

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja MOREL

**GENSKE TRANSFORMACIJE ORHIDEJ *Phalaenopsis*
IN *Bletilla* Z *Agrobacterium tumefaciens***

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja MOREL

**GENSKE TRANSFORMACIJE ORHIDEJ *Phalaenopsis* IN *Bletilla* Z
*Agrobacterium tumefaciens***

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

**GENETIC TRANSFORMATIONS OF *Phalaenopsis* AND
Bletilla ORCHIDS BY *Agrobacterium tumefaciens***

B. SC. THESIS
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija Kmetijstvo - agronomija in hortikultura, smer hortikultura. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje, Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta BOHANCA.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Borut BOHANEČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: dr. Helena LESAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, ne izključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Morel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dv1
DK	UDK 582.594:577.2:631.53:582.594:577.2 (043.2)
KG	<i>Phalaenopsis/Bletilla</i> /genske transformacije/ <i>Agrobacterium tumefaciens/gus</i> gen/ <i>gfp</i> gen/razmnoževanje rastlin/mikropropagacija
AV	MOREL, Mateja
SA	BOHANEČ, Borut (mentor)/LESAR, Helena (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za genetiko
LI	2015
IN	GENSKE TRANSFORMACIJE ORHIDEJ <i>Phalaenopsis</i> IN <i>Bletilla</i> Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TD	Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študijski program - 1. stopnja)
OP	XI, 41,[18] str., 3 pregl., 21 sl., 12 pril., 59 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V poskus genskih transformacij smo vključili orhideje <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla</i>. Po opravitvi je pri <i>Phalaenopsis</i> semenske glavice oblikovalo 31 (77,5 %) cvetov, od teh je bilo 6 (19,4 %) semenskih glav praznih, ostalih 25 (80,7 %) semenskih glav pa je vsebovalo seme. Skupno smo posejali semena na gojišče 148 petrijev, od tega 105 petrijev s semeni <i>Phalaenopsis</i> in 43 petrijev s semeni <i>Bletilla</i>. Kaljivost je bila boljša pri <i>Bletilla</i> (71,2 %), medtem ko je bila kaljivost semen pri <i>Phalaenopsis</i> 42,1 %. V genom orhidej <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla</i> smo z vektorskim sistemom z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in binarnim plazmidom pCAMBIA1301 vnesli <i>gus</i> gen za sintezo β-glukoronidaze. <i>Gfp</i> gen za zeleno fluorescentni protein smo vnesli s plazmidom pART27 2mgfp5-ER. Za transformacije smo izbrali 21 dni stare sejančke, ki so pri orhidejah pri tej starosti še v obliki protokormov. Skupno smo tretirali 411 protokormov <i>Phalaenopsis</i> in 724 protokormov <i>Bletilla</i>. Protokorme smo inkubirali v bakterijski suspenziji od 10 minut do 22 ur. Teden dni po transformaciji je preživel 37 protokormov <i>Phalaenopsis</i> (9 %) in 26 protokormov <i>Bletilla</i> (3,6 %). Izražanje <i>gus</i> gena smo testirali pri 21 protokormih, 6 je bilo GUS pozitivnih in 15 GUS negativnih. <i>Gus</i> se je izražal v zelo majhnem delu, le v nekaj celicah protokormov. Za izražanje <i>gfp</i> gena smo pregledali 33 protokormov z epifluorescentnim mikroskopom. Samo en protokorm je malo zeleno fluoresciral, vendar fluorescenca ni bila tako izrazita, da bi lahko z gotovostjo trdili, da je posledica transformacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dv1
DC UDC 582.594:577.2:631.53:582.594:577.2 (043.2)
CX *Phalaenopsis/Bletilla/genetic transformation/Agrobacterium tumefaciens/gus gene/gfp gene/plant propagation/micropropagation*
AU MOREL, Mateja
AA BOHANEČ, Borut (supervisor)/LESAR, Helena (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2015
TI GENETIC TRANSFORMATION OF *Phalaenopsis* AND *Bletilla* ORCHIDS BY *Agrobacterium tumefaciens*
DT B. Sc. Thesis (Professional Study Programmes)
NO XI, 41, [18] p., 3 tab., 21 fig., 12 ann., 59 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Phalaenopsis* and *Bletilla* orchids were included in the study of genetic transformation. After artificial pollination 31 (77.5 %) flowers developed seed capsules in *Phalaenopsis*, 6 (19.4 %) capsules were empty and 25 (80.7 %) capsules contained seeds. 148 petri dishes were inoculated seeds, 105 with *Phalaenopsis* seeds and 43 with *Bletilla* seeds. The germination was better in *Bletilla* (71.2%), while in *Phalaenopsis* only 42.1 % seeds germinated. The indirect method of vector system of *Agrobacterium tumefaciens* and plasmid pCambia1301 was used for transfer of *gus* gene for the synthesis of β -glucuronidase into *Phalaenopsis* and *Bletilla* genome. Plasmid pART27 2mgfp5-ER was used for transfer of *gfp* gene for the synthesis of green fluorescent protein. Protocorms obtained 21 days after germination were selected for transformation. 411 *Phalaenopsis* protocorms and 724 *Bletilla* protocorms were treated. Protocorms were incubated in bacterial suspension 10 minutes to 22 hours. One week after infection, 37 protocorms *Phalaenopsis* (9 %) and 26 protocorms *Bletilla* (3.6 %) were vital. Expression of *gus* gene was assayed in 21 protocorms and confirmed in 6 protocorms, but only a few cells in each protocorm were GUS positive. Emission of green fluorescence was observed under an epifluorescence microscope. Only one protocorm emitted some green fluorescence, but it was indistinct and we were unable to confirm the transformation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 DRUŽINA ORCHIDACEAE– KUKAVIČEVKE	2
2.1.1 <i>Phalaenopsis</i> – falenopsis	2
2.1.2 <i>Bletilla striata</i>	3
2.2 RAZMNOŽEVANJE	3
2.2.1 Zgradba cveta	3
2.2.2 Razvoj plodu	4
2.3 MIKROPROPAGACIJA.....	5
2.4 GENSKÉ TRANSFORMACIJE	5
2.4.1 Neposredni oziroma direktni vnos genov v rastlino	6
2.4.2 Posredni vnos genov	6
2.4.3 Seleksijski in markerski geni.....	8
2.4.4 Genske transformacije orhidej.....	10
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	12
3.1.1 <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla striata</i>	12
3.1.2 Ročno opraševanje.....	12
3.2 MIKROPROPAGACIJA.....	13
3.2.1 Sterilizacija in sejanje semen.....	13
3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ	13
3.4 BAKTERIJE IN PLAZMIDI	14
3.5 TRANSFORMACIJA ORHIDEJ.....	14
3.5.1 Priprava bakterijske kulture za transformacijo.....	14

3.5.2 Transformacija protokormov.....	15
3.5.3 Spiranje protokormov po transformaciji in selekcija.....	16
3.6 TESTI IZRAŽANJA GENOV	16
3.6.1 Histokemični test izražanja <i>gus</i> gena.....	16
3.6.2 Pregled izražanja <i>gfp</i> gena.....	16
3.7 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI PROTOKORMI.....	16
4 REZULTATI.....	17
4.1 OPLODITEV IN TVORBA PLODOV PRI <i>Phalaenopsis</i>	17
4.2 KALITEV PO SEJANJU	17
4.3 TRANSFORMACIJE Z <i>gfp</i> GENOM.....	20
4.3.1 Izražanje <i>gfp</i> gena.....	22
4.4 TRANSFORMACIJE Z <i>gus</i> GENOM	22
4.4.1 Izražanje <i>gus</i> gena	27
4.5 KONTROLNI POSKUS SEJANJA BREZ OKUŽEVANJA Z <i>A. t.</i>	28
4.6 VITALNOST PROTOKORMOV PO SEJANJU IN TRANSFORMACIJI.....	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	31
5.1 RAZPRAVA.....	31
5.1.1 Navzkrižno opraševanje, razvoj plodov in semen	31
5.1.2 Izbira izsečka za transformacije	31
5.1.3 Transformacija orhidej <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla striata</i>	32
5.1.4 Nekaljivost semen in okužbe.....	34
5.2 SKLEPI.....	35
6 POVZETEK	36
7 VIRI	38
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Število odprtih, oprašenih, oplojenih in propadlih cvetov orhidej rodu <i>Phalaenopsis</i>	17
Preglednica 2:	Stanje na gojišču 19 dni po inokulaciji semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla</i>	18
Preglednica 3:	Število izločenih petrijevk in vzrok za propad sejančkov orhidej <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla</i> 19, 25 in 45 dni po sejanju	29

KAZALO SLIK

Slika 1:	<i>Phalaenopsis</i> - falenopsis	2
Slika 2:	<i>Bletilla striata</i> (Bletilla, 2006)	3
Slika 3:	Deli cveta rodu <i>Phalaenopsis</i>	4
Slika 4:	Semenska glavica (A) in seme (B) rodu <i>Phalaenopsis</i>	4
Slika 5:	Semenska glavica nastala po križanju <i>Phalaenopsis</i> 'Ocean Pacifik' x <i>Phalaenopsis</i> 'Anthura Tainan'	12
Slika 6:	Na levi je petrijevka s protokormi <i>Phalaenopsis</i> v bakterijski suspenziji, desno od nje pa je sterilna elenmajerica, na kateri je sterilen lij. Nanj je položen avtoklaviran filter papir, na katerem bodo pri vlivanju ostali protokormi, za zračno sušenje po inkubaciji.	15
Slika 7:	Inkubacija protokormov <i>Phalaenopsis</i> v bakterijski suspenziji (A) in zračno sušenje po inkubaciji (B)	15
Slika 8:	19 dni stari sejančki <i>Phalaenopsis</i> v morfološki fazi protokorma	18
Slika 9:	Delež zelenih protokormov in delež propadlih protokormov <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla</i> 19 dni po inokulaciji semen	19
Slika 10:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Phalaenopsis</i> teden dni po transformaciji v prvem poskusu	20
Slika 11:	Protokormi po 3 dneh kokultivacije orhideje <i>Phalaenopsis</i> z razraščeno bakterijo <i>Agrobacterium</i>	21
Slika 12:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Bletilla</i> teden dni po transformaciji v drugem poskusu	21
Slika 13:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Phalaenopsis</i> teden dni po transformaciji v prvem poskusu	22
Slika 14:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Bletilla</i> teden dni po transformaciji v četrtem poskusu	24
Slika 15:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Bletilla</i> teden dni po transformaciji v šestem poskusu	25
Slika 16:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Bletilla</i> teden dni po transformaciji v sedmem poskusu	26
Slika 17:	Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje <i>Bletilla</i> teden dni po transformaciji v osmem poskusu	27
Slika 18:	Izražanje <i>gus</i> gena v protokormih <i>Phalaenopsis</i>	28
Slika 19:	Kontrolni sejančki pri <i>Phalaenopsis</i> : A – 21 dni stari sejančki na gojišču za regeneracijo, B – mesec in pol stari sejančki pred subkultivacijo, C – 4 mesece stari kontrolni sejančki pred drugo subkultivacijo	29
Slika 20:	Število okuženih petrijevok 25 oziroma 45 dni po inokulaciji sejančkov orhidej <i>Phalaenopsis</i> in <i>Bletilla</i>	30
Slika 21:	Okužbe s plesnijo (A in B) in propadli protokormi (C)	30

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Zgradba cveta rodu *Phalaenopsis* (Jevšnik, 2006)
- Priloga B: V križanje vključene sorte orhidej rodu *Phalaenopsis*
- Priloga C: V križanje vključeni sorti orhidej rodu *Phalaenopsis*
- Priloga D: V križanje vključeni sorti orhidej *Phalaenopsis*
- Priloga E: *Bletilla striata* (Ignacio, 2008)
- Priloga F: Križanje in razvoj plodov *Phalaenopsis*
- Priloga G: Razvoj plodov *Phalaenopsis*
- Priloga H: Sestava gojišč
- Priloga I: Plazmid pCAMBIA1301 (Cambia, 1997)
- Priloga J: Plazmid pART27 (Gleave, 1992)
- Priloga K: Barva oprašenih cvetov orhidej rodu *Phalaenopsis* ter njihove oznake
- Priloga L: Čas inkubacije 21 dni starih protokormov *Phalaenopsis* in število rastlin, ki so preživele prvi teden po transformaciji

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

As	acetosiringon
A.t.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
B.	<i>Bletilla</i>
DICA	dikloroizocianurna kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
MS	Murashige in Skooggojišče
P.	<i>Phalaenopsis</i>
PLB	Protocorm - like bodies, protokorm

1 UVOD

Opraševanje orhidej je bilo vse do sredine 18. stoletja popolna neznanka. Prvi, ki je v znanstvenem članku natančno opisal to metodo, je bil zdravnik, dr. John Harris. Začel je popolnoma drugačen sistem gojenja orhidej (Jevšnik, 2006).

Mnoga leta je bil edini zanesljivi način razmnoževanja orhidej vegetativno razmnoževanje z delitvijo večje rastline, saj je skoraj do sredine 19. stoletja prevladovalo mnenje, da so orhideje rastline, ki se jih ne da razmnoževati s semenom (Jevšnik, 2006). Leta 1922 je Lewis Knudson ugotovil, da je možna asimbiotska kalitev orhidej in prisotnost mikoriznih gliv ni potrebna. Pri tej kalitvi je možna kalitev in preživetje večjega števila semen oziroma rastlin na manjšem prostoru, to pa je z ekonomskega vidika zelo zaželeno. Kasneje so naredili še mnogo poskusov na različnih gojiščih, uporabili pa so različne vrste tropskih orhidej. Nekateri poskusi so zahtevali večletna opazovanja in preučevanja preden so dokončno ugotovili, na katerem gojišču posamezne vrste bolje uspevajo (George, 1993).

Gensko spreminjanje rastlin oziroma metoda žlahtnjenja je dopolnitev obstoječim metodam. Biotehnološke metode žlahtnjenja rastlin vključujejo različna znanja in tehnike, ki omogočajo izbiro genotipa, poznavanje regeneracijskih sposobnosti posamezne rastline v *in vitro* razmerah, izbiro genov, pripravo genskega konstrukta oziroma genskih elementov, transformacijo oziroma vnos genov, gojenje transformiranih rastlin in spremljanje transgenov na nivoju genotipa, kot tudi fenotipsko izražanje transgenov. Genske transformacije nam omogočajo, da brez filogenetskih omejitev vključimo zelene lastnosti v genom rastline (Javornik, 2000).

S klasičnimi metodami žlahtnjenja so nastajali številni križanci orhidej. Vsi so imeli pomembne lastnosti, vključno z novimi barvami in oblikami cvetov. Vendar pa je hitrost pridobivanja novih križancev omejena z dolgim življenjskim ciklom orhidej in majhno količino spontanij mutacij. Tehnike prenosa genov tako predstavljajo pomemben preskok v razvoju novih lastnosti orhidej, kot so barva in velikost cvetov, vonj, odpornost na bolezni in škodljivce, toleranca na stres ali dolga obstojnost cvetov.

1.1 CILJI NALOGE

Cilj diplomskega dela je bil v genom orhidej *Phalaenopsis* z vektorskim sistemom z *Agrobacterium tumefaciens* vnesti *gus* gen za sintezo β -glukuronidaze in *gfp* gen za zeleno fluorescenco ter selekcijski gen za odpornost na antibiotik. Pri regenerantih smo želeli določiti izražanje markerskih genov.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavili smo, da sta markerska sistema *gus* in *gfp* primerna za ugotavljanje transformacije pri orhidejah *Phalaenopsis* in *Bletilla striata*. Pričakovali smo, da bomo gene lahko vnesli v 21 dni stare protokorme s pomočjo komercialnih binarnih plazmidov pCAMBIA1301 za *gus* gen in pART27 2mgfp5-ER za *gfp* gen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA ORCHIDACEAE– KUKAVIČEVKE

Kukavičevke, kakor s slovenskim imenom poimenujemo družino Orchidaceae, so poleg košarnic (Asteraceae) in trav (Poaceae), ena najbolj razširjenih družin med cvetočimi rastlinami na Zemlji. Družina kukavičevk naj bi po zadnjih ocenah obsegala okoli 750 rodov in 25.000 vrst, kar predstavlja med 8 in 10 odstotki vseh rastlinskih vrst na Zemlji (Jevšnik, 2006).

Skupne značilnosti kukavičevk so omejene na osnovne botanične lastnosti. Pri vseh vrstah imajo plodovi obliko glavic oziroma kapsul, ki vsebujejo množico drobnih semen brez rezervnih snovi. Seme lahko kali le v simbiozi z glivo. Someren cvet je sestavljen iz šestih cvetnih listov, ki so razporejeni v dveh vretencih. Pelodna zrna so združena v bolj ali manj čvrste skupke, ki jih imenujemo poliniji. Prašniki in brazda so zrasli v tvorbo, ki ji pravimo stebriček (Jevšnik, 2006).

Kukavičevke so se prilagodile, z izjemo skrajnih polarnih in puščavskih predelov, vsem klimatskim razmeram. Najštevilčnejše so v tropskih predelih Južne Amerike in jugovzhodne Azije. Niso pa vse vrste tropske, okoli 300 jih raste tudi v Evropi, od tega jih je v Sloveniji znanih okoli 76 vrst in podvrst, ki jih uvrščamo v 27 rodov (Ravnik, 2002).

2.1.1 *Phalaenopsis* – falenopsis

Ime *Phalaenopsis* izvira iz grških besed *phalaina* (molj) in *opsis* (izgled), kar se nanaša na obliko cveta (slika 1) (Jevšnik, 2006).



Slika 1: *Phalaenopsis* - falenopsis

Vrste rodu *Phalaenopsis* uspevajo po tropski Aziji in otokih Tihega Oceana. Največ jih je v stalno vlažnih in toplih razmerah. To so vrste podrodov *Phalaenopsis* in *Polychilos* (Christenson, 2001). Rastline *Phalaenopsis* so epifiti ali litofiti in se s koreninami oprijemajo vej, debel ter z mahom poraščenih skal, na mestih, kjer ni direktnega sonca. Korenine v naravi prosto visijo v zraku oziroma se oprijemajo podlage. Listi so mesnati, podolgovato ovalni in služijo shranjevanju snovi ter vlage (Jevšnik, 2006).

2.1.2 *Bletilla striata*

Temnejše cvetoča (roza do temno vijolična) vrsta *Bletilla striata* izvira iz Kitajske in Japonske, svetlejše cvetoča (bela, rumena) iz Tajvana in Vietnama. Je simpodialna, terestrična orhideja, s pokončno rastjo in suličastimi listi. Večina rastlin zraste v višino približno 30 cm. Vsak list ima cevasto listno steblo. Na vrhu poganjka izrašča klasasto socvetje s 6 - 10 cvetovi, ki se odpirajo postopoma, od tistega, ki leži najnižje do tistega cveta, ki leži najvišje. Medena ustna ima nekaj nagubanih brazd, ki so lahko v isti ali drugi barvi kot preostali cvet (slika 2) (Orchid .., 2004, cit. po Zupan, 2004).



Slika 2: *Bletilla striata* (Bletilla, 2006)

Bletilla striata vse bolj pridobiva na pomenu tudi v Evropi, kot okrasna rastlina in kot vir farmakoloških učinkovin. Je nezahtevna za gojenje, dobro prezimi tudi pri nas in je zato zelo primerna za zasaditev na zelenicah v vrtovih in parkih. Pozno jeseni spusti liste oz. posušeni listi pokrijejo bulbile pred poškodbami živali (Brickell, 1996; Strong, 2000).

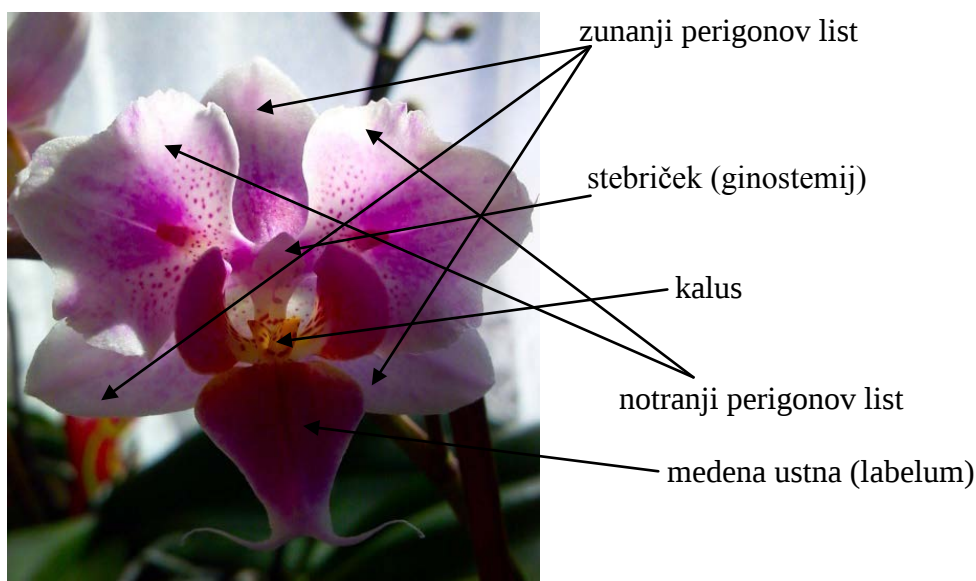
2.2 RAZMNOŽEVANJE

2.2.1 Zgradba cveta

Cvetovi kukavičevk so zigomorfni, sestavljeni iz šestih cvetnih listov. Osnova cveta pri orhidejah so trije zunanji čašni listi imenovani sepale, ki varujejo notranje tri venčne liste imenovani petale (slika 3) (priloga A).

Notranji krog cveta je sestavljen iz treh venčnih listov. Od njih je navadno eden drugačen po izgledu (medena ustna) oz. labelum. Podaljšan je v ostrogo, v kateri se nahajajo nektarne žleze, ki privlačijo žuželke k opraševanju (slika 3, priloga A).

Spolni organi, ki so sestavljeni iz prašnikov in pestiča, so pri orhidejah združeni v podolgovato strukturo imenovano stebriček oz. ginostemij. Pelodna zrna so pri večini kukavičevk združena v voskaste kepice (poliniji). Ležijo pod prašnično kapico na vrhu stebrička v vdolbinici (klinandrij). Ženski spolni organ (brazda oz. stigma) se s tkivom imenovanim rostelum loči od moškega spolnega organa (slika 3, priloga A) (Kramer, 1997; Jevšnik, 2006).



Slika 3: Deli cveta rodu *Phalaenopsis*

2.2.2 Razvoj plodu

Pri opraševanju večine kukavičevk imajo glavno vlogo žuželke, kar pomeni, da so te rastline alogamne (tujeprašne). Žuželka na cvetu oplazi lepljivi del prašnika (viscidij) in ta se ji zalepi na glavo ali hrbet. Ko se s hitrim refleksom umika, odtrga polinije, ki so skriti pod kapico in odleti na drugi cvet. S telesom se dotakne stebrička in poliniji se prilepijo na lepljivo brazdo. Tako pride do oprašitve. Na poti iz cveta se znova dotakne njegovih polinijev in jih odnese na drugi cvet (Jevšnik, 2006). Rastline v zaprtem prostoru je potrebno oprašiti umetno. Ta postopek je podoben, kot bi cvet oprašile žuželke. Umetno oprašitev lahko izvedemo kadarkoli, ko je cvet odprt.



A



B

Slika 4: Semenska glavica (A) in seme (B) rodu *Phalaenopsis*

Po uspešni oprašitvi je funkcija cvetnih listov zaključena, zato se začnejo sušiti. Plodnica, ki je do sedaj opravljala nalogo cvetnega peclja, se začne debeliti (Jevšnik, 2006).

V semenski glavici oziroma kapsuli (slika 4), plodu orhidej, se razvije od 20 do 50 lahko pa tudi do 4 milijone semen (Arditti, 1992). To, da se semenska glavica razvije, še ne pomeni, da je seme v njej že dozorelo.

Semena orhidej so zelo lahka in majhna. Običajno je v njih znotraj perikarpa še nedozorel embrij. Sekundarnega endosperma imajo malo ali pa ga sploh nimajo, zato za kalitev in razvoj posebej potrebne simbiotske glive. Kukavičevke imajo razvito orhidejsko mikorizo. Simbioza se mora vzpostaviti zelo hitro po kalitvi semena (Sinkovič, 2000).

2.3 MIKROPROPAGACIJA

Sadike orhidej je mogoče preprosto pridobivati neposredno iz semena. Kalitveno gojišče potrebuje dodatne hranilne snovi. Orhideje lahko z mikropropagacijo tudi kloniramo. V tem primeru so sadike popolnoma identične izhodiščni rastlini. Mikropropagacijo se največkrat uporablja pri gojenju okrasnih rastlinah za trg, saj se tako nekoliko višji stroški pridelave lažje obrestujejo (Bohanec, 2004).

Ko seme inokuliramo na gojišče s sladkorjem, vzkali po 7 do 235 dneh. Pri rodu *Phalaenopsis* se celice terminalnega dela začnejo hitro deliti in tvorijo meristem. Pod meristemom se celice ne delijo, temveč se le povečajo. Zaradi tega je embrij najprej hruškaste oblike, nato pa postane okroglast. V tej fazi embrij zapusti semensko ovojnico oziroma testo. Tedaj ga imenujemo protokorm. Iz njega poženejo številni lasasti rizoidi. Ti so sprva enocelični, nato pa večcelični. Nekatere celice na zgornji strani tvorijo zametke primordialnega lista. Prvi list se razvije kot ovoj mlade rastline. Kmalu zatem nasproti njega požene drugi list. Prva korenina se razvija znotraj protokorma. Predre ga na spodnji ali bazalni strani. Semena orhidej nimajo endosperma in imajo navadno zelo občutljivo strukturo. Tako se ločijo od ostalih rastlin. Razen nekaj škrobnih zrn ne vsebujejo zaloge ogljikovih hidratov. Čeprav v naravi semena orhidej kalijo samo, če jih okužijo mikorizne glive *Rhizoctoria*, *Tulasnella*, *Ceratobasidium*. Na specifičnih gojiščih v laboratorijih uspevajo relativno dobro (Arditti, 1992).

Razvoj sejancev *in vitro* lahko traja od 50 do 724 dni, za poznejši razvoj *in vitro* je potrebnih še 4 do 31 mesecev. Sejančki lahko, odvisno od vrste, prvič zacvetijo po enem večasih pa celo po 11 letih (Arditti, 1992).

2.4 GENSKÉ TRANSFORMACIJE

Pri genskih transformacijah gre za vnos genov v genom rastline. Ta proces je ena od metod žlahtnjenja rastlin in dopolnitev obstoječim načinom žlahtnjenja. Vendar imajo genske transformacije prednost v tem, da s to metodo pridobimo požlahtnjene želene lastnosti rastlin v relativno kratkem času, hkrati pa omogočajo prenos genov med različnimi organizmi brez filogenetskih omejitev (Javornik, 2000).

Prva uspela genska transformacija je bila izvedena leta 1983, ko so v tobak vnesli bakterijski gen za odpornost na antibiotik. Vnos so izvedli posredno s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* (A. t.). Drugo uspešno metodo so začeli pogosteje uporabljati v prvi polovici devetdesetih let. Biolistična metoda se je uporabljala posebno za transformacijo žit, ker A. t. za enokaličnice v tistem obdobju ni bil učinkovit (Bohanec, 2004).

2.4.1 Neposredni oziroma direktni vnos genov v rastlino

Sistem posrednega vnosa genov z *Agrobacterium* je uporabljen predvsem pri dvokaličnicah. Vendar zaradi uporabe antibiotikov lahko pride do zmanjšane regeneracijske sposobnosti tkiva pri odstranjevanju bakterije po okužbi. Začele so se uveljavljati metode neposrednega vnosa genov. To pa predvsem zato, ker se enokaličnice (žita) slabo odzovejo na okužbo z *A. t.*. Pri vnosu genov v rastlinsko celico ali tkivo pride do povečanja propustnosti membrane z različnimi postopki (Potrykus, 1990; Songstad in sod., 1995).

▪ Elektroporacija

Pri tej tehniki gre za povečanje permeabilnosti lipidnih dvojnih slojev celične membrane, do katere pride s pomočjo kratkih električnih impulzov. Tako je skozi membrano omogočena difuzija makromolekul DNA. Metoda je učinkovita. Pri specifičnem rastlinskem materialu, kot so protoplasti, mikrospore, meristemi in somatski embriji z manjšim številom celic, omogoča lažji prehod makromolekul. Glavna težava pri delu s protoplasti je nizka regeneracija, saj ta iz protoplastov uspe le pri manjšem številu rastlinskih vrst. Ta metoda je zato uporabna le pri nizkem številu rastlinskih vrst. Uspešna je bila za transformacijo riža, koruze, itd. Elektroporacija je uporabna tudi za vnos DNA v mikrospore, ovule in predvsem za vnos v enocelične strukture oziroma v tkiva z manjšim številom celic.

▪ Polietilen glikol (PEG)

Večkrat ga uporabljajo pri protoplastih v kombinaciji z ultrazvokom ali v izbranih tkivih. Polietilen glikol deluje po podobnem načelu kot elektroporacija.

▪ Mikro in makro vbrizgavanje DNA

Gre za zelo zahtevno in natančno tehniko. Z mikro pipeto vbrizgamo DNA v protoplaste, ta tehnika je bila uspešna le pri ogrščici. Makro vbrizgavanje DNA v mlade cvetne poganjke je bilo uspešno pri rži.

▪ Obstreljevanje s hitrimi delci oziroma biolitska

Gre za trenutno najbolj konkurenčno metodo posrednemu vnosu s pomočjo vektorjev. Uporablja se tam, kjer drugi načini (predvsem transformacija z *A. t.*), še niso uspešni zaradi narave rastlinskega tkiva. Postopek temelji na vezavi DNA na drobne delce (0,1 - 1,5 μm) zlata ali volframa. Plazmidno DNA nanesejo na membrane oziroma na plastične "izstrelke". S pomočjo potisnega plina jih močno pospešijo in nato ustrelijo v tarčno tkivo. Delci zlata prodrejo skozi celično steno in omogočijo vnos DNA (Bohanec, 2004).

2.4.2 Posredni vnos genov

Pri posrednem načinu se DNA vnese s pomočjo vektorjev. Ta vnos poteka predvsem s pomočjo bakterij *Agrobacterium tumefaciens* in *Agrobacterium rhizogenes* (Bohanec, 2004). *A. t.* je talna gram negativna bakterija, ki v naravi lahko okuži rastline in na poškodovanem mestu izzove nastanek rakastega tumorja (angl. crown gall disease). V tem kalusnem tkivu se tvorijo opini, derivati aminokislin arginina in leucina. *A. t.* jih za svojo rast izrablja kot vir ogljika in dušika (Zupan in sod., 2000). Bakterija torej spremeni del

rastline v skupek celic, ki proizvajajo snovi za njeno korist. *A. t.* namreč vključi majhen del svoje DNA, tako imenovano T-DNA (tumorska DNA), v genom rastline. Pride do naravnega prenosa DNA iz bakterijskega plazmida v rastlinski genom (Hiei in sod., 1994). T-DNA je del Ti-plazmida (tumor inducirajoči plazmid), ki je dolg 200 - 800 kbp in vsebuje gene za virulenco, tako imenovane *vir* gene, gene za sintezo in razgradnjo opinov ter gene za tvorbo rakastih celic, ki jih imenujemo *onc* geni. T-DNA je torej del z *onc* geni in geni za sintezo opinov (Chilton in sod., 1977). Bakterijska T-DNA se vključi v rastlinsko celico ob pomoči več beljakovin, ki jih kodira Ti-plazmid. Tako zavarovana DNA se vnese z beljakovinami, kar olajša prehod skozi citoplazmo in vstop v jedro (Bohanec, 2004).

Tudi pri *A. rhizogenes* je znan takšen prenos DNA iz bakterij v rastlinski genom, ki povzroča pospešeno rast koreninskih laskov (angl. hairy root disease). Takšnega prenosa genov v rastlino s pomočjo Ti-plazmida pa so sposobne tudi rastlinske simbiotske bakterije *Rhizobium*, *Sinorhizobium* in *Mesorhizobium* (Broothaerts in sod., 2005).

Za prenos T-DNA so potrebni geni za virulenco, tako imenovani *vir* geni in kromosomski virulentni geni, ki jih imenujemo *chv* geni. Na bakterijskem kromosomu se nahajata gena *chvA* in *chvB*. Protein, ki sodeluje pri sintezi cikličnega glukana, kodira gen *chvB*. Ta protein vpliva na pritrditev bakterije na celično steno rastlinske celice. *ChvA* v bakterijski notranji membrani kodira transportni protein in prenaša ciklični β -1,2 glukan v prostor med celično steno in plazmalemo, imenovan periplazma (Hellens in sod., 2000).

35 *vir* genov je organiziranih v 7 operonov, ki so označeni kot *virA*, *virB*, vse do *virG*. Nahajajo se na Ti-plazmidu in uravnavajo prenos T-DNA. Izražajo se samo v območju poškodovanih rastlinskih celic. Geni *vir* regije so potrebni za izrez T-DNA iz Ti-plazmida, prenos preko bakterijske membrane v rastlinsko celico, transport v jedro in vključitev v rastlinski genom. VirA protein zazna fenolne komponente, ki se sprostijo ob poškodbi rastline. Posledica tega je avtofosforilacija virA proteina, ki nato fosforilira virG protein. Modificiran virG protein aktivira ostale *vir* gene. VirD1 in virD2 proteina prepoznata mejne sekvence T-DNA in omogočita cepitev enojne verige T-DNA v mejnih sekvencah. Mejne sekvence so na obeh straneh T-DNA, dolge so približno 25 bp in imajo specifično mesto za endonukleazno cepitev. Po cepitvi se znotraj mejnih sekvenc sintetizira nova veriga. Odcepljena enoverižna T-DNA je pred nukleazami zaščitena z virD2 proteinom, ki se veže na 5' koncu. Na verigo se veže še virE2 protein in nastane T-kompleks, ki se transportira iz bakterijske v rastlinsko celico in se naključno vključi v rastlinski genom (Zupan in Zambryski, 1995).

Danes se naravni transformacijski sistem *A. t.* uporablja za vnos zelenih genov v rastlino. Da bi dosegli gensko transformacijo, je bil naravni plazmid povsem spremenjen, izoblikovani pa so različni sistemi Ti-plazmidnega vektorja. Tem sistemom je skupno, da imajo odstranjene bakteriji koristne gene za sintezo opinov in *onc* gene iz naravne T-DNA. Posledično ne pride do tvorbe rakastih celic in tvorbe opinov, ampak ostanejo samo mejne sekvence T-DNA, ki omogočajo vnos tarčne DNA v genom rastline. Želeni genski konstrukt pa je bilo mogoče vključiti znotraj območja mejnih sekvenc (Zambryski in sod., 1983).

Poznamo dve osnovni obliki vektorjev. Integrirana oziroma *cis* vektorska oblika ima T-DNA, ki jo želimo vnesti v rastlino in *vir* regijo na enem plazmidu. Tak vektor je zelo velik (≈ 100 kbp). Posledično so molekule in genetske manipulacije z njim precej otežene. Pri *trans* ali binarnih vektorjih bakterija vsebuje dva plazmida. To sta razoroženi plazmid, sestavljen iz skoraj celotnega Ti-plazmida brez T-DNA in binarni plazmid. Zanj je značilno, da je manjši in vključuje samo T-DNA ter mejne regije. Pri binarnih plazmidih kloniramo izbrane gene v binarni plazmid. Ta se lahko razmnožuje tako v bakteriji *Escherichia coli* kot tudi v *A. t.*. Z njim lahko enostavno upravljamo v *E. coli* in ga šele nato vežemo v *A. t.*, ki ima še drugi plazmid (razoroženi Ti-plazmid) z *vir* geni (Bevan, 1984).

Tuje gene, ki jih želimo prenesti, vključimo med mejne sekvence T-DNA, genski konstrukt pa je potrebno opremiti z ustreznimi promotorji in terminatorji. Ti omogočajo izražanje vnesenega gena v rastlini. Promotor je specifično nukleotidno zaporedje, ki se nahaja pred zapisom za gen in uravnava čas, mesto in obseg prepisa določenega gena in s tem proteina, ki ga kodira.

Promotorji so lahko konstitutivni ali inducibilni. Prvi se izražajo neprekinjeno, medtem ko se drugi aktivirajo le v določenem tkivu ali organu, v določeni razvojni fazi ali ob določenem dražljaju (Stiekema in Visser, 1991).

Metoda posrednega vnosa genov ima prednost pred neposrednim vnosom. Rezultati namreč kažejo, da med transgenimi regeneranti pri metodi posrednega vnosa genov, vnesemo manjše število kopij genov, ki so pogosto tudi manj poškodovani. Ker gre za naravni vnos genov je tudi rastlinsko tkivo manj poškodovano (Bohanec, 2004).

2.4.3 Seleksijski in markerski geni

Seleksijski geni bakterijskih plazmidov so večinoma geni za odpornost na določene antibiotike (kanamicin, higromicin) (Wilmink in Dons, 1993). V večini primerov se transformira le majhen delež rastlinskih celic, zato je potrebno skupaj z želenim genom med mejne sekvence T-DNA vnesti še seleksijski gen, s pomočjo katerega lahko ločimo transformirane celice od netransformiranih. Selekcija je lahko pozitivna ali negativna. Pozitivni seleksijski geni so tisti, ki kodirajo protein, običajno encim, ki zagotavlja odpornost na določen seleksijski agens, ki je toksičen za netransformirane celice ali pa spodbuja, analog metabolita, vir ogljika ali prekursor fitohormonov (Miki in McHugh, 2004). Najpogosteje se uporablja bakterijski gen, ki kodira encim NPT (neomicin fosfotransferaza) in lahko privede do fosforilacije ter inaktivacije antibiotika kanamicina. Z vnosom tega gena postanejo rastline odporne na kanamicin, drugače pa so občutljive in propadejo, če to snov vključimo v gojišče (Wilmink in Dons, 1993). Izbrati je potrebno koncentracijo antibiotika oziroma seleksijskega agensa, ki popolnoma prepreči regeneracijo na neokuženih izsečkih in hkrati čim bolj zmanjša število netransformiranih regenerantov, ki se razvijejo na ko-kultiviranih izsečkih zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic (Park in sod., 1998).

Uporaba selekcijskih genov za odpornost na antibiotike in rezistenco na herbicide daje največ pomislekov glede komercialne uporabe transgenih rastlin. Prenos DNA med transgenimi rastlinami in ostalimi organizmi je malo verjeten, *nptII* gen ne pomeni nobenega tveganja za zdravje ljudi in živali.

S pomočjo genov, ki jih vključimo v plazmidni konstrukt, preverimo uspešnost metode in izražanje vnesenega DNA konstrukta. Imenujemo jih markerski ali testni geni, ki kodirajo enostavno določljive substance ter nam povedo ali je uspela vgradnja tuje DNA v rastlinsko celico. Če je aktivnost markerskega gena zaznana, lahko domnevamo, da je bil vključen tudi želeni gen. Kakšna je aktivnost gena in v katerih tkivih poteka ekspresija pa je odvisno od uporabljenega promotorja. Najpogosteje se kot markerski uporablja *gus* gen za sintezo encima β -glukuronidaza (GUS). Aktivnost GUS proteina lahko zaznamo s histokemičnim barvnim testom s 5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronidom (X-Gluc) kot substratom in modrim precipitatom kot rezultatom testa. GUS encim hidrolizira X-Gluc v brezbarven indoksil derivat, ki se preoblikuje v moder precipitat. Rastlinske celice ne kažejo endogene aktivnosti GUS encima, zato lahko njegovo aktivnost določimo histokemično z modrim obarvanjem (Jefferson in sod., 1987). Slabost tega markerskega gena je destruktiven test, to pomeni, da pri preučevanju tkivo uničimo.

V novejših raziskavah se pogosto uporabljajo geni za fluorescentne markerske proteine. V primerjavi z *gus* genom imajo veliko prednost. Izražanje gena je namreč mogoče zaznati v živi celici (nedestruktiven test), lahko pa tudi nadomestijo selekcijske gene, ker preprosto regenerante odberemo na osnovi izražene fluorescence. Veliko se uporabljajo pri študijah ekspresije genov, saj omogočajo kontinuirano spremljanje izražanja transgenov od zgodnjih stopenj razvoja dalje (Bohanec, 2004). Najpogosteje je uporabljen zeleno fluorescentni gen (*gfp*), ki so ga izolirali iz meduze *Aequorea victoria* (Prasher in sod., 1992). Osvetljen z UV (395 nm) ali modro svetlobo (475 nm) emitira svetlo zeleno fluorescenco. GFP za izražanje fluorescence ne potrebuje nobenih substratov in je zelo stabilen, v celici se izraža kmalu po transformaciji, kar omogoča hitro identifikacijo transformiranih tkiv še preden jih izpostavimo selekcijskemu pritisku (npr. antibiotiku). S tem povečamo učinkovitost transformacije ter skrajšamo čas, ki je potreben za pridobitev transformiranih rastlin, kar bi bilo še posebej uporabno pri rastlinskih vrstah in genotipih, ki so slabo odzivni oz. imajo neučinkovit regeneracijski/transformacijski sistem (Jordan, 2000).

Gfp je izredno pomemben in splošno uporaben markerski sistem, vendar je njegova slabost v tem, da je včasih oteženo ločevanje *gfp* signala od avtofluorescence rastlinskih tkiv. Močan fluorescentni signal lahko emitira klorofil, celične stene, ksilem, epidermalne ali nekrotizirane celice, če jih vzpodbujamo z UV svetlobo, ta avtofluorescenca rastlinskih tkiv pa je glavna ovira za detekcijo nizkih ravni *gfp* proteina v rastlinah. Za uporabnost *gfp* kot markerskega gena je zato ključna sposobnost razlikovanja njegove fluorescence od avtofluorescence ozadja (Billinton in Knight, 2001).

V zadnjem obdobju zato razvijajo nove markerske sisteme. Odkrili so veliko različnih proteinov iz morskih koral. DsRed je rdeče fluorescentni protein, ki so ga izolirali iz korale *Discosoma sp.* (Jach in sod., 2001). ZsGreen in ZsYellow so izolirali iz *Zoanthus sp.* (Matz

in sod., 1999). Produkte teh genov zaznamo s fluorescentnim mikroskopom in ustreznimi filtri.

2.4.4 Genske transformacije orhidej

Orhideje se pri transformacijah v marsičem razlikujejo od ostalih enokaličnic. Njihove dediferencirane celice se slabo regenerirajo in so manj občutljive na antibiotično selekcijo, njihova proliferacija je slaba in v gojišče izločajo velike količine fenolnih eksudatov.

Dober sistem vnosa genov je odvisen od sposobnosti regeneracije tkiv, ki jih želimo transformirati. Na ta način lahko raziskujemo vnesene gene in njihovo izražanje. Pri orhidejah se večinoma uporabljajo PLB - protokormi, ki se jih dobi s postopkom indukcije iz različnih somatskih tkiv (mladih listov, stebelnih segmentov ali cvetnega stebela). Taki PLB so genetsko uniformni in so jih kot začetni material uporabili Men in sod. (2003) pri *Dendrobium*, Liau in sod. (2003) pri *Oncidium*, pri *Phalaenopsis* so jih uporabljali Chai in sod. (2002) in Chan in sod. (2005). Kot vir PLB so uporabili tudi kulture tankih rezov pri vrstah rodu *Dendrobium* (Yu in sod., 1999), Belarmino and Mii (2000) sta uporabila skupke celic drobljivega kalusa, ki sta ga pridobila iz izsečkov iz cvetnega stebela orhidej *Phalaenopsis*.

Sestava gojišča za regeneracijo je izrednega pomena za uspešno regeneracijo transformiranih celic izsečkov. Pri orhidejah so potrebe po hranilih zelo specifične. Odvisne so od vrste ali celo sorte orhidej. Rast in morfogeneza *in vitro* sta tako v veliki meri odvisni od primerne uravnoteženosti med rastnimi regulatorji v rastnem gojišču in endogenimi rastnimi regulatorji. Zelo pomembno pri tem pa je pravilna uporaba avksinov in citokininov (Sanjaya in Chan, 2007).

Prve transformacije pri orhidejah so naredili z biolistiko, oziroma neposrednim vnosom genov (Kuehnle in Sugii, 1992). Pri tem pa so se pojavile težave, kot so transgeno utišanje genov, nestabilnost in prerazporejanje genov. Teh težav je pri posrednem vnosu z *A. t.* veliko manj.

Transformacije z *Agrobacterium*

Uspešnost pritrditve bakterij na rastlinske celice je odvisno od vrste celic, celičnega cikla, starosti tkiv in drugih fizioloških parametrov (Chan in Chang, 1992). Posredni vnos genov z uporabo *Agrobacterium* je bil dolgo časa omejen na dvokaličnice, te imajo močno izražen odgovor na poškodbe. Enokaličnice, še posebno žita pa se na poškodbe skoraj ne odzivajo in zato niso tako dovzetne za okužbe z bakterijami. Pri vnosu genov z *A. t.* so uspeli nadomestiti odsotnost naravnega odgovora na poškodbe z dodajanjem acetosiringona v kokultivacijsko gojišče. Ta poveča virulentnost bakterij (Hiei in sod., 1994). Tudi fenolne komponente, ki jih v gojišče izločajo orhideje, povečajo ekspresijo *vir* genov *Agrobacterium* in posledično povečajo pogostost transformacije (Men in sod., 2003).

O prvi uspešni transformaciji orhidej z *Agrobacterium* so poročali Hsieh in sod. (1997, cit. po Sanjaya in Chan, 2007), ki so transformirali PLB različnih sort *Phalaenopsis*. Protokoli za transformacije z *A. t.* so vzpostavljeni tudi za *Dendrobium*, *Oncidium* in *Cymbidium*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

3.1.1 *Phalaenopsis* in *Bletilla striata*

V poskus smo zajeli 13 komercialnih rastlin rodu *Phalaenopsis* in 2 rastlini rodu *Bletilla*. Razlikovale so se po barvi in velikosti cveta. Iz oplojenih cvetov so se razvili plodovi s semeni in ta semena smo vključili v nadaljnje poskuse transformacije. Skupno smo uporabili 15 plodov in poskuse označili z M1 do M15.

V prvo križanje je bilo vključenih 8 rastlin *Phalaenopsis*, ki rastejo v stanovanju že več let (priloga B). Komercialnih imen ne poznamo. Plodove smo označili z M1 do M8.

V drugo križanje so bile vključene 4 rastline 2 različnih sort *Phalaenopsis*, za katere komercialnih imen ne poznamo. Križanje so opravili študentje februarja 2010 v okviru vaj. Dve rastlini sta imeli vijolične cvetove in dve bele cvetove (priloga C). Plodove smo označili z M10 in M11 z vijolične rastline ter M12 in M13 z bele rastline.

Komercialna križanca *Phalaenopsis*'Anthura Tainan' in *Phalaenopsis*'Ocean Pacifik', sta bila navzkrižno oprašena spomladi 2008 (priloga D). Na rastlini *Phalaenopsis*'Anthura Tainan' 1 cvet, na rastlini *Phalaenopsis*'Ocean Pacifik' pa 2 cvetova. Semenske kapsule so bile porezane v polni zrelosti in do uporabe hranjene pri sobni temperaturi (slika 5). Plod smo označili z M14.



Slika 5: Semenska glavica nastala po križanju *Phalaenopsis* 'Ocean Pacifik' x *Phalaenopsis* 'Anthura Tainan'

Rastlina *Bletilla striata* raste več let na prostem na vrtu v Ljubljani (priloga E). Cvetovi so bili oprašeni poleti 2010. Semenske kapsule so bile porezane v polni zrelosti in do uporabe hranjene v hladilniku pri 4°C. Plodove smo označili z M9 in M15.

3.1.2 Ročno opraševanje

Cvetove rastlin *Phalaenopsis* iz prvega križanja smo navzkrižno oprašili 24.1.2010. Iz enega cveta smo s pomočjo ošiljenega predmeta odstranili polinije, ki imajo na spodnji strani lepljiv jeziček. Iz polinijev smo nežno odstranili prašnično kapico in polinije namestili na svetlečo, lepljivo brazdo drugega cveta. Razvoj plodu je prikazan na slikah v prilogah F in G.

Glavice s semeni smo pobirali postopoma kot so se odpirale, in sicer 5.7.2010, 26.7.2010, 28.7.2010, 30.9.2010, 4.10.2010. Pobrane semenske glavice smo shranili na sobni temperaturi, ki je nihala okrog 20 °C.

3.2 MIKROPROPAGACIJA

3.2.1 Sterilizacija in sejanje semen

Za razkuževanje semen smo si pripravili 1,66 % dikloroizocianurno kislino (DICA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA). Pri pripravi smo prijemali samo za spodnji, najširši del erlenmajerice in pazili, da se njenega vratu ne dotikamo. Pripravljeni raztopini smo dodali 2 - 3 kapljice močila Tween 20 (Sigma-Aldrich).

V posamezno mikrocentrifugirko smo dali približno 10 mg semena, z mikropipeto dodali 800 µl 1,66 % razkužila in razkuževali 8 minut z občasnim pretresanjem na sobni temperaturi. Nato smo postopek 2 minuti nadaljevali v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 4000 obratih/min in temperaturi 4 °C. Sterilizacijsko raztopino smo s postopkom centrifugiranja ločili od semena in jo nato odpipetirali. Semenu smo dodali 800 µl sterilne bidestilirane vode, premešali in ponovno centrifugirali 2 minuti pri 4000 obratih/min in temperaturi 4 °C. Postopek spiranja smo ponovili še dvakrat. S pomočjo mikropipete smo seme v zadnji vodi za spiranje inokulirali na gojišče (priloga H1 in H2). Petrijevke z inokuliranimi semeni smo zaprli s parafilmom in jih označili.

Kalitev in gojenje je potekalo v rastni komori, pri temperaturi 24 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba / tema) ter intenziteti svetlobe $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ

Posamezne komponente gojišč smo stekali in jih pretresli v čašo. Nato smo jih prelili z bidestilirano vodo. V nastalo zmes smo dali magnet obdan z teflonom in postavili na električni mešalnik. Končni volumen smo določili z merilno bučko. Tako umerjeno raztopino smo prelili nazaj v čašo ter določili pH vrednost, ki smo jo uravnali z 1 N HCl ali 1 N KOH. Če smo pripravljali trdno gojišče, smo dodali strjevalec Phytigel po umerjeni pH vrednosti. Gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri 121°C ter pri pritisku 110 kPa. V brezprašni komori smo gojišče razlili v sterilne petrijevke ter jih označili. Sestava gojišč je predstavljena v prilogi H.

Gojišča, ki so imela dodane antibiotike (timetin) ali acetosiringon, ki so termolabilni, smo ohladili na 40°C in jih dodali s sterilno pipeto, raztopino pa nato temeljito premešali in razlili v petrijevke.

3.4 BAKTERIJE IN PLAZMIDI

Za vnos genov z vektorskim sistemom smo izbrali komercialni sev *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 v katerega je bil vnesen komercialni binarni plazmid pCAMBIA1301. Sev ima TiAch5 kromosom na katerem je selekcijski gen *rif* (odpornostna antibiotik rifampicin 50 mg /l) in pAL4404 razoroženi Ti-plazmid s selekcijskima genoma *spec* (odpornost na antibiotik spektinomycin 100 mg/l) in *strep* (odpornost na antibiotik streptomycin 100 mg/l).

Binarni plazmid pCAMBIA1301 (priloga I) vsebuje funkcionalni *gusA* (N358Q) markerski gen za enostavno in natančno analizo prisotnosti ali izražanja gena v regeneriranih rastlinah z GUS testom. Mutacija N358Q omogoča tej obliki *gus* gena, da ohrani popolno aktivnost v rastlinski celici, tako da se veže na signalni peptid. Testni *gusA* gen vsebuje tudi intron iz ricinusove katalaze, ki preprečuje izražanje *gus* gena v prokariontih, kot je *Agrobacterium* (Ohta in sod., 1990). Ta intron pa se učinkovito izreže pri evkariontih, tako pri enokaličnicah kot dvokaličnicah. Plazmid vsebuje gene, ki omogočajo selekcijo transformiranih bakterij in transformiranih rastlinskih tkiv in restrikcijska mesta za izrez in vključitev želenih genov. Plazmid je stabilen v *Agrobacterium* tudi pri gojenju v neselektivnih pogojih zaradi prisotnosti *rep* (funkcija podvajanja plazmida) in *sta* (funkcija stabilnosti plazmida) regij iz plazmida pVS1 (Deblaere in sod., 1987).

Plazmid pART27 2mgfp5-ER je binarni vektor, ki so ga pripravili v laboratoriju prof. dr.C. C. Eady-ja (Crop and Food Research, Christchurch, Nova Zelandija) tako, da so v plazmidni vektor pART27 (priloga J) na mestu *SpeI* v multiplo mesto za kloniranje (MCS) vključili dve ponovitvi gena mgfp5-ER iz vektorja pBIN m-gfp5-ER. Vektor pART27 vsebuje selekcijski gen *spec* za odpornost na antibiotik spektinomycin za selekcijo transformiranih bakterij in gen *nptII* za odpornost na aminoglikozidna antibiotika geneticin in kanamicin za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv (Gleave, 1992)

3.5 TRANSFORMACIJA ORHIDEJ

3.5.1 Priprava bakterijske kulture za transformacijo

Bakterijsko kulturo smo pripravili dvajset dni po setvi oziroma en dan pred transformacijo. V sterilno elenmajerico smo odmerili tekoče YEB gojišče (priloga H6). Dodali smo 50 mg/l rifampicina in 50 mg/l kanamicina.

Bakterije so shranjene v glicerolu pri -80 °C. Pred nacepitvijo v gojišče smo jih počasi odmrznili na ledu. Bakterije smo dali v YEB gojišče z antibiotiki in elenmajerico pokrili s sterilno alu folijo. Čez noč smo jih inkubirali v stresalniku pri temperaturi 28 °C in s stresanjem 120 stresljajev/minuto. S spektrofotometrom (Eppendorf Bio Photometer RS 232C) smo izmerili gostoto bakterijskih celic. Pri gostoti celic 0,6 OD₆₀₀(5 × 10⁶ celic/ml) smo bakterijsko kulturo prelili v 50 ml sterilno centrifugirko ter jo 5 minut centrifugirali pri 5000 obratih/min in 4°C (centrifuga Beckman J2-MS). Supernatant smo odlili, bakterijski pelet pa prelili z enakim volumnom (50 ml) tekočega gojišča za resuspenzijo bakterij (priloga H7).

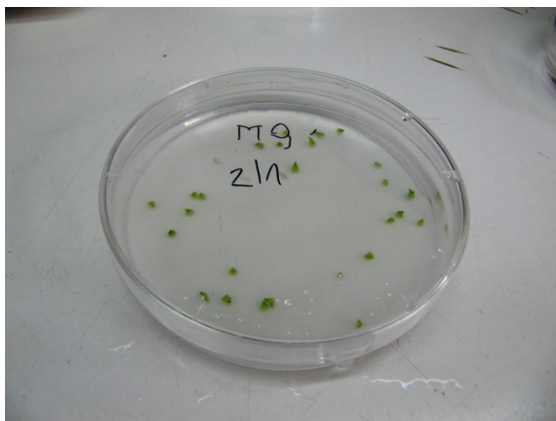
3.5.2 Transformacija protokormov

Pred transformacijo smo 19 dni stare protokorme (PLB) prestavili v gojišče s 100 μ M acetosiringonom (priloga H3) in jih za 3 dni inkubirali v rastni komori.

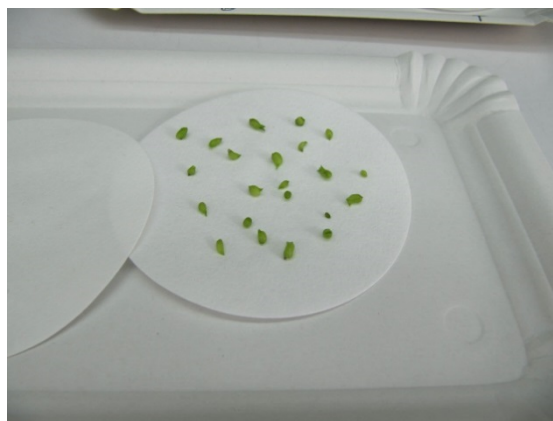
Resuspendirane bakterije v $\frac{1}{2}$ MS gojišču (priloga H3) smo prelili v sterilno petrijevko in vanjo položili protokorme (slika 6). Čas inkubacije je bil od 10 minut do 22 ur in je zaradi preglednosti v celoti predstavljen v poglavju rezultati. Protokorme smo zračno osušili na sterilnem filter papirju in jih inokulirali na gojišče za kokultivacijo (slika 7). Protokorme in *A. t.* smo kokultivirali 3 dni v temi v rastni komori pri temperaturi 24 ± 1 °C.



Slika 6: Na levi je petrijevka s protokormi *Phalaenopsis* v bakterijski suspenziji, desno od nje pa je sterilna elenmajerica, na kateri je sterilen lij. Nanj je položen avtoklaviran filter papir, na katerem bodo po vlivanju ostali protokormi, za zračno sušenje po inkubaciji.



A



B

Slika 7: Inkubacija protokormov *Phalaenopsis* v bakterijski suspenziji (A) in zračno sušenje po inkubaciji (B)

3.5.3 Spiranje protokormov po transformaciji in selekcija

Protokorme smo spirali s sterilnim antibiotikom timetinom (200 mg/l) 5 minut. Postopek smo dvakrat ponovili. Po drugem izpiranju smo protokorme zračno osušili na filter papirju in jih inokulirali na trdno selekcijsko gojišče. Protokorme smo gojili v rastni komori pri temperaturi 24 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba / tema) ter intenziteti svetlobe $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.6 TESTI IZRAŽANJA GENOV

3.6.1 Histokemični test izražanja *gus* gena

Aktivnost *gus* gena smo testirali s histokemičnim GUS testom (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994) z barvilom X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronid) (Duchefa). Encim β -glukuronidaza razgradi X-Gluc in produkt se obarva modro.

Protokorme smo predstavili v 24 valjne plošče in jih inkubirali pri 37 °C eno uro v 50 mM fosfatnem pufru NaPO_4 [NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 ; pH 6,8] z dodatkom Triton X-100. Pufer smo nato odstranili in dodali svež fosfatni pufer z dodatkom barvila 0,1 mM X-Gluc in 20% metanola. Reakcijsko zmes smo nato 5 minut vakumirali (≈ 100 mbar), nato pa inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo modro obarvan produkt aktivnega *gus* gena vizualno in s pomočjo stereomikroskopa pregledali. Transformirane celice se obarvajo modro, ker imajo v genom vključen aktiven *gus* gen.

3.6.2 Pregled izražanja *gfp* gena

Protokorme smo pregledali z epifluorescentnim mikroskopom (Nikon SMZ 1000) in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence *gfp* gena. Zeleno fluorescentni protein m-GFP5-ER, ki ima ekscitacijska vrhova pri 395 in 475 nm ter emisijski vrh pri 509 nm (Haseloff in sod., 1997).

3.7 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI PROTOKORMI

Če je vzkalilo dovolj semen, smo vzporedno s kokultiviranimi protokormi nastavili še kontrolno petrijevko z gojiščem za kalitev semen. Neokužene protokorme smo gojili pod enakimi pogoji kot okužene.

4 REZULTATI

4.1 OPLODITEV IN TVORBA PLODOV PRI *Phalaenopsis*

V poskus smo zajeli 8 komercialnih rastlin rodu *Phalaenopsis*. Razlikovale so se po barvi (priloga K) in velikosti cveta. Iz oplojenih cvetov so se razvili plodovi s semeni in ta semena smo vključili v nadaljnje poskuse transformacije.

Na rastlinah, ki so bile vključene v križanje, je nastalo 74 cvetov, od katerih je bilo 40 cvetov oziroma 54 % cvetov opršenih.

Preglednica 1: Število odprtih, opršenih, oplojenih in propadlih cvetov orhidej rodu *Phalaenopsis*

Oznaka rastlin	Odprti cvetovi	Oprašeni cvetovi	Oplojeni cvetovi	Propadli plodovi
1	8	4	2 (50 %)	2
2	7	3	3 (100 %)	/
3	9	4	3 (75 %)	1
4	11	5	4 (80 %)	1
5	10	6	4 (66 %)	2
6	10	7	5 (71 %)	2
7	8	4	4 (100 %)	/
8	11	7	6 (85 %)	1
Skupaj	74	40	31	9

Po opršitvi je semenske glavice oblikovalo 31 cvetov oziroma 77,5 % opršenih cvetov, od teh je bilo 6 oziroma 19,4 % semenskih glavic praznih, ostalih 25 oziroma 80,7 % semenske glavice pa je vsebovalo seme. Propadlo oziroma predčasno odpadlo pa je 9 plodov oziroma 22,5 % plodov (preglednica 1).

Od 25 semenskih glavic, ki so vsebovale seme, smo izbrali 8 semenskih glavic, ki so vsebovale največ semen in ki so se med seboj razlikovale glede na barvo opršenih cvetov.

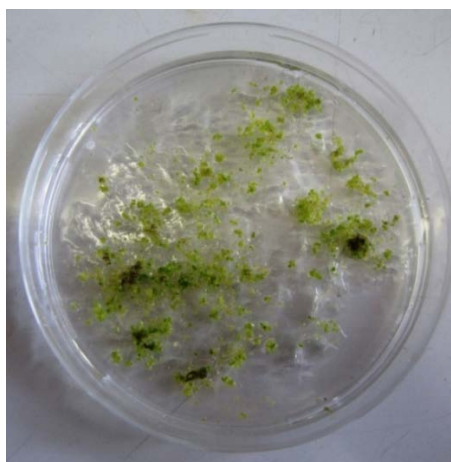
4.2 KALITEV PO SEJANJU

V sedmih dneh po inokulaciji ni bilo vidnih sprememb na semenih. Po devetih dneh od inokulacije pa so se pojavile prve spremembe, seme je nabreknilo. Začele so se oblikovati okrogle strukture značilne za kalitev orhidej, ki jih imenujemo protokormi. 19 dni po inokulaciji so protokormi še bolj nabrekli ter postajali zeleni (preglednica 2).

Preglednica 2: Stanje na gojišču 19 dni po inokulaciji semen orhidej *Phalaenopsis* in *Bletilla*

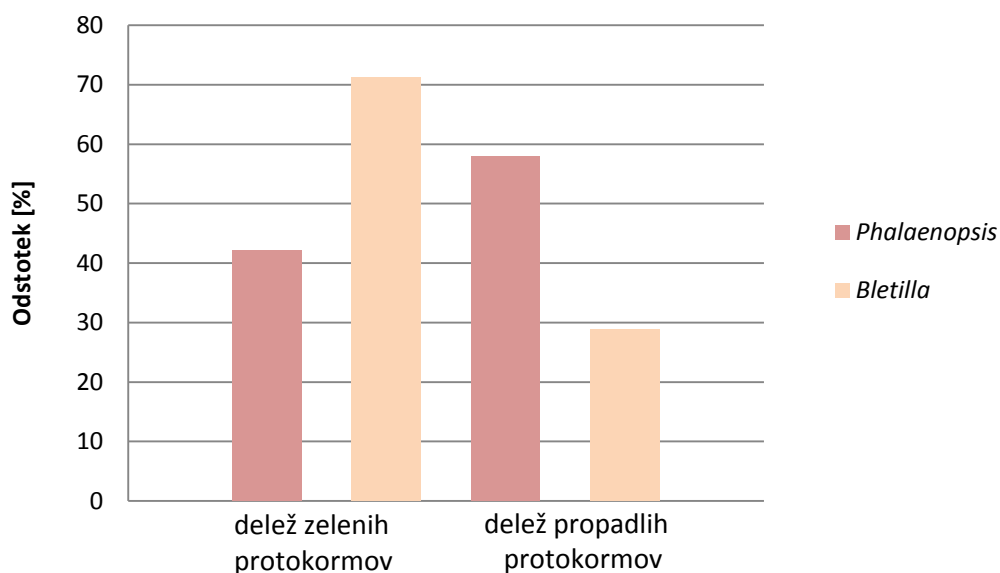
Oznaka poskusa	število petrijevk	število vseh semen	Število petrijevk s kaljivimi semeni	število nabreklih semen	delež nabreklih semen (%)	število zelenih protokormov	delež zelenih protokormov (%)	število propadlih protokormov	delež propadlih protokormov (%)
M1 (P.)	8	400	/	/	/	/	/	/	/
M2 (P.)	7	350	/	/	/	/	/	/	/
M3 (P.)	10	500	10	256	51,2	120	46,9	136	53,1
M4 (P.)	6	300	/	/	/	/	/	/	/
M5 (P.)	8	400	/	/	/	/	/	/	/
M6 (P.)	2	100	/	/	/	/	/	/	/
M7 (P.)	10	500	8	183	36,6	102	55,7	81	44,3
M8 (P.)	10	500	7	158	31,6	48	30,4	110	69,6
M9 (B.)	35	1750	23	713	40,7	604	84,7	109	15,3
M10 (P.)	10	500	2	52	10,4	11	21,2	41	78,8
M11 (P.)	18	500	18	231	46,2	130	56,3	101	43,7
M12 (P.)	5	250	/	/	/	/	/	/	/
M13 (P.)	8	400	/	/	/	/	/	/	/
M14 (P.)	3	150	/	/	/	/	/	/	/
M15 (B.)	8	400	8	208	52	120	57,7	88	42,3
	148	7000	76	1801	25,7	1135	63	666	37

Po devetnajstih dneh od sejanja smo protokorme, ki so ozeleneli prestavili iz trdega $\frac{1}{2}$ MS gojišča (slika 8) na tekoče $\frac{1}{2}$ MS gojišče z dodanim 100 μ M acetosiringonom. V tekočem gojišču so bili protokormi tri dni, nato pa smo jih transformirali.



Slika 8: 19 dni stari sejančki *Phalaenopsis* v morfološki fazi protokorma

Kot je razvidno iz preglednice 2 in iz slike 9, so semena orhideje *Bletilla* (M9 in M15) bolj kalila kot semena *Phalaenopsis*. Semena orhideje *Bletilla* so v povprečju kalila 71,2 %, medtem ko so semena *Phalaenopsis* kalila 42,1 %.



Slika 9: Delež zelenih protokormov in delež propadlih protokormov *Phalaenopsis* in *Bletilla* 19 dni po inokulaciji semen

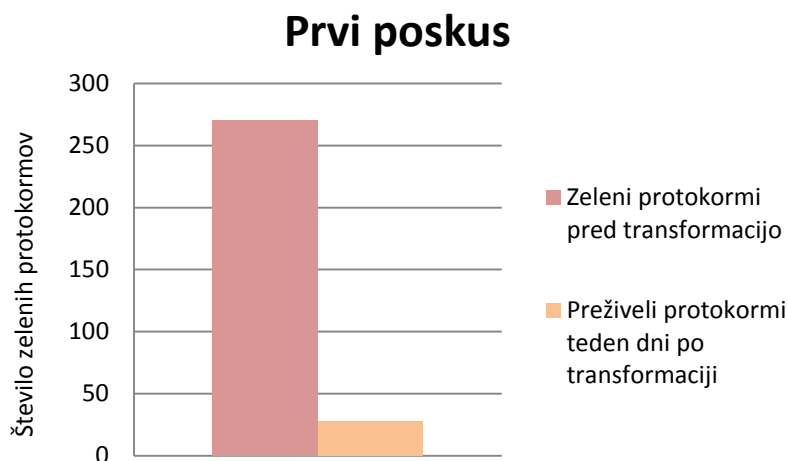
4.3 TRANSFORMACIJE Z *gfp* GENOM

Protokorme smo inokulirali v bakterijski suspenziji *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, ki ima vključen *gfp* gen.

Prvi poskus

V prvem poskusu smo skupno inokulirali 270 zelenih protokormov *Phalaenopsis* v 23 petrijev. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 10 minut do 4 ure (priloga L1).

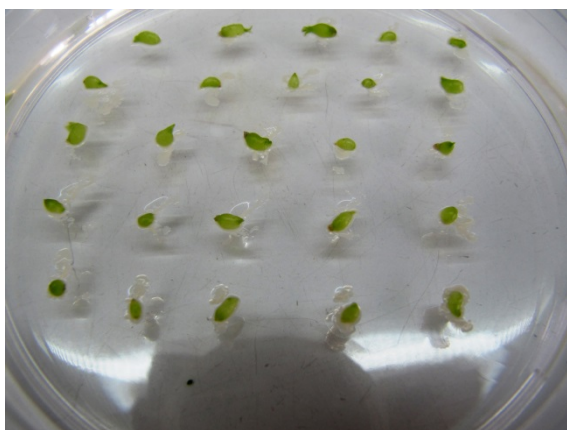
Protokorme smo 19 dni po kalitvi prenesli iz kalitvenih gojišč v tekoče gojišče z acetosiringonom in jih za 3 dni inkubirali v rastni komori. Manipulacija protokormov, ki so na tej stopnji veliki približno 1 mm, je zelo zahtevna. Da bi se v nadaljevanju izognili poškodbam protokormov smo se odločili, da bomo v nadaljnjih poskusih seme sejali v tekoča gojišča.



Slika 10: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Phalaenopsis* teden dni po transformaciji v prvem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije (slika 11) smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

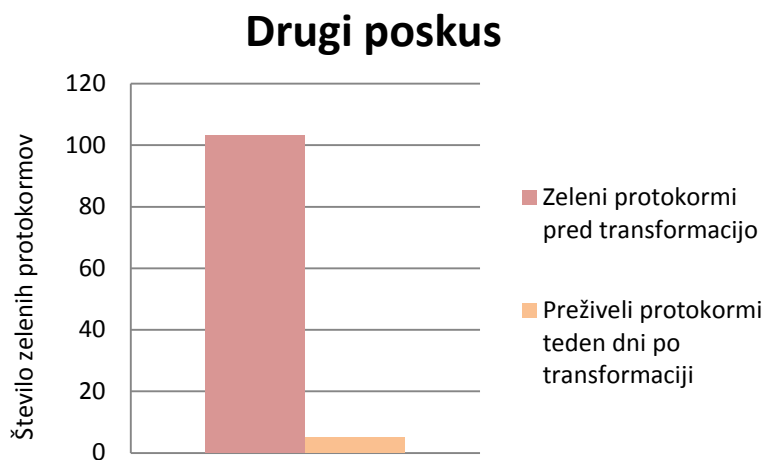
Po 1 tednu od transformacije je bilo vitalnih še 28 protokormov (slika 10, priloga L1), to je 10,4 % inokuliranih protokormov. Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 4 ure, 3 ure in 5 minut, 2 uri in 5 minut, 20 minut in 15 minut, zato sklepamo, da dolžina inkubacije v bakterijski suspenziji ni vplivala na preživetje protokormov. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben protokorm. Protokormi so bili porjaveli in propadli.



Slika 11: Protokormi po 3 dneh kokultivacije orhideje *Phalaenopsis* z razraščeno bakterijo *Agrobacterium*

Drugi poskus

V drugem poskusu smo skupno inokulirali 88 zelenih protokormov *Bletilla* v 3 petrijevke. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil 4 ure in 14 minut in 4 ure in 18 minut (priloga L2).



Slika 12: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Bletilla* teden dni po transformaciji v drugem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije je bilo vitalnih še 5 protokormov (slika 12, priloga L2), to je 4,9 % inokuliranih protokormov. Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 4 ure in 18 minut. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben od inokuliranih protokormov. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

4.3.1 Izražanje *gfp* gena

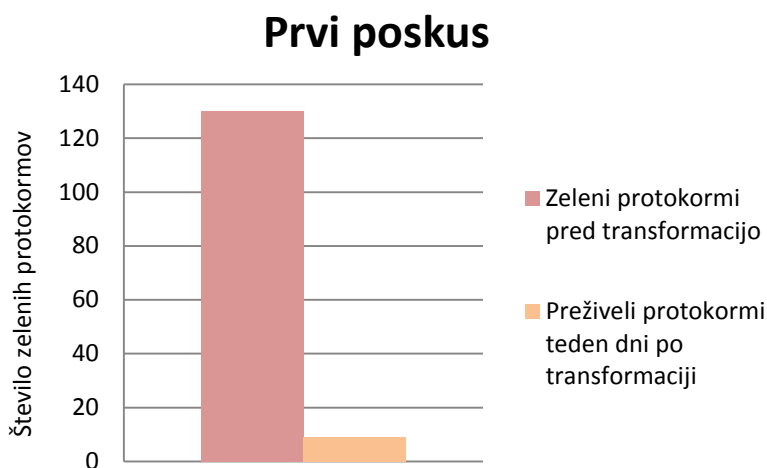
En teden po transformaciji smo preživele protokorme pregledali z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence. Skupno smo pregledali 33 protokormov iz 2 poskusov oziroma 7 petrijev. Opazili smo zelo malo zelene fluorescence. Večinoma so fluorescirali deli gojišča, ostanki propadlih semen in propadli protokormi. Samo en vitalen protokorm je malo zeleno fluoresciral, vendar fluorescenca ni bila tako izrazita, da bi lahko z gotovostjo trdili, da je posledica transformacije. Protokorm smo spremljali še 14 dni in v tem času se njegova fluorescenca ni spremenila. Po 14 dneh je protokorm propadel.

4.4 TRANSFORMACIJE Z *gus* GENOM

Protokorme smo inokulirali v bakterijski suspenziji *A. t.*-pCAMBIA 1301, ki ima vključen *gus* gen.

Prvi poskus

V prvem poskusu smo skupno inokulirali 130 zelenih protokormov *Phalaenopsis* v 18 petrijev. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 2 uri do 2 uri in 13 minut (priloga L3).



Slika 13: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Phalaenopsis* teden dni po transformaciji v prvem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije je bilo vitalnih še 9 protokormov (slika 13, priloga L3), to je 6,9 % inokuliranih protokormov. Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski

suspenziji 2 uri in 15 minut ter 2 uri in 13 minut. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben od protokormov. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Drugi poskus

V drugem poskusu smo skupno inokulirali 12 zelenih protokormov *Bletilla* v 1 petrijevko. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil 22 ur.

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije ni bil vitalen noben protokorm. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Tretji poskus

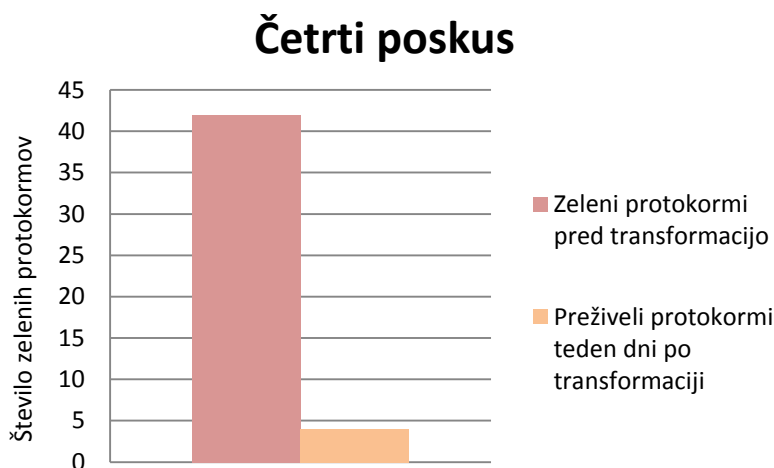
V tretjem poskusu smo skupno inokulirali 24 zelenih protokormov *Phalaenopsis* in *Bletilla* v 3 petrijevke. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 10 ur, 30 minut do 18 ur, 40 minut (priloga L4).

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije ni bil vitalen noben protokorm. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Četrty poskus

V četrtem poskusu smo skupno inokulirali 42 zelenih protokormov *Bletilla* v 2 petrijevki. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil 18 ali 20 minut.



Slika 14: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Bletilla* teden dni po transformaciji v četrtem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije so bili vitalniše 4 protokormi (priloga L5), to je 9,5 % inokuliranih protokormov (slika 14). Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 20 minut in 18 minut. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben od protokormov. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Peti poskus

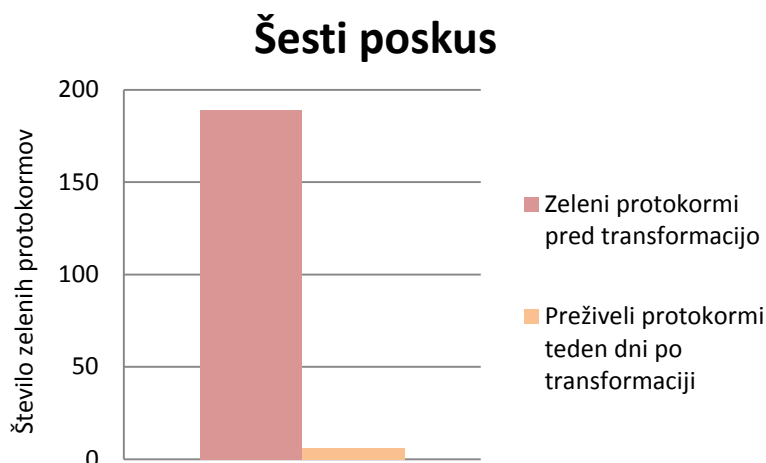
V petem poskusu smo skupno inokulirali 143 zelenih protokormov *Bletilla* v 5 petrijevki. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 14 do 31 minut (priloga L6).

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije ni bil vitalen noben protokorm. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Šesti poskus

V šestem poskusu smo skupno inokulirali 168 zelenih protokormov *Bletilla* v 6 petrijevk. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 10 do 30 minut (priloga L7).



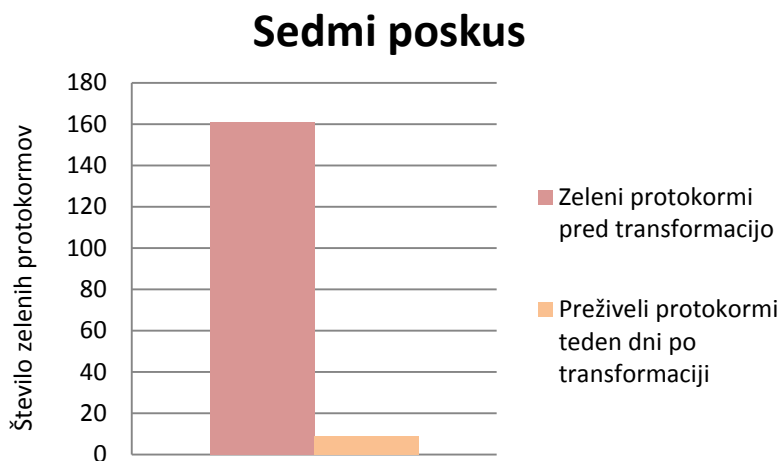
Slika 15: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Bletilla* teden dni po transformaciji v šestem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije je bilo vitalnih še 6 protokormov (slika 15), to je 3,2 % inokuliranih protokormov. Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 20 minut in 30 minut. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben od protokormov. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Sedmi poskus

V sedmem poskusu smo skupno inokulirali 146 zelenih protokormov *Bletilla* v 5 petrijev. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 40 do 60 minut (priloga L8).



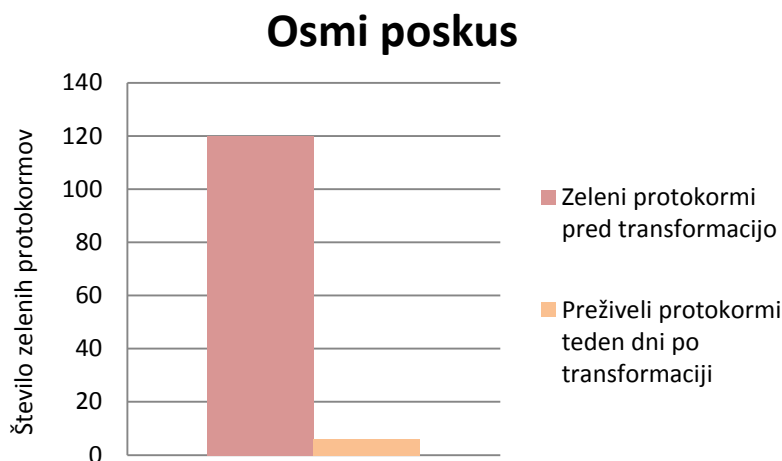
Slika 16: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Bletilla* teden dni po transformaciji v sedmem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije je bilo vitalnih še 5 protokormov (slika 16), to je 3,1 % inokuliranih protokormov. Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 45 minut in 50 minut. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben od protokormov. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

Osmi poskus

V osmem poskusu smo skupno inokulirali 112 zelenih protokormov *Bletilla* v 5 petrijev. Čas inkubacije protokormov v bakterijski suspenziji je bil od 21 do 38 minut (priloga L9).



Slika 17: Število zelenih protokormov pred transformacijo ter število preživelih protokormov orhideje *Bletilla* teden dni po transformaciji v osmem poskusu

Po 3 dneh kokultivacije smo protokorme po spiranju s timetinom prestavili na gojišče za selekcijo in regeneracijo.

Po 1 tednu od transformacije je bilo vitalnih še 6 protokormov (slika 17), to je 5 % inokuliranih protokormov. Vitalni so bili protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 21 minut in 32 minut. Ostali protokormi so bili porjaveli in propadli. Po 3 tednih na selekcijskem gojišču s timetinom ni bil vitalen noben od protokormov. Protokormi so bili porjaveli in propadli.

4.4.1 Izražanje *gus* gena

En teden po transformaciji smo preverili vitalnost transformiranih protokormov orhidej *Phalaenopsis* in *Bletilla*. Skupno je bilo vitalnih 30 protokormov iz 8 poskusov oziroma 10 petrijev.

Tri tedne po transformaciji protokormov z *A. t.* - pCAMBIA 1301, smo imeli po pregledu petrijev še 8 petrijev, ostale so bile okužene. Po dveh mesecih smo protokorme analizirali s histokemičnim GUS testom in preverili izražanje *gus* gena. Modro so se obarvale tiste celice, ki so imele v genom vključen aktiven *gus* gen. Skupno smo z GUS testom analizirali 21 protokormov. Od teh je bilo 6 GUS pozitivnih, 15 pa GUS negativnih. *Gus* se je izražal v zelo majhnem delu, le v nekaj celicah protokormov (slika 18).

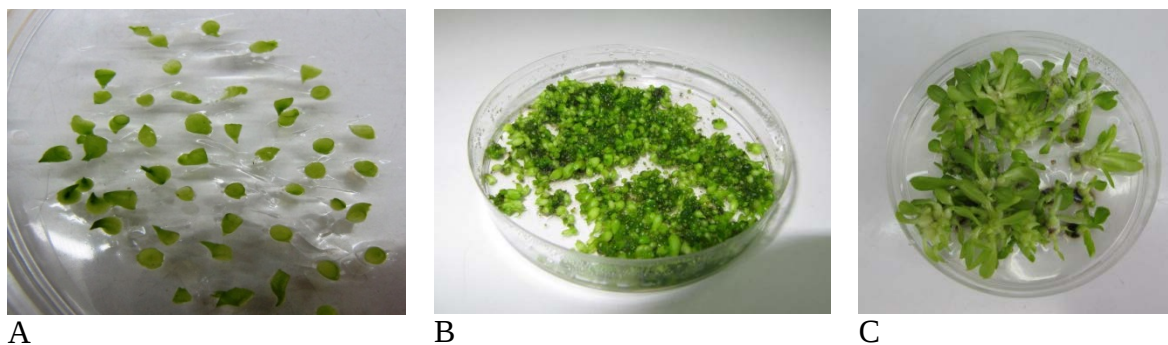


Slika 18: Izražanje *gus* gena v protokormih *Phalaenopsis*

4.5 KONTROLNI POSKUS SEJANJA BREZ OKUŽEVANJA Z *A. t.*

Sejančke križancev z oznakama M7/7 in M7/8 smo uporabili za kontrolo (slika 19). Sejančke M7/7 smo predstavili na gojišče za regeneracijo brez timetina, sejančke M7/8 pa na gojišče za regeneracijo z dodatkom timetina.

Sejančki z oznako M7/7 so po drugem prestavljanju na gojišče $\frac{1}{2}$ MS s saharozo propadli. Sejančki z oznako M7/8 pa smo uspešno subkultivirali na gojišče in jih gojili do velikosti primerne za aklimatizacijo. Sejančki so zaradi okužbe propadli pri naslednjem prestavljanju.



Slika 19: Kontrolni sejančki pri *Phalaenopsis*: A - 21 dni stari sejančki na gojišču za regeneracijo, B- mesec in pol stari sejančki pred subkultivacijo, C- 4 mesece stari kontrolni sejančki pred drugo subkultivacijo

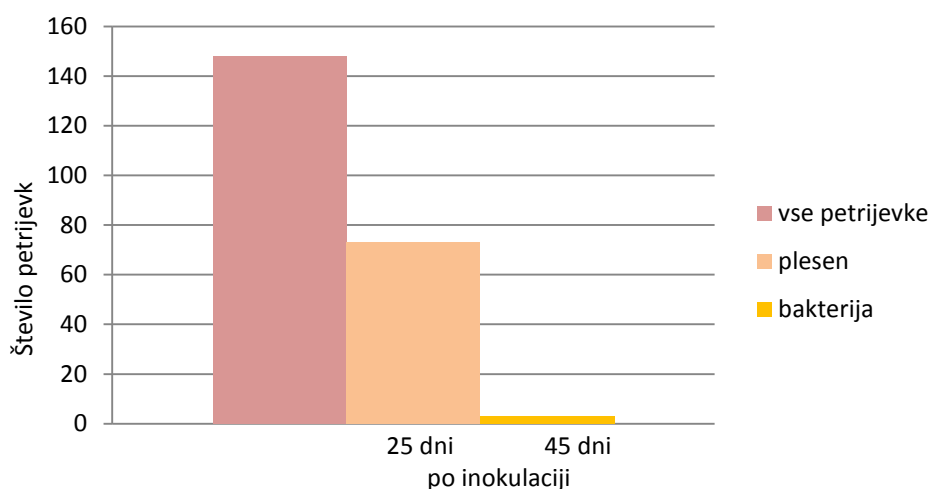
4.6 VITALNOST PROTOKORMOV PO SEJANJU IN TRANSFORMACIJI

Semena orhideje *Bletilla* so boljše kalila kot semena *Phalaenopsis*, preživetje protokormov po transformaciji pa je bilo ravno obratno. Skupno smo transformirali 411 protokormov *Phalaenopsis* in 724 protokormov *Bletilla*. Zelene protokorme, ki smo jih transformirali, so po tednu dni od transformacije boljše preživeli pri *Phalaenopsis*, in sicer 37 protokormov, to je 9 %, medtem ko je pri *Bletilla* preživelo samo 26 protokormov, to je samo 3,6 %.

Preglednica 3: Število izločenih petrijev in vzrok za propad sejančkov orhidej *Phalaenopsis* in *Bletilla* 19, 25 in 45 dni po sejanju

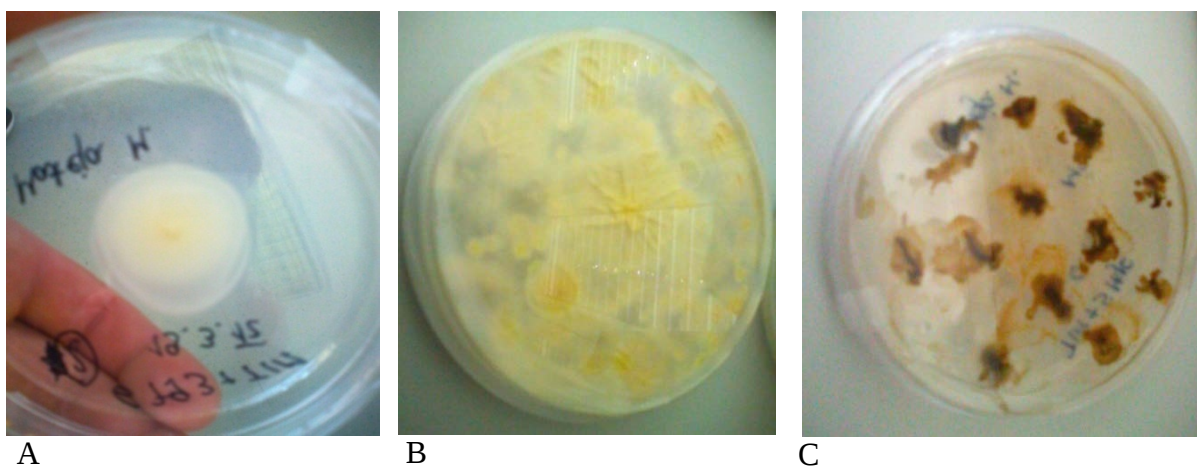
Oznaka križanca	število propadlih petrijev po inokulaciji			vzrok za propad semen/protokormov
	19 dni	25 dni	45 dni	
M1 (P.)	8			semena niso kalila
M2 (P.)	7			semena niso kalila
M3 (P.)		10		plesen
M4 (P.)	6			semena niso kalila
M5 (P.)	8			semena niso kalila
M6 (P.)	2			semena niso kalila
M7 (P.)	2	8		semena niso kalila / plesen
M8 (P.)	3	7		semena niso kalila / plesen
M9 (B.)	12	18	3	semena niso kalila / plesen / bakterija
M10 (P.)	8	2		semena niso kalila / plesen
M11 (P.)		18		plesen
M12 (P.)	5			semena niso kalila
M13 (P.)	8			semena niso kalila
M14 (P.)	3			semena niso kalila
M15 (B.)		8		plesen
SKUPAJ	72	71	3	

Kot je razvidno iz preglednice 3 smo v prvih devetnajstih dneh izločili 72 petrijev, oziroma 48,6 %, vzrok je bil v nekalečih semenih.



Slika 20: Število okuženih petrijevok 25 oziroma 45 dni po inokulaciji sejančkov orhidej *Phalaenopsis* in *Bletilla*

V petindvajsetih dneh smo izločili še dodatnih 71 petrijevok, oziroma 48 %, vzrok je bil okužba s plesnijo (sliki 20 in 21). V petinštiridesetih dneh smo izločili še 3 petrijevke, oziroma 2 %, vzrok je bil okužba z bakterijo. Skupno je bilo izločenih 98,6 % petrijevok.



Slika 21: Okužbe s plesnijo (A in B) in propadli protokormi (C)

Po petinštiridesetih dneh ni prišlo več do okužb tako, da sta nam ostali še 2 petrijevki, kar je 1,35 %. Skupno smo imeli pet rastlin orhideje rodu *Bletilla*, ki smo jih po 77 dneh od transformacije iz gojišča 6793 s timetinom in 1 mg/l higromicina prestavili na gojišče 6793 s timetinom in 5 mg/l higromicina. Čez 14 dni, so rastline porjavele oziroma propadle.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Navzkrižno opraševanje, razvoj plodov in semen

V poskus smo vključili 8 cvetočih komercialnih rastlin, ki so skupno imele 74 cvetov. Na rastlinah smo skupno oprašili 40 cvetov. Pri 31 cvetovih se je začel razvijati plod, to je 77,5 % vseh oprašenih cvetov. Plodovi so se razvili na vseh rastlinah.

Na rastlinah z oznako 2 in 7 so se oplodili vsi oprašeni cvetovi. Največ cvetov (6 od 7) se je oplodilo pri rastlini z oznako 8. Pri šestih rastlinah sta 1 ali 2 cvetova po oprašitvi propadla, skupno je propadlo devet cvetov (22,5 %). Odpadanje cvetov po oprašitvi je lahko posledica preobremenitve rastline. Med razvojem plodov je priporočljivo dodatno dognojevanje rastline (Hicks, 2000).

Od 31 nastalih plodov je bilo 6 (19,4 %) semenskih glavic praznih, niso vsebovale semen. Do tega je lahko prišlo zaradi inkompatibilnosti, nekatere kombinacije križanj niso uspešne. Hicks (2000) navaja, da je izbira starševske rastline zelo pomembna. Rastline, ki imajo manjše cvetove naj bi se uporabljalo kot materinske rastline, rastline z večjimi cvetovi pa kot darovalke peloda. Lahko se namreč zgodi, da pelod rastlin z manjšimi cvetovi po kalitvi na brazdi večjih cvetov, ne razvije dovolj dolge pelodne cevi. Pelodna cev ne doseže plodnice materinske rastline in spolni celici se ne moreta združiti. Posledično se seme ne razvije.

Skupno smo posejali 148 petrijevk, od tega 105 petrijevk semen *Phalaenopsis* in 43 petrijevk semen *Bletilla*. Kaljivost je bila boljša pri semenih *Bletilla* (71,2 %), medtem ko je bila kaljivost semen *Phalaenopsis* 42,1 %. Semena z oznakami M1, M2, M4, M5, M6, M12, M13 in M14 niso kalila v nobenem poskusu sejanja. Sklepamo, da tudi te kombinacije križanj niso bile uspešne, saj nastala semena niso bila sposobna kalitve.

Semena *Phalaenopsis* z oznakami M7, M8 in M10 so v prvih poskusi sejanja kalila in sejančke smo lahko uporabili pri poskusih transformacije. Čez nekaj mesecev pa poskusi sejanja teh semen niso bili več uspešni, čeprav smo jih sejali pod enakimi pogoji kot prvič. *Phalaenopsis* je tropska orhideja, zato smo semena shranjevali pri sobni temperaturi. Pritchard in Seaton (1993) navajata, da se je viabilnost semen nekaterih tropskih orhidej zmanjšala, če so jih shranjevali pri 5 °C. Vendar pa v našem primeru nekatera semena po nekaj mesecih niso več kalila, čeprav smo jih shranjevali pri sobni temperaturi.

5.1.2 Izbira izsečka za transformacije

Za uspešno transformacijo je predpogoj dobra regeneracija rastline. Pri tem je izbira izsečka zelo pomembna. Prva sta poročala o uspešni transformaciji orhidej *Phalaenopsis* z *A. t.* šele leta 2000 Belarmino in Mii. Za transformacijo sta uporabila skupke celic drobljivega kalusa, ki sta ga pridobila iz stebelnih izsečkov. Vzpostavitev kulture drobljivega kalusa je zelo zahtevna, uspeh je odvisen tudi od posameznih sort. Chai in sod.

(2002) so zato kot izsečke za transformacijo uporabili PLB, ki so jih pridobili iz brstov na stebelnih nodijih. Ker sta obe omenjeni metodi za pridobivanje izsečkov precej dolgotrajni, so Mishiba in sod. (2005) za izseček uporabili protokorme v zgodnji fazi po kaljenju. Poročil o uspešni transformaciji orhidej *Bletilla* do sedaj še nismo zasledili.

Protokolu, po katerem so delali Mishiba in sod. (2005), smo pri našem poskus sledili tudi mi. Za izseček pri transformaciji smo izbrali 21 dni stare sejančke, ki so pri orhidejah pri tej starosti še v obliki protokormov. Mishiba in sod. so ugotovili, da protokormi mlajši od 21 dni takoj po transformaciji porjavijo in propadejo, 21 ali več dni stari protokormi pa se regenerirajo.

Sejančki *Bletilla* so rastli hitreje kot sejančki *Phalaenopsis*, zato so bili po 21 dneh bistveno večji kot sejančki *Phalaenopsis*. Po 19 dneh od sejanja smo za poskus transformacije imeli 45 petrijevk *Phalaenopsis* in 31 petrijevk *Bletilla*.

5.1.3 Transformacija orhidej *Phalaenopsis* in *Bletilla striata*

O uspešni transformaciji orhidej z uporabo biolistike so med drugim poročali Kuehnle in Sugii (1992) in Anzai in sod. (1996). Prvo uspešno transformacijo orhidej *Phalaenopsis* z *Agrobacterium* pa sta opravila Belarmino in Mii šele leta 2000. Posredni vnos genov z uporabo *Agrobacterium* je bil dolgo časa omejen na dvokaličnice, ker imajo močno izražen odgovor na poškodbe. Enokaličnice se na poškodbe skoraj ne odzivajo in niso tako dovzetne za okužbe z bakterijami.

Chai in sod. (2002) so PLB, ki so jih uporabili kot izsečke, pred transformacijo transversalno prerezali ali jim odstranili zunanjo plast celic. Z dodatnim poškodovanjem PLB so želeli povečati učinkovitost transformacije. Bakterije namreč privlači poškodovano tkivo in kemijski signali, ki jih tako tkivo izloča (Hiei in sod., 1994).

Mishiba in sod. (2005) so pri vnosu genov z *A. t.* uspeli nadomestiti odsotnost naravnega odgovora na poškodbe z dodajanjem acetosiringona v kokultivacijsko gojišče. V našem poskusu smo 3 dni pred transformacijo protokorme prenesli v tekoče gojišče, ki smo mu dodali 100 μ M acetosiringon. Tudi gojišču za kokultivacijo smo dodali 100 μ M acetosiringon. Acetosiringon poveča virulentnost bakterij z aktiviranjem *vir* genov na Ti plazmidu (Hiei in sod., 1994).

Podatki za čas inokulacije izsečkov z *A. t.* so zelo različni, od nekaj minut do nekaj ur. Belarmino in Mii (2000) sta inokulirala 10 ur, Chai in sod. (2002) 30 minut in Mishiba sod. (2005) 7 ur. Ker se podatki glede trajanja inkubacije zelo razlikujejo, smo se odločili, da bomo naredili več različnih poskusov. Čas inkubacije v naših poskusih je bil od 10 minut do 22 ur. Po inokulaciji so bili vitalni protokormi, ki so bili v bakterijski suspenziji 4:18, 4:00, 3:05, 2:15, 2:13, 2:05, 0:50, 0:45, 0:32, 0:30, 0:21, 0:20, 0:18 in 0:15 ure. Pri inkubaciji od 10 minut do 4 ure in 18 minut, nismo opazili razlike v sposobnosti preživetja protokormov. Protokormi po inkubaciji 18:40, 18:30 in 10:30 ure so propadli. Poskus z daljšim časom inkubacije bi bilo potrebno ponoviti, da bi lahko potrdili, da vpliva na

preživetje protokormov. Belarmino in Mii (2000) sta v svojih poskusih namreč določila, da je 10 ur optimalen čas inkubacije.

Po inkubaciji v bakterijski kulturi, smo protokorme za 3 dni predstavili na gojišče za kokultivacijo z dodatkom acetosiringona. Tudi Belarmino in Mii (2000) sta celice pustila v kokultivaciji 3 dni, Chai in sod. (2002) pa protokorme samo 2 dni. Mishiba in sod. (2005) so imeli čas kokultivacije 3 dni. Na tej stopnji noben od omenjenih raziskovalcev ni dodajal antibiotikov v gojišče, vsi pa so dodali acetosiringon. JULKIFLE in sod. (2010) navajajo, da poleg že omenjenih parametrov, na uspešnost transformacije vplivajo tudi temperatura med kokultivacijo, koncentracije L-cysteine, CaCl_2 in AgNO_3 v kokultivacijskem gojišču, pH in svetlobni pogoji.

Po kokultivaciji smo protokorme sprali s timetinom, ki je odstranil *A. t.* in jih prenesli na regeneracijsko gojišče. Na tej stopnji selekcijskih antibiotikov nismo dodajali, saj smo želeli zagotoviti čim boljše preživetje protokormov, kot to navajajo tudi Chai in sod. (2002). Ti regeneracijskemu mediju niso dodali selekcijskih antibiotikov, PLB pa so na takem gojišču pustili 6 tednov. Belarmino in Mii (2000) ter Mishiba in sod. (2005) so takoj po kokultivaciji že uporabili gojišče s selekcijskimi antibiotiki. V našem poskusu smo regeneracijskemu gojišču dodali tudi BAP in NAA, ki stimulirata proliferacijo PLB (Košir in sod., 2004).

Skupno smo tretirali 411 protokormov *Phalaenopsis* in 724 protokormov *Bletilla*. Teden dni po transformaciji je bilo vitalnih še 37 (9 %) protokormov pri *Phalaenopsis* in 26 (3,6 %) protokormov *Bletilla*.

Aktivnost *gus* gena smo testirali s histokemičnim GUS testom. Modro obarvan produkt aktivnega *gus* gena smo zaznavali vizualno s pomočjo stereomikroskopa. Skupno smo z GUS testom analizirali 21 protokormov. Od teh je bilo 6 GUS pozitivnih, 15 pa GUS negativnih. *Gus* se je izražal v zelo majhnem delu, le v nekaj celicah protokormov. Možno je, da se pri delitvi celic, transgena sekvenca DNA ni prenesla na hčerinske celice. Včasih transgeno sekvenco endonukleaze prepoznajo kot tujek in jo izrežejo. Zato lahko nastanejo regeneranti s transformiranimi in ne-transformiranimi celicami. Tako točkovno izražanje *gus* gena je pri nekaterih vrstah zelo pogosto (Finer in Finer, 2000)

Izražanje *gfp* gena v protokormih smo pregledali z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence. Skupno smo pregledali 33 protokormov. Zeleno so fluorescirali le deli gojišča, ostanki propadlih semen in propadli protokormi. Izmed vitalnih protokormov je zeleno fluoresciral samo en protokorm, vendar fluorescenca ni bila izrazita. Protokorm smo spremljali 14 dni in v tem času se njegova fluorescenca ni spremenila, zato ne moremo trditi, da je fluorescenca posledica transformacije. Po 14 dneh je protokorm propadel.

Belarmino in Mii (2000) sta gojišču za selekcijo in regeneracijo za skupke celic drobljivega kalusa dodala 50 mg/l higromicina. Chai in sod. (2002) so dodali 3 mg/l higromicina šele po 6 tednih regeneracije, do takrat pa so bili protokormi brez selekcijskega antibiotika. Tudi v našem poskusu selekcijskega antibiotika nismo dodajali, čeprav so preliminarni rezultati (ki v to nalogo niso vključeni) pokazali, da pri ne-

transformiranih protokormih higromicin v gojišču v koncentracijah od 1-50 mg/l ne vpliva na preživetje.

V primeru, da je vzkalilo dovolj semen, smo nastavili tudi kontrolni poskus in protokorme gojili pod enakimi pogoji kot okužene oziroma transformirane. Za kontrolo smo uporabili sejančke križancev z oznakama M7/7 in M7/8. Prve smo predstavili na gojišče za regeneracijo brez timetina, druge pa na gojišče za regeneracijo z dodatkom timetina. Sejančki z oznako M7/7 so po drugem subkultiviranju na gojišče ½ MS s saharozo propadli. Sejančke z oznako M7/8 smo uspešno subkultivirali in jih gojili do velikosti primerne za aklimatizacijo, vendar so pri zadnjem subkultiviranju propadli zaradi okužbe.

Raziskave transformacij pri rižu so pokazale, da na uspešnost transformacij vplivajo številni dejavniki in njihova kombinacija, kot so genotip transformirane rastline, vrsta in starost inokuliranih tkiv, vrsta vektorja, vrsta seva *Agrobacterium*, selekcijski geni in pogoji za selekcijo, prav tako pa številni dejavniki tkivnih kultur (Hiei in sod., 1997).

5.1.4 Nekaljivost semen in okužbe

V prvih devetnajstih dneh od sejanja semen na gojišče ½ MS s saharozo, smo zaradi nekaljivosti semen izločili 72 petrijevk.

Semena z oznako M1, M2, M4, M5, M6, M12, M13 in M14 niso kalila v nobenem poskusu sejanja. Sklepamo, da te kombinacije križanj niso bile uspešne, saj nastala semena niso bila sposobna kalitve. Ostala semena, ki smo jih sami vzgojili s križanjem, so v začetnih poskusih sejanja dobro kalila, kasneje pa ne več. Ker smo ostali brez materiala za sejanje in transformacije, smo v poskus naknadno najprej vključili plodove (in semena) *Phalaenopsis*, ki so nastali pri vajah opraševanja orhidej in kasneje tudi semena *Bletilla*. Semena križancev *Phalaenopsis* smo shranjevali pri sobni temperaturi, saj je *Phalaenopsis* tropska rastlina, vendar sklepamo, da je vseeno prišlo do propada in s tem nekaljivosti semen.

Plesen, ki se je pojavila v prvih tednih po sejanju semen, to je pri 71 petrijevkah, je verjetno posledica neučinkovitega in nenatančnega razkuževanja semen ali sekundarne okužbe že steriliziranega semena med samim postopkom sejanja. Semena smo razkuževali z 1,66 % dikloroizocianurno kislino in jih po 10 minutnem razkuževanju tudi centrifugirali. Semena so zelo hidrofobna, centrifugiranje pripomore k boljši omočitvi in zmanjšanju površinske napetosti, s tem pa k boljšemu razkuževanju (Zupan, 2004).

Okužbe, ki so se pojavile kasneje, so verjetno sekundarne. Protokormi so na tej stopnji veliki približno 1 mm, zato jih nismo mogli posamezno predstavljati s pinceto, kot to lahko delamo pri večjih izsečkih. Zaradi majhnosti smo jih prelivali preko filtrov in verjetno smo jih med postopkom okužili z orodjem, ki smo ga pri delu uporabili. Prišlo je tudi do sekundarne okužbe s plesnijo zaradi kondenza. Ta je nastajal na robovih in na pokrovcih petrijevk.

5.2 SKLEPI

Po opraitvi je semenske glavice oblikovalo 77,5 % cvetov, od teh je bilo 19,4 % semenskih glavic praznih, ostalih 80,7 % semenskih glavic pa je vsebovalo seme. Propadlo oziroma predčasno odpadlo pa je 22,5 % plodov.

Asimbiotska kaljivost je bila boljša pri orhideji *Bletilla* kar 71,2 %, medtem ko je bila pri *Phalaenopsis* 42,1 %. Semena nekaterih križanj niso kalila v nobenem poskusu sejanja.

Za transformacije smo izbrali 21 dni stare sejančke, ki so pri orhidejah pri tej starosti še v obliki protokormov. Pred transformacijo smo protokorme za 3 dni prenesli v gojišče z acetosiringonom, ki poveča virulentnost bakterij z aktiviranjem *vir* genov na Ti plazmidu. Protokorme smo inkubirali v bakterijski suspenziji od 10 minut do 22 ur. Pri inkubaciji od 10 minut do 4 ure in 18 minut, nismo opazili razlike v sposobnosti preživetja protokormov.

Po kokultivaciji smo protokorme sprali s timetinom, ki je uspešno odstranil *A. t.* Seleksijskih antibiotikov v regeneracijsko gojišče nismo dodajali, saj smo želeli zagotoviti čim boljše preživetje protokormov.

Za vnos genov z vektorskim sistemom smo izbrali komercialni sev *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Za *gus* gen smo uporabili komercialni binarni plazmid pCAMBIA1301, za *gfp* gen pa plazmid pART27 2mgfp5-ER.

Aktivnost *gus* gena smo testirali s histokemičnim GUS testom z barvilom X-Gluc. Od analiziranih 21 protokormov jih je bilo 6 GUS pozitivnih in 15 GUS negativnih. *Gus* gen se je izražal v zelo majhnem delu, le v nekaj celicah protokormov.

Izražanje *gfp* gena v protokormih smo pregledali z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence. Skupno smo pregledali 33 protokormov. Zeleno so fluorescirali le deli gojišča, ostanki propadlih semen in propadli protokormi. Izmed vitalnih protokormov je zeleno fluoresciral samo en protokorm, vendar fluorescenca ni bila izrazita in ne moremo trditi, da je fluorescenca posledica transformacije. Po 14 dneh je protokorm propadel.

Skupno smo transformirali 411 protokormov *Phalaenopsis* in 724 protokormov *Bletilla*. Teden dni po transformaciji je bilo vitalnih še 9 % protokormov *Phalaenopsis* in 3,6 % protokormov *Bletilla*.

V petindvajsetih dneh smo izločili 48 % petrijevk, vzrok je bila okužba s plesnijo. V petinštiridesetih dneh smo izločili še 2 % petrijevke, vzrok je bila okužba z bakterijo. Po petinštiridesetih dneh sta nam ostali še 2 oziroma 1,35 % petrijevk. Skupno smo imeli pet rastlin orhidej rodu *Bletilla*, ki smo jih po 77 dneh od transformacije iz gojišča z oznako 6793 s timetinom prestavili na gojišče 6793 s timetinom in 5 mg/l higromicina. Čez 14 dni so rastline porjavele.

6 POVZETEK

Orhideje so po raznolikosti barv in cvetov priljubljene rastlinske vrste. Predvsem orhideje rodu *Phalaenopsis* imajo veliko komercialno vrednost in prilagodljivost, zato se zelo pogosto pojavljajo v žlahtniteljskih programih. Spadajo v družino kukavičevk (Orchideaceae). So epifiti, za katere je značilno, da rastejo v tropskih predelih na drevju, na koreninskih izboklinah in na kamenju.

V isto družino spada tudi rod *Bletilla*, ki je teoretično in vse bolj dobiva na pomenu tudi v Evropi. Je nezahtevna za gojenje.

Za vse kukavičevke je značilna tvorba plodov glavic oziroma kapsul, ki vsebujejo zelo veliko število drobnih semen, vendar vsa semena pogosto ne vsebujejo dozorelega embrija. Seme potrebuje za kalitev ustrezne mikorizne glive. V *in vitro* razmerah nadomestimo produkte gliv z ustrezno sestavo gojišč. V poskus smo vključili 13 cvetočih komercialnih rastlin rodu *Phalaenopsis* ter 2 rastlini rodu *Bletilla*.

Namen dela je bil v genom orhidej *Phalaenopsis* z vektorskim sistemom z *Agrobacterium tumefaciens* vnesti *gus* gen za sintezo β -glukuronidaze in *gfp* gen za zeleno fluorescenco ter selekcijski gen za odpornost na antibiotik higromicin. Pri regenerantih smo želeli določiti izražanje markerskih genov. V ta namen smo oprašili cvetove orhideje rodu *Phalaenopsis*. Semenske glavice smo pobirali postopoma, kot so se odpirale in jih shranili na sobni temperaturi do inokulacije na gojišče.

Na rastlinah, ki so bile vključene v križanje, je nastalo 74 cvetov, od katerih je bilo 40 (54 %) cvetov opršenih. Po opršitvi je semenske glavice oblikovalo 31 (77,5 %) opršenih cvetov, od teh je bilo 6 (19,4 %) semenskih glavic praznih, ostalih 25 (80,7 %) semenske glavice pa je vsebovalo seme. Propadlo oziroma predčasno odpadlo pa je 9 (22,5 %) plodov.

Od 148 inokuliranih petrijev s semeni je bilo 76 petrijev s kalivimi semeni. Kaljivost je bila boljša pri orhideji *Bletilla* (71,2 %), medtem ko je bila kaljivost semen pri *Phalaenopsis* 42,1 %. Semena nekaterih križanj niso kalila v nobenem poskusu sejanja.

Za vnos genov z vektorskim sistemom smo izbrali komercialni sev *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Za *gus* gen smo uporabili komercialni binarni plazmid pCAMBIA1301. Aktivnost *gus* gena smo testirali s histokemičnim GUS testom z barvilom X-Gluc, katerega sintetiziran encimom β -glukuronidaza razgradi in produkt se obarva modro.

Za vnos *gfp* gena smo uporabili plazmid pART27 2mgfp5-ER. Aktivnost *gfp* gena smo testirali z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence.

Skupno smo transformirali 411 protokormov *Phalaenopsis* in 724 protokormov *Bletilla*. Čas inkubacije v naših poskusih je bil od 10 minut do 22 ur. Zelene protokorme, ki smo jih

transformirali, so po tednu dni od transformacije bolje preživel pri *Phalaenopsis*, in sicer 37 (9 %) protokormov, medtem ko je pri *Bletilla* preživel samo 26 (3,6 %) protokormov.

Izražanje *gus* gena z GUS testom smo spremljali pri 21 protokormih, od teh je bilo 6 GUS pozitivnih in 15 GUS negativnih. *Gus* se je izražal v zelo majhnem delu, le v nekaj celicah protokormov. Izražanje *gfp* gena z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznim setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence smo pregledali pri 33 protokormih. Od vseh protokormov je samo en protokorm malo zeleno fluoresciral, vendar fluorescenca ni bila tako izrazita, da bi lahko z gotovostjo trdili, da je posledica transformacije. Protokorm smo spremljali še 14 dni in v tem času se njegova fluorescenca ni spremenila. Po 14 dneh je protokorm propadel.

V primeru, da je vzkalilo dovolj semen, smo vzporedno s kokultiviranimi protokormi nastavili še kontrolno petrijevko na gojišče za kalitev semen. Neokužene protokorme smo gojili pod enakimi pogoji kot okužene. Za kontrolo smo uporabili sejančke križancev z oznakama M7/7 in M7/8. Prve smo predstavili na gojišče za regeneracijo brez timetina, druge pa na gojišče za regeneracijo z dodatkom timetina. Sejančki z oznako M7/7 so po drugem prestavljanju na gojišče ½ MS s saharozo propadli. Sejančki z oznako M7/8 pa smo uspešno subkultivirali na gojišče in jih gojili do velikosti primerne za aklimatizacijo, vendar so pri naslednjem prestavljanju propadli zaradi okužbe.

V petindvajsetih dneh smo izločili 71 (48 %) petrijevki, vzrok je bil okužba s plesnijo. V petinštiridesetih dneh smo izločili še 3 (2 %) petrijevke, vzrok je bil okužba z bakterijo. Po petinštiridesetih dneh sta nam ostali še 2 (1,35 %) petrijevki. Skupno smo imeli pet rastlin orhideje rodu *Bletilla*, ki smo jih po 77 dneh od transformacije iz gojišča 6793 s timetinom in 1 mg/l higromicina predstavili na gojišče 6793 s timetinom in 5 mg/l higromicina. Po prestavljanju smo kontrolirali čez 14 dni, rastline so bile porjavele.

7 VIRI

- Anzai H.Y., Ishii M.S., Katsumata K., Nojiri C., Morikawa H., Tanaka M. 1996. Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tissue Culture Letters*, 13: 265-272
- Arditti J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*, New York, John Wiley & Sons: 712 str.
- Belarmino M.M., Mii M. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Report*, 19: 435-442
- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 22: 8711-8721
- Billinton N., Knight A.W. 2001. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry*, 291: 175-197
- Bletilla.Wikipedia. 2006.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Bletilla> (5.3.2014)
- Bohanec B. 2004. *Osnove rastlinske biotehnologije V: Gensko spremenjena hrana*. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 2-28
- Brickell C. 1996. *The RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. London, Dorling Kindersley: 1136 str.
- Broothaerts W., Mitchell H.J., Weir B., Kaines S., Smith L.M.A., Yang W., Mayer J.E., Roa-Rodríguez C., Jefferson R.A. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433: 629-633
- CAMBIA. 1997. *pCambia Vector release manual version 3.05*. Canberra, Center for the application of molecular biology to international agriculture: 6 str.
- Chai M.L., Xu C.J., Senthil K.K., Kim J.Y., Kim D.H. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 96: 213-224
- Chan M.T., Lee T.M., Chang H.H. 1992. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiology*, 33: 577-583
- Chan Y.L., Lin K.H., Sanjaya, et al. 2005. Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transgenic Research*, 14: 279-288
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263-271
- Christenson E. 2001. *Phalaenopsis*. Portland, The Haseltine Building: 183 str.
- Deblaere R., Reynaerts A., Höfte H., Hernalsteens J.P., Leemans J., VanMontagu M. 1987. Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology*, 153:277-292.

- Finer K.R., Finer J.J. 2000. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soy bean cotyledons. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 406 - 410
- George E.F. 1993. The propagation of orchids. V: Training manual for short course in orchids culture Lubag A.M. (ur.). Los Banos, University of the Philippines, Ornamental Crops Division: 917-922
- 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
- 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 Sciences of the United States of America*, 94: 2122-2127
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 10: 446-451
- Hicks A.J. 2000. Asymbiotic technique of orchid seed germination. Chandler, The Orchid Seedbank Project: 134 str.
- Hiei Y., Komari T., Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 35:205-218
- 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. *The Plant Journal*, 6, 2: 271-282
- Ignacio J. 2008. *Bletilla striata* germination - photographs, culture sheet project, *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f.
[http://culturesheet.org/orchidaceae:bletilla:striata\(15.9.2013\)](http://culturesheet.org/orchidaceae:bletilla:striata(15.9.2013))
- Jach G., Binot E., Frings S., Luxa K., Schell J. 2001. Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal*, 28: 483-491
- Javornik B. 2000. Gensko spremenjene rastline. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 6: 290-294
- 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
- Jevšnik T. 2006. Orhideje - Gojenje tropskih orhidej. Dobrovnik, Ocean Orchids: 149 str.
- Jordan M.C. 2000. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Report*, 19: 1069-1075
- Julkifle A.L., Rathinam X., Sinniah U.R., Subramaniam S. 2010. Optimisation of transient green fluorescent protein (GFP) gene expression in *Phalaenopsis violacea* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 3424-3432
- Košir P., Škof S., Luthar Z. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae Slovenica*, 83: 233 - 242

- Kramer J. 1997. Orchid for everyone. New York, Smithmark Publisher: 208 str.
- Kuehnle A.R., Sugii N. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. Plant Cell Report, 11: 484–488
- Liau C.H., You S.J., Prasad V., et al. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of an *Oncidium* orchid. Plant Cell Report, 21:993–998
- Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nature Biotechnology, 17: 969-973
- Men S., Ming X., Liu R., Wei C., Li Y. 2003. *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 75: 63-71
- Men S., Ming X., Wang Y., et al. 2003. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. Plant Cell Report, 21:592–598
- Miki B., McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. Journal of Biotechnology, 107: 193-232
- Mishiba K., Chin D.P., Mii M. 2005. *Agrobacterium* - mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. Plant Cell Report, 24: 297–303
- OceanOrchids. Zlata in srebrna medalja za naše orhideje na Nizozemskem. 2010.
<http://www.oceanorchids.si/si/index.php?sklop=novice>(15.9.2013)
- Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant and Cell Physiology, 31: 805-813
- 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
- Phytamax orchid multiplication medium. 1992. St.Louis, Sigma Chemical Company: 2 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/5/p6793dat.pdf> (22.1.2014)
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene, 111: 229-233
- Pritchard H.W., Seaton P.T. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. Selbyana, 14:89-104
- Ravnik V. 2002. Orhideje Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 192 str.
- Sanjaya, Chan M. - T. 2007. Genetic transformation as a tool for improvement of orchids. V: Chen, W.H., Chen, H.H. (eds.). Orchids Biotechnology. Singapur, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur: 225-253
- Semiarti E., Indrianto A., Purwantoro A., Machida Y., Machida C. 2011. *Agrobacterium*-mediated transformation of Indonesian orchids for micropropagation. V: Alvarez, M. (Ed.). Genetic Transformation. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. In Tech: 215-240

- <http://www.intechopen.com/books/genetic-transformation/agrobacterium-mediated-transformation-of-indonesian-orchids-for-micropropagation> (15.12.2013)
- Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko: za študente visokošolskega strokovnega študija kmetijstva -agronomija in hortikultura. Ljubljana, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete: 176 str.
- Songstad D.D., Somers D.A., Griesbach R.J. 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40: 1-15
- 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
- Strong G. 2000. *A Gardener's Guide to Orchids and Bromeliads*. London, Murdoch books: 96 str.
- Wilmink A., Dons J.J.M. 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 2: 165-185
- Yu Z., Chen M., Nie L., et al. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 87-92
- 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
- Zupan S. 2004. Vpliv različnih priprav semen orhidej *Bletilla striata* (Thunb.) in *Vanda cristata* (Lindl.) na kalitev. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 49 str.

ZAHVALA

Vse si, kar je.
Tvoje misli, tvoje življenje.
Uresničitev tvojih sanj.
Vse si, kar izbereš, da boš.
Neomejen si, kakor neskončno vesolje.

(Neznan avtor)

Mentor, prof. dr. Borut Bohanec, hvala, ker ste me sprejeli in odobrili naslov mojega diplomskega dela. Hvala za vse predloge, pripombe in popravke pri sami izvedbi ter pri izdelavi pisnega dela naloge.

Največja zahvala pa gre somentorici, dr. Heleni Lesar. Helena hvala za vso pomoč pri izvedbi mojega diplomskega dela. Ti si bila tista, ki si me naučila dela v laboratoriju, pokazala si mi pot mikropropagacije in skrivnosti sterilnosti. Naučila si me dela z bakterijskimi kulturami in izvedbe transformacije pri orhidejah. Hvala, ker se nisi naveličala ponavljati enega in istega, dokler je bilo potrebno. Predvsem pa hvala, za odgovore na nešteto mojih vprašanj v vsakem trenutku, tudi ob praznikih ali pozno zvečer. Navsezadnje hvala, ker si zaradi mojega dela presedela kar nekaj ur za računalnikom in popravljala moje napake ter mi dajala predloge pri izdelavi pisnega dela naloge. Helena, iz srca HVALA!!

Nataša Hren, hvala, ker si mi pri vajah genetike nazorno pokazala razmnoževanje orhidej, prav to me je vzpodbudilo k izvedbi diplomskega dela na temo orhidej. Hvala, ker si mi tolikokrat pokazala kako »poženem« avtoklav in druge naprave, ki sem jih potrebovala.

Prof. dr. Zlata Luthar, hvala za semena orhideje *Bletilla*, ki so prišla še kako prav.

Hvala vsem sodelavcem in sodelavkam Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje, ker so mi omogočili prostor za izvedbo praktičnega dela.

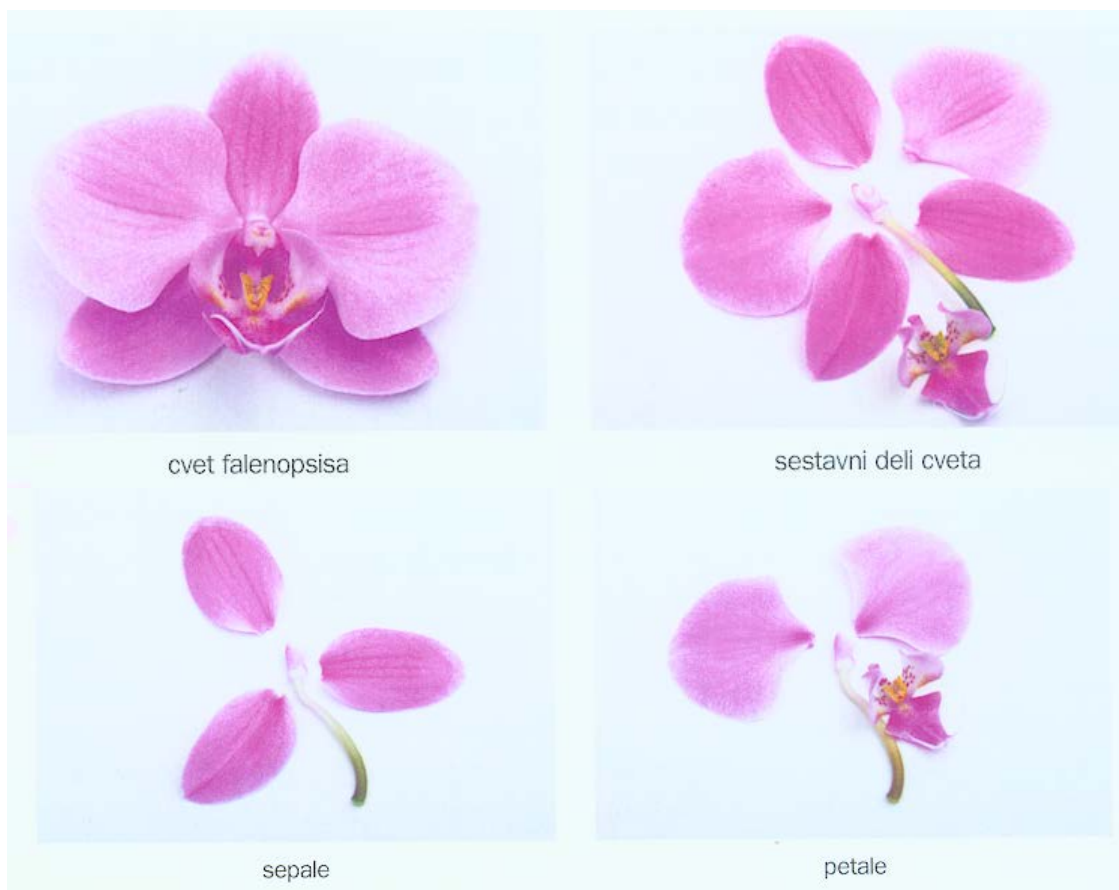
Mama in ata hvala, za vso podporo, ki sta mi jo nudila ter me vzpodbujala skozi vsa šolska in študijska leta. Hvala sestra Tina, za vse ure, ki si jih z menoj presedela, ko si popravljala stavke in me vzpodbujala. Hvala brat Sandi, da si mi uredil in olepšal vse slike, ki jih diplomska naloga vsebuje.

Nazadnje gre zahvala še tebi Goran, ker si mi skozi celoten študij stal ob strani, me podpiral in mi vedno priskočil na pomoč, ko sem te potrebovala. Tebi in najinimahčerkama Taji in Naji, hvala za vso potrpežljivost.

PRILOGE

Priloga A

Zgradba cveta rodu *Phalaenopsis* (Jevšnik, 2006)



Priloga B

V križanje vključene sorte orhidej rodu *Phalaenopsis*



Priloga C

V križanje vključeni sorti orhidej rodu *Phalaenopsis*



Vijolična



Bela

Priloga D

V križanje vključeni sorti orhidej *Phalaenopsis*

Phalaenopsis 'Ocean Pacifik' – levo ter *Phalaenopsis* 'Anthura tainan' – desno (OceanOrchids, 2010)



Priloga E

Bletilla striata (Ignacio, 2008)



Priloga F

Križanje in razvoj plodov *Phalaenopsis*

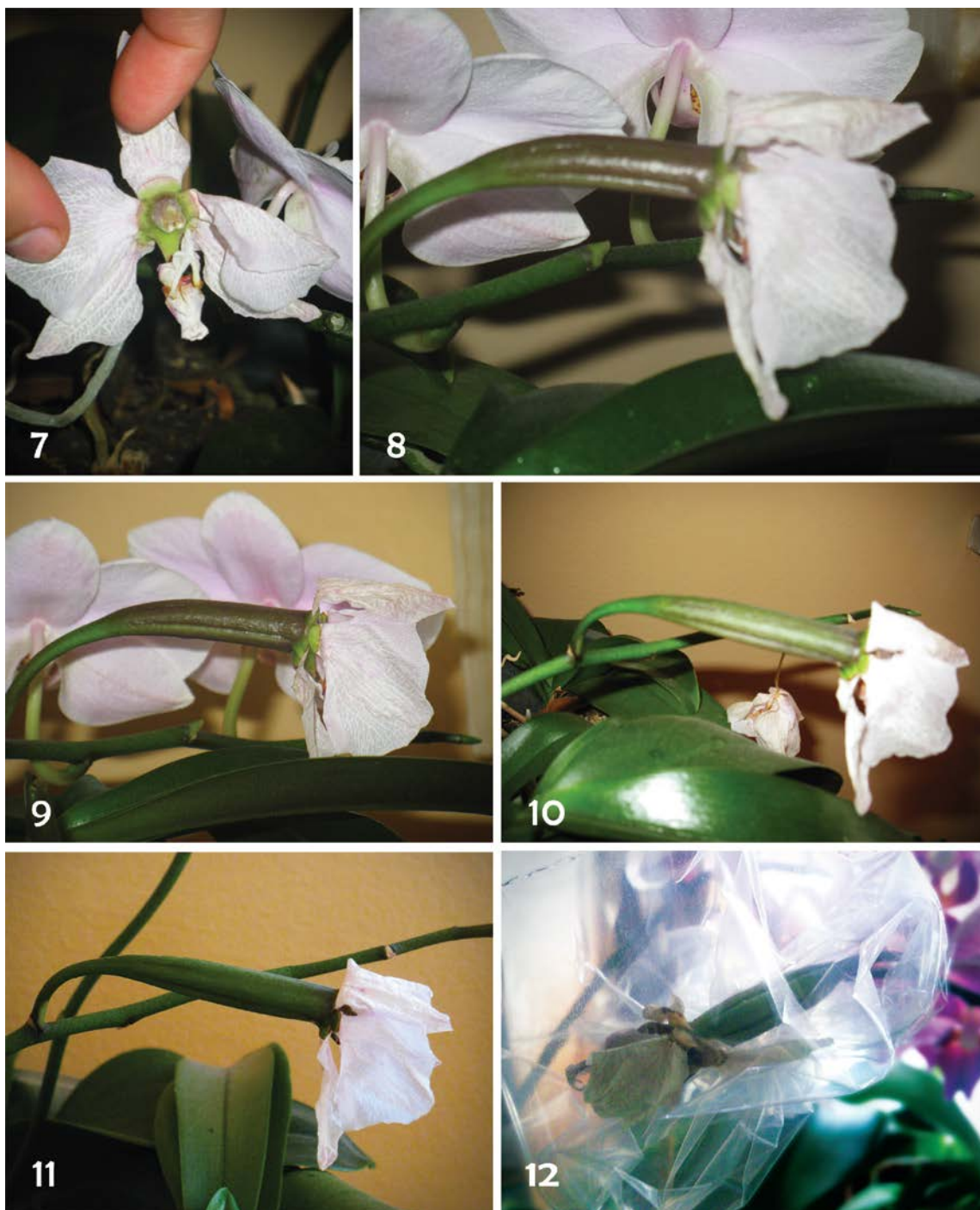
Cvetova orhideje rodu *Phalaenopsis*, ki smo jih med seboj križali (1). Cvetova dan po opraitvi (2). Cvetova dva dni po opraitvi se povesita (3). Sedem dni po opraitvi se cvetni pecelj oz. plodnica že začne debeliti, petale in sepale sta že posušena (4). Cvet, kateremu smo odvzeli polinij, se je posušil in odpadel, cvetni pecelj, katerega cvet je dobil polinij, pa se vztrajno debeli, petale in sepale so posušeni (5 in 6).



Priloga G

Razvoj plodov *Phalaenopsis*

Cvet po dveh tednih od opranitve (7). Plodnica po 21 dneh od opranitve (8). Plodnica po 25 dneh od opranitve (9). Plodnica 55 dni po opranitvi, plodnica se je podaljšala (10). Plodnica po 62 dni po opranitvi (11). Po 136 dneh od opranitve smo dali na odebeljeno plodnico vrečko, v katero se je semenska glavica s semeni odprla (12).



Priloga H

Sestava gojišč

Priloga H1: Sestava gojišča MS (Murashige in Skoog, 1962)

SESTAVINE	KOLIČINA
Makroelementi	
NH ₄ NO ₃	825 mg/l
KNO ₃	950 mg/l
CaCl ₂	166,1 mg/l
MgSO ₄	90,35 mg/l
KH ₂ PO ₄	85 mg/l
Mikroelementi	
H ₃ BO ₃	3,1 mg/l
MnSO ₄ × H ₂ O	8,45 mg/l
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	4,3 mg/l
KI	0,415 mg/l
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,0125 mg/l
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,0125 mg/l
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,125 mg/l
Na ₂ -EDTA	18,63 mg/l
FeSO ₄ × 7H ₂ O	13,90 mg/l

Priloga H2: Gojišče za kalitev semen

$\frac{1}{2}$ MS	
saharoza	20 g/l
pH	7,0

Za pripravo trdnega gojišča smo dodali 2,6 g/l Phytagela (Sigma-Aldrich).

Priloga H3: Tekoče gojišče z acetosiringonom za rastline, 3 dni pred transformacijo

$\frac{1}{2}$ MS	
saharoza	20 g/l
acetosiringon	100 μ M
pH	5,5

Priloga H4: Gojišče za kokultivacijo

komercialno gojišče z oznako P6793, Sigma (sestava je navedena v prilogi H5)	25,3 g/l
acetosiringon	100 µM
pH	6,5

Priloga H5: Gojišče za selekcijo in regeneracijo (komercialna oznaka P6793, Sigma, 1992)

SESTAVINE	KOLIČINA
Makroelementi	
KH ₂ PO ₄	85 mg/l
NH ₄ NO ₃	825 mg/l
KNO ₃	950 mg/l
CaCl ₂	166 mg/l
MgSO ₄	90,350 mg/l
Mikroelementi	
H ₃ BO ₄	3,10 mg/l
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5,30 mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	8,450 mg/l
KJ	0,4150 mg/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0125 mg/l
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0125 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,1250 mg/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,850 mg/l
Na ₂ - EDTA	37,240 mg/l
Ogljikov hidrat	
Saharoza	20000 mg/l
Organske snovi, vitamini in hormoni	
Mio-inozitol	100 mg/l
Pepton	2000 mg/l
MES	1000 mg/l
Piridoksin	0,50 mg/l
Tiamin	1 mg/l
Nikotinska kislina	0,50 mg/l
α-naftalen očetna kislina (NAA)	0,50 mg/l
6-benzil aminopurin (BAP)	2 mg/l

Gojišču smo dodali 50 mg/l timetina.

Priloga H6: YEB gojišče za rast bakterij *Agrobacterium tumefaciens*

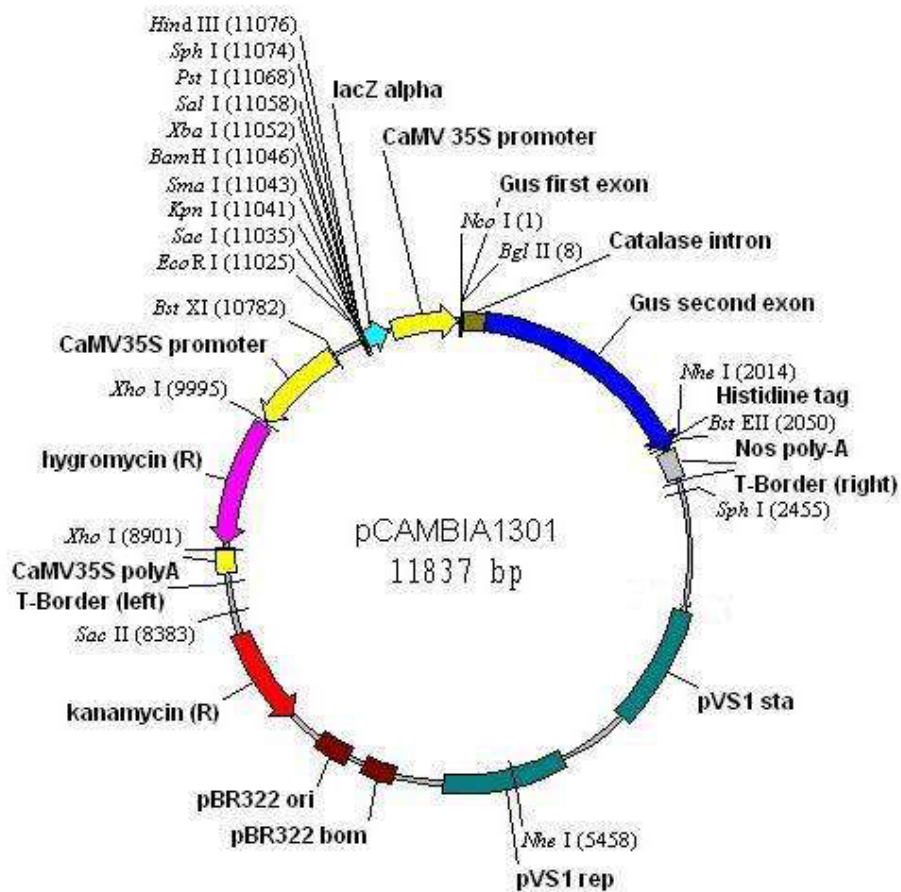
saharoza	5 g/l
pepton (Sigma)	5 g/l
goveji ekstrakt (Sigma)	5 g/l
kvasni ekstrakt	1 g/l
MgSO ₄ ×7H ₂ O (Merck)	1 g/l
agar	15 g/l
pH	7,0

Priloga H7: Gojišče za resuspenzijo bakterij po centrifugiranju

$\frac{1}{2}$ MS	
saharoza	10 g/l
pH	7,0

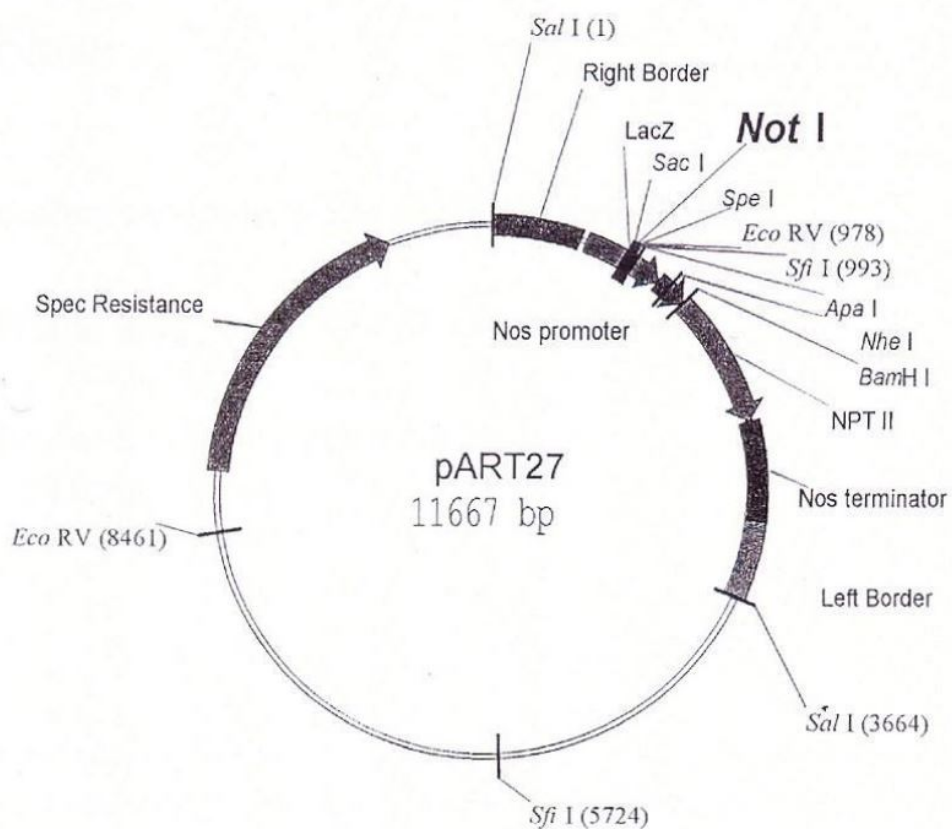
Priloga I

Plazmid pCAMBIA1301 (Cambia, 1997)



Priloga J

Plazmid pART27 (Gleave, 1992)



Priloga K

Barva opršenih cvetov orhidej rodu *Phalaenopsis* ter njihove oznake

Oznaka rastlin	Barva cveta
1	viola
2	bela
3	rumena
4	roza
5	rumena
6	bela
7	bela
8	bela

Priloga L

Čas inkubacije 21 dni starih protokormov *Phalaenopsis* in *Bletilla* ter število rastlin, ki so preživele prvi teden po transformaciji

Priloga L1: *gfp* gen - prvi poskus s protokormi *Phalaenopsis*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M3/2	4 ure	10
2	M3/1	4 ure	8
3	M8/9	3 ure in 5 min	0
4	M8/10	3 ure in 5 min	3
5	M3/3	3 ure	0
6	M8/2	3 ure	0
7	M3/8	2 uri in 5 min	2
8	M8/8	2 uri in 5 min	0
9	M7/6	2 uri	0
10	M3/4	2 uri	0
11	M7/8	1 ura in 5 min	0
12	M7/2	1 ura in 5 min	0
13	M8/5	1 ura	0
14	M3/10	1 ura	0
15	M3/9	45 min	0
16	M8/6	55 min	0
17	M7/3	30 min	0
18	M3/5	40 min	0
19	M3/6	20 min	0
20	M3/7	20 min	3
21	M7/10	15 min	2
22	M7/1	15 min	0
23	M8/1	10 min	0
Skupaj			28

Priloga L2: *gfp* gen - drugi poskus s protokormi *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M9/1	4 ure in 18 min	0
2	M9/2	4 ure in 18 min	5
3	M9/3	4 ure in 14 min	0
Skupaj			5

Priloga L3: *gus* gen - prvi poskus s protokormi *Phalaenopsis*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M11/1	2 uri	0
2	M11/2	2 uri	0
3	M11/3	2 uri	0
4	M11/4	2 uri in 11 min	0
5	M11/5	2 uri in 12 min	0
6	M11/6	2 uri in 10 min	0
7	M11/7	2 uri	0
8	M11/8	2 uri in 13 min	0
9	M11/9	2 uri	0
10	M11/10	2 uri in 15 min	3
11	M11/11	2 uri in 16 min	0
12	M11/12	2 uri in 18 min	0
13	M11/13	2 uri in 25 min	0
14	M11/14	2 uri in 23 min	0
15	M11/15	2 uri in 18 min	0
16	M11/16	2 uri in 16 min	0
17	M11/17	2 uri in 15 min	0
18	M11/18	2 uri in 13 min	6
Skupaj			9

Priloga L4: *gus* gen - tretji poskus s protokormi *Phalaenopsis* in *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M10/1	10 ur in 30 min	0
2	M10/2	18 ur in 30 min	0
3	M9/1	18 ur in 40 min	0
Skupaj			0

Priloga L5: *gus* gen - četrti poskus s protokormi *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M9/1	20 min	3
2	M9/2	18 min	1
Skupaj			4

Priloga L6: *gus* gen - peti poskus s protokormi *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M9/1	14 min	0
2	M9/2	30 min	0
3	M9/3	30 min	0
4	M9/4	31 min	0
5	M9/5	31 min	0
Skupaj			0

Priloga L7: *gus* gen - šesti poskus s protokormi *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M9/1	10 min	0
2	M9/2	10 min	0
3	M9/3	20 min	2
4	M9/4	30 min	4
5	M9/5	30 min	0
6	M9/6	30 min	0
Skupaj			6

Priloga L8: *gus* gen - sedmi poskus s protokormi *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M9/1	60 min	0
2	M9/2	40 min	0
3	M9/3	45 min	3
4	M9/4	50 min	2
5	M9/5	50 min	0
Skupaj			5

Priloga L9: *gus* gen - osmi poskus s protokormi *Bletilla*

Zap. št.	Oznaka križancev	Čas inkubacije	Število preživelih rastlin en teden po transformaciji
1	M9/1	21 min	2
2	M9/2	24 min	0
3	M9/3	27 min	0
4	M9/4	32 min	4
5	M9/5	38 min	0
Skupaj			6