

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Niko PAVLIN

**SPREMLJANJE ZELENO FLUORESCENTNEGA *gfp*  
GENA PRI TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Niko PAVLIN

**SPREMLJANJE ZELENO FLUORESCENTNEGA *gfp* GENA PRI  
TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**OBSERVATION OF GREEN FLUORESCENT *gfp* GENE IN  
TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Zlato Luthar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:                   prof. dr. Marijana JAKŠE  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član:                           prof. dr. Zlata LUTHAR  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član:                           prof. dr. Jernej JAKŠE  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Niko Pavlin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 633.71:577.2:631.528(043.2)  
KG *Nicotiana tabacum/gfp* gen/*nptII* gen/uspešnost transformacije/ izražanje transgenov/ DNA analiza  
KK AGRIS F30  
AV PAVLIN, Niko  
SA LUTHAR, Zlata (mentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2014  
IN SPREMLJANJE ZELENO FLUORESCENTNEGA *gfp* GENA PRI TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 34 str., [5] str., 5 pregl., 12 sl., 1 pril., 40 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Listne izsečke tobaka (skupno 110 izsečkov) smo transformirali z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) sev LBA4404 in plazmidom pBIN mgfp5-ER, ki vsebuje eno kopijo zeleno fluorescentnega *gfp* gena (60 izsečkov) in s plazmidom pART27 2mgfp5-ER, ki vsebuje dve kopiji *gfp* gena (50 izsečkov). Oba plazmida imata vgrajen še selekcijski *nptII* gen za odpornost na antibiotik kanamicin. Prisotnost zeleno fluorescentnega *gfp* proteina smo z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznim setom filtrov zasledili v posameznih celicah 3 dni po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER in po 6 dneh tudi v celicah transformiranih z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER. Izražanje *gfp* gena oz. sinteza *gfp* proteina po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER je bila hitrejša in intenzivnejša, saj je bila opazovana fluorescanca močnejša. Regeneracija je bila po okužbi *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER v večini primerov direktna, brez vmesne faze kalusa in hitrejša, saj so prve globularne strukture nastale že 10–12 dni po transformaciji ter dosežena je bila 204 % regeneracija. Prve globularne strukture po okužbi z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER so se pojavljale šele po 18 dneh, nastalo je več kalusa in regeneracija je bila manjša, samo 78,4 %. Pri vseh 149 nastalih regenerantih smo z dupleks PCR analizo potrdili prisotnost fragmentov dolžine 650 bp, značilnih za selekcijski *nptII* gen in fragmentov dolžine 422 bp, značilnih za markerski *gfp* gen. Oba uporabljeni plazmida sta primerna za transformacijo tobaka, vendar je bistveno boljši plazmid pART27 2mgfp5-ER.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 633.71:577.2:631.528(043.2)  
CX *Nicotiana tabacu/gfp* gene/*nptII* gene/transformation efficiencies/transgene expression/DNA analysis  
CC AGRIS F30  
AU PAVLIN, Niko  
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2014  
TI OBSERVATION OF GREEN FLUORESCENT *gfp* GENE IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 34 p., [5] p., 5 tab., 12 fig., 1 ann., 40 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Tobacco leaf explants (together 110 leaf explants) were transformed by bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) strain LBA4404 and plasmid pBIN mgfp5-ER, which has a single copy of the green fluorescent *gfp* gene (60 leaf explants) and by plasmid pART27 2mgfp5-ER, which has two copies of the *gfp* gene (50 leaf explants). Both plasmids have a built-in selection *nptII* gene for resistance to the antibiotic kanamycin. The presence of the green fluorescent mGFP-ER protein was detected with the epifluorescent microscope and appropriate set of filters in the individual cells 3 days after transformation with *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER and after 6 days in cells transformed with *A. t.*-pBIN mgfp5-ER. The *gfp* gene detection and *gfp* protein synthesis respectively was faster and more intensive after transformation with *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, since it was observed fluorescence stronger. After infection by *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, in most cases the regeneration was direct, without intermediate stages of callus and faster, as the first globular structures were formed 10–12 days after transformation and a 204 % regeneration was achieved, while the first globular structure, after infection with *A. t.*-pBIN mgfp5-ER, occurred after 18 days and formed more callus and the regeneration was only 78.4 %. The duplex PCR analysis, performed on all 149 resulting regenerants, confirmed the presence of fragments of length 650 bp specific to the selection *nptII* gene and length of 422 bp specific for *gfp* marker gene. Both plasmides used are suitable for tobacco transformation, where the plasmid pART27 2mgfp5-ER presented better outcome.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 NAVADNI TOBAK ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	2
2.2 TRANSFORMACIJE GENOV	3
<b>2.2.1 Vnos genov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	4
<b>2.2.2 Markerski geni</b>	6
2.2.2.1 Zeleno fluorescentni protein – <i>gfp</i>	7
<b>2.2.3 Seleksijski geni</b>	8
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>10</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	10
3.2 SESTAVA GOJIČ	10
3.3 PRIPRAVA GOJIČ	11
3.4 BAKTERIJA IN PLAZMIDI	11
<b>3.4.1 Plazmid pBIN mgfp5-ER</b>	11
<b>3.4.2 Plazmid pART27 2mgfp5-ER</b>	12
3.5 TRANSFORMACIJA TOBAKA	12
3.6 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA	13
3.7 FENOTIPSKO IZRAŽANJE <i>gfp</i> GENA	13
3.8 ANALIZA PRISOTNOSTI <i>gfp</i> GENA S PCR METODO	14
<b>3.8.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva</b>	14
<b>3.8.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom</b>	15
<b>3.8.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</b>	15
<b>3.8.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno gelsko elektroforezo</b>	16
<b>4 REZULTATI</b>	<b>17</b>
4.1 FENOTIPSKO IZRAŽANJE <i>gfp</i> GENA	17
4.2 REGENERACIJA LISTNIH IZSEČKOV TOBAKA	19
4.3 MOLEKULSKA ANALIZA VKLUČENOSTI TRANSGENOV S PCR METODO	19
<b>4.3.1 Genski konstrukt A. t.-pBIN mgfp5-ER</b>	19

<b>4.3.2</b>	<b>Genski konstrukt A. t.-pART27 2mgfp5-ER</b>	20
4.4	KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA	22
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	26
5.1	RAZPRAVA	26
5.2	SKLEPI	28
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	29
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	31
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: MS bazalno gojišče za rast in mikropropagacijo rastlin tobaka (Murashige in Skoog, 1962)	10
Preglednica 2: MSr gojišče za regeneracijo rastlin tobaka (Stolarz in sod., 1991)	10
Preglednica 3: YEB gojišče za rast in namnoževanje <i>A. t.</i> LBA4404	11
Preglednica 4: Sestava MSr gojišč kontrolnega poskusa z neokuženimi listi tobaka	13
Preglednica 5: DNA nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov za posamezen transgen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta	15

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Navadni tobak ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) (Sullivan, 2001)	3
Slika 2: Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Matthysse in sod., 2008)	4
Slika 3: Prenos T-DNA iz bakterijske v rastlinsko celico (Transfection ..., 2008)	6
Slika 4: Meduza <i>Aequorea victoria</i> : A – pri navadni svetlobi; B – pri dolgovalovni UV svetlobi (The Nobel ..., 2013)	7
Slika 5: Struktura zeleno fluoroscentnega proteina – <i>gfp</i> (Green ..., 2013)	8
Slika 6: T-DNA plazmida pBIN m-gfp5-ER (Haseloff in sod., 1997)	12
Slika 7: Epifluorescentni mikroskop z ustreznim setom filtrov za spremljanje <i>gfp</i> proteina	14
Slika 8: Izražanje <i>gfp</i> gena na listnih izsečkih tobaka nekaj dni po trasformaciji s plazmidom pART27 2mgfp5-ER: levo z navadno svetlobo; desno s fluorescentno svetlobo in ustreznimi filterji za detekcijo zelene fluorescence <i>gfp</i> proteina	17
Slika 9: Izražanje <i>gfp</i> gena v somatskih embrijih oz. v formirajočih regenerantih tobaka po trasformaciji s plazmidom pART27 2mgfp5-ER: levo z navadno svetlobo; desno s fluorescentno svetlobo in ustreznimi filterji za detekcijo zelene fluorescence <i>gfp</i> proteina	18
Slika 10: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji po transformaciji tobaka z <i>A. t.</i> -pBIN mgfp5-ER s parom začetnih oligonukleotidov za <i>gfp</i> gen (422 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za <i>nptII</i> gen (650 bp) od 1 do 46 in 149, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pBIN mgfp5-ER, S – slepi vzorec, M – velikostni standard	20
Slika 11: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji po transforamciji tobaka z <i>A. t.</i> -pART27 2mgfp5-ER s parom začetnih oligonukleotidov za <i>gfp</i> gen (422 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za <i>nptII</i> gen (650 bp) od 47 do 148, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pART27 2mgfp5-ER, S – slepi vzorec, M – velikostni standard	21
Slika 12: Neokuženi izsečki listov tobaka – kontrole, bonitirano 11 in 19 dni po inokulaciji na ustreznom selekcijskem MSr gojišču: K1 – gojišče brez dodatkov; K2 – gojišče z acetosiringonom (100 µM); K3 – gojišče kanamicinom (300 mg/l); K4 – gojišče s timentinom (150 mg/l); K5 – gojišče s kanamicinom (300 mg/l) in s timentinom (150 mg/l)	24

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A. <i>t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
GFP	zeleno fluorescentni protein (green fluorescent protein) iz meduze <i>Aequorea victoria</i>
MS	Murashige in Skoog gojišče
MSr	MS regeneracijsko gojišče
NPT	neomicin fosfotransferaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
T-DNA	del Ti-plazmida, ki se vključi v genom rastline – transfer DNA
Ti-plazmid	plazmid iz A. <i>t.</i> , ki povzroča novotvorbe pri rastlinah (tumour inducing plasmid)

## 1 UVOD

Žlahtnenje rastlin s pomočjo transformacij je postopek, kjer izbrani sorti s pomočjo genskega inženiringa vnesemo želene lastnosti. V rastline vnašamo točno določene lastnosti iz drugih rastlin ali organizmov. Prednost genskih transformacij je, da delamo ciljno s posameznimi geni in dobimo v krajšem času rastline z vnesenimi točno želenimi geni. Tako se izognemo postopkom odstranjevanja neželenih genov s povratnimi križanji.

Za vzpostavitev transformacijskega sistema uporabljamo markerske oziroma testne gene, ker so njihovi produkti lahko določljivi. Za ločevanje transformiranih tkiv od netransformiranih pa uporabljamo selekcijske gene. Selekcijski geni s svojim delovanjem dajejo prednost celicam, tkivom, ki imajo ta gen vključen. Uničujejo netransformirane celice in dajejo prednost v rasti in razvoju transformiranim celicam. Najpogostejši selekcijski geni so geni za odpornost na določen antibiotik, herbicid, povečano koncentracijo sladkorja, ti agensi delujejo toksično na netransformirane celice.

Markerski geni se uporabljajo za vizualno prepoznavanje transformiranih celic, največkrat so to fluorescentni geni, katerih izražanje lahko spremljamo s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa, ustrezne svetlobe in ustreznih filtrov. Ker je metoda spremeljanja nedestruktivna, lahko transformiran material uporabljam za nadaljnje raziskave.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil vnos markerskega *gfp* gena za zeleno fluorescenco v genom tobaka s pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) in dveh plazmidov pBIN mgfp5-ER z eno kopijo *gfp* gena in pART27 2mgfp5-ER z dvema kopijama ter spremljati prisotnost transgenov in njihovo izražanje.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Poskušali smo ugotoviti, kateri od uporabljenih plazmidov pBIN mgfp5-ER z enim *gfp* genom ali pART27 2mgfp5-ER z dvema *gfp* genoma je primernejši za vzpostavitev in optimizacijo transformacijskega sistema pri tobaku.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NAVADNI TOBAK (*Nicotiana tabacum* L.)

Rod tobakov (*Nicotiana* sp.), je uvrščen v družino razhudnikovk (Solanaceae) obsega 76 vrst, med katerimi je zaradi tržnega pomena najbolj znana botanična vrsta *Nicotiana tabacum* L. ali navadni tobak. Rastlina je svetovno znana zaradi tobačne industrije. Navadni tobak je izvorno ameriška vrsta, danes raste v vseh tropskih deželah, goji se po celem svetu, kjer so zanj ustrezne klimatske razmere. Najbolje uspeva pri temperaturi med 20 in 30 °C in 80 do 85 % zračni vlagi ter v zemlji z manjšo vsebnostjo dušika. Na področju Balkana ga največ gojijo v Republiki Makedoniji. Največ ga pridelajo v Združenih državah Amerike, Kitajski, Indiji in Braziliji (de Witt, 1978).

Vrsta *Nicotiana tabacum* L. je samoprašna enoletnica, ki lahko zraste do 2,5 m v višino. Oblikuje liste različnih oblik in velikosti, spodnji so največji in dolgi do 60 cm, široko eliptični, brez ali z majhnim listnim pecljem, proti vrhu se listi proporcionalno krajsajo in so podolgovato suličasti (slika 1). Cvetovi so trobentaste oblike, belo-roza barve. Seme je številčno, drobno, okroglo ali ledvičaste oblike, rjave barve. Vsi deli rastline razen semen so lepljivi in prekriti s kratkimi dlačicami. Vsebuje strupen alkaloid nikotin, ki deluje insekticidno, zato se uporablja kot nadomestilo za pesticide v ekološki pridelavi hrane. Vsi deli rastline, razen semena ga vsebujejo. Koncentracija nikotina je pogojena z različnimi dejavniki, kot so vremenski pogoji, tip zemlje, sorta. Prav tako se koncentracija nikotina v rastlini povečuje s starostjo rastline. Količina nikotina pri dozorelih rastlinah je zelo različna, približno: 64 % vsega nikotina vsebujejo listi, 18 % steblo, 13 % korenine in 5 % cvetovi. Tobak oz. njegove učinkovine se uporablja kot antispazmolitik, diuretik, bljuvalo, sredstvo za izkašljevanje, pomirjevalo in v homeopatiji. Tobak deluje tudi rakotvorno (Encyclopedia of Life, 2014).

Poleg nikotina tobak vsebuje še anabasin, ki je podoben alkaloid nikotinu, le manj aktiven, glukozide, 2,3,6-trimetil-1,4-naftokinon, 2-metilkinon, 2-naftilamin, propionsko kislino, holin, piren, nikotein, nikotinin in nikotelin (Encyclopedia of Life, 2014).

Do sedaj je bilo opravljenih na rastlinah tobaka ogromno žlahniteljskih in drugih poskusov. Izkazal se je, zaradi hitre in uspešne rasti ter regenerativne sposobnosti v *in vitro* razmerah in doveznosti za sprejem transgenov, kot odlična modelna rastlina pri genskih transformacijah za vzpostavljanje transformacijskih sistemov. Med drugim je to prva rastlina, ki je bila uspešno transformirana. S pomočjo talne bakterije *Agrobacterium tumefaciens* so leta 1983 vnesli v tobak gen za odpornost na antibiotik kanamicin (Horsch in sod., 1984). Tobak je bil tudi prva transgena rastlina (odpornost na glifosat) v poljskih poskusih izvedenih leta 1986 v Franciji in Združenih državah Amerike in med prvimi z dovoljenjem za komercialno pridelavo leta 1994 (Javornik, 2004).

Danes se tržno pridelujeta gensko spremenjen tobak s toleranco na herbicida bromoksinil in ioksinil ter gensko spremenjen tobak z zmanjšano vsebnostjo nikotina (CERA, 2014).



Slika 1: Navadni tobak (*Nicotiana tabacum* L.) (Sullivan, 2001)

## 2.2 TRANSFORMACIJE GENOV

Z odkritjem novih načinov vnašanja genov v rastlinski genom so se povečale možnosti za spremjanje in izboljšanje pomembnejših kmetijskih rastlin. Tako je genski inženiring postal pomemben pri izboljšavah lastnosti rastlin in odkrivanju mehanizmov vnešenih genov (Rao in sod., 2009).

Gensko spremenjene poljščine se komercialno pridelujejo že od leta 1994, površine pa se iz leta v leto povečujejo. Tako je bilo leta 2011 posajenih že 160 milijonov hektarjev, največ v Združenih državah Amerike (43 %), nato v Braziliji (19 %), prav tako so velike površine tudi v Argentini, Indiji, Kanadi, Kitajski, Paragvaju, Pakistanu, Južni Afriki in Urugvaju. Najbolj razširjene gensko spremenjene poljščine so soja (47 %), koruza (32 %), bombaž (15 %) in oljna ogrščica (5 %). Gensko spremenjene lastnosti, ki so najpogosteje pa so odpornost na herbicide (59 %), izboljšana kakovost (26 %) in odpornost na škodljivce (15 %) (ISAAA, 2014).

Poznamo neposredne metode vnosa genov v tkivo, to so elektroporacija, biolistika ali obstreljevanje rastlinskih tkiv, mikro in makro vbrizgavanje DNA, ultrazvok in kemična obdelava s polietilen glikolom.

Pri posrednem načinu se kot vektorja uporabljava talni bakteriji *Agrobacterium tumefaciens* in *Agrobacterium rhizogenes*. Želeni geni, v našem primeru zeleno fluorescentni *gfp* gen in *nptII* gen odpornost na antibiotik kanamacin, sta vgrajene v T-DNA regijo plazmida *Agrobacterium tumefaciens*, ki služi kot vektor za vnos v rastlinski genom. Plazmid je mala DNA molekula, ki je fizično ločena od kromosomske DNA in se neodvisno podvaja. Najbolj pogosta je krožna oblika plazmida in se nahaja v bakterijah, arhejah in evkariontih.

### 2.2.1 Vnos genov z *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je talna bakterija, ki povzroča na ranjenih delih rastline obobelitev tkiva oz. tumorje (slika 2). Rast tumorjev je lastnost, katere dedni zapis se nahaja v plazmidu imenovanem Ti-plazmid. Ta plazmid s pomočjo mehanizma prenosa lahko vključi del plazmidne DNA, imenovane prenešalne (T-DNA), v rastlinski genom. Z beljakovinami zavarovana T-DNA je neprepoznavna nukleazam in tako zavarovana pred razgradnjo, se lažje transportira po bakterijski in rastlinski citoplazmi ter vstopa v jedro celice (Zupan in sod., 2000).



Slika 2: Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* (Matthysse in sod., 2008)

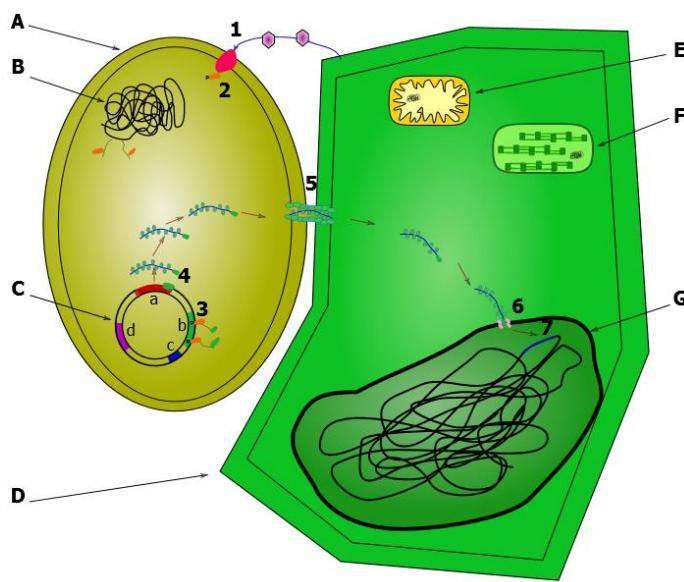
Pri uporabi vektorskega sistema s plazmidi v rastlinskih transformacijah so naravnii plazmidi modificirali tako, da so ohranjene le tiste regije, s katerimi se omogoča podvojitev - replikacija in vnos tarčne DNA na mesta, kjer je imela bakterija locirane gene za tvorbo opinov in rast tumorjev. Na to mesto, s katerega se z restrikcijskimi encimi izreže bakterijske gene, se vstavi želeni genski konstrukt (Bohanec, 2004). Bakterija *A. tumefaciens* v naravi uspešno okužuje in prenaša naravno T-DNA rastlinam iz skupine dvokaličnic, vendar so laboratorijski sevi uspešno spremenjeni, da lahko okužujejo tudi enokaličnice (Hiei in sod., 1994).

V tumorjih, ki jih povzroča *A. tumefaciens* se tvorijo snovi opini, ki so podobni aminokislinam. Opine bakterija uporablja kot vir ogljika in dušika za rast. Geni za sintezo opinov se nahajajo na delu bakterijskega plazmida imenovanem T-DNA, ki ga bakterija vključi v rastlinski genom. T-DNA se nahaja na Ti-plazmidu, na katerem se izven T-DNA oziroma mejnih sekvenc nahajajo tudi virulentni *vir* geni povzročitelji okužbe, geni za razgradnjo opinov in *onco* geni za tvorbo tumorskih celic oz. rakastih tvorb (Zupan in sod., 2000).

Poleg genov, ki se nahajajo na bakterijskem plazmidu so za pravilen izrez T-DNA, transport in vgradnjo v rastlinski genom odgovorni tudi virulentni *chv* geni locirani na bakterijskem kromosomu. Pri pritrditvi bakterijske celice na rastlinsko celično steno sodelujejo produkti *chvA* in *chvB* genov (Stiekema in Visser, 1991).

*Vir* geni se izražajo v območju poškodb rastlinskega tkiva. Protein *virA* je občutljiv na fenolne komponente (acetosiringon in hidroksiacetosiringon), ki se sproščajo ob poškodbah rastlinskih tkiv. Ob povečani koncentraciji pride do autofosforilacije *virA* proteina, ki fosforilizira *virG* protein. Spremenjen *virG* protein aktivira ostale *vir* gene. Proteina *virD1* in *virD2* prepoznata mejne sekvence T-DNA dolge približno 25 bp in omogočita endonukleazno cepitev oziroma izrez enojne verige T-DNA v mejnih sekvenkah. Po tej cepitvi znotraj teh mejnih sekvenc nastane nova T-veriga. Na 5' konec izrezane T-DNA verige se vežeta *virD2* in *virE2* proteina in nastane T-kompleks, ki preide iz bakterijske v rastlinsko celico in se naključno vgradi v rastlinski genom (Zupan in Zambryski, 1995) (slika 3).

Ti-plazmid služi pri prenosu želenih genov v rastlinske celice. Naravna T-DNA, ki ima odstranjene gene za sintezo opinov in *onc* gene, ima prosto mesto med mejnima sekvencama za želene gene. Tako spremenjeni Ti-plazmid ne more povzročiti rast rakavih tvorb, obdrži pa sposobnost vključevanja segmentov DNA v rastlinski genom (Zambryski in sod., 1983) (slika 3).



Legenda:

A - bakterija *Agrobacterium tumefaciens*; B - bakterijski kromosom; C - Ti-plazmid; a - T-DNA; b - *vir* geni, povzročitelji okužbe; c - ori mesto podvajanja plazmida; d - geni za razgradnjo opinov; D - rastlinska celica; E - mitohondrij; F - kloroplast; G - jedro: 1 - sinteza rastlinski fenolnih substanc; 2 - vezava fenolnih substanc z *virA* proteinom; 3 - fosforilizacija *virG* proteina; 4 - cepitev in zaščita s proteini enoverižne T-DNA; 5 - prenos preko bakterijske membrane v rastlinsko celično citoplazmo; 6 - vstop v jedro in razgradnja proteinskega ovoja okoli T-DNA; 7 vgraditev v rastlinski kromosom

Slika 3: Prenos T-DNA iz bakterijske v rastlinsko celico (Transfection ..., 2008)

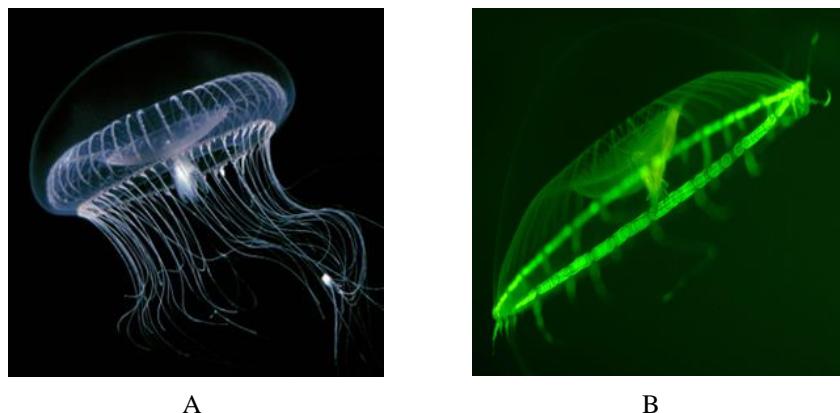
## 2.2.2 Markerski geni

Testni ali markerski geni so geni, katerih genski produkt lahko vizualno prepoznamo in določimo mesto nahajanja (Bohanec, 2004). Služijo hitrejšemu prepoznavanju transformiranega tkiva.

Za vzpostavitev transformacijskega sistema se pogosto uporabljam geni za sintezo fluorescentnih proteinov, primer je zeleno fluorescentni *gfp* gen. V primerjavi z ostalimi markerskimi geni imajo ti geni več prednosti, ker se jih da vizualno določati v živem tkivu brez uporabe raznih postopkov, kjer se uporabljam razne snovi, ki difundirajo skozi celice in tkiva in delujejo smrtonosno. Tkiva in celice, ki so bile transformirane s temi geni je možno določiti v kratkem času po transformaciji, saj se produkt – protein sintetizira zelo hitro, kar nam omogoča tudi spremljati delitev transformiranih celic (Harper in sod., 1999).

Flourescentni geni vnešeni v kmetijske rastline se lahko uporabljam za spremljanje produktov v rastlinah in njihov vpliv na okolje (Stewart, 2005). Flourescentni *gfp* gen je bil izoliran iz meduze *Aequorea victoria* (slika 4A), ki z osvetljevanjem z dolgovalovno UV svetlobo oddaja zeleno fluorescenco (slika 4B). Veliko morskih živali vsebuje zelene

fluorescentne proteine, vendar so pri *A. victoria* najbolj poudarjeni v valovni dolžini 395-475 nm. Najnižji nivo vidnega spektra je dosežen pri 509 nm. Divji tip zelenega fluorescentnega proteina so spremenili tako, da se odlično izraža v tkivih, obenem so mu spremenili spektralne lastnosti in izboljšali fluorescenco (Haseloff in sod., 1997; Reichel in sod., 1996).



Slika 4: Meduza *Aequorea victoria*: A – pri navadni svetlobi; B – pri dolgovalovni UV svetlobi (The Nobel ..., 2013)

Poleg zeleno fluorescentnega proteina so zelo pomembni markerski geni rdeči fluorescentni protein DsRED, ki je izoliran iz korale rodu *Discosoma* in oranžna fluorescentna proteina mOrange-ER in TdTomato-ER, ki med vsemi fluorescentnimi proteini fluorescira najsvetlejše (Haseloff in Amos, 1995; Mann in sod., 2012).

#### 2.2.2.1 Zeleno fluorescentni protein – gfp

Protein gfp je sestavljen iz 238 aminokislin, dolg je 26,9 kDa in oddaja zeleno svetlobo pri izpostavitvi svetlobi modro vijoličnega spektra. Fluorescentno kvantno polje gfp je 0,79 (Cubitt in sod., 1999). Do sedaj so vnesli *gfp* gen v bakterije, kvasovke, razne glive, muhe, ribe (zebrice), rastline, in tudi v celice sesalcev, vključno človeške (Stewart, 2006). Martin Chalfie, Osamu Shimomura in Roger Y. Tsien so bili nagrajeni leta 2008 z Nobelovo nagrado iz kemije za odkritje in razvoj zeleno fluorescentnega proteina (slika 5) (The Nobel ..., 2013).

Protein gfp ima tipično beta sodasto strukturo, sestavljen iz enajstih beta ovojev s šestimi alfa vijačnicami ovitih kovalentno, na sredini pa vsebuje kromofor 4 (*p*-hidroksibenziliden) imidazolidin-5-on. Narava tesno ovite sodaste oblike ščiti kromoforovo fluorescenco od vodne motnosti (slika 5).



Slika 5: Struktura zeleno fluorescentnega proteina – gfp (Green ..., 2013)

### 2.2.3 Seleksijski geni

Seleksijski geni so lahko odgovorni za negativno ali pozitivno selekcijo transformiranih celic, tkiv ali poganjkov. Negativni seleksijski geni povzročijo propad transformiranih celic (Miki in McHugh, 2004). V primerih, kjer si želimo transformirane rastline, ne uporabljamo negativne selekcije. Pozitivna selekcija je povzročena s seleksijskimi geni, ki so sposobni sinteze proteina – encim, ki omogoča celici razgradnjo in s tem odpornost na dodan seleksijski agens. Seleksijski agens povzroči nekroze netransformiranih celic in spodbuja rast transformiranih – odpornih celic. Seleksijski agens je lahko antibiotik, herbicid, zdravilo, analog metabolita, povišana koncentracija sladkorjev, vir ogljika, prekurzor fitohormonov in podobno. Najbolj pogosto uporabljen in vključen tudi v naš poskus je seleksijski *nptII* gen, odpornost na antibiotik kanamicin, ki ovira sintezo proteinov in je toksičen za netransformirane celice. Učinkovit je tisti seleksijski agens, v našem primeru antibiotik kanamicin, ki popolnoma prepreči regeneracijo netransformiranih izsečkov in čim bolj zmanjša število netransformiranih regenerantov, ki nastanejo zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic (Park in sod., 1998). Transformirane celice z razgradnjo seleksijskega agensa povzročijo v okolini zmanjšanje koncentracije oz. popolno porabo, kar ima za posledico rast netransformiranih celic. Da se izognemu temu, izsečke pogosto prestavljamo na sveže gojišče z dodanim agensom, bolj zanesljivo je, da nastale regenerante čim prej prestavimo na sveže gojišče z dodanim agensom. Če je seleksijski gen aktiven, ni utišan, bo regenerant sposoben razgradnje agensa, če ne, zelo hitro propade.

Seleksijski geni za odpornost na antibiotike, se danes uporabljajo samo v laboratorijih v raziskovalne namene. Od leta 2008 je njihova uporaba oz. izpust rastlin na prosto, ki imajo vključene gene za odpornost na antibiotike v Evropski uniji prepovedana. Za vzpostavitev transformacijskega sistema je selekcija ob dejstvu, da se transformira zelo majhen odstotek

celic, zelo dobrodošla. Selekcijo z antibiotiki se lahko nadomesti z drugimi selekcijskimi geni in obstajajo uspešne metode odstranitve teh genov (Afolabi, 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V postopku transformacije smo uporabili liste mikropropagirane sorte tobaka Havana 38.

#### 3.2 SESTAVA GOJIŠČ

Za izvedbo poskusa smo uporabili rastlinsko MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962) z dodatki za rast (preglednica 1), transformacijo (tekoči  $\frac{1}{2}$  MS) in regeneracijo tobaka (preglednica 2) (Stolarz in sod., 1991) ter bakterijsko YEB gojišče (preglednica 3) za namnoževanje bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) LBA4404.

Preglednica 1: MS bazalno gojišče za rast in mikropropagacijo rastlin tobaka (Murashige in Skoog, 1962)

Sestavine	Koncentracija
makro- in mikroelementi	4,3 g/l
tiamin	2 mg/l
piridoksin	1 mg/l
nikotinska kislina	1 mg/l
saharoza	30 g/l
agar	8 g/l
pH 5,8	

Preglednica 2: MSr gojišče za regeneracijo rastlin tobaka (Stolarz in sod., 1991)

Sestavine	Koncentracija
makro- in mikroelementi	4,3 g/l
Fe-Na <sub>2</sub> -EDTA	0,1 mg/l
saharoza	30 g/l
inozitol	0,1 g/l
tiamin	0,1 mg/l
BAP	1,0 mg/l
NAA	0,1 mg/l
agar	8 g/l
pH 5,8	

Preglednica 3: YEB gojišče za rast in namnoževanje *A. t.* LBA4404

Sestavine	Koncentracija
saharoza	5 g/l
pepton	5 g/l
goveji ekstrakt	5 g/l
kvasni ekstrakt	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1 g/l
agar	15 g/l
pH 7,0	

### 3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ

V čašo smo zatehtali sestavine in jih prelili z bidestilirano vodo. Raztopili smo jih z magnetom na električnem mešalniku, sproti smo dodajali vitamine in hormone iz založnih raztopin. Volumen gojišča smo določili z merilno bučo in določili pH vrednost s pH metrom z dodajanjem po kapljicah 1N KOH ali 1N HCl. Za trdo gojišče smo v raztopino dodali strjevalec – agar v zahtevani koncentraciji. Raztopino smo prelili v steklenice namenjene avtoklaviranju. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na približno 40 °C. V brezprašni komori smo filtrsko dodali v rastlinsko MSr gojišče antibiotik kanamicin (300 mg/l), v tekoče bakterijsko YEB pa antibiotik rifampicin (50 mg/l) in kanamacin (50 mg/l) za *A. t.* pBIN mgfp5-ER ter rifampicin (50 mg/l) in spektinomicin (50 mg/l) za pART 2mgfp5-ER. Nato smo dobro premešali in razlili v sterilne petrijevke velikosti 90 × 15 mm ali v sterilne steklenice s polipropilenskimi pokrovi velikosti 55 × 75 mm ter bakterijsko gojišče v 300 ml sterilne erlenmajerice.

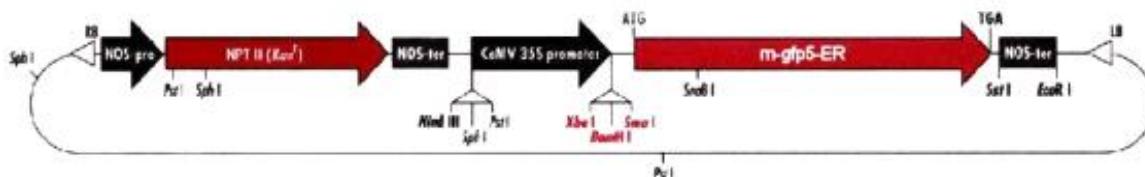
### 3.4 BAKTERIJA IN PLAZMIDI

Za vnos genov v tobak smo izbrali komercialno bakterijo *A. t.* sev LBA4404, v katero sta bila ločeno z elektroporacijo vnešena modificirana plazmida pBIN mgfp5-ER ali pART27 2mgfp5-ER.

#### 3.4.1 Plazmid pBIN mgfp5-ER

Plazmid pBIN m-gfp5-ER (Haseloff in sod., 1997) je binarni vektor, nastal z modifikacijo plazmida pBI121 (Jefferson in sod., 1987), pri katerem so *gus* testni gen zamenjali s fluorescentnim *m-gfp5-ER* genom. *m-gfp5-ER* je modificiran *gfp* gen z boljšim izražanjem v rastlinah, ker ima odstranjen kriptični intron in intracelularno usmerjanje v

endoplazmatski retikulum. Protein se lahko spremlja s fluorescentnim mikroskopom z dvema ekscitacijskima vrhovoma (395 nm in 473 nm). Plazmid vsebuje selekcijski gen *nptII* za odpornost na antibiotik kanamicin za selekcijo transformiranih bakterij in za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv. T-DNA plazmida pBIN m-gfp5-ER z restriktijskimi mesti je prikazana na sliki (slika 6).



Slika 6: T-DNA plazmida pBIN m-gfp5-ER (Haseloff in sod., 1997)

### 3.4.2 Plazmid pART27 2mgfp5-ER

Plazmid pART27 2mgfp5-ER je binarni vektor nastal z modifikacijo, v laboratoriju prof. dr. C. C. Eady-ja (inštitut Crop and Food Research, Christchurch, Nova Zelandija), tako da so vanj vključili dve ponovitvi gena iz vektorja pBIN m-gfp5-ER. T-DNA obej genskih konstruktov (slika 6) se razlikujeta samo v številu kopij *gfp* gena. Vektor pART27 vsebuje selekcijski gen *spec* za odpornost na antibiotik spektinomicin za selekcijo transformiranih bakterij in gen *nptII* za odpornost na aminoglikozidne antibiotike geneticin in kanamicin za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv (Gleave, 1992).

## 3.5 TRANSFORMACIJA TOBAKA

Liste tobaka Havana 38 smo 17.10.2008 v brezprašni komori s sterilnim skalpelom in s pomočjo sterilne pincete razrezali na izsečke velike približno 1 cm<sup>2</sup>. Skupaj smo pripravili 110 izsečkov za plazmid pBIN mgfp5-ER 60 izsečkov in za plazmid pART27 2mgfp5-ER 50. Transformacijo listnih izsečkov smo opravili po nekoliko spremenjeni metodi, ki jo navajajo Horsch in sod. (1985) ter Fisher in Guiltinan (1995).

Bakterijsko suspenzijo – namnoženo bakterijo *A. t.* LBA4404 z ustreznim plazmidom v YEB gojišču smo centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/minuto. Odlili smo supernatant in pelet prelili s tekočim ½ MS gojiščem za tobak. Izsečke listov tobaka smo prelili z bakterijsko suspenzijo in inkubirali v petrijevkah približno 20 minut. Nato smo izsečke zračno osušili na sterilnem filtrskem papirju v brezprašni komori in inokulirali na MSr gojišče z dodatkom 100 µM acetosiringona. Kokultivacija je trajala 3 dni, nato smo izsečke dvakrat sprali v raztopini antibiotika timetina (200 mg/l) in zračno osušili na sterilnem filtrskem papirju v brezprašni komori.

Izsečke listov smo nato prestavili na selekcijsko MSr gojišče z dodanim selekcijskim antibiotikom kanamicin (300 mg/l) in antibiotikom timentin (150 mg/l) za preprečevanje rasti *A. t.*.

Izsečke smo gojili v rastni komori pri 16/8 urni fotoperiodi in temperaturi  $24 \pm 1$  °C ter osvetlitvi  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Po petih tednih smo izsečke prestavili na ustrezeno sveže selekcijsko MSr gojišče. Nastale regenerante pa na mikropropagacijsko MS gojišče z dodanim kanamicinom (300 mg/l). Po petih tednih smo regenerante, ki so uspešno rastli, prestavili na ustrezeno selekcijsko MS gojišče v steklenice s pokrovom velikosti  $55 \times 75$  mm.

Po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pBIN mgfp5-ER smo dobili 47 vitalnih regenerantov in po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pART27 2mgfp5-ER pa 102 regeneranta.

### 3.6 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA

V kontrolni poskus (preglednica 4) smo vključili izsečke neokuženih listov tobaka. Vsako obravnavanje je imelo dve ponovitvi po 10 izsečkov velikosti približno  $1 \text{ cm}^2$ . Izsečke smo gojili na MSr gojišču brez oz. z dodanim antibiotikom (kanamicim ali timentin) ali acetosiringonom pri enakih pogojih kot transformirani izsečki in regeneranti. Kontrolni poskus smo nastavili prav tako 17.10.2008, kot poskus z okuženimi listi.

Preglednica 4: Sestava MSr gojišč kontrolnega poskusa z neokuženimi listi tobaka

Oznaka petrijevk v kontrolnem poskusu	Gojišče MSr z dodatki
K1	MSr, brez dodatkov
K2	MSr, acetosiringon 100 $\mu\text{M}$
K3	MSr, kanamicin 300 mg/l
K4	MSr, timentin 150 mg/l
K5	MSr, kanamicin 300 mg/l in timentin 150 mg/l

### 3.7 FENOTIPSKO IZRAŽANJE *gfp* GENA

Po transformaciji smo izražanje fluorescentnega *gfp* gene spremljali na izsečkih pred (3 in 6 dni po transformaciji) in po regeneraciji oz. oblikovanju zametkov za poganjke. Pregledali smo jih z epifluorescentnim mikroskopom Nikon SMZ 1000 (slika 7) pri 20

kratni povečavi in ustreznim setom filtrov: eksitacijski filter (EX) 480/40 nm, dikroično zrcalo (DM) 505 nm in emisijski filter (BA) 535/50 nm.



Slika 7: Epifluorescentni mikroskop z ustreznim setom filtrov za spremjanje gfp proteina

Kot kontrolo smo uporabili neokužene izsečke iz kontrolnega poskusa.

### 3.8 ANALIZA PRISOTNOSTI *gfp* GENA S PCR METODO

Za spremjanje prisotnosti transgenov v genomu tobaka smo iz regenerantov tobaka izolirali celokupno DNA, izmerili koncentracijo izolirane DNA, pripravili redčitve na 20 ng/ $\mu$ l, naredili verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in analizirali namnožene fragmente z agarozno gelsko elektroforezo.

#### 3.8.1 Izolacija DNA

Iz listov transformiranih regenerantov tobaka in kontrole – neokužen tobak, smo izolirali celokupno genomsko DNA (Kump in sod., 1992). Ustrezno količino listov smo položili v terilnico in prelili z 800  $\mu$ l CTAB pufra segretega na 68 °C in zdrobili. Suspenzijo smo prelili v označeno mikrocentrifugirko in inkubirali 1,5 ure pri 68 °C. Suspenziji smo dodali 700  $\mu$ l topila kloroform : izoamilalkohol (24:1) in dobro premešali ter centrifugirali 10 min pri 11000 obratih/minuto.

Supernatant smo odpipetirali v čisto označeno mikrocentrifugirko in dodali 70  $\mu$ l 3 M Na-acetata pH 5,2 in 700  $\mu$ l ledeno mrzlega izopropanola ter dobro premešali. Vzorce smo inkubirali 20 minut pri -20 °C. Nato smo jih centrifugirali 10 min pri 11000 obratih/minuto. Supernatant smo odlili in dodali 500  $\mu$ l 70 % etanola in z obračanjem mikrocentrifugirk odlepili pelet od mikrocentrifugirke. Po 20 minutah smo previdno odlili etanol in preostanek odpipetirali ter pelet DNA posušil pri sobni temperaturi. Dodali smo

40 µl TE pufra in vzorce čez noč shranili v hladilniku pri 4 °C, nato pa v zamrzovalniku pri -20 °C (priloga A).

### 3.8.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom

S pomočjo DNA fluorometra DyNA Quant™ 200 (GE Healthcare) smo izmerili koncentracije izolirane DNA v raztopini. Delovno raztopino smo pripravili iz 10 × TNE pufra [0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 7)] ter ji dodali barvilo Hoechta 33258 v končni koncentraciji 0,1 µg/ml. Za umeritev fluorometra smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 × TNE pufru). V kiveto smo odpipetirali 2 ml delovne raztopine in dodali 2 µl DNA vzorca, pokrili s pokrovom in dobro premešali ter izmerili koncentracijo DNA. Vzorce DNA smo redčili na 20 ng/µl.

### 3.8.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Transgena *gfp* in *nptII* smo specifično namnožili v dupleks PCR reakciji, pri kateri smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov za vsak transgen (preglednica 5). Vzorce za PCR reakcijo smo pripravili v brezprašni komori. V PCR mikrocentrifugirke smo odpipetirali 5 µl redčenega DNA vzorca in dodali 20 µl PCR mešanice: 1 × PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40] (Fermentas), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM vsakega deoksinukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 4 × 0,5 µM ustreznega začetnega oligonukleotida in 0,5 enote encima Taq DNA polimeraze (Fermentas). Končni volumen PCR reakcije je bil 25 µl. PCR reakcija je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, ZDA) po modificiranem temperaturnem vzorcu (Lakshmi in sod., 1998).

Začetna denaturacija je trajala 5 minut pri 94 °C, nato je sledilo 33 ponavljačih se ciklov, ki so bili razdeljeni na denaturacijo DNA, ki je trajala 1 minuto pri 94 °C, nato je sledilo 1 minutno prileganje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 58 °C, na koncu posameznega cikla je sledila še sinteza fragmentov DNA, ki je trajala 1,5 minute pri 72 °C. Za nadaljnje analize smo vzorce hranili pri 12 °C.

Preglednica 5: DNA nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov za posamezen transgen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'	Pričakovana dolžina fragmenta
GFP1a	AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT G	422 bp
GFP1b	TTG TGG CGG GTC TTG AAG TTG G	
NPTII1a	GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG	650 bp
NPTII1b	ATG GGG AGC GGC GAT ACC GTA	

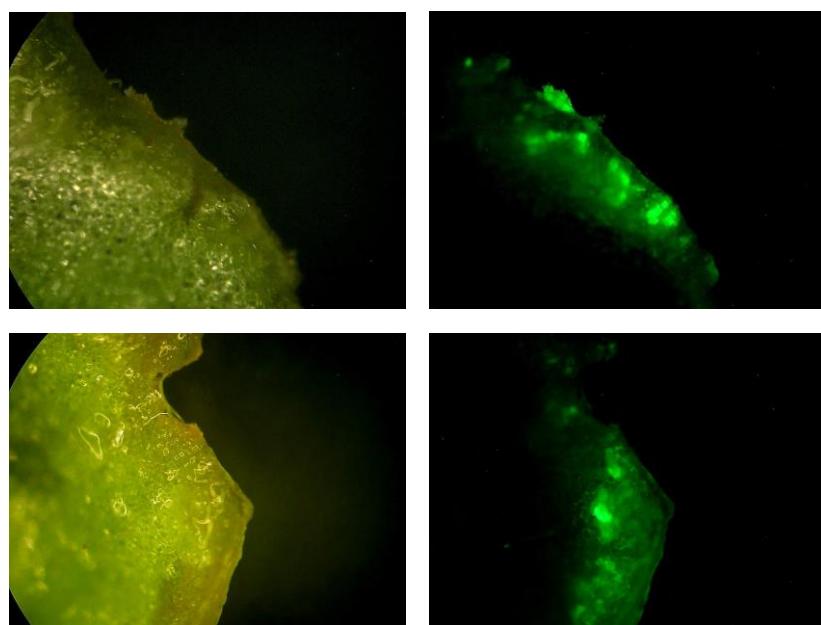
### 3.8.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno gelsko elektroforezo

Fragmente DNA smo ločili z uporabo horizontalne elektroforeze v 1,4 % gelu [1,4% SeaKem LE agarosa (CambreX, ZDA), 1 × TBE pufer, etidijev bromid 0,5 µg/ml], ki smo ga položili v elektroforetsko posodo (Bio Rad Sub-Cell, model 192) in prelili z 1 × TBE puferom [89 mM Tris, 89 mM borna kislina, 2 mM EDTA]. PCR vzorcem smo dodali 5 µl nanašalnega barvila BPB [12,5% (w/v) ficol 400, 0,2% (w/v) bromfenol modro, 6,7% (v/v) 10 × TBE], premešali in 17 µl vzorca nanesli v odprtine agaroznega gela. Poleg vzorcev smo nanesli še DNA, izolirano iz netransformiranega tobaka (kontrola), čisti plazmid izoliran iz *E. coli*, slepi vzorec, ki je vseboval vse komponente reakcijske mešanice razen DNA, namesto katere smo dodali vodo in velikostni standard (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) s 14 fragmenti: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 bp). Elektroforeza je potekala v v anodni smeri in je trajala 1 uro in 30 minut pri 140 V. S pomočjo 0,5 µg/ml etidijevega bromida, ki ga je vseboval gel in se je vezal v kompleks z dvooverižno DNA molekulo smo lahko detektirali namnožene fragmente s transiluminatorjem TMF-30 (UVP Inc., Velika Britanija) pod UV svetlobo (302 nm). Gele smo fotografirali z digitalnim fotoaparatom.

## 4 REZULTATI

### 4.1 FENOTIPSKO IZRAŽANJE *gfp* GENA

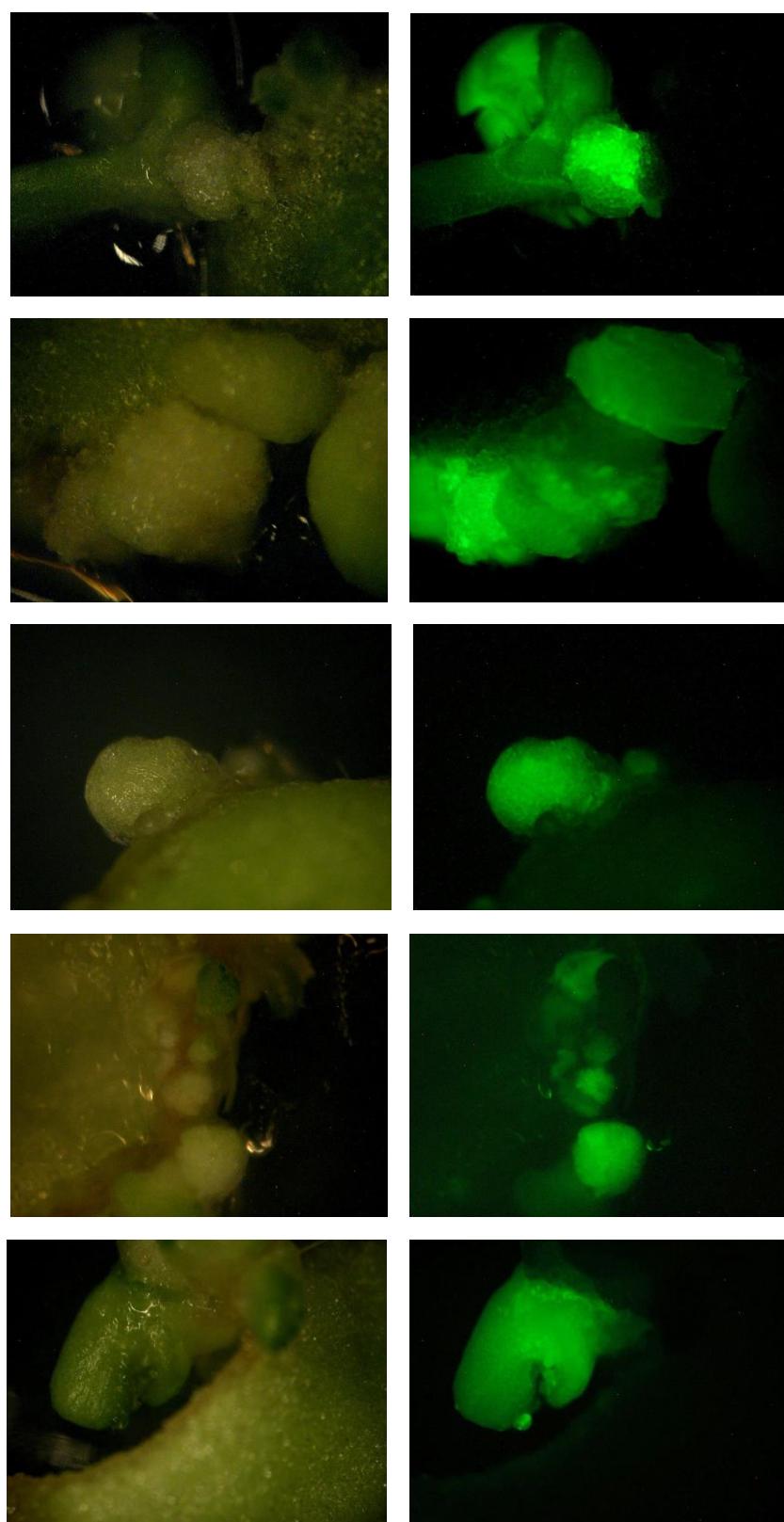
S pomočjo epifluorescentnega mikroskopa (slika 7) in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence *gfp* gena oz. proteina smo 3. dan po transformaciji v posameznih celicah zasledili izražanje na izsečkih transformiranih z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER in 6. dan po trasformaciji tudi v celicah izsečkov transformiranih z *A. t.*-BIN mgfp5-ER.



Slika 8: Izražanje *gfp* gena na listnih izsečkih tobaka nekaj dni po trasformaciji s plazmidom pART27 2mgfp5-ER: levo z navadno svetlobo; desno s fluorescentno svetlobo in ustreznimi filterji za detekcijo zelene fluorescence *gfp* proteina

Na vseh 110 izsečkih smo 11 dni po transformaciji zasledili izražanje *gfp* proteina. Ponekod je bilo na posameznih izsečkih tudi več ločenih transformiranih predelov. Največ fluorescence je bilo opaziti ob neposredni bližini ran in poškodbah na tkivu izsečka. Fluorescensa se je močneje izražala na tkivu transformiranim z *A. t.*-pART27 2mgfp-ER. (slika 8).

Ko se je začela regeneracija smo spremjanje ponovili na globularnih strukturah oz. somatskih embrijih. Fluorescensa je bila izrazitejša po 3 oz. 6 dneh, razlik v intenziteti med konstrukti nismo opazili (slika 9).



Slika 9: Izražanje *gfp* gena v somatskih embrijih oz. formirajočih regenerantih tobaka po trasformaciji s plazmidom pART27 2mgfp5-ER: levo z navadno svetlobo; desno s fluorescentno svetlobo in ustreznimi filterji za detekcijo zelene fluorescence *gfp* proteina

## 4.2 REGENERACIJA LISTNIH IZSEČKOV TOBAKA

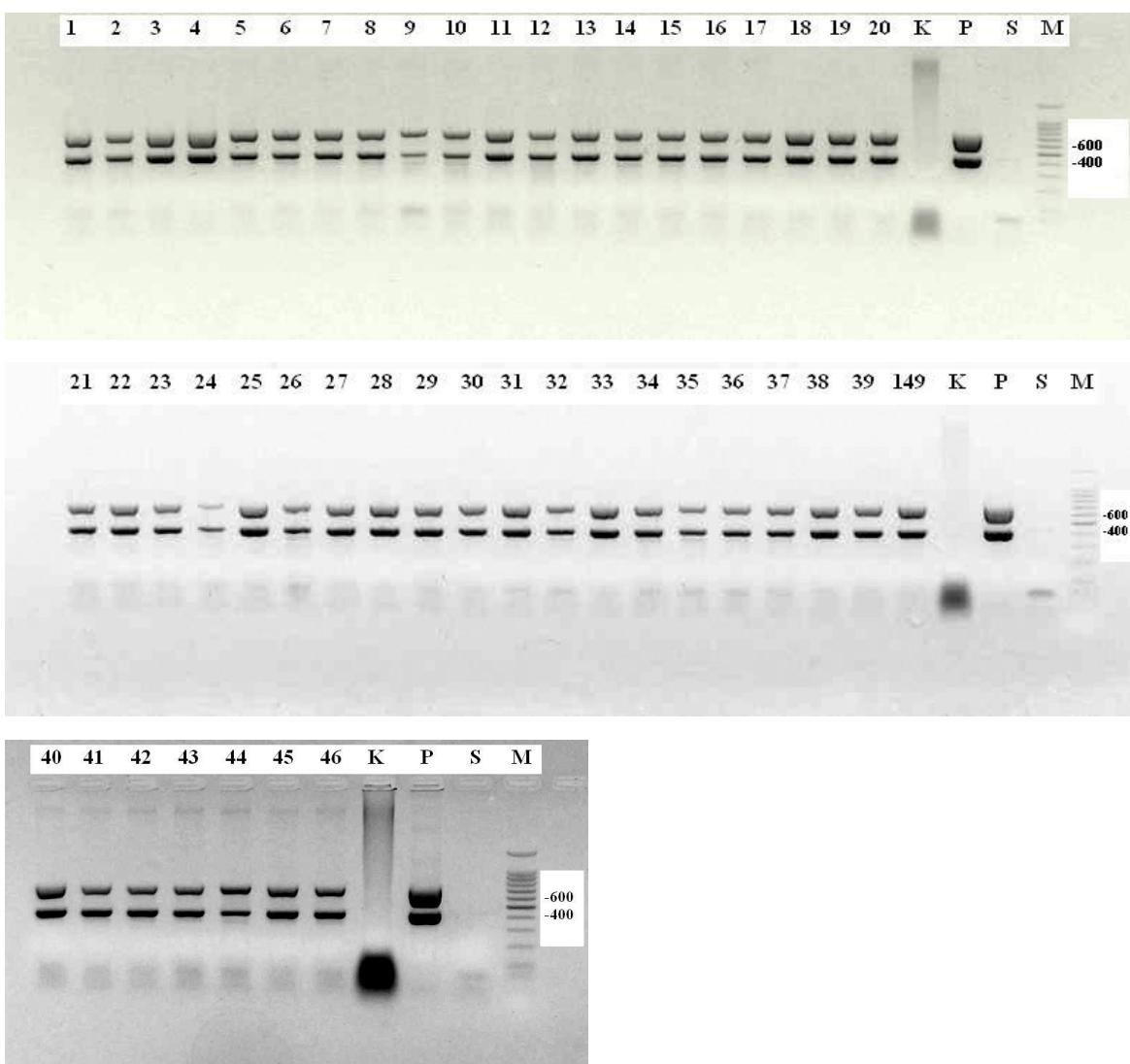
Pri genskem konstraktu *A. t.*-pBIN mgfp5-ER je iz 60 listnih izsečkov nastalo 47 vitalnih regenerantov, medtem ko je pri genskem konstraktu *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER iz 50 listnih izsečkov nastalo 102 regeneranta. Regeneracija je bila po okužbi *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER v večini primerov direktna, brez vmesne faze kalusa in hitrejša, saj so prve globularne strukture nastale že 11 dni po transformaciji ter je bila dosežena 204 % regeneracija. Prve globularne strukture po okužbi z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER so se pojavljale šele po 18 dneh, nastalo je več kalusa in regeneracija je bila manjša, samo 78,4 %. Genski konstrukt pART27 2mgfp5-ER, kjer sta prisotni dve kopiji *gfp* gena, je bolje vplival na regeneracijo, saj je nastalo več regenerantov, kot pri genskem konstraktu pBIN mgfp5-ER z eno kopijo *gfp* gena.

Nastale regenerante smo pri bazi odrezali in jih prestavili na sveže mikropropagacijsko MS gojišče z dodanim kanamicinom (300 mg/l). Vse nastale regenerante smo testirali na molekulskem nivoju z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) na prisotnost transgenov.

## 4.3 MOLEKULSKA ANALIZA VKLJUČENOSTI TRANSGENOV S PCR METODO

### 4.3.1 Genski konstrukt *A. t.*-pBIN mgfp5-ER

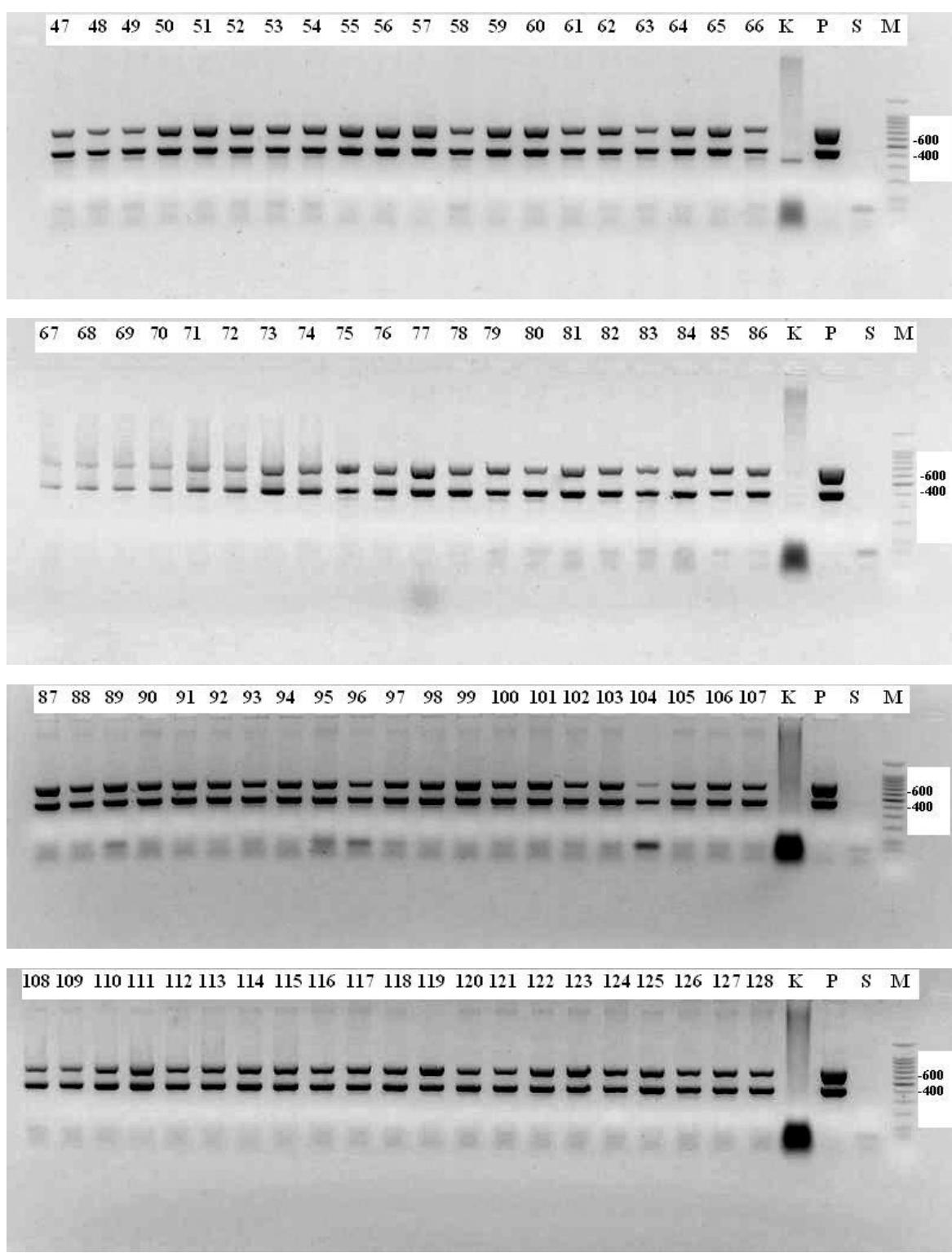
Pri vseh 47 regenerantih tobaka, označenih od 1 do 46 in 149 (slika 10), ki so nastali po transformaciji z *A.t.*-pBIN mgfp5-ER smo ugotovili prisotnost fragmenta dolžine 422 bp značilnega za markerski *gfp* gen in fragment 650 bp značilen za seleksijski *nptII* gen in s tem potrdili prisotnost obeh transgenov (slika 10).



Slika 10: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji po transformaciji tobaka z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER s parom začetnih oligonukleotidov za *gfp* gen (422 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za *nptII* gen (650 bp) od 1 do 46 in 149, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pBIN mgfp5-ER, S – slepi vzorec, M – velikostni standard

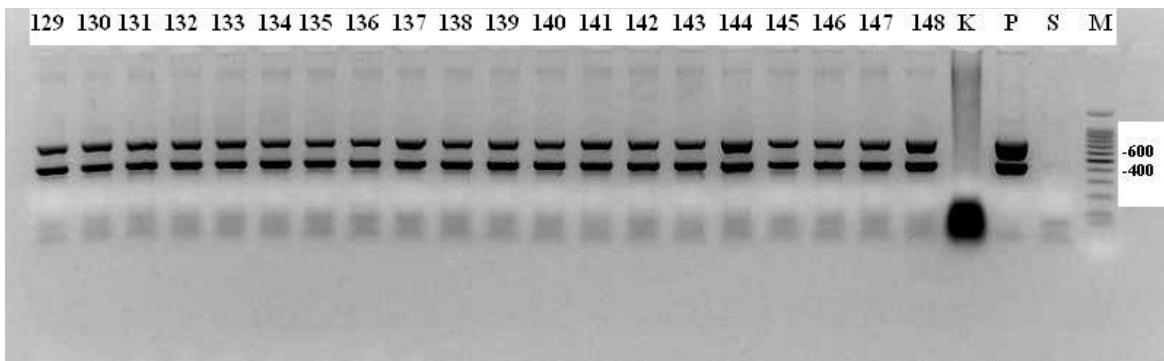
#### 4.3.2 Genski konstrukt *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER

Prav tako pri vseh 102 regenerantih, označenih od 47 do 148 (slika 11), ki so nastali po transformaciji z *A.t.*- pART27 2mgfp5-ER smo ugotovili prisotnost fragmenta dolžine 422 bp značilnega za markerski *gfp* gen in fragmenta 650 bp značilen za selekcijski *nptII* gen in s tem potrdili prisotnost obeh transgenov (slika 11).



Slika 11 se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 11: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji po transforamciji tobaka z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER s parom začetnih oligonukleotidov za *gfp* gen (422 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za *nptII* gen (650 bp) od 47 do 148, K – kontrola – netransformirani tobak, P – plazmid pART27 2mgfp5-ER, S – slepi vzorec, M – velikostni standard

#### 4.4 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA

Izsečke listov tobaka v kontrolnem poskusu smo pregledali 11 in 19 dni po inokulaciji (slika 12).

##### Kontrola K1

Izsečki gojeni na regeneracijskem MSr gojišču brez dodatkov so se v 11 dneh zelo povečali. Hitra rast medžilne listne ploskve se je odražala na gubanju listne povšine. Izsečki so bili zeleni. V naslednjih 8 dneh je prišlo na listnih izsečkih do formiranja kalusa in tudi direktne regeneracije in barva izsečkov in regenerantov je bila zelena (slika 12).

##### Kontrola K2

Izsečki gojeni na regeneracijskem MSr gojišču z dodatkom 100 µM acetosiringona so se v 11 dneh zelo povečali in bili so zeleni. V naslednjih 8 dneh je prišlo do regeneracije kalusa in intenzivne direktnje regeneracije poganjkov, katerih je bilo več in bili so večji kot pri kontroli K1. Acetoriringon je imel pozitiven vpliv na regeneracijo (slika 12).

##### Kontrola K3

Izsečki gojeni na regeneracijskem MSr gojišču z dodatkom 300 mg/l selekcijskega antibiotika kanamacina so se v 11 dneh malo povečali in bili so svetlo zeleni v primerjavi z izsečki v kontroli K1 in K2. V naslednjih 8 dneh sta se rast in regeneracija zaustavili (slika 12).

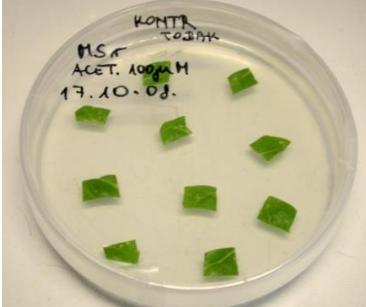
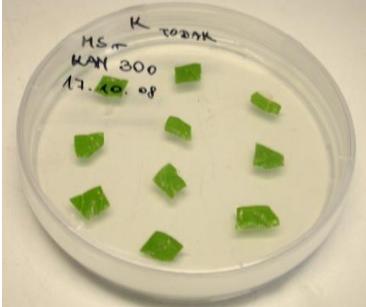
##### Kontrola K4

Izsečki gojeni na regeneracijskem MSr gojišču z dodatkom 150 mg/l antibiotika timentin za preprečevanje rasti *A. tumefaciens* so se v 11 dneh zelo povečali in listna površina se je

zaradi hitre medžilne rasti nagubala in bili so intenzivno zeleni. V naslednjih 8 dneh je prišlo na listnih izsečkih do formiranja kalusa in tudi direktne regeneracije in barva izsečkov in regenerantov je bila zelena. Glede barve in regeneracije je bila kontrola K4 vmes med kontrolo K1 in K2 (slika 12).

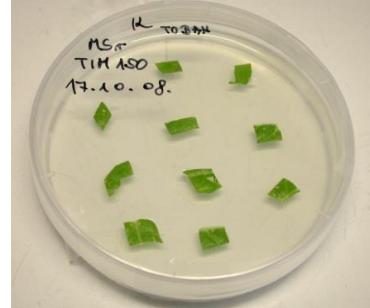
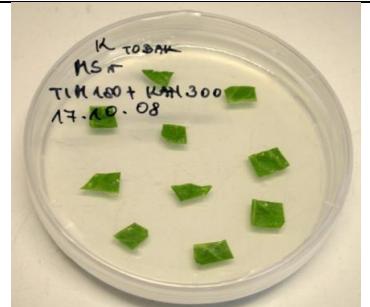
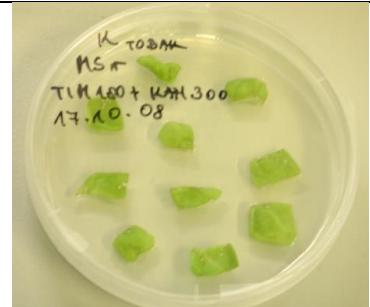
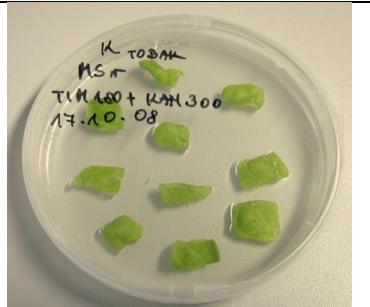
#### Kontrola K5

Izsečki gojeni na regeneracijskem MSr gojišču z dodatkom 300 mg/l kanamacina in 150 mg/l timentina so se v 11 dneh le malo povečali, bili so svetlo zeleni in brez zametkov za regenerante. V naslednjih 8 dneh sta se rast in regeneracija ustavili, podobno kot pri K3 (slika 12).

Inokulacija na gojišče 17.oktober 2008	1. bonitiranje po 11 dneh 28. oktober 2008	2. bonitiranje po 19 dneh 5. november 2008
		
K1- MSr gojišče brez dodatkov	Povečanje izsečkov in gubanje površine. Barva izsečkov zelena.	Pojav regenerantov. Barva izsečkov in regenerantov zelena.
		
K2 – MSr gojišče z dodatkom acetosiringona 100 µM	Povečanje izsečkov in gubanje površine. Barva izsečkov zelena.	Pojav regenerantov. Barva izsečkov in regenerantov zelena. Intezivnejša rast in regeneracija kot pri K1.
		
K3 – MSr gojišče z dodatkom antibiotika kanamicin 300 mg/l	Manjsa rast izsečkov v primerjavi z rastjo K1 in K2. Barva izsečkov svetlo zelena.	Izsečki ostanejo nagubani, svetlo zelene barve in brez regenerantov.

Slika 12 se nadaljuje

nadaljevanje

		
K4 – MSr gojišče z dodatkom antibiotika timentin 150 mg/l	Povečanje izsečkov in gubanje površine. Barva izsečkov zelena.	Pojav regenerantov. Barva izsečkov in regenerantov zelena. Rast primerljiva rasti K1 in K2.
		
K5- MSr gojišče z dodatkom antibiotikov kanamicin 300 mg/l in timentin 150 mg/l	Manjša rast izsečkov v primerjavi z rastjo K1, K2 in K4. Barva izsečkov svetlo zelena.	Izsečki ostanejo nagubani, svetlo zelene barve in brez regenerantov.

Slika 12: Neokuženi izsečki listov tobaka – kontrole, bonitirano 11 in 19 dni po inokulaciji na ustremnem selekcijskem MSr gojišču: K1 – gojišče brez dodatkov; K2 – gojišče z acetosiringonom (100 µM); K3 – gojišče kanamicinom (300 mg/l); K4 – gojišče s timentinom (150 mg/l); K5 – gojišče s kanamicinom (300 mg/l) in s timentinom (150 mg/l)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

S posredno transformacijo z *Agrobacterium tumefaciens* in plazmidoma pBIN mgfp5-ER ali pART27 2mgfp5-ER smo v tobak sorte Havana 38 vnesli markerski *gfp* gen za zeleno fluorescenco in selekcijski *nptII* gen za odpornost na antibiotik kanamicin. Namen je bil primerjati izražanje vnesenih genov in uspešnost regeneracije po transformaciji. Genska konstrukta se med seboj ločita po številu kopij markerskega gena. Plazmid pBIN mgfp5-ER ima samo eno kopijo *gfp* gena, medtem ko ima plazmid pART27 2mgfp5-ER dve kopiji.

Izsečke, ki smo jih narezali iz listov mikropagiranega tobaka smo okužili s sevom *A. t.* LBA4404 in plazmidoma pBIN mgfp5-ER ali pART27 2mgfp5-ER po nekoliko spremenjeni metodi kot priporočajo Horsch in sod. (1985) ter Fisher in Guiltinan (1995). Izsečke smo kokultivirali na regeneracijskem MSr gojišču, ki smo mu dodali fenolno snov, acetosiringon, ki vpliva na učinkovitost transformacije tako, da aktivira *vir* gene oz. gene odgovorne za virulenco in pospeši proces izrezovanja, transporta ter vgradnje T-DNA (Sunilkumar in sod., 1999).

Po transformaciji smo 3. dan na posameznih izsečkih transformiranih z *A. t.*-pART27 2mgfp-ER zasledili z epifluorescentnim mikroskopom izražanje *gfp* gena in po 6 dneh tudi na izsečkih transformiranih z *A.t.*-pBIN mgfp5-ER. Na vseh 110 izsečkih in to na večih mestih smo 11 dni po transformaciji zasledili izražanje *gfp* proteina. Največ fluorescence je bilo opaziti ob neposredni bližini ran in poškodbah na tkivu izsečka. Fluorescensa se je močneje izražala v tkivu transformiranem z *A. t.*-pART27 2mgfp-ER.

Po treh dneh kokultivacije smo izsečke prestavili na selekcijsko MSr gojišče z dodatkom antibiotika timentin, ki preprečuje rast bakterije *A. t.* in dodatkom selekcijskega antibiotika kanamicin. Timentin je popolnoma preprečil rast in namnoževanje *A. t.* in pozitivno vplival na regeneracijo listnih izsečkov, kar smo potrdili tudi s kontrolnim poskusom K4. O pozitivnem vplivu timentina na rastlinsko regeneracijo in negativnem na *A. t.* poročajo tudi Nauerby in sod. (1996). Kanamicin je deloval zaviralno oz. je preprečeval rast netransformiranega tkiva oz. regeneracijo, kar smo potrdili s kontrolnima poskusoma K3 in K5. Na teh izsečkih 19 dni po inokulciji na selekcijsko gojišče nismo dobili regenerantov v primerjavi s poskusi K1, K2 in K4, kjer jih je bilo v tem obdobju zelo veliko.

S kontrolnim poskusom smo potrdili, da smo uporabili primerno koncentracijo selekcijskega antibiotika, t.j. 300 mg/l kanamicina, saj je preprečila rast netransformiranih delov izsečkov in regeneracijo. Prenizka koncentracija povzroči preživetje tudi netransformiranih rastlin, previsoka koncentracija pa lahko poškoduje transformirane

rastline. Parveez in sod. (2007) poročajo o minimalni inhibitorni koncentraciji selekcijskega agensa na razvoj nedozorelih embrijev oljne palme. Proučevali so vpliv štirih antibiotikov in hebicida v koncentraciji od 10-2000 mg/l. Najučinkovitejša pri zaviranju rasti netransformiranih nezrelih embrijev oljne palme sta bila higromocin in Basta v koncentraciji 20 mg/l. Kanamicin v koncentraciji 2000 mg/l je bil neučinkovit, saj je preprečil rast samo 15 % netransformiranih nezrelih embrijev, kar kaže na visoko endogeno odpornost, ki jo pri tobaku nismo zasledili. Koncentracija 300 mg/l kanamicina je bila že zelo učinkovita, saj je preprečila rast netransformiranih somatskih embrijev tobaka, kar smo potrdili s fenotipsko in molekulsko analizo regenerantov.

Park in sod. (1998) navajajo, da je učinkovit tisti selekcijski agens, ki popolnoma prepreči regeneracijo netransformiranih izsečkov in čim bolj zmanjša število netransformiranih regenerantov, ki nastanejo zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic. Na kontrolnem gojišču K3 s kanamicinom se niso pojavili regeneranti in tudi rast izsečkov se je ustavila, tako da je kanamicin v koncentraciji 300 mg/l preprečil rast in regeneracijo. V kombinaciji s timentinom, kontrolni poskus K5, je bil učinek enak kot pri K3. Prisotnost samo timentina v kontrolnem poskusu K4 je delovala pospeševalno na rast izsečkov ter na nastanek in rast regenerantov. Da sta timentin in kanamicin učinkovita pri transformaciji tobaka potrjujejo nastali transformirani regeneranti, ki po več subkultivacijah na sveže gojišče brez timentina niso imeli prisotne bakterije.

Tobak Havana 38 smo izbrali kot modelno rastlino zaradi izredne dovzetnosti njegovega genoma za sprejem transgenov ter hitre regeneracije in rasti v tkivni kulturi. Zametki prvih regenerantov po transformaciji z *A. t.-pART27 2mgfp5-ER* so se pojavili že po 11 dneh in regeneracija je bila povečini direktna, brez tvorbe vmesnega kalusa, podobno kot navajajo Stolarz in sod. (1991). Po transformaciji z *A. t.-pBIN mgfp5-ER* so se prve globularne strukture pojavile šele po 18 dneh in nastalo je več kalusa. Z uporabo tobaka kot modelne rastline pri genskih transformacijah smo pridobili veliko število regenerantov v kratkem času. Po transformaciji z *A. t.-pART27 2mgfp5-ER* je bila regeneracija 204 % po transformaciji z *A. t.-pBIN mgfp5-ER* pa 78,4 %. Vseh 149 regenerantov, ki so dobro uspevali, smo prestavili na ustrezno selekcijsko MSr gojišče, na katerem so vsi preživelci in z dupleks PCR analizo namnožili fragmente dolžine 422 bp značilni za markerski *gfp* gen in dolžine 650 bp značilni za selekcijski *nptII* gen.

## 5.2 SKLEPI

Oba uporabljeni plazmida (pBIN mgfp5-ER in pART27 2mgfp5-ER) sta se za vnos *gfp* gena izkazala za primerna, vendar je boljši in učinkovitejši plazmid pART27 2mgfp5-ER z dvema kopijama *gfp* gena.

Sinteza *gfp* proteina je bila po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER hitrejša, saj smo ga zasledili v celicah tobaka 3 dni prej kot po transformaciji z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER.

Prav tako je bila regeneracija po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER učinkovitejša, saj je dosegla 204 %, medtem ko je bila regeneracija po transformaciji z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER le 78,4 %.

Antibiotik timentin je uspešno preprečil rast *A.t.* in ni vplival na regeneracijo tobaka.

Antibiotik kanamicin v koncentraciji 300 mg/l je popolnoma preprečil regeneracijo netransformiranih regenerantov.

Pri vseh nastalih regenerantih smo z dupleks PCR analizo zasledili prisotnost fragmentov značilnih za oba transgena *gfp* in *nptII*.

## 6 POVZETEK

Postopki genskih transformacij na rastlinah omogočajo vnašanje želenih genov iz drugih organizmov. Gene lahko vnašamo v rastlinske celice neposredno z biolistično tehniko, lahko se poslužujemo tudi raznih kemičnih agensov, električnega toka, ultrazvoka in mikroiniciranja. Najpogosteje se uporablja posreden način prenosa s pomočjo talne bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.

Pri prepoznavanju transformiranega tkiva od netransformiranega so v pomoč fluorescentni markerski geni, katere lahko v transformiranem tkivu z nedestruktivno metodo spremljamo. Izražanje fluorescentnih genov vizualno spremljamo z epifluorescentnim mikroskopom, opremljenim z ustreznimi filtri in ob ustrezni svetlobi. Namen dela je bil spremljati izražanja fluorescentnega *gfp* gena, ki smo ga vnesli v tobak s pomočjo posredne metode transformacije z *Agrobacterium tumefaciens* in dvema plazmidoma pBIN mgfp5-ER in pART27 2mgfp5-ER. Plazmida se razlikujeta v številu kopij *gfp* gena. Plazmid pBIN mgfp5-ER vsebuje eno kopijo *gfp* gena in plazmid pART27 2mgfp5-ER vsebuje dve kopiji *gfp* gena. Žeeli smo ugotoviti vpliv plazmidov na uspešnost transformacije in na izražanje.

Iz listov mikropropagiranega tobaka sorte Havana 38 smo narezali izsečke, v katere smo vnesli markerski *gfp* gen in selekcijski *nptII* gen za odpornost na antibiotik kanamicin. 60 listnih izsečkov smo okužili z bakterijo *A. t.* sev LBA4404 in plazmidom pBIN mgfp5-ER in 50 izsečkov smo okužili z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER in nato tri dni kokultivirali na MSr gojišču za regeneracijo z dodatkom 100 µM acetosiringona, za pospešitev transformacije.

Fenotipsko izražanje *gfp* gena z epifluorescentnim mikroskopom smo opazili na vseh izsečkih 3 dni po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER in po 6 dneh tudi v celicah transformiranih z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER. Po petih tednih smo nastale regenerante prestavili na sveže gojišče z dodanim kanamicinom. Po transformaciji sta na selekcijskem gojišču dobro uspevala 102 regeneranta z vnešenim *gfp* in *nptII* genom s pomočjo *A. t.*-pART27 2mgfp-ER in 47 regenerantov z vnešenima transgenoma z *A. t.*- pBIN mgfp5-ER.

Regeneracija je bila po okužbi *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER v večini primerov direktna, brez vmesne faze kalusa in hitrejša, saj so prve globularne strukture nastale že 10–12 dni po transformaciji ter dosežena je bila 204 % regeneracija. Prve globularne strukture po okužbi z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER so se pojavljale šele po 18 dneh, nastalo je več kalusa in regeneracija je bila manjša, samo 78,4 %.

Z dupleks PCR analizo smo pri vseh 149 regenerantih potrdili prisotnost fragmentov dolžine 650 bp, značilnih za selekcijski *nptII* gen in fragmentov dolžine 422 bp, značilnih za markerski *gfp* gen.

S kontrolnim poskusom, ki je bil sestavljen iz petih obravnavanj smo preverjali vpliv acetosiringona, antibiotika timentin, ki preprečuje rast *A. t.* in selekcijskega antibiotika kanamicin na rast in regeneracijo netransformiranih listnih izsečkov tobaka. Kontrola oziroma gojišče K1 je vsebovalo samo MS regeneracijsko gojišče, brez dodatkov, K2 je imel dodan še acetosiringon (100 µM), K3 je vseboval kanamicin (300 mg/l), K4 timentin (150 mg/l) in K5 kanamicin (300 mg/l) in timetin (150 mg/l). Na gojišču K1, K2 in K4 so se po 11 dneh izsečki povečali, bili so zeleni in po 19 dneh je nastal kalus ter prvi regeneranti. Na gojišču K3 in K5 z dodatkom kanamicina so izsečki začeli rumeneti, pojavila se je nekroza in izsečki so propadli. V tem primeru ni prišlo do tvorbe regenerantov.

## 7 VIRI

- Afolabi A.S. 2007. Status of clean gene (selection marker-free) technology. African Journal of Biotechnology, 6: 2910-2923
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 1-28
- CERA. 2014. GM crop database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA). Washington D.C. ILSI Research Foundation.  
[http://cera-gmc.org/index.php?hstIDXCode\[\] = 17 & gType\[\] = & auDate1 = & auDate2 = & action = gm\\_crop\\_database&mode=Submit](http://cera-gmc.org/index.php?hstIDXCode[] = 17 & gType[] = & auDate1 = & auDate2 = & action = gm_crop_database&mode=Submit) (17.marec 2014)
- Cubitt A. B., Woollenweber L. A., Heim R. 1999. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. V: Methods in Cell Biology. Green Fluorescent Proteins, vol. 58. Sullivan K. F., Kay S. A. (ur.). San Diego. Academic Press: 19-30
- de Witt H. C. 1978. Rastlinski svet. Vol. 2: Semenovke 2. Ljubljana, Mladinska knjiga: 378 str.
- Encyclopedia of Life. 2014.  
<http://eol.org/pages/581050/overview> (17.marec 2014)
- Fisher D.K., Guiltinan M.J. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. Plant Molecular Biology Reporter, 13, 3: 278-289
- Green Fluorescent Protein. 2013.  
[http://swift.cmbi.ru.nl/teach/graduateCourse/GC\\_2.html](http://swift.cmbi.ru.nl/teach/graduateCourse/GC_2.html) (30.9.2013)
- Gleave A.P. 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology, 20: 1203-1207
- Harper B.K., Mabon S.A., Leffel S.M., Halfhill M.D., Richards H.A., Moyer K.A., Stewart Jr., C.N. 1999. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. Nature Biotechnology, 17: 1125-1129
- Haseloff J., Amos B. 1995. GFP in plants. Trends in Genetics 11: 328-329
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 94: 2122-2127

- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant Journal, 6: 271-282
- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. 1984. Inheritance of functional foregin genes in plants. Science, 223: 496-498
- 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. Science, 227: 1229-1231
- ISAAA Brief – 43. 2014 Executive summary.  
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>  
(17.marec 2014)
- Javornik B. 2004 Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 29-58
- 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. EMBO Journal, 6: 3901-3907
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo, 59: 63-66
- Lakshmi Sita G., Sreenivas G.L., Bhattacharya A. 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 4, 3-4: 189-195
- Mann D.GJ., Abercrombie L.L., Rudis M.R., Millwood R.J., Dunlap J.R., Stewart C.N. Jr. 2012. Very bright orange fluorescent plants: endoplasmatic reticulum targeting of orange fluorescent proteins as visual reporters in transgenic plants. BMC Biotechnology, 12: 17
- Matthysse A. G., Holmes K. V., Gurlitz R. H. G. 2008. A Virtuous Infection. The White House.  
<http://clinton4.nara.gov/WH/EOP/OSTP/Science/html/infection.html> (2.9.2013)
- Miki B., McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. Journal of Biotechnology, 107: 193-232
- Murashige T., Skoog H. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-479
- Nauerby B., Billing K., Wyndaele R. 1996. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 123: 169-177

- Park S.H., Rose S.C., Zapata C., Srivatanakul M., Smith R.H. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 34, 2: 117-121
- Parveez G.K.A., Majid N.A., Zainal A., Rasid O.A. 2007. Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for selecting transformed immature embryos of oil palm. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 15: 133-146
- Rao A.Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A.A., Husnain T., Riazuddin S. 2009. The myth of plant transformation. Biotechnology Advances, 27: 753-763
- Reichel C., Mathur J., Ecke P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B., Maas C. 1996. Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 5888-5893
- Stewart C.N. 2005. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. Trends in Plant Science, 10: 390-396
- Stewart C.N. 2006. Go with the glow: Fluorescent proteins to light transgenic organisms. Trends in Biotechnology, 24: 155-162
- Stiekema W.J., Visser L. 1991. Gene transfer and genes to be transferred. V: Biotechnological innovations in crop improvement. Jones L. (ed.) Oxford, Butterworth – Heinemann: 184-199
- Stolarz A., Macewicz J., Lörz H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. Journal of Plant Physiology, 137: 347-357
- Sullivan M. 2001. *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker. PP 728 – Soilborne Pathogens Class Project. Raleigh, North Carolina State University  
<http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Phytophthora/Ppnicotianae.htm> (2.9.2013)
- Sunilkumar G., Vijayachandra K., Veluthambi K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. Plant Science, 141: 51-58
- The Nobel Prize in Chemistry. 2013.  
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html)  
(2.9.2013)
- Transfection by Agrobacterium. 2008  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Agrobacterium\\_tumefaciens](http://en.wikipedia.org/wiki/Agrobacterium_tumefaciens) (2.9.2013)

Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 2: 2143-2150

Zupan J.R., Zambryski P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiology*, 107: 1041-1047

Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23, 1: 11-28

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Zlati Luthar za mentorstvo pri poskusu in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem za skrben pregled naloge recenzentu prof. dr. Jerneju Jakšetu in predsednici prof. dr. Marijani Jakše.

Posebna zahvala gre moji mami, ki mi je ves čas študija stala ob strani.

Za dodatno bodrenje in lektoriranje gre zahvala Ismetu Makiću in Dušanu Jošarju.

Tisočkrat hvala!

## PRILOGA A

Fenotipska in genotipska prisotnost *gfp* gena v regenerantih tobaka po transformaciji z *A. t.*-pBIN mgfp5-ER  
in *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER

Vzorec	Plazmid	Prisotnost <i>gfp</i> proteina	Konz. DNA ng/µl	Redčenje 20 ng/µl		Prisotnost transgenov
				DNA µl	H <sub>2</sub> O µl	
1	pBIN mgfp5-ER	da	916	2,2	97,8	da
2	pBIN mgfp5-ER	da	623	3,2	96,8	da
3	pBIN mgfp5-ER	da	329	6,1	93,9	da
4	pBIN mgfp5-ER	da	451	4,4	95,6	da
5	pBIN mgfp5-ER	da	442	4,5	95,5	da
6	pBIN mgfp5-ER	da	563	3,6	96,4	da
7	pBIN mgfp5-ER	da	417	4,8	95,2	da
8	pBIN mgfp5-ER	da	469	4,3	95,7	da
9	pBIN mgfp5-ER	da	506	4,0	96,0	da
10	pBIN mgfp5-ER	da	399	5,0	95,0	da
11	pBIN mgfp5-ER	da	750	2,7	97,3	da
12	pBIN mgfp5-ER	da	303	6,6	93,4	da
13	pBIN mgfp5-ER	da	423	4,7	95,3	da
14	pBIN mgfp5-ER	da	527	3,8	96,2	da
15	pBIN mgfp5-ER	da	1035	1,9	98,1	da
16	pBIN mgfp5-ER	da	469	4,3	95,7	da
17	pBIN mgfp5-ER	da	548	3,6	96,4	da
18	pBIN mgfp5-ER	da	516	3,9	96,1	da
19	pBIN mgfp5-ER	da	317	6,3	93,7	da
20	pBIN mgfp5-ER	da	443	4,5	95,5	da
21	pBIN mgfp5-ER	da	306	6,5	93,5	da
22	pBIN mgfp5-ER	da	454	4,4	95,6	da
23	pBIN mgfp5-ER	da	353	5,7	94,3	da
24	pBIN mgfp5-ER	da	227	8,8	91,2	da
25	pBIN mgfp5-ER	da	431	4,6	95,4	da
26	pBIN mgfp5-ER	da	546	3,7	96,3	da
27	pBIN mgfp5-ER	da	509	3,9	96,1	da
28	pBIN mgfp5-ER	da	283	7,1	92,9	da
29	pBIN mgfp5-ER	da	521	3,8	96,2	da
30	pBIN mgfp5-ER	da	497	4,0	96,0	da
31	pBIN mgfp5-ER	da	566	3,5	96,5	da
32	pBIN mgfp5-ER	da	422	4,7	95,3	da
33	pBIN mgfp5-ER	da	422	4,7	95,3	da
34	pBIN mgfp5-ER	da	439	4,6	95,4	da
35	pBIN mgfp5-ER	da	359	5,6	94,4	da
36	pBIN mgfp5-ER	da	413	4,8	95,2	da
37	pBIN mgfp5-ER	da	631	3,2	96,8	da
38	pBIN mgfp5-ER	da	692	2,9	97,1	da
39	pBIN mgfp5-ER	da	191	10,5	89,5	da
40	pBIN mgfp5-ER	da	1209	1,7	98,3	da
41	pBIN mgfp5-ER	da	306	6,5	93,5	da
42	pBIN mgfp5-ER	da	242	8,3	91,7	da
43	pBIN mgfp5-ER	da	498	4,0	96,0	da
44	pBIN mgfp5-ER	da	497	4,0	96,0	da
45	pBIN mgfp5-ER	da	593	3,4	96,6	da
46	pBIN mgfp5-ER	da	430	4,7	95,3	da

Priloga A se nadaljuje

nadaljevanje

Vzorec	Plazmid	Prisotnost gfp proteina	Konc. DNA ng/µl	Redčenje 20 ng/µl		Prisotnost transgenov
				DNA µl	H <sub>2</sub> O µl	
47	pART27 2mgfp5-ER	da	676	3,0	97,0	da
48	pART27 2mgfp5-ER	da	714	2,8	97,2	da
49	pART27 2mgfp5-ER	da	634	3,2	96,8	da
50	pART27 2mgfp5-ER	da	312	6,4	93,6	da
51	pART27 2mgfp5-ER	da	328	6,1	93,9	da
52	pART27 2mgfp5-ER	da	457	4,4	95,6	da
53	pART27 2mgfp5-ER	da	515	3,9	96,1	da
54	pART27 2mgfp5-ER	da	418	4,8	95,2	da
55	pART27 2mgfp5-ER	da	504	4,0	96,0	da
56	pART27 2mgfp5-ER	da	503	4,0	96,0	da
57	pART27 2mgfp5-ER	da	284	7,0	93,0	da
58	pART27 2mgfp5-ER	da	707	2,8	97,2	da
59	pART27 2mgfp5-ER	da	392	5,1	94,9	da
60	pART27 2mgfp5-ER	da	575	3,5	96,5	da
61	pART27 2mgfp5-ER	da	669	3,0	97,0	da
62	pART27 2mgfp5-ER	da	368	5,4	94,6	da
63	pART27 2mgfp5-ER	da	330	6,1	93,9	da
64	pART27 2mgfp5-ER	da	472	4,2	95,8	da
65	pART27 2mgfp5-ER	da	451	4,4	95,6	da
66	pART27 2mgfp5-ER	da	240	8,3	91,7	da
67	pART27 2mgfp5-ER	da	104	19,2	80,8	da
68	pART27 2mgfp5-ER	da	319	6,3	93,7	da
69	pART27 2mgfp5-ER	da	402	5,0	95,0	da
70	pART27 2mgfp5-ER	da	503	4,0	96,0	da
71	pART27 2mgfp5-ER	da	342	5,8	94,2	da
72	pART27 2mgfp5-ER	da	446	4,5	95,5	da
73	pART27 2mgfp5-ER	da	298	6,7	93,3	da
74	pART27 2mgfp5-ER	da	419	4,8	95,2	da
75	pART27 2mgfp5-ER	da	468	4,3	95,7	da
76	pART27 2mgfp5-ER	da	196	10,2	89,8	da
77	pART27 2mgfp5-ER	da	103	19,4	80,6	da
78	pART27 2mgfp5-ER	da	284	7,0	93,0	da
79	pART27 2mgfp5-ER	da	304	6,6	93,4	da
80	pART27 2mgfp5-ER	da	316	6,3	93,7	da
81	pART27 2mgfp5-ER	da	478	4,2	95,8	da
82	pART27 2mgfp5-ER	da	217	9,2	90,8	da
83	pART27 2mgfp5-ER	da	394	5,1	94,9	da
84	pART27 2mgfp5-ER	da	167	12,0	88,0	da
85	pART27 2mgfp5-ER	da	50	40,0	60,0	da
86	pART27 2mgfp5-ER	da	817	2,4	97,6	da
87	pART27 2mgfp5-ER	da	414	4,8	95,2	da
88	pART27 2mgfp5-ER	da	428	4,7	95,3	da
89	pART27 2mgfp5-ER	da	341	5,9	94,1	da
90	pART27 2mgfp5-ER	da	177	11,3	88,7	da
91	pART27 2mgfp5-ER	da	361	5,5	94,5	da
92	pART27 2mgfp5-ER	da	458	4,4	95,6	da
93	pART27 2mgfp5-ER	da	497	4,0	96,0	da
94	pART27 2mgfp5-ER	da	356	5,6	94,4	da
95	pART27 2mgfp5-ER	da	1182	1,7	98,3	da
96	pART27 2mgfp5-ER	da	602	3,3	96,7	da

Priloga A se nadaljuje

nadaljevanje

Vzorec	Plazmid	Prisotnost gfp proteina	Konc. DNA ng/µl	Redčenje 20 ng/µl		Prisotnost transgenov
				DNA µl	H <sub>2</sub> O µl	
97	pART27 2mgfp5-ER	da	487	4,1	95,9	da
98	pART27 2mgfp5-ER	da	335	6,0	94,0	da
99	pART27 2mgfp5-ER	da	587	3,4	96,6	da
100	pART27 2mgfp5-ER	da	514	3,9	96,1	da
101	pART27 2mgfp5-ER	da	1220	1,6	98,4	da
102	pART27 2mgfp5-ER	da	868	2,3	97,7	da
103	pART27 2mgfp5-ER	da	1210	1,7	98,3	da
104	pART27 2mgfp5-ER	da	641	3,1	96,9	da
105	pART27 2mgfp5-ER	da	1060	1,9	98,1	da
106	pART27 2mgfp5-ER	da	439	4,6	95,4	da
107	pART27 2mgfp5-ER	da	771	2,6	97,4	da
108	pART27 2mgfp5-ER	da	678	2,9	97,1	da
109	pART27 2mgfp5-ER	da	638	3,1	96,9	da
110	pART27 2mgfp5-ER	da	1131	1,8	98,2	da
111	pART27 2mgfp5-ER	da	281	7,1	92,9	da
112	pART27 2mgfp5-ER	da	292	6,8	93,2	da
113	pART27 2mgfp5-ER	da	364	5,5	94,5	da
114	pART27 2mgfp5-ER	da	379	5,3	94,7	da
115	pART27 2mgfp5-ER	da	349	5,7	94,3	da
116	pART27 2mgfp5-ER	da	362	5,5	94,5	da
117	pART27 2mgfp5-ER	da	418	4,8	95,2	da
118	pART27 2mgfp5-ER	da	273	7,3	92,7	da
119	pART27 2mgfp5-ER	da	145	13,8	86,2	da
120	pART27 2mgfp5-ER	da	447	4,5	95,5	da
121	pART27 2mgfp5-ER	da	612	3,3	96,7	da
122	pART27 2mgfp5-ER	da	787	2,5	97,5	da
123	pART27 2mgfp5-ER	da	741	2,7	97,3	da
124	pART27 2mgfp5-ER	da	847	2,4	97,6	da
125	pART27 2mgfp5-ER	da	839	2,4	97,6	da
126	pART27 2mgfp5-ER	da	709	2,8	97,2	da
127	pART27 2mgfp5-ER	da	997	2,0	98,0	da
128	pART27 2mgfp5-ER	da	1414	1,4	98,6	da
129	pART27 2mgfp5-ER	da	1097	1,8	98,2	da
130	pART27 2mgfp5-ER	da	677	3,0	97,0	da
131	pART27 2mgfp5-ER	da	826	2,4	97,6	da
132	pART27 2mgfp5-ER	da	560	3,6	96,4	da
133	pART27 2mgfp5-ER	da	787	2,5	97,5	da
134	pART27 2mgfp5-ER	da	415	4,8	95,2	da
135	pART27 2mgfp5-ER	da	682	2,9	97,1	da
136	pART27 2mgfp5-ER	da	537	3,7	96,3	da
137	pART27 2mgfp5-ER	da	500	4,0	96,0	da
138	pART27 2mgfp5-ER	da	584	3,4	96,6	da
139	pART27 2mgfp5-ER	da	539	3,7	96,3	da
140	pART27 2mgfp5-ER	da	648	3,1	96,9	da
141	pART27 2mgfp5-ER	da	900	2,2	97,8	da
142	pART27 2mgfp5-ER	da	1190	1,7	98,3	da
143	pART27 2mgfp5-ER	da	629	3,2	96,8	da
144	pART27 2mgfp5-ER	da	721	2,8	97,2	da
145	pART27 2mgfp5-ER	da	595	3,4	96,6	da
146	pART27 2mgfp5-ER	da	575	3,5	96,5	da

Priloga A se nadaljuje

nadaljevanje

Vzorec	Plazmid	Prisotnost <i>gfp</i> proteina	Konc. DNA ng/µl	Redčenje 20 ng/µl		Prisotnost transgenov
				DNA µl	H <sub>2</sub> O µl	
147	pART27 2mgfp5-ER	da	877	2,3	97,7	da
148	pART27 2mgfp5-ER	da	562	3,6	96,4	da
149	pBIN mgfp5-ER	da	463	4,3	95,7	da