

Závěry

- U suspenzních kultur buněčné linie tabáku BY-2 odvozených z kalusů po transformaci bylo po transformaci téměř 90 % linií tvořeno buňkami s různou mírou fluorescence GFP.
- Nově zavedená metoda klonování umožnila získání téměř poloviny klonů s homogenní expresí *GFP* z primárně heterogenních linií BY-2.
- Heterogenita exprese *GFP* u transgenních linií BY-2 měla původ jednak genetický (primární linie obsahovaly buňky s různými inzercemi T-DNA) a jednak epigenetický.
- Epigenetická heterogenita linií BY-2 souvisela s umlčováním transgenů, tvorbou stabilních epigenetických stavů brzy po transformaci a „permanentní heterogenitou“ projevující se kolísavými změnami v expresi *GFP*.
- Snížení nebo umlčení exprese transgenů u bramboru bylo pozorováno přednostně u linií s vyšším počtem insercí T-DNA a s vyšší počáteční expresí *GFP*.
- Umlčení vždy postupně postihlo oba vnesené geny, přičemž vymizení exprese *GFP* předcházelo (v řádu měsíců) ve všech sledovaných případech ztrátě rezistence ke kanamycinu (umlčení genu *NPTII*), což naznačuje vzájemné propojení mezi umlčováním obou transgenů.
- Stejná posloupnost v umlčení obou transgenů byla také pozorována u umlčených linií po obnovení exprese transgenů 5-azacytidinem, který způsobuje demetylaci DNA.
- Byl navržen možný mechanismus postupného umlčování transgenů v rámci celých rostlin zahrnující čtyři následné kroky: 1) posttranskripční umlčení exprese (PTGS) genu pro GFP vyvolané zřejmě náhodně v jedné či více buňkách rostliny; 2) rozšíření po celé rostlině prostřednictvím siRNA; 3) přechod PTGS na transkripční umlčování *GFP* prostřednictvím metylace promotoru; 4) rozšíření metylace na sousední sekvenci *NPTII*.
- Analýza inhibičního efektu 5-azacytidinu na vrcholové segmenty rostlin bramboru umožnila stanovení poločasu rozpadu 5-azacytidinu v kultivačním médiu na přibližně dva dny.
- U obou rostlinných materiálů došlo k účinnému obnovení exprese transgenů 5-azacytidinem pouze při aplikaci k intenzivně se dělícím buňkám.
- Kombinací přechodného ošetření listových segmentů bramboru 10 μ M 5-azacytidinem a *de novo* regenerací na selekčním médiu s kanamycinem byla optimalizována metoda získávání rostlin bramboru s přechodně nebo stabilně obnovenou expresí dříve umlčených transgenů.