

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: Ing. Andrea Hricová, PhD.	Evidenčné číslo projektu: APVT-51-0286/02
Názov projektu: Inovatívne biotechnologické prístupy ku skvalitneniu šľachtiteľského procesu pri ľane	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
--	--

Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače alebo pripravované):	PREŤOVÁ, A. – OBERT, B. – BARTOŠOVÁ, Z. Flax Biotechnology. In: LORZ, H. – WILDHOLM, J.M. (eds.): Biotechnology in Agriculture and Forestry – Transgenic crops VI. Springer, Heildberg, 2006 , v tlači
<i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	BARTOŠOVÁ, Z. – OBERT, B. – TAKÁČ, T. – KORMUŤÁK, A. – PREŤOVÁ, A. Using enzyme polymorphism to identify the gametic origin of flax regenerants. In: Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica , 47, 2005, p. 173-178
	OBERT, B. – BENSON, E. – MILLAM, S. – PREŤOVÁ, A. – BREMNER, D. Moderation of morphogenic and oxidative stress responses in flax <i>in vitro</i> cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. In: Journal of Plant Physiol. , 162, 2005, p. 537-547
	PREŤOVÁ, A. – ŠAMAJ, J. – OBERT, B. Cytological, physiological and biochemical aspects of somatic embryo formation in flax. In: MUJIB, A. – ŠAMAJ, J. (eds.): Somatic embryogenesis. Springer, Heildberg, 2005 , p. 235-245
	OBERT, B. – BARTOŠOVÁ, Z. – PREŤOVÁ, A. Dihaploid production in flax by anther and ovary cultures. In: Journal of Natural Fibers , 1, 2004, p. 1-14

V čom vidíte uplatnenie výsledkov tohto projektu:	Podarilo sa nám izolovať čiastočné fragmenty génov chitinázy a glukanázy, ktoré predstavujú prvé známe sekvencie chitinázy a glukanázy izolovaných pri druhu <i>Linum</i> . Z našich výsledkov vyplýva, že ich možno považovať za pravdepodobné markéry embryogénneho vývinu. Výsledky tohto projektu taktiež prispievajú k rozšíreniu vedeckých poznatkov týkajúcich sa genetickej transformácie ľanu siateho, predvídateľnej génovej expresie transgénov a zabezpečenia jej stability.
---	--

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas ku zverejneniu údajov v nej uvedených.

Podpis riešiteľa:

Dátum:

Charakteristika výsledkov

Evidenčné číslo: APVT-51-0826/02

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Projekt bol zameraný hlavne na prípravu účinných regeneračných a transformačných metód pre ľan, inkorporáciu génov pre vylepšenie významných ekonomických vlastností a využitie týchto postupov v modernom šľachtení ľanu. Taktiež na produkciu homozygotných línií ľanu využitím dihaploidov a gametickej embryogenézy.

S cieľom zvýšiť odolnosť ľanu voči hubovým patogénom sme metódou genetickej transformácie pomocou *A. tumefaciens* vniesli do genómu ľanu gény kódujúce uhorkovú chitinázu triedy III a tabakovú glukanázu triedy I, oba pod kontrolou konštitutívneho dCaMV35S. Sledovali sme antifungálny účinok hrubých proteínových extraktov získaných z transgénnych rastlín. *In vitro* antifungálne testy nepreukázali ich výrazný inhibičný efekt na rast testovaných húb. Prítomnosť PR proteínov vnesených do genómu ľanu teda významne nezvyšila rezistenciu k hubovým ochoreniam. Zaoberali sme sa tiež problematikou expresie transgénov a jej variability medzi jednotlivými transformantami. Pozornosť sme venovali úlohe rastlinných MAR sekvencií v stabilizovaní génovej expresie. Porovnanie variability génovej expresie v +MAR populácii transgénnych rastlín s variabilitou pozorovanou v -MAR populácii naznačuje, že tieto DNA sekvencie zohrávajú dôležitú úlohu v redukcii pozičného efektu a génového „silencingu“.

Študovali sme tiež proces somatickej embryogenézy a hľadali sme markéry pre embryogénnu kompetenciu izolovaných pletív ľanu. Izolovali sme a charakterizovali 2 čiastočné cDNA sekvencie chitináz ľanu: chitinázu II. (*FlaxChit1*-AY847514) a IV. triedy (*FlaxChit2* -DQ194379). Akumulácia transkriptov chitináz v zygotových embryách a embryu-podobných štruktúrach naznačuje ich priamu úlohu v procese embryogenézy. Izolovali sme taktiež fragment ľanovej glukanázy (*FlaxGluc*-AY780204), ktorá rovnako ako obe nami popísané chitinázy, je vôbec prvou glukanázou izolovanou z pletív ľanu. Expresia tohto génu vo vyvíjajúcich sa globulárnych zygotových embryách a štruktúrach pripomínajúcich somatické embryá poukazuje na jej určitú úlohu v embryogenéze ľanu, jej prítomnosť v meristematických vrcholoch embryí aj na prípadnú úlohu počas klíčenia zrelých embryí. Získané čiastočné sekvencie sú vhodným objektom pre ďalšie štúdium širokého spektra chitináz a glukanáž pri druhu *Linum usitatissimum*.

V ďalšej časti sme optimalizovali regeneračný protokol peľnicovej kultúry ľanu. Regenerácia výhonkov na kalusoch sa realizovala výhradne cestou organogenézy. Regenerované, zakorenené rastliny mali vo väčšine prípadov diploidný počet chromozómov, ako ukázala karyologická analýza koreňových špičiek. Po prvý raz sme popísali gynogénnu cestu regenerácie di(haploidov) z kultúry vajčiek segmentov semenníkov, i keď schopnosť regenerácie bola nižšia v porovnaní s kultúrou peľníc. Gynogénny pôvod regenerovaných rastlín sme dokázali metódou izoenzymového fingerprintu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

This project has been focused mainly on preparation of efficient flax regeneration and transformation methods, incorporation of the genes to improve economically important features and applying of these procedures in modern flax breeding. We have been also focused on production of homozygous lines using dihaploids and gametic embryogenesis.

With the aim to improve flax resistance to phytopathogens we used genetic transformation by *A. tumefaciens* to transfer genes encoding cucumber chitinase of class III and tobacco glucanase of class I into flax genome. Both genes were under the control of constitutive dCaMV35S promoter. We have investigated antifungal effect of proteins isolated from flax transgenic plants. *In vitro* antifungal tests did not show significant inhibition effect on growth of tested phytopathogens. Therefore, the presence of PR proteins transferred into flax genome did not increased the resistance to pathogenes. We also dealt with problems of transgene expression and its variability between individual transformants. Particular attention was given to the putative role of a plant MAR sequences in stabilising gene expression. Comparing the variation of transgene expression in +MAR transgenic population with variation observed in -MAR population indicates the effect and important role of these DNA sequences in reduction of position effect and gene silencing.

We have studied the process of somatic embryogenesis and looked for markers of embryogenic potential in flax tissues. Two partial cDNA sequences of chitinase were isolated and characterised: chitinase of class II and class IV (*FlaxChit1*-AY847514 and *FlaxChit2* -DQ194379, respectively). Accumulation of the chitinase transcripts in zygotie embryos and embryo-like structures indicates their direct role in embryogenesis. Dominant coding region of flax glucanase (*FlaxGluc*-AY780204) was isolated and like fragments of chitinases represents the first reported sequence of glucanase isolated from flax. Expression pattern of glucanase in globular zygotie and somatic embryos indicates particular role in embryogenesis while its presence in shoot apical meristems indicates putative role in germination. These obtained sequences we use for further studies of other chitinase and glucanase genes in *Linum usitatissimum*. Apart of this we optimized regeneration procedure of anther flax cultures and achieved induction of shoots derived from calli by organogenesis. Obtained plants were mostly diploids as proved by karyologic analysis. For a first time gynogenic pathway of regeneration of flax di(haploid) plants was described, although regeneration ability was lower in comparison with anther culture. Gametic origin of the regenerants was proved on the basis of the isozyme spectra analysis.

Podpis riešiteľa: