sme z *in vitro* rastúcich klíčencov (8 dní po nakličovaní) genotypov rajčiaka jedlého (Hana, Premium a Money Marker) použili hypokotylové a klíčnolistové explantáty. Na regeneráciu bolo použitých 5 variantov médií:

T0 – MS médium bez rastových regulátorov (kontrola)

T1 – MS médium + 1 mg.dm⁻³ ZEA + 0,1 mg.dm⁻³ IAA (ICHIMURA, ODA, 1995)

T2 – MS médium + 1 mg.dm⁻³ BAP + 0,1 mg.dm⁻³ NAA

T3 – MS médium + 2 mg.dm⁻³ BAP + 0,2 mg.dm⁻³ NAA

T4 – MS médium + 4 mg.dm⁻³ BAP + 0,4 mg.dm⁻³ NAA

V tretej etape experimentu boli z *in vitro* rastúcich klíčencov (8 dní po nakličovaní)

genotypov rajčiaka jedlého (Hana, Premium, UC 82) použité ako základ pre klíčnolistové explantáty. Explantáty klíčnych listov boli kultivované na pevných kultivačných médiách, na báze solí média MS, doplnených rôznymi rastovými regulátormi cytokinínového charakteru (ZEA, BAP a TDZ) a auxínmi IAA alebo NAA. Koncentrácia auxínu sa pohybovala v rozmedzí 0,05 – 0,2 mg.dm⁻³ a cytokinínov 0,05 – 3 mg.dm⁻³.

Regenerácia explantátov bola hodnotená po 6-tich týždňoch kultivácie, kde boli hodnotené nasledovné znaky: frekvencia regenerácie (percento regenerujúcich explantátov) a počet výhonkov s aspoň 1 vyvinutým listom na nasadený explantát (efektívita regenerácie).

3 Transformácia rastlín

Na genetickú transformáciu modelových rastlín bol použitý účinný kmeň *Agrobacterium tumefaciens* – LBA4404 (HORSCH et al., 1985) so zabudovaným plazmidom pBI – P5CSF129A (ZHANG et al., 1995), obsahujúci gény pre neomycín transferázu (*nptII*), beta-glukuronidázu (GUS) a P5CS pod kontrolou CaMV 35C promótoru.

Rajčiak jedlý – Na genetickú transformáciu boli použité klíčnolistové explantáty 14-dňových klíčnych rastlín rajčiaka jedlého (Hana) s 3 dňovou predkultiváciou na T1 médium. Explantáty boli inokulované bakteriálnou suspenziou *A. tumefaciens* (nočná kultúra kultivovaná v tekutom LB médiu, pri 28 °C v mikrobiologickom termostate) s OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 počas 5 – 30 min. a následne osušené medzi sterilnými papiermi na odstránenie prebytočnej bakteriálnej suspenzie. Inokulované explantáty boli po osušení prenesené na povrch regeneračného média T1 (MS + 1 mg.dm⁻³ ZEA a 0,1 mg.dm⁻³ IAA) a kokultivované 2 – 3 dni v tme 27 ± 1 °C. Po kokultivácii boli transformované explantáty rajčiaka opláchnuté v sterilnej vode, vysušené medzi filtračnými papiermi a prenesené na pevné selekčné regeneračné médium (MS + 1 mg.dm⁻³ zeatín a 0,1 mg.dm⁻³ IAA) doplnené antibiotikami (400 mg.dm⁻³ cefotaxímu, 400 mg.dm⁻³ karbenicilínu a 80 mg.dm⁻³ kanamycínu) a kultivované vo fotoperióde 16 h svetlo s intenzitou 50 μmol.m⁻².s⁻¹ (25 °C) a 8 h tma (20 °C). Explantáty rezistentné ku kanamycínu boli prenesené na čerstvé selekčné regeneračné médium v 14-dňových intervaloch. Regenerujúce výhonky putatívnych transformantov rajčiaka dosahujúce minimálne 10 mm boli prenesené na zakoreňovacie živné médium MS spevnené agarom (7 g.dm⁻³), obsahujúce 80 mg.dm⁻³ kanamycínu.

Tabak virgínsky – Na genetickú transformáciu boli použité 0,5x0,5 cm listové disky 8-týždňových klíčnych rastlín tabaku (M 51 a Bel B). Izolované listové disky boli inokulované bakteriálnou suspenziou (nočná kultúra v tekutom LB médiu, 28 °C v mikrobiologickom termostate) *A. tumefaciens* OD₆₀₀ = 0,6 počas 15 min. a následne osušené medzi sterilnými papiermi na odstránenie prebytočnej bakteriálnej suspenzie. Inokulované listové disky boli po osušení prenesené na povrch MS média obsahujúce 1 mg.dm⁻³ BAP a kokultivované 3 dni v tme 27 ± 1 °C. Po kokultivácii boli transformované listové disky opláchnuté v sterilnej vode, vysušené medzi filtračnými papiermi a prenesené na pevné selekčné regeneračné médium MS + 1 mg.dm⁻³ BAP doplnené s antibiotikami (250 mg.dm⁻³ cefotaxímu, 250 mg.dm⁻³ karbenicilínu,

100 mg.dm⁻³ kanamycínu) a kultivované vo fotoperióde 16 h svetlo s intenzitou 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (25 °C) a 8 h tma (20 °C). Explantáty rezistentné ku kanamycínu boli rekultivované na čerstvé selekčné regeneračné médium v 14-dňových intervaloch. Regenerujúce výhonky putatívnych transformantov tabaku dosahujúce 20 – 30 mm boli prenesené na zakoreňovacie živné médium MS spevnené agarom (7 g.dm⁻³), obsahujúce 100 mg.dm⁻³ kanamycínu.

3 Molekulárne a histologicko-chemické analýzy

Molekulárne analýzy boli uskutočnené pomocou PCR analýz so špecifickými primermi detekujúcimi *P5CSF129A* gén s veľkosťou produktu 468 bp a *nptII* markérový gén s veľkosťou produktu 330 bp a elektroforetická detekcia PCR produktov sa uskutočnila v 1,4 % agarózovom géle farbenom etídium bromidom.

Histologicko-chemické analýzy transformovaných rastlín boli uskutočnené podľa JEFFERSON et al. (1987).

3.5 Aklimatizácia rastlín na *ex vitro* podmienky

Zakorenené rastliny boli po vybratí z kultivačných nádob zbavené zvyškov živného média a prepláchnuté v 0,15 % roztoku fungicídneho prípravku Previcur® 607 SL. Po presadení do záhradníckeho substrátu boli prikryté polyetylénovou fóliou, udržiavané v kontrolovaných podmienkach pri umelom osvetlení (50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 90 % vlhkosti vzduchu. Počas 4 týždňov boli postupne odokrývané.

3 Navodenie stresových podmienok

V prvom experimente boli rastliny pestované v skleníku pri definovaných podmienkach (25 – 30 °C, 65–85 % RHv) v letných mesiacoch. Rastliny v štádiu 5 vyvinutých listov [divý typ (wild type – WT) kultivaru M51 a Bel B ako aj transformované kultivary] boli diferencovanou zálievkou rozdelené na 2 skupiny: kontrola (70 % obsah vody v substráte) a rastliny stresované suchom (40 % obsah vody v substráte).

V druhom experimente netransformované línie (WT) a transformované línie odrody M51 boli 6 týždňov pestované v zeminovom substráte v kultivačnom boxe pri 16 / 8 hod. perióde (130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), teplote 25 / 23 °C (deň / noc) a relatívnej vlhkosti 80 %. Potom bola polovica rastlín prenesená do boxu s rovnakými podmienkami, s nižšou relatívnou vlhkosťou 35 % a bez zálievky na dobu 10 dní. Po odberoch boli vzorky zvážené a následne zmrazené v tekutom dusíku. Potom boli rastliny opäť zaliate a po 24 hod. boli opakovane odobraté vzorky po rehydratácii.

Pri strese teplom boli použité kontrolné zalievané rastliny tabaku, prípadne rastliny vystavené stresu suchom (10 dní). Rastliny boli prenesené do termostatu a vystavené teplote 40 °C na 3 alebo 6 hodín.

3.7 Fyziologické hodnotenie transgénnych rastlín v stresových podmienkach

Stanovenie obsahu voľného prolínu: sa uskutočnilo z 1 g FW listov podľa metodiky BATES et al. (1973) meraním množstva farebnej reakcie produktu prolínu s kyselinou ninhydrínovou pri 519 nm spektrofotometrom NOVA 400.

Stanovenie relatívneho obsahu vody (RWC) v percentách: $(RWC = [(FW - DW) / (FW_{\text{saturovaný}} - DW)] \times 100 \%)$.

Stanovenie obsahu pigmentov: sa uskutočnilo v listoch po extrakcii v 80 % acetóne pri 20 °C a meraním absorbančie pri 663 nm, 645 nm a 440 nm spektrofotometrom NOVA 400, alebo nedeštruktívnou metódou pomocou SPAD metra (Minolta, USA) a vyjadrený v relatívnych hodnotách.

Stanovenie polyamínov: sa uskutočnilo podľa GEMPERLOVÁ et al. (2006) a SLOCUM et al. (1989).

3.8 Štatistické analýzy

Štatistické rozdiely medzi výsledkami boli hodnotené pomocou analýzy variancie softwérom SPSS (13.0). Rozdiely medzi priemermi boli analyzované použitím LSD ($P \leq 0,05$) testu podľa metódy SNEDECOR, COCHRAN (1956) a Duncanovho testu.

4 VÝSLEDKY

4 Regeneračné schopnosti rajčiaka jedlého v *in vitro* podmienkach

Nevyhnutnou podmienkou väčšiny transformačných techník je zvládnutie regenerácie kompletných fertílých rastlín v *in vitro* podmienkach. Regeneráciu rastlín ovplyvňuje veľké množstvo faktorov, z ktorých najdôležitejšie sú: zloženie bazálneho živného média, doplnkové živiny, rastové regulátory (typ, koncentrácia, vzájomný pomer), spevňovacie činidlo, intenzita a fotoperiódá osvetlenia, teplota, typ kultivačných nádob a uzáverov a napokon množstvo živného média. Preto prvoradým cieľom v našich experimentoch bolo zistiť vplyv rastových hormónov (ZEA, TDZ, BAP, IAA) na regeneráciu rajčiaka jedlého v *in vitro* kultúre.

Počas skrínungu regeneračnej schopnosti 13-tich odrôd a 6-tich typov explantátov rajčiaka sme zistili, že najlepšia regeneračná kapacita (regenerácia primordií výhonkov) bola pri odrodách Hana, Premium a Robura, zatiaľ čo referenčná odroda Money Maker mala najnižšiu priemernú regeneračnú schopnosť. Iba regenerácia z hypokotylových explantátov bola porovnateľná s regeneračnou schopnosťou už spomínaných odrôd. V rámci našich experimentov bol taktiež potvrdený pozitívny účinok rastových regulátorov na množstvo výhonkov regenerujúcich z kľúčnych listov a hypokotyl rajčiaka. Regeneračná schopnosť kľúčnolistových explantátov sa pohybovala v rozmedzí 0,08 – 1 výhonku na

explantát, zatiaľ čo pri hypokotylových explantátoch bola v rozmedzí 0 - 0,89 výhonku na explantát. Medzi 8 testovanými variantmi rastových hormónov, prítomnosť ZEA v živnom médiu vždy signifikantne indukovala najvyšší priemerný počet výhonkov na explantát a to pri všetkých odrodách. V práci sme dosiahli až 100 % frekvenciu regenerácie pri 12-tich odrodách z 13 použitých. V ďalších experimentoch sa frekvencia regenerácie hypokotylových explantátov pohybovala v intervale od 83 % do 99 % a klíčnolistových od 61 % do 94 %, v závislosti od živného média.

4 Transformácia rastlín a histologicko-chemické a molekulárne analýzy transformovaných rastlín

Celkovo sme pripravili 40 explantátov tabaku odrôd Bel B a M51, ktoré boli transformované *A. tumefaciens* obsahujúcim plazmid s génom *P5CSF129A*. Na selekčnom médiu sa dopestovalo 5 výhonkov Bel B a 15 výhonkov M51, u ktorých sa očakávalo, že budú transformované. U odrody Bel B bola regeneračná frekvencia 50 % (1,33 výhonkov na regenerovaný explantát), u odrody M51 to bolo 52,5 % (1,4 výhonkov na regenerovaný explantát). Všetky rastliny, ktoré sa presadili do pôdneho substrátu sa aklimatizovali na *ex vitro* podmienky. Kontrolné (netransformované) explantáty na regeneračnom médiu s 100 mg.dm⁻³ kanamycínu neregenerovali. Po selekcii a premnožení v podmienkach *in vitro* sa testovala prítomnosť vnesených génov v regenerovaných výhonkoch PCR analýzou. PCR analýzou sa tiež otestovali zakorenené výhonky preložené do pôdy, pričom sa potvrdila prítomnosť oboch génov - *nptII* aj *P5CSF129A*. Prítomnosť oboch génov sa potvrdila vo všetkých testovaných vzorkách pochádzajúcich z *in vitro* kultúr ako aj u *ex vitro* aklimatizovaných rastlín. Transformanty zakorenené v *in vitro* podmienkach sa tiež testovali histochemickou analýzou GUS. Všetky regenerované výhonky boli GUS-pozitívne.

V rámci našich transformačných experimentov s rajčiakom jedlým sme použili odrodu Hana (českého pôvodu), ktorá sa v predchádzajúcich experimentoch vyznačovala vysokou regeneračnou schopnosťou klíčnolistových explantátov. Aj napriek vysokej regeneračnej schopnosti klíčnolistových explantátov sme v transformačnom experimente dosiahli iba 3,75 % frekvenciu transformácie pri kultivácii explantátov na selekčnom médiu s prídavkom 400 mg.dm⁻³ cefotaxímu a karbenicilínu. Z regenerujúcich

explantátov bolo získaných 7 putatívnych transformantov, ktoré boli presadené na zakoreňovacie médium (MS + 80 mg.dm⁻³ kanamycín) a následne podrobené molekulárnej analýze prítomnosti génu *P5CSF129A*. Po amplifikácii PCR produktov bola v analyzovaných vzorkách putatívnych transformantov rajčiaka odrody Hana potvrdená prítomnosť génu *P5CSF129A*.

4 Charakteristika fyziologických odpovedí rastlín na podmienky stresu

Cieľom štúdie bolo získať regenerované výhonky tabaku transformované génom pre biosyntézu prolínu so zámerom zlepšiť toleranciu rastlín na rôzne druhy stresu. Syntézu a akumuláciu voľného prolínu sme potvrdili už v *in vitro* podmienkach stanovením množstva obsahu voľného prolínu v orgánovej kultúre. Explantáty transformantov odrody M51 akumulovali 8,05 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW voľného prolínu, pričom divý typ M51 akumuloval len 0,37 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW. Transformanty odrody Bel B akumulovali 12,75 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, pričom v divom type sa dokázalo 0,34 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW. Podobný spôsob akumulácie voľného prolínu sa zistil aj pri rastlinách pestovaných v skleníku (ak sa porovnali transformované rastliny s divým typom) za oboch podmienok - pri rastlinách dostatočne zásobených vodou a aj pri rastlinách stresovaných suchom. Signifikantné rozdiely ($P \leq 0,05$) v obsahu prolínu sa zistili aj medzi genotypmi, ktoré sa použili v experimentoch. V priemere bola akumulácia voľného prolínu v rastlinách transformovaného tabaku v kontrolných podmienkach (obsah vody v pôde 70 %) takmer 17-krát vyššia (odroda M51) resp. 22-krát vyššia (odroda Bel B) než pri divom type. V podmienkach stresu (obsah vody v pôde 40 %) bola 14-krát vyššia (odroda M51) resp. 16-krát vyššia (odroda Bel B) ak sa porovnála so stresovanými rastlinami divého typu. V podmienkach stresu sa prolín akumuloval v listoch odrody M51 vo vyšších množstvách než v listoch odrody Bel B.

Fyziologická charakteristika nami študovaných genotypov tabaku odhalila odlišnú schopnosť produkcie biomasy. Odroda Bel B mala mierne zvýšenú schopnosť produkcie suchej hmoty, na druhej strane bola citlivejšia na podmienky stresu. Transformácia nemala negatívny účinok na dynamiku produkcie suchej hmoty, hlavne v odrode Bel B. V podmienkach stresu sa pri trasgénnych rastlinách množstvo produkovanej suchej hmoty znížilo menej než u divého typu.

V tejto štúdii sme sledovali aj relatívny obsah vody

(RWC) v listoch. Kontrolné rastliny mali RWC na úrovni 86 - 94 %. Prerušenie zalievania vodou vyústilo do pomalého poklesu RWC. Pri divom type M51 a pri transformantoch Bel B sa zistil 2-percentný pokles listového RWC po 12 dňoch stresovania suchom, pričom pri transformantoch M51 a divého typu Bel B bol zaznamenaný pokles RWC v listoch o 5 %. Po 6 ďalších dňoch stresu sa pozoroval pokles listového RWC približne o 4 - 5 % pri divom type M51 a Bel B a o 7 - 8 % pri transformantoch Bel B a M51.

Vystavenie rastlín tabaku M51 a Bel B oboch typov stresu suchom vyústilo po 12 a 18 dňoch stresu do zvýšenia hladín Chl *a*, Chl *b*, celkového obsahu chlorofylov (Chl) a karotenoidov. Štatisticky signifikantné rozdiely ($P \leq 0,05$) v celkovom obsahu Chl a karotenoidov sa zistili medzi odrodami ako aj počas trvania deficitu. Obsah celkových Chl a karotenoidov ovplyvňoval najmä genotyp. Obsah chlorofylu bol tiež stanovovaný v relatívnych hodnotách nedeštruktívnym spôsobom pomocou SAPD metru (Minolta, USA). Rastliny tabaku M51 oboch typov boli vystavené stresu suchom prerušením zálievky (10 dní sucha pri relatívnej vlhkosti vzduchu 35 %) a následne rehydratované. Meraním obsahu chlorofylu počas stresu suchom sme zistili, že už na 3. deň po prerušení zálievky obsah chlorofylu v najstarších listoch výrazne klesol. Počas stresu suchom sme tiež zaznamenali výraznú akumuláciu chlorofylu v najmladších listoch. Aj napriek tomu, že transgénna línia mala za kontrolných podmienok menej chlorofylu, počas stresu ho strácala pomalšie ako divý typ. Pri transgénej línii obsah chlorofylu v mladých listoch stúpala postupne od mierneho stresu (3. deň) až po rehydratáciu rastlín (14. deň).

V nasledujúcom experimente boli stanovované obsahy voľných polyamínov v horných a stredných listových poschodiach a v koreňoch transgénnych a kontrolných WT rastlinách tabaku v súvislosti so stresom vyvolaným suchom a vysokou teplotou (40 °C). Rastliny boli použité z predchádzajúceho experimentu. Kontroly WT a kontroly transgénu sa navzájom odlišovali predovšetkým v rozdielnych hladinách putrescínu (Put) a spermidínu (Spd) v horných listoch. Transgénna línia tabaku obsahovala významne vyšší obsah Spd a mierne zvýšený Put v horných listoch, zatiaľ čo v strednom poschodí bola hladina oboch polyamínov nižšia ako vo WT rastlinách. Obsah polyamínov v koreňoch sledovaných rastlín bol podobný a pôsobením sucha sa takmer nemenil. Rastliny WT i transgénne odpovedali na stresové podmienky sucha výrazným zvýšením koncentrácie voľného Put

a sperminu (Spm) a miernym nárastom hladiny Spd v porovnaní s kontrolnými rastlinami. Po rehydratácii bol pozorovaný u transgénnych ale aj WT rastlín v horných listových poschodiach pokles Put, Spd a Spm na hodnoty kontrolných rastlín bez stresu. Avšak po rehydratácii v stredných listových poschodiach prišlo iba k miernemu zníženiu hladiny polyamínov.

WT a transgénne rastliny reagovali na stres vyvolaný vysokou teplotou odlišne ako pri odpovedi na sucho. Bol pozorovaný pokles Put v listoch (najvýraznejšie v horných listových poschodiach) i v koreňoch a významne zvýšený Spd a Spm, opäť predovšetkým v horných listoch.

5 ZÁVERY

Na základe dosiahnutých experimentálnych výsledkov z riešenia dizertačnej práce sme vyvodili nasledovné závery:

1. Vplyv zloženia média na regeneračnú schopnosť rajčiaka v in vitro podmienkach

- Reakcie explantátov rajčiaka (*Lycopersicon esculentum* Mill.) na *in vitro* kultiváciu závisia od genotypu, typu primárneho explantátu [hypokotyl, kľúčny list (kotyledon), epikotyl, list, listová stopka (petiola), internódium] a taktiež od pomeru auxínov a cytokinínov v médiu.
- Zo šiestich typov explantátov najlepšiu regeneráciu vykazovali hypokotylové, kotyledonárne, epikotylové a listové explantáty. Regenerácia týchto explantátov sa štatisticky významne odlišovala od regenerácie internódií a petiol.
- V práci sme taktiež zaznamenali štatisticky významné rozdiely medzi regeneráciou rôznych genotypov.
- Najefektívnejším regeneračným médiom pre regeneráciu rajčiaka bolo MS médium doplnené 1 mg.dm⁻³ zeatínu a 0,1 mg.dm⁻³ IAA.

2. Transformácie modelových rastlín a ich efektívnosť

- Bol uskutočnený prenos plazmidu pBI-P5CSF129A do *A. tumefaciens* (kmeň LBA 4404) a jeho dôkaz PCR metódou.
- Boli vypracované metódy kokultivácie explantátov tabaku a rajčiaka so suspenziou agrobaktera.
- V transformačnom experimente tabaku bolo získaných 20

transformovaných rastlín tabaku, ktoré boli overené na prítomnosť vnesených génov metódou PCR a aklimatizované na *ex vitro* podmienky.

- Pri rajčiaku bolo získaných 7 putatívnych transformantov, ktoré sa nepodarilo zakoreniť a aklimatizovať na *ex vitro* podmienky; transformačné experimenty rajčiaka neboli zatiaľ z časových dôvodov úplne ukončené a zostávajú otvoreným problémom pre ďalší výskum.

3. Fyziologické reakcie transgénnych a kontrolných rastlín na stresy

- Transgénne rastliny oboch odrôd tabaku akumulovali vysoké hladiny voľného prolínu počas stresu suchom.
- Zmeny obsahu suchej hmoty, ako aj zníženie obsahu chlorofylov sme nezaznamenali. V kontrolných ani v stresových podmienkach sme nepozorovali predčasné starnutie, listové nekrózy alebo morfológické zmeny (RWC poklesol o 7 - 8 %).
- V stresových podmienkach sa divý typ a transgén navzájom odlišovali hlavne v rozdielnych hladinách voľných polyamínov putrescínu a spermidínu v horných listoch.
- Po rehydratácii bol pri transgénnych ale aj pri divom type rastlín pozorovaný v horných listových poschodiach pokles putrescínu, spermidínu a sperminu na hodnoty kontrolných rastlín bez stresu.
- Rastliny divého typu a transgénne reagovali na stres vyvolaný vysokou teplotou odlišne ako pri odpovedi na sucho.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arrillaga, I., Gisbert, C., Sales, E., Roig, L., Moreno, V. 2001. *In vitro* plant regeneration and gene transfer in the wild tomato *Lycopersicon cheesmanii*. In: *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76, 2001, p. 413-418.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., Altabella, T. 2006. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. In: *Biotechnology Letters*, 28, 2006, p. 1867-1876.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. 1973. Rapid

- determination of free proline for water-stress studies. In: *Plant and Soil*, 39, 1973, p. 207-207.
- Bray, E. A. 1997. Plant responses to water deficit. In: *Trends in Plant Science*, 2, 1997, p. 48-54.
- Dana Mdl, M., Pintor-Toro, J. A., Cubero, B. 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. In: *Plant Physiology*, 142, 2006, p. 722-730.
- Frery, A., Earle, E. D. 1996. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. In: *Plant Cell Reports*, 16, 1996, p. 235-240.
- Fillati, J. J., Kiser, J., Ronald, R., Comai, L. 1987. Efficient transfer of glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. In: *Biotechnology*, 5, 1987, p. 726-730.
- Gemperlová, L., Nováková, M., Vaňková, R., Eder, J., Cvikrová, M. 2006. Diurnal changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylase, and diamine oxidase in tobacco leaves. In: *Journal of Experimental Botany*, 57, 2006, p. 1413-1421.
- Hansen, G., Wright, M. S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. In: *Trends in Plants Science*, 4, 1999, p. 226-231.
- Hayashi, H., Murata, N. 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. In: Satoh, K., Murata, N. (eds). *Stress responses of photosynthetic organisms*. Amsterdam: Elsevier, 1998, p. 133-148, ISBN 0444828842.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. In: *Science*, 227, 1985, p. 1229-1231.
- Chaves M. M., Maroco J. P., Pereira J. S. 2003. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. In: *Functional Plant Biology*, 30, 2003, p. 239-264.
- Ichimura, K., Oda, M. 1995. Stimulation of shoot regeneration from cotyledon segment of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by agar and its extract. In: *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64, 1995, p. 135-141.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile

- gene fusion marker in higher plants. In: *The EMBO Journal*, 6, 1987, p. 3901-3907.
- Jones, M. P. A., Yi, Z., Murch, S. J. Saxena, P. K. 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L. micropropagation in solid and liquid culture systems. In: *Plant Cell Reports*, 26, 2007, p. 13- 19.
- Kakkar, R. K., Sawhney, V. K. 2002. Polyamine research in plants - a changing perspective. In: *Physiologia Plantarum*, 116, 2002, p. 281-292.
- Kavi Kishor, P. B., Hong, Z., Miao, G., Hu, C. A. A., Verma, D. P. S. 1995. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. In: *Plant Physiology*, 108, 1995, p. 1387-1394.
- Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. In: *Current Science*, 88, 2005, p. 424-438.
- Kirigwi, F. M., van Ginkel, M., Trethowan, M., Sears, R. G., Rajaram, S., Paulsen, G. M. 2004. Evaluation of selection strategies for wheat adaptation across water regimes. In: *Euphytica*, 135, 2004, p. 361-371.
- Liu, J. H., Honda, C., Moriguchi, T. 2006a. Involvement of polyamine in floral and fruit development. In: *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40, 2006, p. 51-58.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., Fraley, R. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumifaciens*. In: *Plant Cell Reports*, 5, 1986, p. 81-84.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum*, 15, 1962, p. 473-497.
- Sharma, S. S, Dietz, K. J. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. In: *Journal of Experimental Botany*, 57, 2006, p. 711-726.
- Sivakumar, P., Sharmila, P., Saradhi, P.P. 2000. Proline alleviates salt-stress induced enhancement in Rubisco oxygenase activity. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 2000, p. 512-515.
- Slocum, R. D., Flores, H. E., Galston, A. W., Einstein, L.

- H. 1989. Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. In: *Plant Physiology*, 89, 1989, p. 512-517.
- Snedecor, G. W., Cochran, W. G. 1956. *Statistical Methods* 5th ed. The Iowa State University Press. Ames. Iowa, 1956, p. 367.
- Sugiyama, A., Sekiya, J. 2005. Homoglutathione confers tolerance to acifluorfen in transgenic tobacco plants expressing soybean homoglutathione synthetase. In: *Plant and Cell Physiology*, 46, 2005, p. 1428-1432.
- Teixeira da Silva, J. A. 2005. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of *in vitro*-grown tobacco by stem thin cell layers. In: *Plant Science*, 169, 2005, p. 1046-1058
- Vain, P. 2007. Thirty years of plant transformation technology development. In: *Plant Biotechnology Journal*, 5, 2007, p. 221-229.
- Vanrensburg, L., Kruger, G. H. J., Kruger, R. H. 1993. Proline accumulation the drought tolerance selection: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultra structure in *Nicotiana tabacum* L. In: *Journal of Plant Physiology*, 141, 1993, p. 188-194.
- Voetberg, G. S., Sharp, R. E. 1991. Growth of the maize primary root in low water potentials. III. Roles of increased proline depositions in osmotic adjustment. In: *Plant Physiology*, 96, 1991, p. 125-130.
- Zhang, H. Y., Liu, X. Z. , Wei, L., Zhou, L. Y., Yang, Y. M. 2007. Transgenic tobacco plants containing *Bt* and *GNA* genes. In: *Biologia Plantarum*, 51, 2007, p. 746-748.
- Zhang, H. Y., Liu, X. Z. , Wei, L., Zhou, L. Y., Yang, Y. M. 2007. Transgenic tobacco plants containing *Bt* and *GNA* genes. In: *Biologia Plantarum*, 51, 2007, p. 746-748.
- Zhang, C. S., Lu, Q., Verma, D. P. S., 1995. Removal of feedback inhibition of D1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. In: *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 1995, p. 20491-20496.
- Wu, Y. F., Chen, Y., Liang, X. M., Wang, X. Z. 2006. An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato. In: *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, 2006, p. 252-256.**

7 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

Gubiš, J., Vaňková, R., Červená, V., Dragúňová, M., Hudcovicová, M., Lichtnerov, H., Dokupil, T., Jureková, Z. 2007. Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. In: South African Journal of Botany, 73, 2007, 4, p. 505-511.

ADD Vedecké práce v domácich karentovaných časopisoch

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2004. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato. In: Biológia Bratislava, 59, 2004, 3, p. 405-408.

ADE Vedecké práce v zahraničných nekarentovaných časopisoch

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. In: Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 39, 2003, 1, p. 9-14.

Gubiš, J., Lajchová, Z., Klčová, L., Jureková, Z. 2005. Influence of growth regulators on plant regeneration in tomato. In: Horticultural Science, 32, 2005, p. 118-122.

Gubiš, J., Lajchová, Z., Klčová, L. 2005. The effect of carbon source on plant regeneration in tomato. In: Horticultural Science, 32, 2005, p. 6-8.

AFC Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách

Jureková, Z., Gubiš, J. 2002. Regeneration system of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for the transformation of foreign gene. In: Application of genetic and molecular methodologies to study physiological processes involved in abiotic stress response in plants : NATO meeting, Parma, Italy 28-30 november 2002. - Parma : Università Degli Studi, 2002.

Gubiš, J., Jureková, Z., Dragúňová, M., Hudcovicová, M., Lichtnerová, H., Dokupil, T. 2006. Transformed tobacco plants with increased proline content. In: Biotechnolgy 2006, 15th-17th February 2006 : CD-ROM - České Budějovice : Scientific Pedagogical Publishing, 2006, p. 584-586, ISBN 80-85645-53-X.

Frýdlová, Z., Wilhelmová, N., Havlová, M., Vaňková, R., Gubiš, J. 2007. Vliv sucha a teplotního šoku na aktivity antioxydačních enzymů v rostlinách tabáku se zvýšenou hladinou prolinu. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 21.3. - 22.3. 2007: sborník

příspěvků, VÚRV : Praha-Ruzyně, 2007, s. 184-188, ISBN 978-80-87011-00-3.

Havlová, M., Cvikrová, M., Malbeck, J., Dobrev, P., Dobrá, J., Gaudinová, A., Gubiš, J., Vaňková, R. 2007. Vliv sucha a zvýšené teploty na hladiny polyaminů, cytokininů, kyseliny abscisové a auxinu v rostlinách tabáku se zvýšenou hladinou prolinu. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 21.3. - 22.3. 2007: sborník příspěvků, VÚRV : Praha-Ruzyně, 2007, s. 460-463, ISBN 978-80-87011-00-3.

AFD Publikované příspěvky na domácích vědeckých konferenciách

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2001. Faktory vplývajúce na regeneráciu výhonkov cestou adventívnej organogenézy v *in vitro* kultúre rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. In: Zborník referátov zo VII. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, 26. septembra 2001, Nitra : AF SPU, SAV, s. 97-101, ISBN 80-7137-915-8.

Filová, A., Gubiš, J., Dragúňová, M. 2002. Influence of osmotic stress on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds germination in *in vitro* conditions. In: Ecophysiology of plant stress: Proceedings of the 5th International Conference 3.-4. july 2002, Ed. M. Zima - K. Černá , Nitra : SPU, SAV, 2002, p. 86-87, ISBN 80-88943-16-7.

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2002. Vplyv genotypu a typu explantátu na morfogézu rajčiaka v *in vitro* kultúre. In: Zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie „Biologické dni“, 5. - 6. september 2002, Nitra : FPV UKF, 2002, s. 96-97, ISBN 80-8050-520-9.

Lajchová, Z., Gubiš, J. 2004. Optimalizovanie regeneračného systému rajčiaka a genetické modifikácie jeho genómu. In: Zborník zo seminára „Genomický prístup k zlepšeniu parametrov rastlinnej výroby“ 10.-11. november 2004, VÚRV : Piešťany, 2004, s. 27, ISBN 80-88790-35-2.

Gubiš, J., Lajchová, Z., Klčová, L., Jureková, Z. 2003. Regeneračná schopnosť rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) v podmienkach *in vitro*. In: Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín BIOS 2003 : Zborník z VIII. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou : Nitra 18. september 2003 : CD-ROM - Nitra : SPU, 2003, s. 72-76, ISBN 80-8069-259-9.

Gubiš, J., Lajchová, Z. 2005. Vplyv rôznej koncentrácie kazeín hydrolyzátu a zdroja uhlíka na regeneráciu výhonkov rajčiaka jedlého [The effect of various concentration of casein hydrolysate and carbon source on shoot regeneration of tomato]. In: Acta horticulturae et regioteecturae : ENVIRO NITRA 2005 : výber príspevkov z X. Medzinárodnej vedeckej konferencie, roč. 8, mimoriadne číslo 2005, s. 15-17. - Abstrakt uverejnený v Enviro Nitra 2005 : 10th International scientific conference. - Nitra : SPU, 2005, s. 32-33, ISBN 80-8069-507-5.

AFG Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií

Havlová, M., Cvikrová, M., Malbeck, J., Motyka, V., Dobrev, P., Gaudinová, A., Gubiš, J., Vaňková, R. 2007. The impact of heat shock and/or drought stress on plant hormone and polyamine levels in tobacco plants. In: IPGSA 19th annual meeting, Puerto Vallarta Mexico, July 21-25, 2007 : abstracts, 2007, p. 39.

Vaňková, R., Havlová, M., Malbeck, J., Motyka, V., Dobrev, P., Gaudinová, A., Martincová, O., Gubiš, J., Cvikrová, M. 2008. The impact of heat shock and drought stress on plant hormone and polyamine levels in tobacco plants. In: COST Action FA605: Signaling control of stress tolerance and production of stress protective compounds in plants, INPAS, April 10-12, 2008: Book of templates, Matera, Italy, 2008, p. 34.

Nováková, M., Gubiš, J., Vaňková, R. 2006. Prolin - důležitá součást obranných mechanismů při odezvě na abiotický stres. In: Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin a Fyziologické sekce Slovenské botanické společnosti, 4. Metodické dny : Abstrakta a články, roč. 6, 2006, č. 2, s. 83, ISSN 1213-6670.

Gubiš, J., Lajchová, Z., Klčová, L. 2005. Transformation of tobacco with gene improving tolerance to drought. In: 6th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology From Laboratory to Business : book of abstracts, 12th-16th September 2005, České Budějovice, : Institute of plant molecular biology ASCR, 2005, p. 41, ISBN 80-86778-16-9.

AFH Abstrakty príspevkov z domácich konferencií

Gubiš, J., Lajchová, Z., Klčová, L. 2003. Regeneration system of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. In: 5th International Symposium in the Series „Recent advances in plant biotechnology“, Stará Lesná, 7.-13. september, 2003,

Nitra : ÚGRB SAV, 2003, p. 31, ISBN 80-89088-15-5.

BED Odborné práce v recenzovaných domácich zborníkoch (konferenčných aj nekonferenčných)

Lajchová, Z., Gubiš, J., Klčová, L. 2003. Štúdium faktorov pôsobiacich na *in vitro* regeneráciu rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : Zborník z 10. odborného seminára 26.-27. november 2003 / Ed. M. Užík, Piešťany : VÚRV, 2003, s. 29-30. ISBN 80-88790-29-8.

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2002. Vplyv antibiotík na *in vitro* regeneráciu rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. In: Zborník z 9. odborného seminára 21. november 2002, Piešťany : VÚRV, 2002, s. 84-85, ISBN 80-88790-25-5.

BEF Odborné práce v nerecenzovaných domácich zborníkoch (konferenčných aj nekonferenčných)

Lajchová, Z., Gubiš, J. 2004. *In vitro* regenerácia genetických zdrojov rajčiaka jedlého. In: Genofond, 2004, č. 8, s. 61, ISSN 1335-5848.

8 OHLASY NA PUBLIKOVANÉ PRÁCE

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. In: Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 39, 2003, 1, p. 9-14.

1. Jabeen, N., Chaudhry, Z., Rashid, H., Mirza, B. 2005. Effect of genotype and explant type on *in vitro* shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Pakistan Journal of Botany, 37, 2005, 4, p. 899-903. SCI
2. Jones, M. P. A., Yi, Y., Murch, S. J., Saxena, P. K. 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid culture systems. In: Plant Cell Reports, 26, 2007, p. 13-119. SCI
3. Chaudhry, Z., Afroz, A., Rashid, H. 2007. Effect of variety and plant growth regulators on callus proliferation and regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*). In: Pakistan Journal of Botany, 39, 2007, 3, p. 857-869. SCI

4. Rajeswari, V., Paliwal, K. 2008. *In vitro* adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from seedling explants of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth.). In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44, 2008, 2, p. 78-83. SCI

Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. 2004. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato. In: *Biológia Bratislava*, 59, 2004, 3, p. 405-408.

1. Bansal, M., Gaurva, P., Sharmila, P., Saradhi, P. P., Dilbaghi, N., Chaudhury, A. 2007. High frequency plant regeneration from cotyledonary explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Pusa Ruby. In: *Annals of Agri Bio Research*, 12, 2007, p. 101-106. SCOPUS