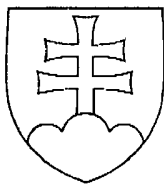


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 19.08.94
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 93/10368
(32) Dátum priority: 30.08.93
(33) Krajina priority: FR
(40) Dátum zverejnenia: 04.09.96
(86) Číslo PCT: PCT/FR94/01017, 19.08.94

(21) Číslo dokumentu:

258-96

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 12N 15/82
C 12N 5/10

(71) Prihlasovateľ: BIOCEM Campus Universitaire des Cézeaux, Aubière, FR;

(72) Pôvodca vynálezu: Knittel Nathalie, Clifton Hill, AU;
Lenee Philippe, Beaumont, FR;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob produkcie transgénnych rastlín, sekundárne meristémy a spôsob ich produkcie**

(57) Anotácia:
Spôsob produkcie transgénnych rastlín, úplne transformovaných v generácii T₀, ktorý zahŕňa: a) krok genetickej transformácie meristémového explantátu a b) krok selektívnej kultivácie, umožňujúci zo všetkých transformovaných buniek, špecifický vývoj takých buniek, ktoré vychádzajú zo sekundárnych meristémov a/alebo buniek, ktoré sú schopné vytvoriť novoformované listové meristémy; c) regeneráciu transgénnych rastlín, vychádzajúcu z bunkového materiálu, získaného v kroku (b).

Spôsob produkcie transgénnych rastlín, sekundárne meristémy a spôsob ich produkcie

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka spôsobu produkcie transgénnych rastlín, vychádzajúcej z meristemických rastlinných tkanív (meristémov), pričom sú rastliny úplne transformované na generáciu T_0 . Vynález zahŕňa aj transformované explantáty, získané počas postupu.

Doterajší stav techniky

Techniky genetického inžinierstva sa teraz bežne používajú pri zlepšovaní rastlinných druhov. Tieto techniky umožňujú zavedenie nových znakov, ktoré je ťažké alebo nemožné zaviesť klasickými technikami. Aj napriek vývoju takýchto techník však existujú určité druhy, ktoré sa ťažko pripravujú na transformáciu, alebo ktoré nemôžu byť regenerované z diferenciálnych explantátov, ako kľúčnych listov alebo listov. U týchto druhov (napríklad u slnečnice, bavlníka, hrachu, fazule, sóji a podobne) bolo dokázané, že tieto ťažkosti je možné čiastočne prekonať použitím meristémového explantátu, napríklad vrcholového meristémového explantátu, ako explantátu na transformáciu.

Používanie meristémov umožňuje regeneráciu plodných rastlín bez etapy kolagenózy. Technika regenerácie z meristémov sa aplikuje u veľkého počtu rôznych druhov a u jedného určitého druhu na veľký počet genotypov. Vďaka tejto technike bolo možné transformovať a regenerovať početné vzdorujúce druhy (viď. napríklad: Bidney so spol., Plant Molecular Biol. 18, 301 až 313, 1992, Bidney so spol., Proc. 13e Int. Sunflower Conf., diel II, Pisa, september 1992; Schrammeijer so spol., Plant Cell Rep. 9, 55 až 60, 1990; Christou so spol., The Plant Journal 2(3), 283 až 290, 1992; Gambley so spol., Plant Cell Rep. 12, 343 až 346, 1993, Russel so spol., Plant Cell Rep. 12, 165 až 169, 1993).

Táto metóda však predstavuje aj isté nevýhody. Početnosť transformácie je extrémne slabá a regenerované rastliny sú takmer výhradne chimerické, to znamená, že niektoré tkanivá sú transformované, zatiaľ čo iné nie sú. Táto charakteristika vychádza zo skutočnosti, že meristém produkuje bunkový materiál, pochádzajúci zo všetkých tkanív rôznych častí rastliny (stonky, koreňov, listov). Avšak hoci ide o vyspelú technológiu, transformačný zákrok vedie k transformácii len obmedzeného počtu buniek explantátu, pričom bunky sú delené alelickým spôsobom. Meristém nie je nikdy po takejto manipulácii úplne transformovaný. Rastliny, regenerované z meristému, ktoré podstúpili etapu transformácie, sú teda chimerické. Rastliny úplne transgénické sú získané len rodovou líniou a to za podmienky, že bunky zárodočnej línie boli zasiahnuté transformáciou. Tento typ postupu je opísaný napríklad v práci: Bidny so spol., *Plant Molecular Biol.* 18, 301 až 313, 1992; a Schrammeijer so spol., *Plant Cell Rep.* 9, 55 až 60, 1990.

Nevýhody, predstavované získaním chimerických rastlín, sú v danej oblasti techniky známe, ale nebolo možné priniesť žiadne riešenie. Bol spísaný systém značenia, dovoľujúci medzi chimerickými rastlinami T_0 rozpoznať tie, ktoré podstúpili transformáciu zárodočnej línie a ktoré teda boli schopné preniesť nový znak na ich potomstvo (Christou a spol., *The Plant Journal* 2(3), 283 až 290, 1992). Táto metóda uľahčuje získanie, v nasledujúcej generácii, úplne transformovaných rastlín, avšak rastliny, produkované v generácii T_0 , sú vždy chimerické.

Až do dneška neexistuje metóda, umožňujúca produkovať systematickým a predvídateľným spôsobom, transgénické rastliny, úplne transformované v generácii T_0 , pokiaľ sa vychádza z meristémových explantátov.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález rieši tento technický problém. Vynález sa zakladá na objasnení metódy, umožňujúcej obohatiť

meristémy o transformované bunky na dosiahnutie úplne transformovaných meristémov, t.j. meristémov, ktorých všetky bunky sú transformované. Podľa vynálezu sa regenerácia rastlín potom uskutočňuje výhradne z takých tkanív úplne transformovaných explantátov, čo zaručuje transgénický charakter získaných rastlín. Autori vynálezu taktiež objasňujú, že sa určitých podmienok môže byť indukovaná nová tvorba (neoformácia) meristémov a novoformovaných listových pupeňov na listoch explantátov, vychádzajúcich z meristémov. Existencia týchto novovytváraných listových pupeňov, obsahujúcich novoformované listové meristémy, nebola v literatúre ešte nikdy opísaná. Spôsob podľa vynálezu taktiež umožňuje získanie takýchto novoformovaných listových meristémov v úplne transformovanom stave. Predstavujú teda vynikajúci bunkový materiál na regeneráciu rastlín, úplne transformovaných v T_0 .

Všeobecne povedané, vynález teda poskytuje metódu produkcie úplne transformovaných meristémov a metódu, ktorá umožňuje regenerovať, pričom vychádza výhradne z takýchto explantátov, rastliny úplne transgénické v T_0 .

Konkrétnejšie sa vynález týka aj spôsobu produkcie transgénických rastlín, úplne transformovaných v generácii T_0 , ktorý zahrňuje:

- a) krok genetickej transformácie meristémového explantátu a
- b) krok selektívnej kultivácie, umožňujúci zo všetkých transformovaných buniek, špecifický vývoj takých buniek, ktoré vychádzajú zo sekundárnych meristémov a/alebo buniek, ktoré sú schopné vytvoriť novoformované listové meristémy;
- c) regeneráciu transgénických rastlín, vychádzajúcu z bunkového materiálu, získaného v kroku (b).

V súvislosti s predkladaným vynálezom označuje výraz "meristémový explantát" explantát, ktorý je zásadne alebo výhradne tvorený meristémovým tkanivom alebo tkanivom, schopným stať sa počas svojho vývoja tkanivom meristémovým. Podľa vynálezu tento vynález zahrňuje najmä:

- vrcholový (apikálny) meristém (v danej oblasti techniky známy tiež ako "primárny meristém"), zvlášť potom vrcholový meristém stonkový, t.j. pôvodom zo stonky;

- novoformovaný listový pupeň;
- časť mladého listu, schopnú vytvoriť novoformované listové pupene.

Výraz "novoformovaný listový pupeň" označuje pupeň, nesený horným epidermom listu. Obsahuje novovytvorený (novoformovaný) listový meristém. Jeho vývoj je indukovaný "umelo" sériou presných kultivačných podmienok.

Podstata týchto odlišných explantátov bude ďalej podrobnejšie opísaná.

Výraz "sekundárny meristém" označuje meristém, vzniknutý z primárneho meristému. Konkrétnejšie tento výraz zahŕňa, v súvislosti s vynálezom, pazušné meristémy, nachádzajúce sa v pazuchách listov a zodpovedajú za vytvorenie bočných vetiev rastlín.

Výraz "pazušný pupeň" označuje pupeň, umiestnený v pazuchách listu, obsahujúci sekundárny meristém.

Výraz "novoformovaný listový meristém" označuje meristém, obsiahnutý v novoformovanom listovom pupeni. Tvorba takýchto meristémov je vyvolávaná "umelo", pomocou podmienok kultivácie, ktoré budú definované neskoršie.

Na bunkovej úrovni majú sekundárne meristémy a novoformované listové meristémy rovnaké štruktúrne usporiadanie a funkciu, ako hlavný meristém, ale sú menšej veľkosti. Novoformované listové meristémy sú okrem toho menšie než sekundárne meristémy.

Práce, vedúce k vypracovaniu predkladaného vynálezu, sa zakladajú na nasledujúcich morfogenetických princípoch. Vrcholový meristém obsahuje, v pazuchách listových primordií, bunky, ktoré vopred daným spôsobom vytvoria bunkovým delením sekundárne meristémy. Existuje možnosť, ako "vopred naprogramované bunky" transformovať postupom genetickej transformácie. Sekundárne meristémy, vzniknuté delením týchto buniek, potom budú zložené výhradne z transformovaných buniek. To isté platí aj pre bunky, ktoré sa vhodných kultivačných podmienok vytvoria novoformované listové meristémy. Následkom toho budú rastliny, regenerované z takýchto sekundárnych meristémov, transformovaných z novoformovaných lis-

tových meristémov, ktoré už boli transformované, úplne transgénické.

Autori vynálezu vypracovali systém selektívnej kultivácie, uprednostňujúci z transformovaných buniek vývoj takých buniek, ktoré majú pôvod v sekundárnych meristémoch a v novoformovaných listových meristémoch. Ostatné bunky sú eliminované.

Selektívna kultivácia s výhodou zahŕňa nasledujúce etapy:

- i) kultiváciu meristémového explantátu, ktorý prešiel krokom transformácie, v selektívnom prostredí;
- ii) odobranie transformovaných pazušných pupeňov a prípadne transformovaných novoformovaných pazušných pupeňov, získaných v priebehu etapy (i);
- iii) kultiváciu transformovaných pupeňov, získaných podľa (ii), v selektívnom prostredí;
- iv) opakovanie etáp (ii) a (iii) ešte najmenej raz.

Inými slovami sa podľa vynálezu explantát, ktorý prešiel krokom transformácie, kultivuje v selektívnom prostredí po stanovenú dobu. Hneď ako sa objaví pučanie a niekoľko listov, kultivácia sa preruší a odoberú sa pazušné pupene a v prípade potreby aj novoformované listové pupene, ktoré sú prinajmenšom čiastočne transformované. Transformovaný stav je rozoznaný pomocou selektívneho označenia. Pupene sú potom prepichované a kultivované v selektívnom prostredí až do doby, kým zase nevytvoria pazušné pupene a prípadne novoformované listové pupene. Kultivácia sa preruší a transformované pupene sú znova odobrané a uvedené do kultúry. Niekoľkonásobným opakovaním tohto cyklu "kultivácia po stanovenú dobu/odobranie pupeňov" je možné získať úplne transformované pupene. S každým pupeňom sa vďaka bunkovému deleniu zvyšuje počet transformovaných buniek v pupeni a pomer transformovaných a netransformovaných buniek. Cykly sú opakované až do doby, než sú získané úplne transformované pupene. Úplne transformovaný pupeň sa pozná podľa svojej schopnosti produkovať výhonok, majúci všade zelené sfarbenie a je charakterizovaný svojou schopnosťou, zodpovedajúcou trans-

formovanému stavu, odolávať inhibícii spôsobenej selektívnym značením. Regenerácia transgénickej rastliny sa vykonáva z pazušných pupeňov alebo z novoformovaných listových pupeňov.

Vraz "selektívne činidlo" označuje, v spojitosti s vynálezom, činidlo, uprednostňujúce rozvoj transformovaných buniek. Používaným selektívnym činidlom je zvyčajne kanamycín. V takomto prípade heterológna sekvencia, zavádzaná počas transformácie, obsahuje gén, kódujúci odolnosť voči kanamycínu, napríklad NPT II. Kanamycín pôsobí prostredníctvom blokády chloroplastových ribozómov. Rastlina, odolná voči kanamycínu, je v dôsledku toho zelená, pretože je schopná vytvárať funkčné chloroplasty, zatiaľ čo neodolná rastlina vykazuje sfarbenie žlté alebo biele, charakterizujúce neprítomnosť chloroplastov. Tento jav umožňuje vizuálnu selekciu transformantov. Vyberané sú zelené, novoformované listové pupene a zelené pazušné pupene; hlavný pupeň, hlavný klíček a všetky časti rastliny, ktoré sú biele alebo žlté, sa odstraňujú.

Odstránenie hlavného pupeňa uprednostňuje vývoj pazušných pupeňov, najmä pokiaľ ide o druh s vrcholovou dominanciou, ako u vybratej slnečnice.

Počet cyklov selektívnej kultivácie je s výhodou najmenej 2, vrátane prvej kultivácie meristémového explantátu, ktorý prešiel etapou transformácie. Počet cyklov musí byť dostatočný na získanie úplne transformovaných pupeňov. Typicky je nutné použiť tri cykly, ale u niektorých druhov alebo u niektorých transformačných techník môže byť nevyhnutné ich použiť viac, napríklad 4, 5 alebo 6 cyklov.

Všeobecne každá etapa kultivácie v selektívnom prostredí trvá približne 15 dní, ale sa môže pohybovať medzi 1 a 3 týždňami, v závislosti na druhu. Trvanie každej etapy kultivácie musí byť dostatočné na nárast výhonkov, majúcich najmenej jeden list. Pokiaľ sa cyklus výberu (selektie) opakuje trikrát, celkové trvanie etapy selektívnej kultivácie bude asi 6 týždňov, pričom je selektívne činidlo prítomné počas celého tohto obdobia. V prípade potreby môže byť počas

transformácie začlenený signálny gén, napríklad GUS, na umožnenie analýzy stavu transformácie.

Účinnosť spôsobu podľa predkladaného vynálezu je nečakaná, pretože súhrn etáp selektívnej kultivácie podľa vynálezu trvá značne dlhšie než zvyčajne používané kultivácie (napríklad 6 týždňov namiesto 2 týždňov). Niekoľkými autormi však bolo zistené, že kanamycín mal osudné účinky na regeneráciu rastlín (Schrammeijer so spol., Plant Cell Rep. 9, 55 až 60, 1990). U spôsobov transformácie a regenerácie, vyvíjaných až do tejto doby, sa teda prejavoval sklon k minimalizácii trvania etapy výberu (selektie) (Bidney so spol., Proc. 13e Int. Sunflower Conf., diel II, Pisa, september 1992). Terajší predkladatelia vynálezu však dokázali, že oproti tomu, čo je uvedené v literatúre, nevykazuje predĺžené obdobie kultivácie, ktoré je selektívne voči kanamycínu, žiadny účinok na regeneráciu rastliny.

Čo sa týka etapy transformácie meristémového explantátu, je možné použiť každú vhodnú techniku. Táto etapa obsahuje uvedenie meristémového explantátu do kontaktu s mikroorganizmom *Agrobacterium*, obsahujúcim heterológnu sekvenciu, ktorá má byť zavedená do rastlinných buniek za podmienok, umožňujúcich prenos DNA.

Ako transformačnú techniku je možné citovať napríklad ostreľovanie meristémového explantátu mikročasticami, pričom sa kontakt explantátu s *Agrobacteriom* uskutočňuje buď súbežne alebo až po ostreľovaní. Táto technika umožňuje spôsobiť rastline zvýšené množstvo mikrozranení, čo je nevyhnutné na prenos DNA pomocou *Agrobacteria*. V prípade súbežného ostreľovania a transformácie (prenosu) sú mikročastice obalené *Agrobacteriom* (EP-A-0486234). Kontakt s *Agrobacteriom* sa s výhodou vykonáva následne po ostreľovaní za použitia napríklad techniky, používanej v EP-A-0486233. Mikročastice sú zvyčajne tvorené zlatom alebo wolfrámom.

Iná transformačná technika zahrňuje uvedenie meristémového explantátu do kontaktu so suspenziou mikroorganizmu *Agrobacterium*. Kontakt trvá 2 až 4 dni, prednosť sa dáva 3 dňom. Prostredím spoločnej kultúry môže byť plné médium,

ktoré sa normálne používa na tento účel.

Zvlášť výhodným prostredím je médium M2, doplnené BAP (benzylaminopurínom), ako je opísané nižšie v príkladoch.

Agrobacteriom je obvykle *Agrobacterium tumefaciens*. Je možné použiť rôzne kmene, napríklad kmeň GV2260 alebo LBA 4404. Ako vektor je možné citovať binárny plazmid pGA 492-GI, alebo navyše ešte intrón p35GUS. Dvojica "kmeň/vektor" môže ovplyvniť účinnosť transformácie. Výhodné je použitie kmeňa LBA 4401 s vektorom pGA 492-GI.

Sekvencia nukleovej kyseliny, ktorá je určená na zavedenie do rastlinných buniek, prenáša všetky sekvencie, ktoré sú schopné rastline udeliť vlastnosti agronomického významu. Spomenúť možno sekvenciu, poskytujúcu odolnosť voči hmyzu, voči herbicidom alebo voči hubovitým ochoreniam (napríklad *Sclerotinia sclerotiorum* alebo *Botrytis cinerea*), jeden alebo viac génov zásobných bielkovín semien alebo zlepšujúcich kvalitu zásobných bielkovín, sekvenciu poskytujúcu odolnosť voči vírusom, jeden alebo viac ribozómov, jednu alebo viac protivzruchových sekvencií, jeden či viac génov, zapojených v metabolizme mastných kyselín alebo aminokyselín alebo jeden či viac génov, zúčastňujúcich sa samčej sterility.

Okrem toho heterológna sekvencia zahrnuje aj sekvenciu, kódujúcu činidlo, ktoré umožňuje výber (selekciu) transformantov; napríklad činidlo, poskytujúce odolnosť voči antibiotiku, ako je kanamycín, G418 alebo neomycín. Vektor zahrnuje regulačné sekvencie, nevyhnutné na stabilnú expresiu heterológnej sekvencie. Ako promótor je možné uviesť promótor 35S, dvojité 35S so zosilňovačom transkripcie Ω alebo promótor ubichitínu, získavaný zo slnečnic. Zvláštna prednosť sa dáva terminátoru NOS.

Etapy transformácie a selektívnej kultivácie, opísané vyššie, tvoria časť celku operácií, umožňujúcich regeneráciu transgénických rastlín z východiskového explantátu. Spôsob podľa vynálezu, môže byť ako celok zhrnutý nasledovne:

1. Príprava meristémového explantátu;
2. Uskutočnenie etapy transformácie explantátu, ako bolo opísané vyššie;

3. Uskutočnenie série krokov (etáp) selekcie, ako bolo uvedené vyššie;

4. Regenerácia transgénických rastlín, vychádzajúc zo štruktúr, získaných v priebehu selekčných cyklov.

Podľa spôsobu, opísaného týmto vynálezom, sa príprava meristémového explantátu skladá z jednej etapy predkultivácie vrcholového meristému alebo vrcholového polovičného meristému počas 5 až 30 dní, s výhodou potom počas 5 až 8 dní.

Prostredím pre predkultiváciu je médium pre rastlinnú bunkovú kultúru, doplnené cytokinínom a navyiac najmä 6-benzylaminopurínom (ďalej označovaným ako BAP). Médium je s výhodou médium MS (Murashige-Skoog), doplnené 0,05 až 2,0 mg/l BAP, napríklad 0,1 mg/l BAP, bez iného hormónu.

Autori vynálezu ukázali, že etapa predkultivácie a jej dĺžka majú dôležitý vplyv na vývoj explantátu. Vzhľadom na to, že jej trvanie prevyšuje 9 alebo 10 dní, objavujú sa na listoch novoformované listové pupene. Regenerované výhonky vrcholového meristému teda majú lístky, ktoré na povrchovom epiderme (pokožke) nesú novoformované listové pupene.

Podľa tohto variantu vynálezu je pred etapou transformácie možné odstrihnúť novoformované listové pupene alebo jednoduchšie aj odobrať kúsky listu a použiť ich v etape transformácie. Podľa tohto spôsobu uskutočnenia vynálezu teda môže byť meristémový explantát, ktorý prešiel transformáciou, vytvorený buď z časti listu, získaného najmenej po 9 dňoch predkultivácie, schopného poskytnúť novoformované listové pupene alebo z odrezaných novoformovaných listových pupenov.

V prípade, že predkultivácia trvá 5 až 12 dní, zapúšťa obvykle vrcholový meristém v etape transformácie priamo meristémový explantát. V takom prípade sú novoformované listové pupene indukované presne povedané už v predkultivačnej etape, ale objavujú sa až počas vývoja kľúčnych listov, napríklad počas spoločnej kultivácie alebo počas kultivácie v selektívnom prostredí.

Podľa vynálezu môže byť rovnaké kultivačné médium používané pre etapy predkultivácie, spoločnej kultivácie a se-

lekcie. Týmto médiom je s výhodou médium MS, doplnené BAP v koncentrácii 0,05 až 2,0 mg/l, s výhodou potom 0,1 mg/l. BAP je normálne jediným fyto-hormónom, prítomným v médiu. Zvlášť sa dáva prednosť tomu, aby médium neobsahovalo ani kyselinu gibereľovú, ani kyselinu indolactovú, najmä pokiaľ ide o predkultivačné médium. Médium tiež môže byť doplnené, pre etapy predkultivácie a spoločnej kultivácie, fenolovou zlúčeninou, napríklad acetosyringonom, schopným aktivovať gény vir *Agrobacteria*. Vhodná je koncentrácia asi 200 μ M. Pre etapu selektívnej kultivácie médium obsahuje najmenej jedno selekčné činidlo, výhodne kanamycín, v koncentrácii od 50 do 200 mg/l, s výhodou potom 50 mg/l a prípadne bakteriostatické činidlá.

Vrcholové meristémy sú získané klíčením zrelých semien, ktoré sú vylúpané a sterilizované. Postup klíčenia sa typicky skladá z kultivácie semien v médiu na klíčenie, s výhodou spevnenom, napríklad v médiu MS, v ktorom boli makro- a mikroprvky prípadne redukované na polovicu. Klíčenie trvá 2 až 4 dni, výhodne 4 dni, pri teplote 25 °C s výhodou pri foto-perióde v dĺžke 16 hodín.

Po etapách predkultivácie, transformácie a selekcie (výberu) sa vykonáva etapa regenerácie, vychádzajúca z úplne transformovaných pupeňov a výhonkov. Kultivačnými médiami a podmienkami sú tie, ktoré sa obvykle na daný účel a danej oblasti techniky používajú. Podmienky regenerácie slnečnice sú udané v nižšie uvedených príkladoch.

Okrem vyššie opísaného spôsobu produkcie transgénických rastlín sa vynález týka aj úplne transformovaných novoformovaných listových pupeňov a sekundárnych meristémov, získaných v priebehu tohto postupu. Rovnako tak sa týka transgénických rastlín, úplne transformovaných v generácii T_0 , získaných z meristémových explantátov.

Spôsob podľa vynálezu predstavuje mnohé výhody. Je najmä účinnejší než techniky, skôr používané v danej oblasti techniky, pretože regenerácia sa vykonáva len vtedy, pokiaľ je explantát úplne transformovaný. Existujúce techniky naopak zahrnujú regeneráciu všetkých meristémov, ktoré prešli

transformačným postupom, po ktorom nasledoval výber takých zo získaných chimerických rastlín, ktorých zárodočná línia bola transformovaná. Spôsob podľa vynálezu teda umožňuje dôležitú úsporu času a vynaložených prostriedkov.

Naviac je výnos u transgénických rastlín, získaných podľa opisovaného postupu, značne vyšší než výnos, získavaný za použitia starších techník. Napríklad u slnečnice poskytuje 92 % regenerovaných rastlín najmenej jednu transgénickú rastlinu v rodovej línii (viď. nižšie Tabuľka 8). Tento údaj je možné porovnať s 0,2 až 2 %, ktoré udáva Bidney so spol., Plant Molecular Biol. 18, 301 až 313, 1992.

Postup podľa vynálezu je možné aplikovať na mnohé rastlinné druhy a zvlášť potom na rastliny dvojklíčne, najmä také, ktoré sa ťažko transformujú a regenerujú. Ako príklad sa uvádza bavlna, sója, olejnaté rastliny, napríklad slnečnica, druhy, patriace medzi strukoviny, ako hrach, fazuľa alebo aj druhy, patriace k tekvicovitým rastlinám ako tekvica. Z okruhu týchto druhov je možné použiť mnoho rôznych genotypov. Zvláštna prednosť sa dáva slnečnici.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Rôzne aspekty vynálezu sú doložené na obrázkoch.

Obr. 1 ukazuje protokol, zaznamenávajúci transformáciu listov, vzniknutých z polovičných meristémov, na analýzu expresie enzýmu glukuronidázy v pazušných výhonkoch, regenerovaných z novoformovaných listových pupeňov.

Označenie:

- 1 - semeno
- 2 - médium na klíčenie M0, 2 dni,
- 3 - podrobný rozbor vrcholu (apexu), odstránenie klíčnych listov, korieňov a prvého listu
- 4 - rozrezanie vrcholu na dve polovice
- 5 - predkultivácia polovičných meristémov v médiu M2, obsahujúcom acetosyringon v koncentrácii 200 μ M počas 30 dní

- 6 - novoformovaný listový pupeň
- 7 - pazušné výhonky, indukované z polovičného meristému
- 8 - odobranie listov, nesúcich na vrchnej strane novoformované listové pupene
- 9 - odobratie listov bez novoformovaných listových pupeňov
- 10 - ostreľovanie a trojdenná spoločná kultivácia listov s mikroorganizmom *Agrobacterium tumefaciens* v médiu M2 obsahujúcom acetosyringon v koncentrácii 200 μM .
- 11 - kultivácia v médiu M2, obsahujúcom augmentín v koncentrácii 400 mg/l po dobu 15 dní
- 12 - pazušné výhonky
- 13 - vývoj novoformovaných listových pupeňov na pazušných výhonkoch
- 14 - analýzy expresie glukuronidázy v pazušných výhonkoch, indukovaných z novoformovaných listových pupeňov, ktoré sa objavili na listoch
- 15 - listový explantát
- 16 - škvryny buniek, transformovaných GUS+
- 17 - bunkové výseče transformované GUS+
- 18 - línie buniek, transformovaných GUS+
- 19 - pazušné pupene, transformované GUS+

Obr. 2 predkladá protokol transformácie polovičných meristémov na analýzu expresie glukuronidázy.

Označenie:

- 1 - semeno
- 2 - médium na klíčenie MO, 2 dni
- 3 - podrobný rozbor vrcholu (apexu), odstránenie kľúčnych listov, korieňov a prvého listu
- 4 - rozrezanie vrcholu na dve polovice
- 5 - predkultivácia polovičných meristémov v médiu M2, obsahujúcom acetosyringon v koncentrácii 200 μM počas 5 dní
- 6 - ostreľovanie a trojdenná spoločná kultivácia listov s mikroorganizmom *Agrobacterium tumefaciens* v médiu M2, obsahujúcom acetosyringon v koncentrácii 200 μM

- 7 - kultivácia polovičných meristémov, ostreľovaných a spoločne kultivovaných v médiu M2, obsahujúcom augmentín (400 mg/l) po dobu 15 dní
- 8 - novoformovaný listový pupeň
- 9 - pazušné výhonky, indukované z polovičných meristémov
- 10 - pazušné výhonky, indukované z polovičných meristémov
- 11 - základný kalus
- 12 - analýzy expresie glukuronidázy v pazušných výhonkoch, indukovaných z polovičných meristémov,
- 13 - škvryny buniek, transformovaných GUS+
- 14 - bunkové výseče transformované GUS+
- 15 - pazušné pupene, transformované GUS+
- 16 - línie buniek, transformovaných GUS+
- 17 - pazušné pupene, transformované GUS+

Obrázok 3 znázorňuje výber (selekciu) pazušných výhonkov, transformovaných a regenerovaných z novoformovaných listových pupeňov na listoch alebo z polovičných meristémov.

Označenie:

- 1 - polovičné meristémy, ostreľované a spoločne kultivované podľa protokolu, uvedeného na obr. 2
- 2 - listy, vzniknuté z polovičných meristémov, ostreľované a spoločne kultivované podľa protokolu, uvedeného na obr. 1

Prvá kultivácia za selekcie vzhľadom na kanamycín:

- 3 - zelený novotransformovaný listový pupeň, odolný voči kanamycínu
- 4 - kultivácia explantátov v médiu M2, obsahujúcom augmentín (400 mg/l) a kanamycín (50 mg/l) po dobu 15 dní
- 5 - biela časť, ktorá je netransformovaná a je citlivá na kanamycín
- 6 - zelený pazušný pupeň, odolný voči kanamycínu
- 7 - zelená transformovaná časť, odolná voči kanamycínu
- 8 - odobratie zelených pazušných pupeňov
- 9 - odobratie zelených novoformovaných listových pupeňov

Druhá kultivácia za selekcie vzhľadom na kanamycín:

- 10 - kultivácia zelených pazušných pupeňov, zelených novoformovaných listových pupeňov a zelených pazušných výhonkov v médiu M2, obsahujúcom augmentín (400 mg/l) a kanamycín (50 mg/l) po dobu 15 dní
- 11 - zelený novoformovaný listový pupeň, odolný voči kanamycínu
- 12 - netransformovaná biela časť, ktorá je citlivá na kanamycín
- 13 - zelený pazušný pupeň, odolný voči kanamycínu
- 14 - zelená časť, odolná voči kanamycínu
- 15 - zelený pazušný výhonok, odolný voči kanamycínu
- 16 - odobratie zelených pazušných pupeňov
- 17 - odobratie zelených novoformovaných listových pupeňov
- 18 - odobratie zelených pazušných výhonkov

Obr. 4 ukazuje regeneráciu transformovaných rastlín.

Označenie:

Tretia kultivácia za selekcie voči kanamycínu:

- 1 - kultivácia zelených pazušných pupeňov, zelených novoformovaných listových pupeňov a zelených pazušných výhonkov v médiu M2, obsahujúcom augmentín (400 mg/l) a kanamycín (50 mg/l) po dobu 15 dní
- 2 - odobratie zelených pazušných výhonkov
- 3 - chimerický pazušný výhonok s netransformovanými bielymi časťami a zelenými transformovanými časťami
- 4 - kultivácia v systéme SORBAROD, doplnenom médiom M3 po dobu 30 dní v kultivačnej miestnosti
- 5 - zakorenenie
- 6 - vymytie média M3, pridanie média M4
- 7 - zakorenená rastlina
- 8 - kultivácia v systéme SORBAROD po dobu 10 dní v kultivačnej miestnosti
- 9 - nezakorenená rastlina
- 10 - vývoj
- 11 - kultivácia v systéme SORBAROD v skleníku po dobu 10 dní

- 12 - vývoj a aklimatizácia
- 13 - prepichanie zakorenených rastlín v rašeline do kvetináčov, vrúbľovanie nezakorenených rastlín na nosiče a kultivácia v rašeline
- 14 - doba kvetu, samoopelenie
- 15 - rast

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Transformácia listov, vzniknutých z polovičných meristémov, na analýzu expresie glukuronidázy vo výhonkoch, regenerovaných z novoformovaných listových pupeňov (obr. 1)

Príprava polovičných meristémov

Na tieto pokusy sa používajú semená slnečnice (*Helianthus annuus*) línií Ha300, RHa 274, RHa 297, RHa 356, RHa 359, RHa 362, dvoch populácií LG60 a LG61, odvodených interspecifickým krížením s *Helianthus petiolaris* a mnohých línií, dodávaných firmou LIMAGRAIN GENETICS (Les Alleuds). Semená sú vylúpnuté kvôli odstráneniu obalov, potom sú sterilizované po dobu 20 minút vo vodnom roztoku javelského lúhu s 12° chlóru, doplnenom Tweenom 80 v množstve 1 ml/l. Vylúpané semená sú následne päťnásobne prepláchnuté sterilizovanou destilovanou vodou. Potom sú ponechané namáčať sa 1 hodinu v sterilnej, odstráni sa blana, kryjúca semeno. Zvlhčené semená sú opäť sterilizované 2 minúty vo vodnom roztoku javelského lúhu s 6° chlóru, trojnásobne premyté sterilnou vodou a vysušené na filtračnom papieri s digestóriou s laminárnym tokom. Suché semená sú potom dané klíčiť do média MO s pH 5,8: makroprvky, mikroprvky, Fe-EDTA a vitamíny média MS (Murashige a Skkog, *Physiologia Plantarum* 15, 473 až 497, 1962) boli doplnené sacharózou (10 g/l) a agarom (7 g/l) a ponechané klíčiť v kultivačnej miestnosti pri 26 °C so 16 hodinou periódou svetla (intenzita svetla 50

$\mu\text{Einstein}/\text{m}^2$) po dobu 2 dní. Klíčiace semená sa odoberú a odstránia sa koreňky a kľúčne listy, rovnako ako horná časť vrcholku. Takto získaný valček s priemerom niekoľko milimetrov je potom rozrezaný na dve polovice v osi napojení kľúčnych listov.

Kultivácia polovičných meristémov

Polovičné meristémy sú kultivované v médiu M2 (makroprvky, mikroprvky, Fe-EDTA a vitamíny média MS), doplnenom sacharózou (10 g/l), BAP (0,1 mg/l), agarom (8 g/l), ktorého pH je 5,8 až 6,0, ktoré obsahuje 200 mM acetosyringonu, po dobu 30 dní v kultivačnej miestnosti pri teplote 26 °C a 16 hodinovej perióde svetla (intenzita svetla 50 $\mu\text{Einstein}/\text{m}^2$). Počas tohto obdobia kultivácie vytvárajú polovičné meristémy výhonky, vychádzajúce zo sekundárnych meristémov v pazuchách primordiálnych listov. Po 10 dňoch kultivácie sa na vrchnej strane listov objavujú výčnelky. Tieto výčnelky, ktoré sú novoformovanými listovými meristémami, sa premieňajú na novoformované listové pupene (obr. 1). Tieto pupene pochádzajú z novotvarov vegetatívnych meristémov, vychádzajúcich z epidermálnych buniek a subepidermálnych buniek vrchnej časti listov.

Po 30 dňoch kultivácie sú odobraté listy, vykazujúce sekundárne meristémy alebo pupene a listy bez novoformovaných listových pupenov (obr. 1).

Ostreľovanie a spoločná kultivácia listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov

Tieto listy sú ostreľované pomocou dela pre častice v hélíu (Particle Inflow Gun, PIG) (Finner so spol., Plant Cell Reports 11, 323 až 328, 1992) časticami wolfrámu (0,2 až 2,0 μm v priemere) na vytvorenie mikroskopických zranení explantátov.

Častice wolfrámu (50 mg) sú sterilizované v 500 μl 95% etanolu po dobu 20 minút, potom sú štvornásobne premyté od-

stredením v sterilnej vode (10 000 otáčok za minútu po dobu 1 minúty). Sterilné častice sú dané do 300 μ l pufra TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Pre každé ostreľovanie sa používa objem 2 μ l čistých častíc. Listy sú umiestnené vrchnou časťou nahor v Petriho miske s priemerom 5 cm, obsahujúcej gelózovú (agarovú) vodu (15 g/l). Petriho misky s explantátmi sa umiestnia do dosahu dela a vytvorí sa vákuum pomocou 0,982 MPa (736,6 mm Hg). Ostreľovanie časticami sa uskutočňuje pri tlaku 0,8 MPa (8 barov) a vzdialenosti 16 cm medzi delom a explantátmi, ktoré majú byť ostreľované.

Ostreľované explantáty sú potom umiestnené do Petriho misky s priemerom 9 cm, obsahujúcom médium M2, doplnené 200 μ M acetosyringonu. Na jeden explantát sa nanesie 1 kvapka (1 až 10 μ l) suspenzie inaktivovaného mikroorganizmu *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (Hoekema so spol., Nature 303, 179 až 180, 1983), pochádzajúceho z kultúry kultivovanej cez noc a o optickej hustote $Do = 2$ až 600 nm. Kmeň LBA 4404 obsahuje binárny vektor pGA492-G1 (an, Plant Physiol. 81, 86 až 91, 1986), nosič génu NPT II, poskytujúceho odolnosť voči kanamycínu pod kontrolou promotora pNOS (Herrera-Estrella so spol., EMBO J., 2, 987 až 995, 1983) a terminátora t-NOS (Depicker so spol., Mol. Appl. Genet. 1, 561 až 573, 1982), v ktorom bol vložený na miesto S_{Ca} I, gén GUS intrón, kontrolovaný promótorom p35S z CaMV a terminátorom t-NOS (Vancanneyt so spol., Mol. Gen. Genet. 220, 245 až 250, 1990). Explantáty, ostreľované a inokulované (zaočkované) mikroorganizmom *Agrobacterium tumefaciens* sú spoločne kultivovaní po dobu 3 dní pri 26 °C a 16 hodinovej perióde svetla (intenzita svetla 50 μ Einstein/m²). Spojenie ostreľovania čistými časticami a spoločnej kultivácie s mikroorganizmom *Agrobacterium tumefaciens* umožňuje bombardovaním vyvolať mikrozranenie listových buniek a sekundárnych meristémov. Tieto mikrozranenia zaistujú prenikanie baktérie a väčšiu účinnosť transformácie podľa postupu Bidneya so spol., Plant Mol. Biol. 18, 301 až 313, 1992.

Kultivácia listov a regenerácia výhonkov z novoformovaných listových pupeňov

Po spoločnej kultivácii sú explantáty prepichané do Petriho misky, obsahujúcej médium M2, doplnené augmentínom (400 mg/l) a umiestnené po dobu 15 dní do kultivačnej miestnosti (16 hodinová svetelná perióda, $15 \mu\text{Einstein/m}^2$, 23°C a 8 hodinová perióda tmy pri 21°C).

Po 15 dňoch kultivácie sa novoformované listové pupene, hoci sa práve objavujúce, alebo už prítomné na ostreľovaných a spoločne kultivovaných listoch, vyvíjajú do výhonkov, majúcich 1 až 5 listov a krátku stonku. Tieto výhonky sú oddelené a umiestnené do pufra na analýzu aktivity glukuronidázy (obr. 1).

Analýza glukuronidázovej aktivity vo výhonkoch, vzniknutých z novoformovaných listových pupeňov

Výhonky, vzniknuté z novoformovaných listových pupeňov, sú ponorené do pufra GUS, obsahujúceho 1 mg/ml X-gluk. (cyklohexyl-amónium-5-bróm-4-chlór-3-indolyl- β -D-glukuronovej kyseliny) (Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5, 387 až 405, 1987) infiltrované vo vákuu a inkubované v tme 24 hodín pri 37°C .

Po 24 hodinách inkubácie sú transformované bunky, u ktorých došlo k expresii génu GUS, vykazujúceho glukuronidázovú aktivitu (označovanú ako aktivita GUS+), schopné hydrolyzovať X-Glu a uvoľňovať zlúčeninu modrej farby.

Po 24 hodinovej inkubácii sú viditeľné rôzne typy plakov transformovaných buniek, majúcich aktivitu GUS+ (obr. 1).

- Škvrny s priemerom niekoľko milimetrov, nachádzajúce sa na povrchu listov výhonkov, regenerovaných z novoformovaných listových meristémov. Tieto škvrny sú vytvárané z buniek novoformovaných listových meristémov, transformovaných v okamžiku ostreľovania a spoločnej kultivácie.

- Rozsiahlejšími oblasťami transformovaných buniek môžu

byť buď modré disky s priemerom väčším než 5 mm, alebo modré polovice listov alebo línie modrých buniek. Tieto rozsiahlejšie oblasti sú vytvárané z transformovaných buniek, nachádzajúcich sa vo vnútri meristémov novoformovaných listových pupenov, ktoré poskytli úplne transformované bunkové rodové línie (polovičné listy - disky a línie buniek).

- V niektorých prípadoch sú modré pupene alebo sekundárne meristémy, vykazujúce glukuronidázu, pozorované v pazuchách listov na výhonkoch. Tieto sekundárne meristémy sú úplne transformované. Pochádzajú buď z vnútorných buniek novoformovaných listových meristémov, ostreľovaných a spoločne kultivovaných, ktoré v priebehu rastu a diferenciácie poskytli pazušný pupeň v pazuche listu alebo z transformovaných buniek na povrchu listu, ktorý novovytvoril novoformované listové meristémy a potom sekundárny pupeň.

Výsledky, uvedené v tabuľke 1, ilustrujú percento ostreľovaných a spoločne kultivovaných listov, ktoré poskytli výhonky, vykazujúce buď škvrny buniek GUS+ alebo rozsiahlejšie oblasti buniek GUS+ alebo sekundárne meristémy GUS. Väčšina ostreľovaných listových explantátov obnovuje (regeneruje) výhonky z novoformovaných listových pupenov, ktoré obsahujú škvrny GUS + (80 %) a rozsiahlejšie oblasti GUS+ (55 %). Tieto výhonky sú chimerickými klíčkami, zloženými zo zmesi transformovaných a netransformovaných buniek.

Tabuľka 1

Percento ostreľovaných a spoločne kultivovaných explantátov vykazujúcich		
škvrny GUS+	rozsiahlejšie oblasti GUS+	pazušné pupene
80	55	2

Tieto výhonky poskytujú geneticky transformovanú rodovú líniu len pokiaľ existujú transformované bunky v oblasti meristému, obsahujúceho zárodočné bunky, pochádzajúce z vajíč-

ka alebo zrníek peľu. Oproti tomu 2 % ostreľovaných a spoločne kultivovaných listových explantátov obsahuje transformované pazušné pupene, nachádzajúce sa v pazuchách listov, nesených výhonky, pochádzajúcimi z novoformovaných listových pupeňov. Jednobunkový pôvod týchto pazuchách pupeňov predpokladá, že sú úplne transformované a poskytujú rodovú líniu transformovaných rastlín podľa mendelovského delenia (najmenej 3/4 rastlín transformovaných a 1/4 rastlín netransformovaných).

Príklad 2

Transformácia polovičných meristémov na analýzu expresie glukuronidázy vo výhonkoch, regenerovaných z polovičných meristémov (obr. 2)

Príprava polovičných meristémov

Príprava polovičných meristémov je zhodná so spôsobom uádzaným v príklade 1 (časť 1.1).

Predbežná kultivácia polovičných meristémov

Polovičné meristémy sú vopred kultivované 1, 5, 8 a 12 dní v médiu M2, obsahujúcom acetosyringon ($200 \mu\text{M}$) pri 26°C a 16 hodinovej perióde svetla ($50 \mu\text{Einstein/m}^2$).

Po predkultivácii vytvárajú meristémy malé výhonky, vyvíjajúce sa zo sekundárnych meristémov a z vrcholového meristému. Vývoj týchto výhonkov je funkciou doby trvania predbežnej kultivácie. Čím je doba predbežnej kultivácie dlhšia, tým sú výhonky vyvinutejšie. Po 12 dňoch predbežnej kultivácie nesú výhonky listy a novoformované listové pupene na vrchnom povrchu listov (obr. 2).

Odstreľovanie a spoločná kultivácia vopred kultivovaných polovičných meristémov

Po predkultivácii sú polovičné meristémy ostreľované a spoločne kultivované podľa postupu, opísaného v príklade 1, časti " Ostreľovanie a spoločná kultivácia listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov".

Kultivácia ostreľovaných a spoločne kultivovaných polovičných meristémov

Polovičné meristémy, ktoré boli predkultivované, ostreľované a spoločne kultivované, sú kultivované v Petriho miskách s priemerom 9 cm, ktoré obsahujú médium M2, doplnené augmentínom (400 mg/l) a sú umiestnené v kultivačnej miestnosti (16 hodinová svetelná perióda, $15 \mu\text{Einstein/m}^2$ pri teplote $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a 8 hodinové obdobie tmy pri teplote $21 \text{ }^\circ\text{C}$).

Po 15 dňoch kultivácie majú výhonky 1 až 5 listov a vyvíja sa stonka z pazušných pupeňov, vrcholového meristému a tiež a novoformovaných listových pupeňov, ktoré sa objavili na vrchnom povrchu listov.

Analýza aktivity glukuronidázy vo výhonkoch, pochádzajúcich z polovičných meristémov (obr. 2)

Výhonky, vytvárajúce sa z polovičných meristémov, sú oddelené a analyzované vzhľadom na expresiu aktivity glukuronidázy. Podmienky testu glukuronidázovej aktivity sú opísané v príklade 1, časti "Analýza glukuronidázovej aktivity vo výhonkoch, vzniknutých z novoformovaných listových pupeňov". Sú pozorované nasledujúce plaky buniek, vykazujúcich glukuronidázovú aktivitu (obr. 2):

- škvrny modrých transformovaných buniek, vykazujúcich glukuronidázu (GUS+)
- rozsiahlejšie oblasti bunkových línií, vykazujúcich glukuronidázu (GUS+)
- sekundárne meristémy v pazuchách listov, celkom modré, prejavujúce glukuronidázu (GUS+)
- navyše v prípade transformácie vopred kultivovaných polovičných meristémov (1 až 12 dní), sa na vrchnej strane

listov objavujú transformované, novoformované listové pupene GUS + (obr. 2). Tieto novoformované listové pupene pochádzajú z transformovaných buniek, nachádzajúcich sa na mladých listoch v okamžiku ostreľovania a spoločnej kultivácie polovičného meristému. Takéto bunky sa potom vyvíjajú v novoformované listové pupene. Jednobunkový pôvod týchto novoformovaných listových pupeňov umožňuje získať pupene úplne transformované, poskytujúce transformované rastliny.

Tabuľka 2

doba predbežnej kultivácie (dni)	percento ostreľovaných a spoločne kultivovaných polovičných meristémov, vykazujúcich:		
	škvrny buniek GUS+	rozsiahlejšie oblasti GUS+	pazušné pupene GUS+
1	38	26	0
5	50	40	4
8	67	47	0
12	70	38	0

Početnosť transformácií, získaných ostreľovaním polovičných meristémov, je zvýšená, 38 až 70 % ostreľovaných a spoločne kultivovaných polovičných meristémov vykazuje škvrny GUS + a 26 až 47 % vykazuje širšie oblasti GUS+ (tabuľka 2).

Percento množstva ostreľovaných a spoločne kultivovaných polovičných meristémov, vykazujúcich širšie oblasti GUS+, je výraznejšie zvýšené, pokiaľ sú polovičné meristémy predbežne kultivované 5 dní (40 %) a 8 dní (47 %) (tabuľka 2).

Len polovičné meristémy, ktoré boli predkultivované 5 dní, poskytli výhonky s celkom modrými pazušnými pupeňmi či novoformovanými listovými pupeňmi.

Tieto pazušné alebo listové novoformované a úplne transformované pupene poskytujú úplne transformované rastli-

ny, ktorých rodovú líniu budú najmenej z 3/4 tvoriť transformované rastliny a z 1/4 netransformované rastliny. Doba 5 dní predbežnej kultivácie je teda optimálnou dobou trvania pre štandardný postup, opisovaný v tomto vynáleze.

Príklad 3

Transformácia polovičných meristémov alebo listov, vzniknutých z polovičných meristémov (obr. 3 a 4)

Transformácia listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov.

Príprava a predbežná kultivácia polovičných meristémov, ostreľovanie a spoločná kultivácia listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov, sa vykonávajú podľa postupu, opísaného v príklade 1 častiach "Príprava polovičných meristémov", "Kultivácia polovičných meristémov" a "Ostreľovanie a spoločná kultivácia listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov".

Transformácia polovičných meristémov

Príprava, predbežná kultivácia, ostreľovanie a spoločná kultivácia polovičných meristémov sa vykonávajú podľa postupu, opísaného v príklade 2 častiach "Príprava polovičných meristémov", "Predbežná kultivácia polovičných meristémov" a "Ostreľovanie a spoločná kultivácia vopred kultivovaných polovičných meristémov".

Výber výhonkov, odolných voči kanamycínu

Prvá kultivácia za výberu v prítomnosti kanamycínu (obr. 3)

Po spoločnej kultivácie sú explantáty (polovičné meristémy alebo listy) umiestnené do Petriho misky s priemerom 9 cm, obsahujúce médium M2, doplnené 400 mg/l augmentínu

a 50, 100, 200 a 400 mg/l kanamycínu.

Misky, obsahujúce explantáty, sú počas 15 dní kultivácie umiestnené v kultivačnej miestnosti (16 hodinová svetelná perióda, $15 \mu\text{Einstein/m}^2$ pri teplote 23°C a 8 hodinové obdobie tmy pri teplote 21°C). V priebehu tejto kultivácie sa explantát vyvíja na poskytnutie výhonkov, majúcich 1 až 5 listov a krátku stonku (obr. 3).

Po 15 dňoch kultivácie v selektívnom médiu, obsahujúcom kanamycín, predstavujú regenerované výhonky rôzne aspekty v závislosti na množstve transformovaných buniek, odolných voči kanamycínu, z ktorých sa skladajú:

- Výhonky, nesúce listy s oblasťami bielymi alebo žltými, zloženými z netransformovaných buniek, citlivých voči kanamycínu a so zelenými oblasťami, zloženými z transformovaných buniek, odolných voči kanamycínu.
- Výhonky, nesúce v priebehu vývoja zelené pazušné pupene v pazuchách listov. Tieto zelené pazušné pupene sú transformované a vyvíjajú sa v prítomnosti kanamycínu v pazušné výhonky.
- Výhonky, nesúce sa svojich listoch novoformované žlté alebo biele netransformované listové pupene, citlivé voči kanamycínu.
- Výhonky úplne biele alebo žlté, netransformované, citlivé voči kanamycínu.
- Výhonky nesúce na listoch vyvíjajúce sa zelené pupene alebo novoformované listové meristémy, odolné voči kanamycínu.

Druhá kultivácia za výberu v prítomnosti kanamycínu (obr. 3)

Zelené pazušné výhonky, zelené pazušné pupene a meristémy alebo zelené novoformované listové pupene a sú rozpichané do média M2, obsahujúceho augmentín (400 mg/l) a kanamycín (50, 100, 200 a 400 mg/l) a inkubujú sa za rovnakých podmienok kultivácie ako predtým, časť "Prvá kultivácia za výberu v prítomnosti kanamycínu", po dobu 15 dní.

Po tomto kultivačnom období pazušné pupene a novoformo-

vané listové pupene novovyvinuli výhonky (obr. 3).

- Niektoré výhonky majú listy, nesúce zelené časti, zložené z transformovaných buniek, odolných voči kanamycínu a biele časti, skladajúce sa z netransformovaných buniek, citlivých voči kanamycínu.

Prítomnosť nie celkom transformovaných výhonkov ukazuje, že od prvej kultivácie neboli všetky pazušné pupene a novoformované zelené listové pupene úplne transformované a umožnili vznik chimerických výhonkov, zložených zo zmesi transformovaných a netransformovaných buniek.

- Niektoré chimerické výhonky majú sekundárne meristémy alebo zelené pazušné pupene odolné voči kanamycínu.

- Niektoré chimerické výhonky majú listy so zelenými a s bielymi plakmi, ktoré nesú zelené pupene alebo novoformované listové meristémy, odolné voči kanamycínu.

- Niektoré výhonky majú zelené listy, nesúce pazušné pupene alebo zelené sekundárne meristémy. Takéto výhonky, zložené z transformovaných buniek, sú odolné voči kanamycínu.

Tieto celkom zelené výhonky, pochádzajúce z pazušných pupenov alebo pupenov či meristémov listových, novoformovaných, sa vyvíjajú. Takéto výhonky sú zložené z veľkého počtu transformovaných buniek, odolných voči kanamycínu.

U výhonkov, získaných zo sekundárnej kultivácie, je pozorované určité množstvo výhonkov, ktoré sú celkom zelené, zatiaľ čo do skončenia prvej kultivácie nebol pozorovaný žiadny úplne zelený výhonok, čo ukazuje, že určité pazušné pupene alebo novoformované listové pupene, kultivované v druhej kultivácii v prítomnosti kanamycínu, boli úplne transformované.

Tretia kultivácia za výberu v prítomnosti kanamycínu (obr.4)

Úplne zelené výhonky, zelené pazušné pupene a zelené pupene alebo novoformované listové meristémy sa oddelia a prepichajú do média M2 a kultivujú sa ako predtým, časť "Prvá kultivácia za výberu v prítomnosti kanamycínu" obr. 3 a 4.

Po 15 dňoch kultivácie sa z týchto explantátov vyvinú výhonky. Väčšina výhonkov je úplne zelených a vyvíjajú sa rýchlo v médiu M2, obsahujúcom kanamycín. Tieto výhonky sú úplne transformované. Malé množstvo výhonkov ešte vykazujú zelené plaky a plaky bielych buniek. Tieto chimerické výhonky sa odstraňujú (obr. 4).

Len zelené výhonky sa prepichujú do kultivačného systému SORBAROD. Kultivačný systém SORBAROD sa skladá z uzavretého a sterilného miniskleníka, obsahujúceho valce z celulózy, zvlhčené médiom M3 (makroprvky, mikroprvky, Fe-EDTA a vitamíny média M3), doplnenom sacharózou (10 g/l). Miniskleník je vybavený tromi otvormi, krytými membránou, ktoré zaručujú výmenu plynov a rovnováhu medzi vnútornou vlhkosťou a vonkajšou relatívnou vlhkosťou.

Zelené výhonky, pochádzajúce z tretej kultivácie, sú pestované v celulózových valcoch a vložené do miniskleníkov SORBAROD (obr. 4). Miniskleníky sú umiestnené v kultivačnej miestnosti (16 hodinová svetelná perióda, $15 \mu\text{Einstein/m}^2$ pri teplote 23°C a 8 hodinové obdobie tmy pri teplote 21°C). Po 3 dňoch kultivácie transformované rastliny zokoreňujú a vyvíjajú sa. Médium M3 je potom odstránené odpipetovaním, valce sú trojnásobne premyté sterilnou destilovanou vodou a zvlhčené médiom M4 (makroprvky, mikroprvky, Fe-EDTA a vitamíny média MS) bez sacharózy. Po 10 dňoch kultivácie v kultivačnej miestnosti rastliny vyvinú široké listy a dosiahnu veľkosť 2 až 3 cm. Miniskleníky SORBAROD sú prenesené do skleníkov (teplota 26°C , foroperióda 16 hodín/ 8 hodín) na dobu 10 dní. Po túto dobu sa zakorenené rastliny vyvíjajú a prispôbujú podmienkam v skleníku (aklimatizujú sa). Potom sú valce, nesúce rastliny slnečnice s rozvinutými koreňmi a listami, umiestnené do kvetináčov, obsahujúcich rašelinu, zavlažovanú roztokom typu COIC a LESAINTE (Hortic. Rf. 8, 11, 191).

Nezakorené rastliny sú vrúbľované na stonky nosičov vrúbľov (netransformovaná slnečnica v štúdiu 4 až 6 listov po odrezaní). Spodok stonky transformovanej rastliny je šikmo zrezaný a umiestnený do rozštetu na stonku nosiča vrúbľa.

Vrúbeľ je pripevnený na nosič spevňujúcou páskou a obalený je plastovým sáčkom. Po prijatí (uchytení sa) vrúbľa sa vyvíjajú listy a stonka a plastový sáčok je odstránený. Nosiča vrúbľov a vrúbľe sú potom pestované v skleníku a zalievané výživným roztokom typu COIC a LEISANT (Hortic. Fr. 8, 11, 1971).

Rastliny slnečnice rastú, kvitnú a sú samoopelené. Semená každej transformovanej rastliny sa zberajú na analýzu oddelenia (segregácie) génu odolnosti voči kanamycínu a génu GUS (vid'. príklad 8).

Príklad 4

Vplyv bakteriálneho kmeňa a binárneho plazmidu na účinnosť genetickej transformácie listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov

Listy, vychádzajúce z polovičných meristémov, sa ostreľujú a spoločne kultivujú s rôznymi kmeňmi:

- LBA 4404, obsahujúcom binárny plazmid PGA 492-GI (opísaný v príklade 1, časti "Ostreľovanie a spoločná kultivácia listov, pochádzajúcich z polovičných meristémov")
- GV 2260, obsahujúcom binárny plazmid p35S GUS intron (Vancanneyt so spol., Mo. Gen. Gnet. 220, 245 až 250, 1990).
- C58'3 (Mullineau so spol., Plant Sci. 63, 237 až 245, 1989).

Po 6 týždňoch kultivácie listov (podľa protokolu, opísaného v príklade 3) v selektívnom médiu, obsahujúcom 100 alebo 200 mg/l kanamycínu, sú zelené výhonky, odolné voči kanamycínu, podrobené testu expresie glukuronidázovej aktivity. Pokiaľ bunky vykazujú glukuronidázovú aktivitu, je označená ako aktivita GUS+. Protokol na testovanie glukuronidázovej aktivity je opísaný v príklade 1, časť "Analýza glukuronidázovej aktivity vo výhonkoch, vzniknutých z novotransformovaných listových pupeňov".

Výsledky sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

kmene a binárne plazmidy	% explantátov, vykazujúcich:		
	škvrny GUS+	rozsiahlejšie oblasti GUS+	pazušné pupene GUS+ alebo výhonky plne GUS+
GV 2260 (pGUS intron)	21,5	4,5	0
C58'3 (pGA 492-GI)	0	0	0
LBA 4404 (pGA 492-GI)	38,5	18,5	1

Len regenerované výhonky, pochádzajúce zo spoločných kultivácií s GV 2260 (pGUS intron) a LBA 4404 (pGA 492 GI) vykázali expresiu glukuronidázy (aktivitu GUS+). Za použitia kmeňa C58'3 nebola nameraná žiadna aktivita GUS+. Percentuálne množstvo ostreľovaných a spoločne kultivovaných explantátov, majúcich najmenej jeden výhonok so širokými oblasťami, vykazujúcimi aktivitu GUS+, je najmenej štvornásobne zvýšené, pokiaľ sú explantáty spoločne kultivované s kmeňom LBA 4404 (pGA 492-GI) v porovnaní s explantátmi, ktoré sú spoločne kultivované s kmeňom GV 2260 (pGUS-intron). Len kmeň LBA 4404 umožňuje získať výhonky alebo sekundárne meristémy, majúce aktivitu GUS+ vo všetkých bunkách.

Príklad 5

Vplyv bakteriálneho kmeňa a binárneho plazmidu na účinnosť genetickej transformácie polovičných meristémov

Polovičné meristémy sú ostreľované a spoločne kultivované s kmeňmi LBA 4404 (pGA 492-GI), C58'3 (pGA 492-GI) a GV 2260 (p35S GUS intron), opísaných v príklade 4.

Po 6 týždňoch kultivácie podľa protokolu, opísaného v príklade 3, bolo spočítané množstvo polovičných meristé-

mov, schopných vyvíjať výhonky v prítomnosti kanamycínu (100 mg/l) (tabuľka 4).

Výsledky sú nasledujúce:

Účinnosť transformácie je definovaná ako percentuálne množstvo ostreľovaných a spoločne kultivovaných polovičných meristémov, poskytujúcich aspoň jeden výhonok, odolný voči kanamycínu.

Tabuľka 4

kmene a binárne plazmidy	účinnosť transformácie (%)
C58'3 (pGA 492-GI)	0
LBA 4404 (pGA 492-GI)	4,5
GV 2260 (p35S GUS intron)	1

Spoločná kultivácia polovičných meristémov s kmeňom LBA 4404 (pGA 492-GI) umožňuje získať množstvo 4,5 % polovičných meristémov, ktoré vytvárajú transformované výhonky, odolné voči kanamycínu po 6 týždňoch v médiu M2, obsahujúcom 100 mg/l kanamycínu. Toto percentuálne množstvo je štvornásobne vyššie než percento, získané použitím kmeňa GV 2260 (p35S GUS intron). Použitím kmeňa C58'3 nebol získaný žiadny výhonok, odolný voči kanamycínu.

Kmeň LBA 4404 (pGA 492-GI) bol zvolený pre štandardný protokol (opisuje obr. 3), pretože umožňuje rutinným spôsobom získať vo zvýšenom množstve úplne transformované výhonky.

Príklad 6

Vplyv koncentrácie kanamycínu na genetickú transformáciu polovičných meristémov

Polovičné meristémy, ostreľované a spoločne kultivované s kmeňom LBA 4404 (pGA 492-GI) sa kultivujú po dobu 6 týždňov v prítomnosti rôznych koncentrácií kanamycínu (50, 100, 200 a 400 mg/l) v médiu M2 (podľa protokolu, opísaného v príklade 3). Po 6 týždňoch kultivácie sú zelené výhonky, odolné voči kanamycínu, podrobené testovaniu expresie glukuronidázy (protokol je opísaný v príklade 1, časti "Analýza glukuronidázovej aktivity vo výhonkoch, vzniknutých z novotransformovaných listových pupeňov".)

Výsledky sú nasledujúce:

Tabuľka 5

koncentrácia kanamycínu (mg/l)	percento polovičných meristémov, poskytujúcich		
	pazušné výhonky so škvrnami GUS+	výhonky s rozsiahlymi	pazušné výhonky úplne GUS+
50	30	22,5	3,3
100	30,5	18,5	3,3
200	29	15,5	0
400	24	12	0,5

Tabuľka 5 ukazuje účinok kanamycínu na percentuálne množstvo polovičných meristémov, vykazujúcich expresiu glukuronidázy. 25 až 30 % ostreľovaných a spoločne kultivovaných polovičných meristémov poskytuje najmenej jeden výhonok, vykazujúci glukuronidázu vo forme škvriek pri akejkoľvek použitej koncentrácii kanamycínu. Výber pri vysokej koncentrácii kanamycínu (200 mg/l alebo 400 mg/l) slabo znižuje percentuálne množstvo polovičných meristémov, poskytujúcich výhonky so škvrnami GUS+, ale citeľne znižuje percentuálne množstvo polovičných meristémov, poskytujúcich výhonky s rozsiahlymi oblasťami GUS+. Len koncentrácie 50 mg/l a 100 mg/l umožňujú získať po výbere 3,3 % úplne transformo-

vaných výhonkov. Koncentrácia kanamycínu 50 mg/l bola zvolená pre štandardný protokol (opisuje obrázky 3 a 4); pri tejto koncentrácii je možné získať odolné výhonky, vykazujúce glukuronidázu, rutinným spôsobom a vo zvýšenom množstve.

Príklad 7

Účinnosť transformácie rôznych genotypov slnečnice

Schopnosť polovičných meristémov vegetatívneho delenia a novotvorby novoformovaných listových meristémov

V predbežnom pokuse bolo testovaných 50 línií slnečnic vzhľadom na schopnosť indukovať pazušné výhonky z polovičných meristémov a novoformovaných listových meristémov na listoch výhonkov. Všetky testované línie regenerujú pazušné výhonky z polovičných meristémov v percentuálnom množstve, pohybujúcom sa od 20 do 90 %. Všetky testované línie poskytujú 7 až 44 % polovičných meristémov, vytvárajúcich pazušné výhonky, nesúce novoformované listové meristémy na vrchnom povrchu listov. Viac než 60 % testovaných línií poskytuje najmenej 20 % polovičných meristémov, regenerujúcich pazušné výhonky s novoformovanými listovými meristémami na listoch.

Schopnosť transformácie polovičných meristémov

Z 50 línií ich bolo 10, vykazujúcich najsilnejšiu schopnosť vegetatívneho rozmnožovania výhonkami a iniciácie meristémov, vybraté na vyhodnotenie účinnosti genetickej transformácie polovičných meristémov.

Približne 200 polovičných meristémov u každého zo 16 línií bolo ostreľovaných a spoločne kultivovaných s kmeňom LBA 4404 (pGA 492-GI) a následne kultivovaných v médiu M2; obsahujúcom 400 mg/l augmentínu a 50 mg/l kanamycínu po dobu 6 týždňov (podľa protokolu, opísaného v príklade 3).

Po 6 týždňoch výberu (selekcia) výhonkov, odolných voči kanamycínu (50 mg/l), poskytlí všetky testované línie najme-

nej jeden polovičný meristém, vytvárajúci pazušné výhonky odolné voči kanamycínu, čo ukazuje, že opísaný spôsob umožňuje získať u 100 % testovaných línií slnečníc úplne transformované rastliny slnečnice (tabuľka 6).

Účinnosť transformácie sa pohybuje od 0,5 do 6 % v závislosti na líniách. Línie, poskytujúce najvyššiu účinnosť transformácie (LG15, LG60 a LG61) majú aj najsilnejšiu schopnosť vegetatívneho rozmnožovania z polovičných meristémov, čo naznačuje pozitívny vzťah (koreláciu) medzi schopnosťou transformácie spôsobom, opísaným vo vynáleze a schopnosťou regenerácie z polovičných meristémov.

Tabuľka 6

línie slnečníc	% polovičných meristémov, poskytujúcich pazušné výhonky	% polovičných meristémov, poskytujúcich výhonky s novoformovanými listovými meristémami	účinnosť transformácie
HA 300	78,5	17,5	2,5
LG 1	65	42,5	0,5
LG 15	85	44,5	3,4
RHa 356	71	43,5	2
RHa 362	46	37,5	0,5
RHa 274	70,5	13,5	2,6
RHa 297	66	39,5	1,4
RHa 359	66	39,5	2,3
LG 60	90	nemerané	3,6
LG 61	90	nemerané	6

Príklad 8

Analýza transformovaných rastlín, regenerovaných z polovičných meristémov a ich rodové línie

Výhonky odolné voči kanamycínu, prenesené do systému SORBAROD a aklimatizované v skleníku (príklad 3), sú kultivované v skleníku. Na týchto rastlinách sa vyvíja niekoľko odnoží, každá s jedným úborom.

Analýzy aktivity glukuronidázy boli vykonané u každej rastliny a každej odnoži. U každej odnoži bol test aktivity glukuronidázy vykonaný na jednom liste, na jednom jazýčkovitom kvete (kvet, umiestnený na obvode úboru, majúceho korunný plátok) a na jednom kvietku kvetenstva, (vnútorný kvet úboru, bez korunného plátku). Cieľom analýzy aktivity GUS je stanovenie percentuálneho množstva úplne transformovaných rastlín, ktoré poskytujú rodovú líniu, v ktorej sa zavedené gény (gén NPT II a gén GUS) delia podľa mendelovského spôsobu. Takéto rastliny musia byť zložené z transformovaných buniek vo všetkých tkanivách a orgánoch a najmä v okvetných orgánoch, obsahujúcich vajíčka a peľ, ktoré po opelení poskytujú zygoténny klíček (zárodok), obsiahnutý v semene. Rastlina je považovaná za úplne transformovanú, pokiaľ vykazuje aktivitu GUS vo všetkých svojich odnožiach, listoch, kvetoch a jazýčkovitých kvietkoch.

Tabuľka 7 ukazuje, že 92 % transformovaných rastlín, kultivovaných v skleníku technikou, opísanou v tomto vynáleze, je úplne transformovaných; u týchto rastlín všetky odnože nesú listy, jazýčkové kvety a kvietky kvetenstva, vykazujúce aktivitu glukuronidázy.

Tabuľka 7

rastliny TO, úplne GUS+	rastliny TO, listy GUS+, kvety GUS-	rastliny TO, odnože GUS+, odnože GUS-
92 %	6,5 %	1,5 %

Oproti tomu, 8 % transformovaných rastlín vykazuje vlastnosti chimerických rastlín:

- 1,5 % rastlín má niektoré odnože, ktorých listy a úbory vykazujú aktivitu GUS+ a iné odnože, ktorých listy a úbory

glukuronidázovú aktivitu nevykazujú.

Tieto chimerické rastliny pochádzajú z výhonkov, ktorých niektoré pazušné pupene boli transformované a iné pazušné pupene neboli transformované.

- 6,5 % rastlín má odnože, ktorých listy vykazujú glukuronidázovú aktivitu a ktorých kvietky kvetenstva alebo jazýčkové kvety glukuronidázu nevykazujú.

Tieto chimerické rastliny pochádzajú z výhonkov, ktorých pazušné pupene, zložené z buniek transformovaných na úrovni meristémového vegetatívneho okružia, pochádzajúcich z vegetatívnych častí (listy, stonky a listové stopky) a z buniek netransformovaných na úrovni dreňovej časti meristému, pochádzajúcich z kvetných a reprodukčných orgánov.

Percentuálne množstvo získaných chimerických rastlín je slabé (8 %). V technike, opísanej v tomto vynáleze, sú rastliny, majúce jazýčkový kvet alebo kvietok kvetenstva, nevykazujúce glukuronidázovú aktivitu, považované za chimerické a eliminujú sa.

Úplne transformované rastliny sú samoopelené niekoľkými po sebe nasledujúcimi úspešnými preletmi na rozloženie peľu na každý úbor. Následne sa jeden až dva mesiace po opelení zberajú semená. Semená sa upravujú 5 hodinovým namáčaním do éteru (0,1% roztok vo vode), vylupujú sa a sterilizujú (podľa protokolu, opísaného v príklade 1). Sterilné semená sa potom ponechajú klíčiť v médiu MO, obsahujúcom 100 mg/l kanamycínu, v kultivačných miskách Phytatray (Sigma ref. P1552). Po 15 dňoch klíčenia sú transformované klíčiace rastliny, odolné voči kanamycínu, zelené a rozvíjajú zelené listy. Klíčiace rastlinky, ktoré sú citové voči kanamycínu, sú biele a nevyvíjajú ani korienok, ani zelené listy.

Test glukuronidázovej aktivity sa vykonáva so zelenými listami klíčiacich rastliniek, odolných voči kanamycínu.

Stanovené sú percentuálne množstvá klíčiacich rastliniek, odolných voči kanamycínu a percentuálne množstvo rastlín, vykazujúcich gén GUS (tabuľka 8).

Tabuľka 8

línia T1	počet zasiatych semien	% semien, odolných voči kanamycínu	% semien GUS+
90-2	37	78	76
84-1-2	40	72	ND
79-1	51	74	20
107-1	8	38	38
139-6	14	35	35
80-1	34	71	71
NT	40	0	0

Delenie (segregácia) génov GUS a NPT II v rodových líniách úplne transformovaných rastlín sleduje mendelovský typ delenia, pretože takmer vo všetkých prípadoch najmenej 3/4 rastlín vykazuje gén NPT II alebo gény GUS a 1/4 rastlín je netransformovaných. Tieto výsledky potvrdzujú, že produkčné rastliny sú úplne transformované a nie sú chimerické.

Molekulárne analýzy týchto transgénických rastlín boli vykonané na určenie počtu miest inzercii, počtu kópií TDNA a na zakreslenie okrajov inzertu (nukleotidové sekvencie, vložené do inej nukleotidovej sekvencie).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob produkcie transgénických rastlín, úplne transformovaných v generácii T_0 , v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje:

- a) krok genetickej transformácie meristémového explantátu a
- b) krok selektívnej kultivácie, umožňujúci zo všetkých transformovaných buniek, špecifický vývoj takých buniek, ktoré vychádzajú zo sekundárnych meristémov a/alebo buniek, ktoré sú schopné vytvoriť novoformované listové meristémy;
- c) regeneráciu transgénických rastlín, vychádzajúcu z bunkového materiálu, získaného v kroku (b).

2. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že etapa selektívnej kultivácie dovoľuje získanie úplne transformovaných sekundárnych meristémov a prípadne novoformovaných listových meristémov, úplne transformovaných a zahrnuje:

- i) kultiváciu meristémového explantátu, ktorý prešiel krokom transformácie, v selektívnom prostredí;
- ii) odobranie transformovaných pazušných pupeňov a prípadne transformovaných novoformovaných pazušných pupeňov, získaných v priebehu etapy (i);
- iii) kultiváciu transformovaných pupeňov, získaných podľa (ii), v selektívnom prostredí;
- iv) opakovanie etáp (ii) a (iii) ešte najmenej raz.

3. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pred etapou transformácie je meristémový explantát podrobený etape predkultivácie v dĺžke trvania 5 až 30 dní, s výhodou potom v dĺžke 5 až 8 dní, v kultivačnom médiu, obsahujúcom cytokinín.

4. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa meristémový explantát skladá z primárneho meristému, alebo novoformova-

ného listového pupeňa alebo aj z oddeleného mladého listu, regenerovaného počínajúc od primárneho alebo sekundárneho meristému a obsahujúceho bunky, schopné dať vzniknúť novotformovaným listovým meristémom.

5. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že etapa transformácie zahrnuje ostreľovanie najmenej jednej časti explantátu mikročasticami, po ktorom nasleduje uvedenie ostreľovaného explantátu do styku s mikroorganizmom *Agrobacterium*, obsahujúcim najmenej jednu sekvenciu nukleovej kyseliny, určenú na zavedenie do meristémových buniek.

6. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že etapa transformácie zahrnuje ostreľovanie najmenej jednej časti explantátu mikročasticami, pokrytými DNA, ktorá je určená na zavedenie do meristémových buniek.

7. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že etapa transformácie zahrnuje uvedenie explantátu do styku so suspenziou mikroorganizmu *Agrobacterium*.

8. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sekvencia nukleovej kyseliny, určená na zavedenie do rastlinných buniek, prenáša gén odolnosti voči hmyzu, voči herbicidom, voči hubovitým ochoreniam (napríklad *Sclerotinia sclerotorium* alebo *Botrytis cinerea*), jeden alebo viac génov zásobných bielkovín semien alebo zlepšujúcich kvalitu zásobných bielkovín, sekvencie, pozmeňujúce dozrievanie ovocia, sekvencie poskytujúce odolnosť voči vírusom, jeden alebo viac génov, zapojených v metabolizme mastných kyselín alebo aminokyselín alebo jeden alebo viac génov, zúčastňujúcich sa samčej sterility.

9. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 5 až 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sekvencia nukleovej kyseliny, určená na zavedenie do rastlinných buniek, zahŕňa sekvenciu, kódujúcu činidlo, ktoré umožňuje selekciu transformantov, napríklad činidlo, poskytujúce odolnosť voči antibiotiku ako je kanamycín.

10. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že *Agrobacterium* je *Agrobacterium tumefaciens*, napríklad kmeň LBA 4404, obsahujúci binárny vektor, napríklad pGA492-GI.

11. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kultivačným médiom, použitým počas etáp predkultivácie, spoločnej kultivácie a selekcie (výberu) je médium MS, doplnené približne 0,05 až 2,0 mg/l BAP, s výhodou potom 0,1 mg/l BAP, a pokiaľ sa jedná o médium na selekciu, najmenej jedným selekčným činidlom, napríklad kanamycínom a prípadne bakteriostatickými činidlami.

12. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že médium je taktiež doplnené, počas etáp predkultivácie a spoločnej kultivácie, fenolickou zlúčeninou, napríklad acetosyringonom, schopným aktivovať gény vir mikroorganizmu *Agrobacterium*.

13. Spôsob produkcie transgénických rastlín podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že meristémový explantát pochádza z bavlníka, z olejnatej rastliny, napríklad slnečnice (*Helianthus annuus*), z druhov, patriacich medzi strukoviny, ako je hrach (*Pisum sativum*), fazuľa (*Phaseolus vulgaris*) alebo aj z druhov, patriacich k tekvicovitým rastlinám, ako je tekvica (*Curcubita pepo*).

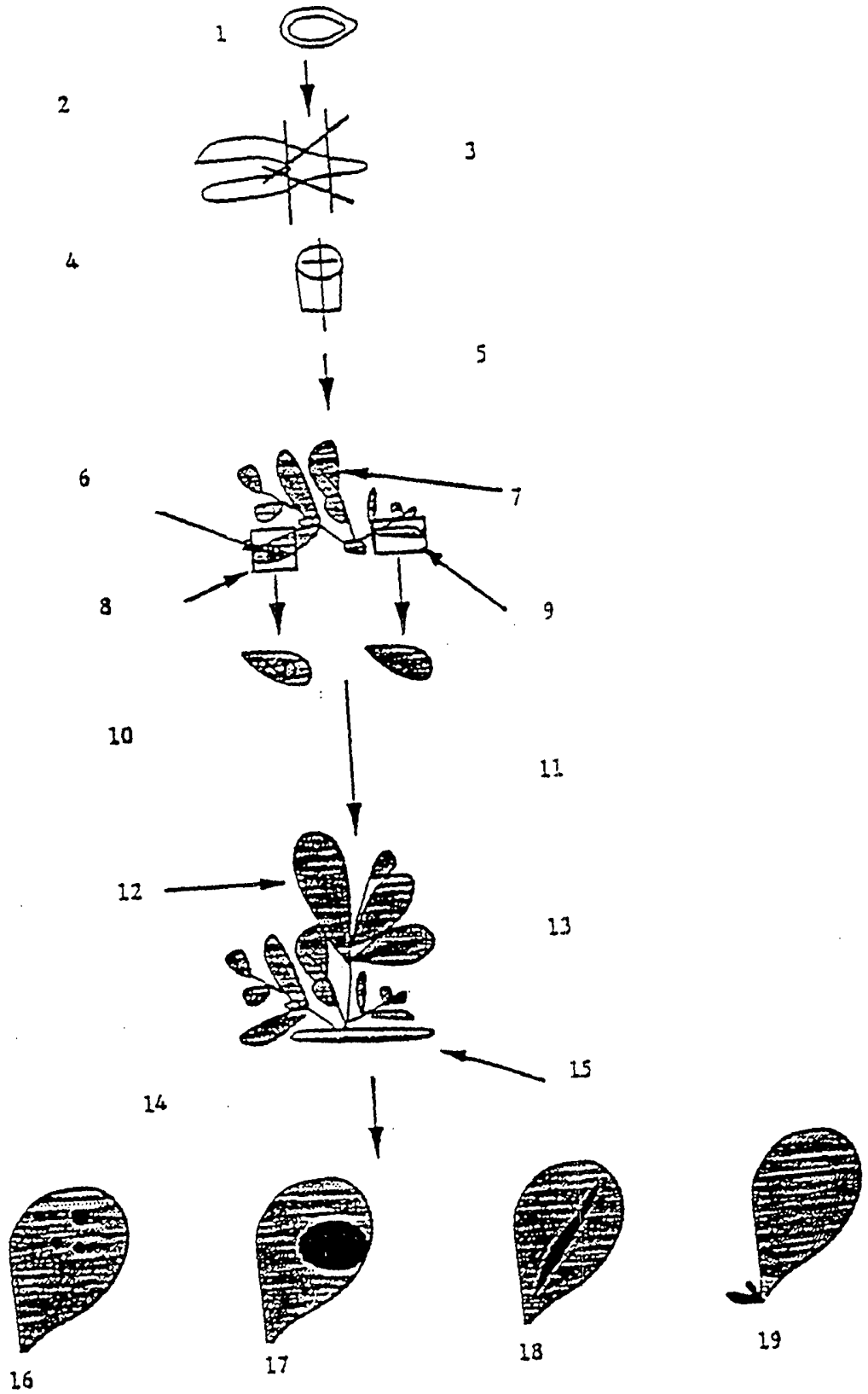
14. Spôsob produkcie úplne transformovaných sekundár-

nych meristémov alebo úplne transformovaných novoformovaných listových meristémov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje:

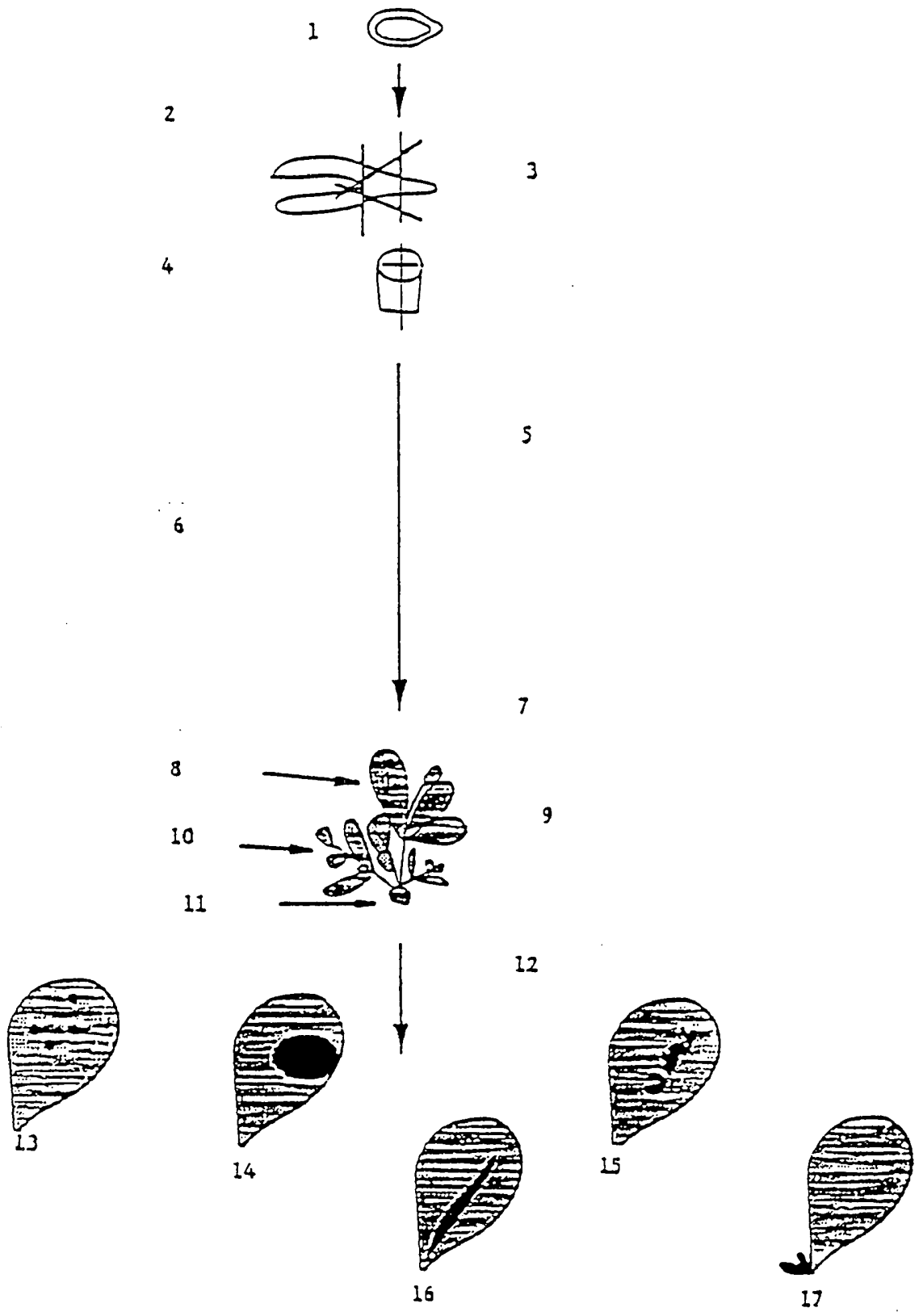
- i) uskutočnenie etapy genetickej transformácie meristémových explantátov;
- ii) kultiváciu explantátov, ktoré podstúpili etapu transformácie, v selektívnom prostredí;
- iii) odobratie transformovaných pazušných pupeňov a prípadne transformovaných listových pupeňov, získaných v priebehu etapy (ii);
- iv) kultiváciu transformovaných pupeňov, získaných podľa (iii), v selektívnom prostredí;
- v) opakovanie, najmenej raz, etáp (iii) a (iv).

15. Spôsob podľa nároku 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že meristémy pochádzajú zo slnečnice.

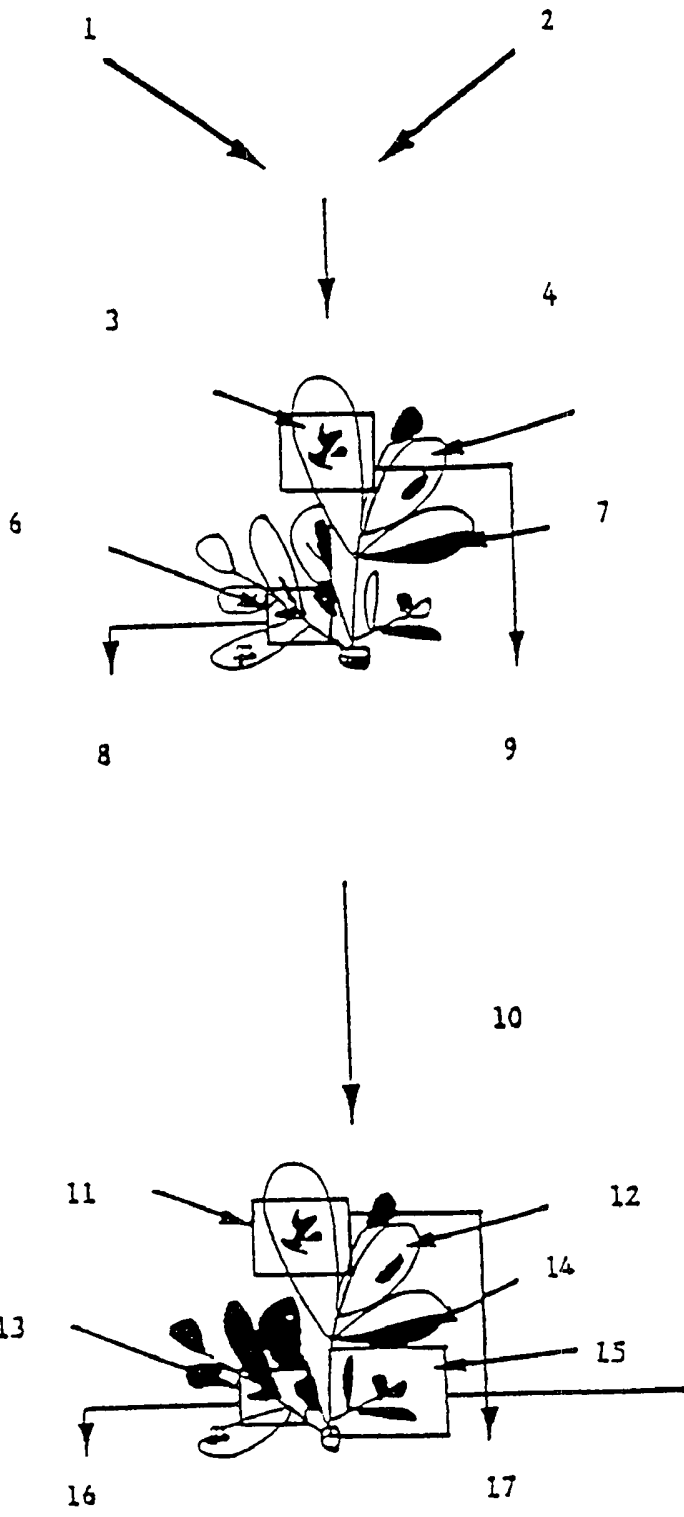
16. Úplne transformované sekundárne meristémy a úplne transformované novoformované meristémy, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že je ich možné získať spôsobom podľa nároku 14 alebo nároku 15.



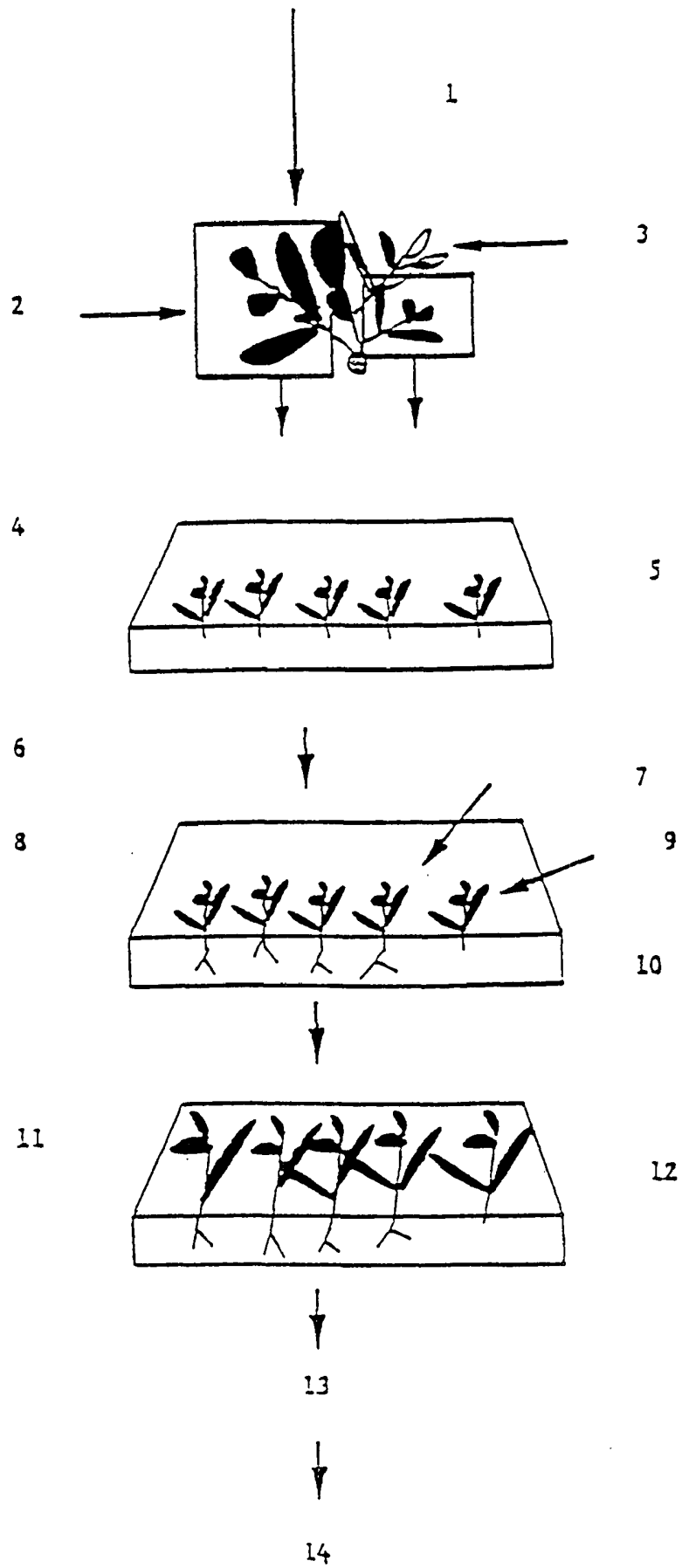
OBR. 1



OBR. 2



OBR. 3



OBR. 4