

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja REMENIH

**DOLOČANJE TRANSGENOV V TOBAKU (*Nicotiana
tabacum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja REMENIH

DOLOČANJE TRANSGENOV V TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

DETERMINATION OF THE TRANSGENES IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2016

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, 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.

Podpis

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK
- KG genska transformacija/*gus* gen/*hptII* gen/tobak/regeneracija/molekulska analiza/
histokemična GUS analiza
- AV REMENIH, Mateja
- SA LUTHAR, Zlata (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Visokošolski
strokovni študijski Kmetijstvo - agronomija in hortikultura
- LI 2016
- IN DOLOČANJE TRANSGENOV V TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)
- TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
- OP IX, str. 34, pregl. 5, sl. 9, vir. 55
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Listne izsečke tobaka smo transformirali z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* sev LBA4404 in s plazmidom pCAMBIA1301 s 4-imi postopki 10-minutne inkubacije v kombinaciji z ultrazvokom in vakuumom. Po 4 dneh kokultivacije smo listne izsečke predstavili na regeneracijsko MSr gojišče z dodanima selekcijskima antibiotikoma higromicin (25 mg/l) in timentin (150 mg/l) za odstranitev *A. tumefaciens*. Uspešnost regeneracije je bila 80,4 %. Največ, 38,48 %, regenerantov je nastalo po 10-minutni inkubaciji listnih izsečkov samo v bakterijski suspenziji z *A. tumefaciens*. Pri ostalih treh obravnavanjih je nastalo manj regenerantov, od 19,6 do 21,24 %, . Pri 99,2 % regenerantih, ki so rasli na selekcijskem gojišču, so se v PCR reakciji namnožili fragmenti značilni za selekcijska gena *hptII* in *gus* , prav toliko jih je imelo potrjen samo *gus* gen in vseh 100 % je imelo prisotne fragmente značilne za *hptII* gen. Na neselekcijskem gojišču je imelo 98,4 % regenerantov namnožene fragmente značilne za oba transgena in prav toliko za samo *hptII* gen ter 96,9 % samo za *gus* gen. Kar pri 32 % regenerantih s PCR analizo potrjeno vgrajenim *hptII* transgenom, se ta ni izražal, imeli pa so funkcionalen *gus* gen, razen 1 %, pri katerih je bil tudi *gus* gen utišan. Pri *gus* genu je bila ugotovljena 100 % skladnost med izražanjem *gus* gena in prisotnostjo namnoženih fragmentov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dv1
- DC UDC
- CX genetic transformation/*gus* gene/*hptII* gene/tobacco/regeneration/molecular analysis/histochemical GUS analysis
- AU REMENIH, Mateja
- AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Professional Study Programme in Agriculture - Agronomy and Horticulture
- PY 2016
- TI DETERMINATION OF THE TRANSGENES IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)
- DT B. Sc. Thesis (Professional Study Programmes)
- NO IX, p. 34, tab. 5, fig. 9, ref. 55
- LA sl
- Al sl/en
- AB Leaf explants of tobacco were transformed by the bacterium *A. tumefaciens*. strain LBA4404 and plasmid pCAMBIA1301 using four different treatments of 10 minute incubation in different combination of ultrasound and vacuum. After 4 days of co-cultivation leaf explants were inoculated in the regenerative MSr medium with the added selective antibiotics hygromycin, 25 mg/l and timentin, 150 mg/l to prevent the growth of *A. tumefaciens*. The success of regeneration was 80.4 %. Most, 38.48 %, regenerants emerged after the 10 minute incubation of the leaf explants only in the bacterial suspension of *A. tumefaciens*. The other three treatments resulted with less regenerants, only from 19.6 to 21.24%. In 99.2% of regenerants, which have grown on selection media, the PCR reaction amplified fragments specific to the selection *hptII* and *gus* gene, as many of them had confirmed only *gus* gene and all 100 % had a present fragments specific only to *hptII* gene. On non-selective medium, 98.4 % of regenerants had amplified fragments characteristic of both transgene and the same goes for *hptII* gene yet 96.9 % for only *gus* gene. As in 32 % of regenerants, by PCR analysis confirmed *hptII* integrated transgene, the transgene was not expressed, though they had a functional *gus* gene, with the exception of 1 %, that had a silenced *gus* gene. In the *gus* gene was found 100 % consistency between the expression of *gus* gene and the presence of amplified fragments.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TOBAK	3
2.2 GENSKÉ TRANSFORMACIJE	4
2.3 METODE VNOSA TRANSGENOV V RASTLINE	4
2.3.1 Neposredni vnos transgenov	5
2.3.1.1 Biolistika	5
2.3.1.2 Elektroporacija	5
2.3.1.3 Polietilen glikol	5
2.3.1.4 Vbrizgavanje DNA	6
2.3.2 Posredni mehanizem prenosa transgenov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.3.2.1 Transformacijski vektorski sistem	7
2.3.2.2 Seleksijski in markerski transgeni	8
2.4 GENSKÉ TRANSFORMACIJE TOBAKA	9
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	11
3.2 SESTAVINE GOJIŠČ	11
3.3 VEKTORSKI SISTEM	12
3.4 TRANSFORMACIJA	13
3.5 FENOTIPSKO IZRAŽANJE TRANSGENOV	15
3.5.1 Izražanje <i>hptII</i> gena	15
3.5.2 Izražanje <i>gus</i> gena	15
3.6 DNA ANALIZA TRANSGENOV	15
3.6.1 DNA izolacija	16
3.6.2 Merjenje koncentracije DNA	16
3.6.3 PCR reakcija	16
3.6.4 Elektroforetska analiza fragmentov DNA	17
4 REZULTATI	19
4.1 REGENERACIJA TOBAKA PO TRANSFORMACIJ	19
4.2 IZRAŽANJE <i>hptII</i> in <i>gus</i> GENA V REGENERANTIH TOBAKA	20

4.3	DNA ANALIZA TRANSGENOV	21
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1	RAZPRAVA	25
5.2	SKLEPI	27
6	POVZETEK	29
7	VIRI	31
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1 Sestava MSm gojišča za mikropropagacijo in MSr gojišča za regeneracijo tobaka po transformaciji	11
Preglednica 2: Sestava YEB gojišča za rast bakterije <i>A. t.</i> LBA4404	12
Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja parov začetnih oligonukleotidov za posamezen transgen in dolžina namnoženega fragmenta (bp)	17
Preglednica 4: Število nastalih regenerantov po transformaciji listnih izsečkov tobaka z <i>A. t.</i> pCAMBIA130	19
Preglednica 5: Število in odstotek transgenov tobaka po transformaciji izsečkov z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301 pri katerih se s PCR reakcijo niso namnožili fragmenti značilni za transgena	21

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Prenos in vgraditev T-DNA v rastlinski genom	7
Slika 2: Plazmid pCAMBIA1301 dolžine 11.837 bp	13
Slika 3: Listni izsečki tobaka sorte 'Havana 38' na MSr gojišču	14
Slika 4: Dolžinski standard s 14 DNA fragmenti od 3.000 do 100 bp	18
Slika 5: Regeneracija listnih izsečkov: A – kontrola brez selekcije; B – po transformaciji na selekcijskem gojišču s 25 mg/l higromicina	19
Slika 6: Odstotek regeneracije po transformaciji listnih izsečkov tobaka z <i>A. t.</i> pCAMBIA10301	20
Slika 7: Fenotipsko izražanje <i>gus</i> gena: A – transformiran tobak; B – natransformiran tobak	21
Slika 8: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov: 1 do 129 - transformiran tobak gojen s selekcijo, 130 do 193 transformiran tobak gojen brez selekcije, K - netransformiran tobak, P - plazmid pCAMBIA1301, S - slepi vzorec, M - velikostni standard s 14 različno dolgimi DNA fragmenti; A - fragmenti dolžine 408 bp značilni za markerski <i>gus</i> gen; B – fragmenti dolžine 641 bp značilni za selekcijski <i>hptII</i> gen	22
Slika 9: Odstotek transgenov tobaka na selekcijskem in neselekcijskem MSr gojišču pri katerih so s PCR reakcijo namnožili značilni fragmenti	23

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

<i>A. t.</i>	bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pCAMBIA1301	plazmid družbe CAMBIA iz Cambere
<i>gus</i> gene	encim β -glukuronidaza
GUS3a-for	oznaka začetnega oligonukleotida za <i>gus</i> gen, prileganje na DNA verigo s smeri 5' - 3'
GUS3b-rev	oznaka začetnega oligonukleotida za <i>gus</i> gen, prileganje na DNA verigo s smeri 3' - 5'
GSO	gensko spremenjeni organizem
GSR	gensko spremenjena rastlina
<i>hptIII</i> gene	gen za encim higromicin fosfotransferaza
Hyg-for	oznaka začetnega oligonukleotida za <i>gus</i> gen, prileganje na DNA verigo s smeri 5' - 3'
Hyg2-rev	oznaka začetnega oligonukleotida za <i>gus</i> gen, prileganje na DNA verigo s smeri 3' - 5'
LBA4404	sev bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
MS gojišče	Murashige in Skoog gojišče (1962)
MSm gojišče	Murashige in Skoog gojišče (1962) za mikoopropagacijo tobaka
MSr gojišče	Murashige in Skoog gojišče (1962) za regeneracijo tobaka
T-DNA	transfer – prenosna DNA
X-Gluc	5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronid

1 UVOD

Ena od metod žlahtnjenja je tudi gensko spreminjanje rastlin, ki je zelo selektivna metoda in usmerjena na en gen oziroma skupino genov. To natančno in selektivno delo omogočajo najrazličnejše tehnike znotraj genskega inženiringa, ki so se razvile zadnjih 40 let. Začetki genskega inženiringa segajo v obdobje po letu 1970 z odkritjem restriktivnih encimov. Ti so omogočili v *in vitro* razmerah razrez oz. cepitev dvoverižne DNA molekule na manjše različno dolge fragmente in njihovo poljubno ali tarčno razporejanje. Z encimom DNA ligazo se jih lahko ponovno poveže v primarno ali rekombinantno zaporedje, ki se od primarnega razlikuje v zaporedju lokusov. Rekombinantna DNA je bila leta 1973 prvič uporabljena v praksi. Fragment tuje DNA je bil vgrajen v plazmid t.i. vektor, ki je bil vnešen v bakterijsko celico. Gensko inženirstvo je s pomočjo restriktivnih encimov obšlo razlike med različnimi vrstami in omogočeno je bilo narediti popolnoma nove in v naravi nepoznane kombinacije genov. Metode genskega inženiringa so omogočile, da so ostre meje in bariere, ki so preprečevale medsebojna križanja in prenose dednega materiala med filogenetsko različnimi vrstami postale mogoče.

Napredki v biotehnologiji, ki so se vrstili po letu 1975 so bili tako skokoviti, da so se v naslednjem desetletju že začele pojavljati prve transgene rastline v poljskih poskusih. Transgeni tobak odporen na glifosat je bil prva transgena rastlina v poljskem poskusu leta 1986. Do leta 2014 je bilo v poljske poskuse vključenih več kot 90 transgenih rastlinskih vrst z najrazličnejšimi lastnostmi. V tržni pridelavi danes prevladujejo: soja, koruza, bombaž, oljna ogrščica, paradižnik, krompir, tobak in druge. Iz leta v leto naraščajo površine s transgenimi rastlinami in prav tako je vedno več držav vključenih v tržno pridelavo transgenih rastlin, kar se odraža na porastu njihovega družbenega dohodka (Clive, 2014).

Tobak (*Nicotiana tabacum* L.) je zelo primeren za *in vitro* gojenje in kot modelna rastlina, zaradi genotipskih in fenotipskih lastnosti, primeren za transformacijska proučevanja optimizacije novih genskih konstruktov. Uvajanje novih genskih konstruktov je zelo kompleksno in zahteva modelno rastlino z dobro proučenimi postopki dela, z znano in ponovljivo odzivnostjo. Vključujejo tako *in vitro* kot *in vivo* proučevanja, od transformacije izbranih celic oz. tkiva, do regeneracije transformiranih celic in spremljanja transgena na molekularnem in fenotipskem nivoju v laboratoriju kot tudi v rastlinjaku in na polju. Šele na polju oz. s poljskimi poskusi, tako kot pri vsaki drugi tehnologiji, ki je predmet žlahtnjenja se zaključijo proučevanja in je nujen predpogoj za tržno pridelavo. Tako kot laboratorijsko delo v zaprtih sistemih z gensko spremenjenimi organizmi (GSO), tudi z GS rastlinami (GSR) je namerno sproščanje v okolje zakonsko regulirano in zahteva specifične pogoje dela ob upoštevanju ocene tveganja, ki izhaja iz morebitne nevarnosti in nepredvljivosti GSR (Zakon o ..., 2005; 2010).

1.1 NAMEN RAZISKAVE

Verižna reakcija s polimرازo (PCR) nam omogoča na molekularni ravni na nivoju genotipa uspešno in hitro testiranje vgraditve transgenov v rastlinski genom. V ta namen smo v genom tobaka z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* in plazmidom pCAMBIA1301 vnesli dva transgena, in sicer markerski *gus* in selekcijski *hptII*. Po transformaciji smo preverili prisotnost transgenov v nastalih regenerantih, z namenom ugotoviti uspešnost vgraditve uporabljenega transformacijskega sistema. Želeli smo vzpostaviti transformacijski sistem, ki bi bil uporaben za žlahtnjenje z agronomsko pomembnimi geni tudi pri drugih rastlinskih vrstah.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

V postopek transformacije listnih izsečkov tobaka smo poleg bakterijske inkubacije vključili še ultrazvok in vakuum s predpostavko izboljšati vgraditev transgenov in njihovo fenotipsko izražanje. Uporabljen genski konstrukt je imel vključena oba transgena in predvidevali smo, da se v genom tobaka vgradi celoten konstrukt in v nastalih regenerantih se bosta tudi oba fenotipsko izražala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TOBAK

Zgodovina tobaka sega v daljno preteklost in sicer v leto 1492, ko je Krištof Kolumb prispel v Ameriko in prišel v stik z Indijanci, ki so ga gojili in žvečili, kadili in njuhali (Zgodovina..., 2004). Od tod se je razširil na vse kontinente in tobačni izdelki so postali široko prepoznavni in uporabljeni.

Tobak (*Nicotiana tabacum* L.) je samoprašnica iz družine razhudnikovk (Solanaceae). V rod tobakov je uvrščenih 60 vrst. Gospodarsko pomembni in uporabni predvsem za kajenje sta vrsti: navadni tobak (*Nicotiana tabacum* L.) in kmečki tobak (*Nicotiana rustica* L.), ki vsebujeta zdravju škodljiv alkaloid, vsem poznan kot nikotin. Uvrščen je med droge, ki so zdravju škodljive, predvsem na dolgi rok. Na kadalce so trenutni vplivi uživanja ugodni, a vodijo v globoko zasvojenost. Neugodno deluje na centralno in vegetativno živčevje. V kombinaciji z ostalimi prav tako zdravju zelo škodljivimi sestavinami, ki se nahajajo v cigaretah in se sproščajo ob kajenju preko cigaretnega dima kot so katran, aldehidi, ogljikov monoksid, ketoni, piridi, fenoli, amoniak, metanol, žveplov dioksid ter še zdravju manj oz. neškodljivimi sestavinami vpliva trenutno blagodejno in pomirjajoče na uživalce.

Koncentracija nikotina v rastlini narašča vse do cvetenja, med cvetenjem in do formiranja semen se sinteza zmanjšuje in hito pada. Pridelovalci podaljšujejo sintezo s trganjem cvetov, da se v listih obdrži večja koncentracija nikotina. Nikotin je zelo učinkovit insekticid in se ga v ekološki pridelavi zamenjuje s prepovedanimi pesticidi.

Tobak ima v diploidnem stanju 48 majhnih kromosomov (Jones in sod., 1996), ki so zelo dovzetni za sprejem transgenov. Velikost haploidne jedrne DNA je 4221-4646 Mbp/1C (Henry, 1997).

V tkivni kulturi je organogeneza listnih izsečkov tobaka hitra in direktna ter z velikim odstotkom vitalnih regenerantov (Stolarz in sod., 1991), kar je osnovni pogoj za uspeh pri transformaciji.

Tobakov genom je zelo primeren za genetske manipulacije in je pogosto vključen v sisteme optimizacije in vzpostavljanja transformacijskega sistema ter proučevanja mehanizmov ekspresije markerskih in gospodarsko pomembnih transgenov. Take raziskave so nujno potrebne za doseg skrajševanja žlahtnjenja drugih gojenih in tudi samoniklih rastlin, ki so bodo vključevale v pridelovanje. Na teh je potrebno opraviti še veliko žlahtniteljskega dela, preden bodo vključene v tržno pridelavo in tu je lahko metodologija transformacij dobrodošlo orodje za spremembo genotipa. V zadnjem obdobju, zadnjih 20 let se tobak uporablja tudi kot možen sistem pridobivanja aktivnih

komponent za zdravila, predvsem cepiva. Ugotovljeno je, da imajo rastlinsko pridobljene aktivne sestavine mnoge prednosti pred komponentnimi cepivi, sintetiziranimi s tradicionalnimi proizvodnimi sistemi mikroorganizmov in sesalskimi celicami (Ma in Wang, 2012; Guan in sod., 2013; Zhou in sod., 2014).

2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE

Genske transformacije so skupek metod s katerimi lahko spremenimo genotip in posledično tudi fenotip rastline. Korenine osnovnih metod biotehnologije, ki so se začele razvijati na bakterijah, segajo v 60 leta in do sredine 80-ih let so se tako razvile, da se jih da uporabljati pri vseh ostalih vrstah genoma. Prvi uspešen vnos genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) je bil opravljen leta 1983 na tobaku. Transformiran je bil bakterijski gen za odpornost na antibiotik. Zelo hitro se je ugotovilo, da bakterija *A. t.* ni sposobna prenosa transgenov v enokaličnice in v te namene so, v prvi polovici 90-ih let, razvili biolistiko za posebe transformacije žit. Ta se ni izkazala kot uspešna metoda, zato je bilo na *A. t.* opravljenih več mutacij, ki so omogočile uspešno transformacijo tudi enokaličnic (Horsch in sod., 1985; Fisher in Guiltinan, 1995; Sunilkumar in sod., 1999).

Transformiranih s posrednim načinom, ki prevladuje v več kot 70 % je bilo že več kot 100 rastlinskih vrst in večina je bila vključena tudi v poljske poskuse. Gensko spremenjena soja, koruza, bombaž, oljna repica, oljna orgrščica, paradižnik, krompir, tobak so vodilne gensko spremenjene kulture, ki so jih v letu 2014 tržno pridelovali na 181 milijoni ha. Za primerjavo eno leto prej, leta 2013 so navedene kulture zavzemale 175 milijonov ha (Clive, 2014).

Gensko spremenjene rastline so v tržnem pridelovanju v bliskovitem porastu. Pred 22 leti so bila izdana prva dovoljenja za tržno pridelavo. Leta 1996 je bilo s transgenimi poljščinami posejanih 2,8 milijonov ha, leta 2003 so skupne površine dosegle kar 67,7 milijonov ha, leta 2004 že 81 milijonov ha, leta 2005 pa so površine narasle na 90 milijonov ha in leta 2014 na kar 181 milijoni ha. Leta 2004 je gensko spremenjene rastline pridelovalo 17 držav, leta 2005 pa 21 in leta 2014 že 28 (Clive, 2008; Clive, 2014).

Največ se gensko spremenjenih rastlin prideluje v ZDA na kar 42,2 milijona ha, sledi Argentina (24,3 milijon ha), Indija in Kanada (11,6 milijona ha), Kitajska in Paragvaj (3,9 milijona ha), Pakistan (2,9 milijona ha), Južna Afrika (2,7 milijona ha) in Urogvaj (1,6 milijona ha) (Clive, 2014).

2.3 METODE VNOŠA TRANSGENOV V RASTLINE

Metode vnosa transgenov v rastlinski genom se delijo na: neposredne (direktne) in posredne (indirektne). Posredna metoda je z določenimi spremembami prenešana iz narave

v laboratorijske razmere. V naravi jo opravljajo talne bakterije iz rodu *Agrobacterium* in v biotehnologiji se z njo poimenuje vnos genov v rastlinske celice s pomočjo genskega inženiringa (Transformation..., 2012).

2.3.1 Neposredni vnos transgenov

V primerih, kjer se za transformacijo uporabljajo posamezne celice ali manjši skupki celic so se začele uporabljati metode neposrednega vnosa genov, ki temeljijo na povečanju prepustnosti celične stene in jedrne membrane z različnimi mehanskimi, električnimi in kemijskimi postopki (Portykus, 1990; Songstad in sod., 1995):

2.3.1.1 Biolitska

Je metoda, pri kateri se plazmidno DNA izolira iz bakterije in nanese oz. pritrdi na površino zlatih ali volframovih delcev, velikosti 0,1 - 1,5 μm , ki se jih nanese na membrane ali na izstrelke. S potisnim plinom helija ali dušika se jih pospeši in usmeri v tkivo. Delci oz. izstrelki obdani z DNA prodrejo skozi celično steno in jedrno membrano ob tem se DNA sprosti ter omogočena je vgraditev DNA v enega od kromosomov. Ta metoda je bila s 7 % najpogosteje uporabljena, takoj za vektorskimi sistemi z *Agrobacterium*. V novejšem obdobju je pridobila na pomenu z uporabo za vnos genov odgovornih za sintezo cepiv (Moravec in sod., 2007; Loc in sod., 2010; Loza-Rubio in sod., 2010; Zhang in sod., 2011).

2.3.1.2 Elektroporacija

Je metoda, ki sloni na kratkih, šibkih električnih impulzih, ki vplivajo na propustnost lipidnih plasti v celični steni. Tako je omogočena samodejno prodiranje makromolekul DNA skozi membrane. Metoda je uspešna pri specifičnem rastlinskem materialu, kjer so prisotne posamične celice ali manjši skupki celic, kot so protoplasti, mikrospore, meristemi in somatski embriji na začetku razvoja. Metoda je omejena na manjše število rastlinskih vrst in je bila uspešno uporabljena za transformacijo riža, pšenice, koruze, nekaterih okrasnih rastlinah in zelenjadnicah.

2.3.1.3 Polietilen glikol

Uporaba polietilen glikola (PEG) je kemična metoda vnosa in sloni na podobnem principu kot elektroporacija v kombinaciji z ultrazvokom na izbranih tkivih, ki so manj primerna za transformacijo z *Agrobacterium*.

2.3.1.4 Vbrizgavanje DNA

S posebno mikro pipeto se vbrizgava DNA v posamične celice (protoplaste, mikrospore). Je natančna in zahtevna tehnika, ki je bila uporabljena na mladih poganjkih rži, ogrščici in drugih križnicah ter žitih.

2.3.2 Posredni mehanizem prenosa transgenov z *Agrobacterium tumefaciens*

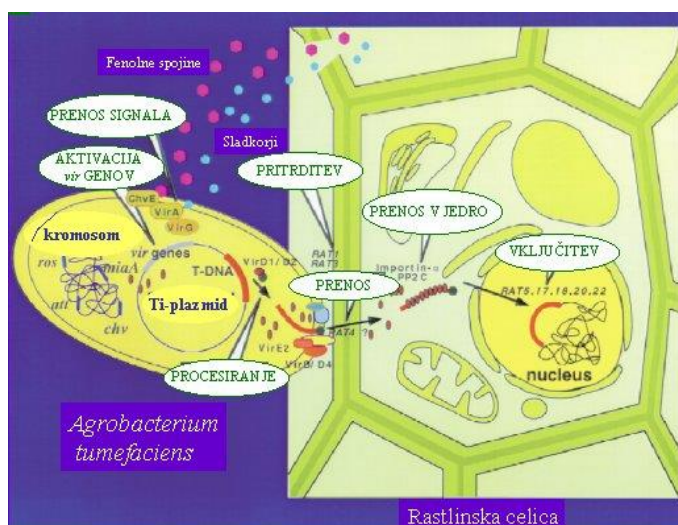
Sistem vnosa transgenov z *Agrobacterium* je zelo pogosto uporabljena in sloni na naravnem prenosu DNA iz bakterijskega plazmida v rastlinski genom. Pri naravni okužbi dvokaličnic na mestu poškodbe nastane rakasta tvorba, kot rezultat prenosa dednega zapisa iz plazmida bakterije *A. tumefaciens* v rastlinski genom. Po letu 1990 so z povzročenimi mutacijami identificirali seve *Agrobacterium* z virulenco, ki uspešno okužuje tudi enokaličnice (Hiei in sod., 1994; Ishida in sod., 1996 cit. po Galun in Breiman, 1998; Patti in sod., 2012).

A. t. vsebuje Ti-plazmid, ki ima vključene virulentne *vir* gene, gene za sintezo in razgradnjo opinov ter *onc* gene za tvorbo rakastih celic. Fragment Ti-plazmida z *onc* geni in geni za sintezo opinov se imenuje prenosna oz. T-DNA. Geni za razgradnjo opinov in *vir* geni ter *ori* mesto, geni odgovorni za podvajanje plazmida so izven T-DNA regije (Chilton in sod., 1977; Zupan in sod., 2000).

T-DNA se prenese v rastlinski genom s pomočjo *vir* genov, ki so odgovorni za virulenco in se nahajajo na Ti-plazmidu izven T-DNA regije. Do sedaj je poznanih 35 *vir* genov, ki jih regulira 7 operonov. Za prenos transgenov so potrebni tudi *chv* virulentni geni, ki so locirani na bakterijskem kromosomu (slika 1).

Kromosomski *chvA* in *chvB* geni imajo odločilno vlogo pri povezavi med *A. t.* in rastlino. Ob poškodbi rastline se v okolico sprostitjo nastale fenolne komponente (acetosiringon) in se povežejo z *virA* proteinom. Ta fenolno-proteinska povezava vpliva na fosfolizacijo *virG* proteina, ki se nahaja v bakterijski citoplazmi (slika 1). Spremenjeni *virG* protein ima vlogo transkripcijskega katalizatorja za ostale *vir* gene. Znanih je več sevov *A. t.* glede na sposobnost virulence. Virulentnejši sevi vsebujejo več kopij *virG* gena, ki ima odločilno vlogo in sposobnost v kombinaciji z ostalimi *vir* geni na okužbo (Hellens in sod., 2000; Stiekema in Visser, 1991).

Za prenos in vgraditev transgenov so odgovorni rastlinski encimi in tudi proteini vezani na T-DNA. Za proces vgraditve je značilno, da je pogostejši in vezan na regijo rastlinske DNA, ki je aktivna in se prepisuje v lastnost ter poteka s pomočjo rekombinacije. V rastlinski genom se lahko vključi ena ali več kopij T-DNA (Zupan in sod., 2000; Stiekema in Visser, 1991).



Slika 1: Prenos in vgraditev T-DNA v rastlinski genom

2.3.2.1 Transformacijski vektorski sistem

Danes se večinoma, ne samo v raziskovalne namene, ampak tudi v aplikativne, kot metoda vnosa transgenov uporablja naravni vektorski sistem z *A. t.*, ki je prilagojen za delo v *in vitro* razmerah. Za te potrebe so prilagojeni in izdelani sistemi Ti-plazmidnega vektorja, ki imajo iz T-DNA izrezane gene za sintezo opinov in *onc* gene. Z izključitvijo omenjenih genov se ne morejo tvoriti rakaste celice in opini. Ostanje samo mejna oz. robna nukleotidna zaporedja T-DNA, ki so sposobna vezave tujih genov in vključitve v rastlinski genom (Zambryski in sod., 1983).

Poznani sta dva vektorska sistema:

- *cis*, ki ima samo en večji plazmid s vključeno T-DNA in *vir* regijo ter
- *binarni*, katerega bakterijska celica ima vključena dva plazmida: t.i. razoroženi plazmid, ki je skoraj celotni Ti-plazmid, izrezano ima samo T-DNA in binarni plazmid, ki je manjši in vključuje T-DNA ter mejna nukleotidna zaporedja.

V binarni sistem, tuje gene vnesemo z genskim inženiringom v T-DNA binarnega plazmida, ki ima sposobnost pomnoževanja v *E. coli* in tudi v *A. t.* (Bevan, 1984). Binarni plazmid konjugirano v *Agrobacterium* z razoroženim Ti-plazmidom, ki ima *vir* gene.

Željene gene z ustrezno opremljenimi promotorji, ki imajo v svoji strukturi specifična zaporedja baz in so sposobni uravnavanja transkripcijskega rastlinskega mehanizma, ki vpliva na specifično tkivno ekspresijo transgena. Promotor je nukleotidno zaporedje, ki se nahaja na 5' strani oz. pred zapisom za gen in usmerja ekspresijo gena. Delimo jih na konstitutivne, ki regulirajo gene, katerih izražanje je v vseh tkivih (npr. CaMV 35S

promotor virusa, ki povzroča mozaik cvetače) in inducibilne, ki se izražajo specifično, samo v določenih tkivih ali organih, v določeni fazi razvoja (Ohta in sod., 1990). Na njihovo izražanje vplivajo dejavniki v rastlini in dražljaji iz okolja. V rastlino se lahko transformira tudi gene iz filogenetsko nesorodnih vrst, če se strukturnemu genu doda promotor, prepoznaven rastlinskemu transkripcijskemu mehanizmu.

Novejši binarni vektorski sistemi imajo rastlinske selekcijske gene locirane na levem mejnem nukleotidnem zaporedju, da se zagotovi čim boljša transformacija markerskih ali tržno zanimivih genov. Sheng in sod. (1996, cit. po Hellens in sod., 2000) so ugotovili, da ima desno mejno nukleotidno zaporedje pri transformaciji prednost pred levim. Razvoj vektorjev je bil usmerjen v uporabo pri večih rastlinskih vrstah, zato so bila dodana restrikcijska mesta, ki imajo veliko možnosti izreza dela DNA, ki ni povezano z izražanjem vnešenih lastnosti (Hellens in sod., 2000).

2.3.2.2 Seleksijski in markerski transgeni

Za uspešno ločitev transformiranih celic od netransformiranih se uporabljajo seleksijski geni, ki omogočajo transformantom prednost v rasti in razvoju. Za selekcijo se uporabljajo geni za odpornost na antibiotike ali herbicide in tudi drugi kot odpornost na povečane koncentracije manoze. Seleksijski geni so zaradi učinkovitejšega transformacijskega sistema vključeni v plazmidno T-DNA skupaj z markerskim genom. Za izboljšanje transformacijskega sistema se uporabljajo različni seleksijski geni, odvisno tudi od rastlinske vrste.

Večina seleksijskih genov je bila izolirana iz bakterijskih plazmidov in transformiranim rastlinskim celicam omogočajo rezistentnost na določene antibiotike. Najpogosteje se uporabljata bakterijska gena, ki kodirata encim NPT (neomicin fosfotransferaza) in HPT (higromicin fosfotransferaza) in sta sposobna fosforilacije ter neaktivnosti antibiotika kanamicin ali higromicin. Z vgradnjo seleksijskih genov postanejo rastline neobčutljive na kanamicin ali higromicin, endogeno pa so občutljive in propadejo. Na velike koncentracije kanamicina so enokaličnice pogosto neobčutljive, medtem ko so že na majhne koncentracije higromicina, tako eno- kot dvokaličnice, zelo občutljive (Wilmink in Dons, 1993). Zaradi evropske direktive, transgene rastline, ki so namenjene pridelavi na prostem ne smejo vsebovati seleksijskih genov rezistentnih na antibiotike (Directive 2001/18/EC, 2001). Obstajajo tudi seleksijski geni, ki sprožijo odpornost na določene herbicide (*bar* oz. *pat*, *epsps*, *aroAcp4* ali *gox*) in so hkrati seleksijski in tudi agronomsko pomembni geni. Po letu 2008 se v Evropi seleksijske gene, ki omogočajo rezistenco na antibiotike, zamenjuje z *xylA* genom, ki kodira ksilozno izomerazo, *manA* genom, ki kodira fosfomanozno izomerazo in špinačnim *badh* genom, ki kodira betain aldehid dehidrogenazo (Joersbo in Okkels, 1996; Jones in sod., 1996).

Uspešnost transformacije se običajno testira s pomočjo markerskih oz. testnih genov. Ti geni kodirajo enostavno določljive substance in njihova prisotnost v celici ali rastlini je dokaz o uspešnosti vključitve tuje DNA. Osnovni pogoj pri izbiri markerskih genov je ta, da jih endogeno rastline, v katere jih vnašamo ne sintetizirajo. Med starejšimi in še vedno pogosto uporabljen je *gus* gen, ki je odgovoren za sintezo encima β -glukuronidaza (GUS). Tkivo z izraženim markerskim *gus* genom se ob dodatku 5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronida obarva temno modro (Jefferson in sod., 1987). Velika slabost tega markerskega gena je njegova destruktivnost. Prednost novejših markerskih genov, ki kodirajo fluorescentne proteine je ta, da ob fenotipskem pregledu tkiva ne uničimo, kar nam omogoča kontinuirano spremljanje. Med prvimi tovrstni markerskimi geni je bil zeleno fluorescentni gen (*gfp*) izoliran iz meduze *Aequorea victoria*. Sintetiziran protein (GFP) povzroča fluorescenco transformiranega tkiva, kar lahko spremljamo z mikroskopom oz. stereomikroskopom s posebnim setom filtrov. Markerski geni so uporabni pri proučevanjih izražanja transgenov, medtem ko so fluorescentni geni istočasno lahko tudi selekcijski geni, ker transformante lahko identificiramo na podlagi izražene fluorescence. V novejšem obdobju se poleg *DsRed* gena (sinteza rdeče fluorescentnega proteina), ki je pogosto uporabljen pri rastlinah, v proučevanja vključuje celo paleto fluorescentnih genov. Ti vplivajo na izražanje različnih fluorescentnih proteinov, ki se uporablja v najrazličnejših proučevanjih spremenjenih proteinskih stanj v sesalskih celica. Predvsem, za klinične študije spremenjenega metabolizma celic (Ohta in sod., 1990; Sarma in sod., 1995).

2.4 GENSKE TRANSFORMACIJE TOBAKA

Genske transformacije, ki so imele v bližnji prihodnosti aplikativni značaj, so se začele s tobakom. Leta 1983 je bil v tobakov genom transformiran bakterijski gen in ugotovljeno je bilo, da je tobak zelo primeren za tovrstno delo. Zato so nadaljni poskusi, ki so sledili temu bili opravljeni prav na tobaku. Prvo dovoljenje za poljski poskus je bilo izdano za transgeni tobak, ki je bil leta 1986 prva transgena rastlina gojena v *in vivo* razmerah. Šest let pozneje, leta 1992 je bil tobak odporen na viruse prva industrijska gensko spremenjena rastlina v tržni pridelavi na Kitajskem (Raspor, 1996). Predhodno je bilo na tobaku opravljenih veliko bazičnih študij na protoplastih (Horsch in sod., 1984), kalusnih kultura (Komari, 1989) in listnih izsečkih (Horsch in sod., 1985; Fisher in Guiltinan, 1995; Sunilkumar in sod., 1999), ki so vodile do prej omenjenene praktične vrednosti.

Tobak je zelo odziven in prilagodljiv na *in vitro* razmere. Regeneracija iz listnih izsečkov je uspešna, zato je zelo primeren za genske transformacije. Uporablja se, kot testna oz. modelna rastlina za postopek uvajanja transformacijskega sistema z novo uvedenimi transgeni. V preteklosti oz. prve generacije transgenega tobaka so imele vključene samo selekcijske gene, predvsem odpornost na kanamicin (Horsch in sod., 1984 in 1985; Caligari in sod., 1993; Sarma in sod., 1995; Fisher in Guiltinan, 1995). Pozneje se je v

transformacijske konstrukte vključevalo tudi markerske in agronomsko pomembne gene ter kanamacinsko selekcijo zamenjevalo za selektivnejšo higromicinsko (Park in sod., 1998; De Block in sod., 1987; Joersbo in Okkels, 1996).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za vnos dveh transgenov v genom tobaka smo uporabili listne izsečke tobaka. Sorta 'Havana 38' je bila mikropropagirana na MSm gojišču (Murashige in Skoog, 1962) v rastni komori. Fizikalni rastni faktorji v rastni komori so bili prilagojeni gojenju tobaka, in sicer temperatura 22 ± 1 °C, fotoperioda z 16 urno svetlobo in 8 urno temo ter intenziteta osvetlitve $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pri teh razmerah je bila opravljena tudi štiri dnevna kokultivacija in embriogeneza ter gojenje transgenov.

3.2 SESTAVINE GOJIŠČ

Preglednica 1: Sestava MSm gojišča za mikropropagacijo in MSr gojišča za regeneracijo tobaka po transformaciji

Sestavine	Gojišče	
	MSm	MSr
MS makro- in mikroelementi	4,3 g/l	4,3 g/l
Fe-Na ₂ EDTA		0,1 mg/l
saharoza	30 g/l	30 g/l
inozitol		0,1 g/l
tiamin	0,1 mg/l	0,1 mg/l
pirodiksin	0,5 mg/l	
nikotinska kislina	0,5mg/l	
BAP		1,0 mg/l
NAA		0,1 mg/l
agar	8 g/l	8 g/l
pH	5,8	5,8
po avtoklaviranju smo filtersko dodali:		
higromicin		25 mg/l
timentin		150 mg/l

Za posamezno gojišče smo zatehtane sestavine stopili v bidestilirani vodi z mešanjem na mešalni plošči in zaradi ohranitve natančnosti iz založnih raztopin dodali vitamine in hormone. Končni volumen smo natančno določili z merilno bučko in pH vrednost z KOH ali HCl. Dodani strjevalec - agar smo stopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Gojišča smo avtoklavirali po standardnem postopku 20 min pri temperaturi 121 °C in pritisku 1,1 bar. Po končanem avtoklaviranju smo gojišča ohladili v hladni vodi na približno 40 °C in filtersko dodali antibiotike. Po temeljitem premešanju smo gojišče glede na potrebo razlili v

sterilne petrijevke oz. v steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom (preglednici 1 in 2).

Preglednica 2: Sestava YEB gojišča za rast bakterije *A. t.* LBA4404

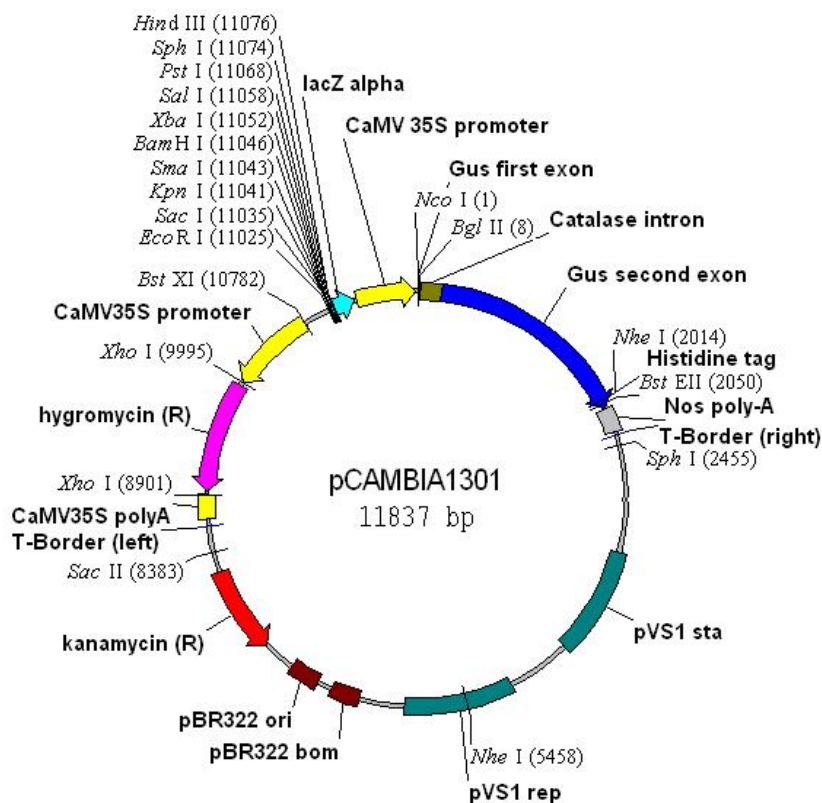
Sestavine	Koncentracija g/l
saharoza	5
pepton	5
goveji ekstrakt	5
kvasni ekstrakt	1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1
pH	7
po avtoklaviranju smo filtersko dodali:	
rifampicin	50 mg/l
kanamicin	100 mg/l

3.3 VEKTORSKI SISTEM

Za transformacijo listnih izsečkov tobaka smo izbrali komercialni sev LBA4404, ki poleg razoroženega plazmida pAL4404 vsebuje še binarni plazmid z oznako pCAMBIA1301. Sev *A. t.* LBA4404 ima kromosom TiAch5 in Ti-plazmid z bakterijsko selekcijo na antibiotik rifampicin (50 mg/l) ter binarni plazmid pCAMBIA1301 z bakterijsko odpornostjo na kanamicin (50 mg/l). V T-DNA regiji binarnega plazmida proti desnemu mejnemu nukleotidnemu zaporedju je markeski *gus* gen, ki je odgovoren za sintezo encima β -glukuronidaze. Proti levemu mejnemu nukleotidnemu zaporedju je lociran rastlinski selekcijski *hptIII* gen, ki daje transformiranim regenerantom odpornost na antibiotik higromicin (slika 2).

Binarni plazmid pCAMBIA1301 ima genetski zapis za *gus* markeerski gen, ki omogoča izražanje v transformiranih regenerantih. Vključena genetska sprememba daje *gus* genu možnost, da s tem ko se veže na signalni peptid, postane aktiven v rastlinski celici. Markerski *gus* gen vsebuje intron iz ricinusove katalaze, ki onemogoča ekspresijo *gus* gena v prokariotih, tudi v *A. t.* (Ohta in sod., 1990; Tanaka in sod., 1990). Pri evkariontih vključno z rastlinami se intron izreže. Izven T-DNA regije ima plazmid locirano bakterijsko selekcijo in v T-DNA rastlinsko selekcijo. Plazmid je opremljen z *rep* in *sta* regijo, ki mu omogočata stabilnost v *A. t.* tudi pri pomnoževanju v neselektivnih razmerah (Deblaere in sod., 1987).

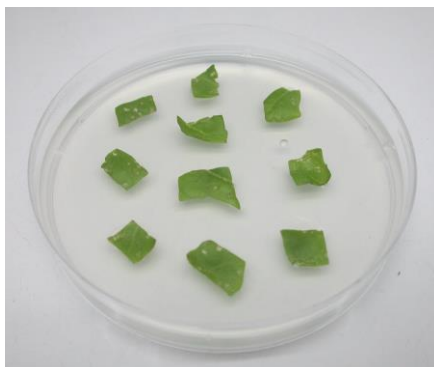
Celoten plazmid pCAMBIA1301 vsebuje 11.837 bp, T-DNA pa 5.607 bp. Markerski *gus* gen je lociran proti desnemu mejnemu nukleotidnemu zaporedju T-DNA in selekcijski *hptII* pa proti levemu mejnemu nukleotidnemu zaporedju (slika 2).



Slika 2: Plazmid pCAMBIA1301 dolžine 11.837 bp (Roberts in sod., 1997)

3.4 TRANSFORMACIJA

Transformacijo listnih izsečkov smo izvedli po metodi kot jo priporočajo Horsch in sod. (1985) ter Fisher in Gultinan (1995) s prilagoditvami za naš poskus. Liste *in vitro* gojene sorte 'Havana 38' smo v sterilnih razmerah brezprašne komore narezali na približno 1 cm² izsečke. Po 10 izsečkov smo za 1 dan inokulirali v petrijevke premera 9 cm in višine 1,5 cm na MSr regeneracijsko gojišče z dodanim 100 μM acetosiringonom (slika 3). Pokrov in spodnji del petrijevke smo zaradi možnosti okužbe oblepili s parafilmom.



Slika 3: Listni izsečki tobaka sorte 'Havana 38' na MSr gojišču

V bakterijsko YEB gojišče smo dodali rifampicin (50 mg/l) in kanamicina (50 mg/l) ter nacepili bakterijo *A. t.* Bakterijo smo gojili približno 12 do 14 ur, pri 28 °C in tresenju 120 obratov/min do približne optične gostote ($A_{600\text{ nm}}$) = 0,6, kar je približno 5×10^6 celic/ml.

Nato smo bakterijsko suspenzijo centrifugirali 10 min pri 6000 obratih/min in 4 °C v centrifugi Beckman J2-MS. Supernatant smo zavrgli in bakterijski pelet prelili s polovičnim MS gojiščem za tobak. S tako pripravljeno bakterijsko suspenzijo in 4 obravnavanji smo inkubirali listne izsečke tobaka V vsakem obravnavanju je bilo 6 petrijevk oz. ponovitev s 60 izsečki. Vsa obravnavanja so bila sestavljena iz inkubacije listnih izsečkov tobaka v bakterijski suspenziji z občasnim mešanjem v kombinaciji z ultrazvokom ali vakuumom:

1. obravnavanje: 10 minut inkubacije listnih izsečkov v bakterijski suspenziji
2. obravnavanje: 5 minut inkubacije v bakterijski suspenziji in nadaljevanje 5 minut z ultrazvokom
3. obravnavanje: 5 minut inkubacije v bakterijski suspenziji in nadaljevanje 5 minut z vakuumom
4. obravnavanje: inkubacija z bakterijsko suspenzijo v kombinaciji s 5 minutnim ultrazvokom in 5 minutnim vakuumom

Izsečke smo nato v brezprašni komori rahlo osušili, da smo odstranili odvečno bakterijsko suspenzijo na sterilnem papirju in prestavili v petrijevke na MS regeneracijsko gojišče s 100 μ M acetosiringona (slika 3) in jih v rastni komori še štiri dni kokultivirali. Nato smo jih 2-krat sprali z raztopino antibiotika timentina (200 mg/l) in jih v brezprašni komori rahlo osušili.

Nato smo jih prestavili na MSr selekcijsko gojišče z antibiotikom higromicin, 25 mg/l in timentin, 150 mg/l za uničitev *A. t.* Regenerante (slika 5A) smo pri bazi odrezali in prestavili v petrijevke premera 9 cm in višine 2 cm na MSm gojišče s higromicinom, 50 mg/l in timentinom, 150 mg/l.

3.5 FENOTIPSKO IZRAŽANJE TRANSGENOV

Vnešena transgena smo spremljali na dva načina. Na selekcijskem gojišču smo v primerjavi s kontrolnimi regeneranti spremljali habitus rasti in razbarvanje. Prisotnost encima β -glukuronidaze pa s histokemičnim GUS testom.

3.5.1 Izražanje *hptII* gena

Regeneranti, ki so imeli vgrajen in funkcionalen selekcijski *hptII* gen so bili sposobni razgrajevati antibiotik higromicin, ki je za netransformirane regenerante toksičen. Transgeni z nefunkcionalnim selekcijskim genom so na selekcijskem gojišču zaostajali v rasti, listi so se vihali navznoter, glavna žila je postala bela in močno izstopila, listna ploskev se je razbarvala, postala je rumena ter korenine niso nastajale. Naključno smo iz petrijevkih izbrali 64 regenerantov, 16 za vsako obravnavanje, pri katerih smo opazili navedene simptome oziroma so začeli propadati na gojišču z dodano selekcijo, 25 mg/l higromicina in jih predstavili na mikropropagacijsko MSm gojišče brez higromicina. Z namenom izboljšati rast in na DNA nivoju določiti prisotnost transgena ter potrditi prisotnost in izražanje *gus* gen pri teh regenerantih.

3.5.2 Izražanje *gus* gena

Pri vseh vitalnih regenerantih na selekciji in brez selekcije, smo z GUS testom spremljali ekspresijo *gus* gena po celi rastlini (list, steblo in korenina):

- dele listov, stebel in korenin vsakega regeneranta smo prelili s 700 μ l 50 mM fosfatnega pufru NaPO₄ (Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄, pH 6,8) in 1 % Tritona X-100 ter inkubirali 1 uro pri 37 °C
- po 1 uri smo pufer odstranili in dodali 700 μ l svežega fosfatnega pufru z dodanim barvilom 1,0 mM X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronid) in 20 % metanolom ter pokrili s pokrovom ter oblepili z dvema plastema parafilma ter inkubiramo čez noč pri 37 °C

Po končani inkubaciji smo vizualno spremljali izražanje *gus* gena.

3.6 DNA ANALIZA TRANSGENOV

Dovolj velikim regenerantom smo z molekulsko PCR metodo (verižna reakcija s polimerazo) analizirali prisotnost transgenov *gus* in *hptII*. Iz listov regenerantov, ki so rasli na selekcijskem MSm gojišču in izbranih 64 regenerantov, ki so bili predstavljeni na MSr gojišče brez selekcije ter netransformiranega tobaka smo izolirali celokupno genomsko DNA. S fluorometrom smo določili koncentracijo izolirane DNA. Specifično namnoževanje frgmentov *gus* in *hptII* transgenov smo opravili v PCR reakciji s pomočjo parov začetnih oligonukleotidov v DNA cikličnem termostatu. Namnožene fragmente

DNA smo ločevali v agaroznem gelu z etidijevim bromidom, ki je omogočal detekcijo fragmentov DNA pod UV svetlobo. Spremljali smo prisotnost oz. odsotnost namnoženih fragmentov značilnih za posamezni transgen.

3.6.1 DNA izolacija

Celokupno genomsko DNA tobaka smo izolirali po metodi Kump in sod. (1992). Sveže dele listov smo v terilnici prelili z 0,6 ml ekstrakcijskega pufra CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid) segretega na 68 °C in zdrobili [2% (w/v) CTAB: 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)]. Zmaceriran material smo prelili v mikrocentrifugirke in v vodni kopeli inkubirali 1,5 ure na 68 °C in vmes nekajkrat suspenzijo s tresenjem premešali. Po končani inkubaciji smo previdno dodali 500 µl mešanice topil kloroform : izoamilalkohol 24:1, premešali in centrifugirali 12 min pri 11.000 obratih/min in 4 °C. Supernatant smo previdno odpipetirali v označene mikrocentrifugirke in dodali 60 µl 3 M natrijevega acetata in 600 µl ledeno hladnega izopropanola ter dobro premešali. DNA se je začela izločati iz raztopine, kar smo opazili kot zgoščene, bele strukture. Vzorce smo inkubirali 30 min v zmrzovalniku pri - 18 °C in nato centrifugirali 12 min pri 11.000 obratih/min in 4 °C. Supernatant smo previdno odlili in dodali 500 µl 70 % etanola ter po 20-ih min previdno odpipetirali etanol in DNA pelet sušili v sušilniku 2 x 3 min pri 40 °C ter dodali 50 µl TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)]. Vzorce DNA smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.6.2 Merjenje koncentracije DNA

Z DNA fluorometrom, tip TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments) smo izmerili koncentracijo DNA. Merjenje smo opravili z barvilom Hoechst 33258, ki smo ga dodali v prefiltriran 1 × TNE pufer [0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,4)] v končni koncentraciji 0,1 µg/ml. Raztopino smo hranili v steklenici oviti z alufolijo, zaradi občutljivosti barvila na svetlobo. Kalibracijo in umeritev fluorometra smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 × TNE pufru z barvilom oz. delovni raztopini). DNA vzorce smo razredčili na 20 ng/µl.

3.6.3 PCR reakcija

Pomnoževanje *gus* in *nptII* transgenov v verižni reakciji s polimerazo (PCR) je potekalo z začetnimi oligonukleotidi GUS3a-for/GUS3b-rev za *gus* transgen in Hyg-for/Hyg2-rev za *hptII* transgen, ki so specifični za pomnožitev fragmentov dolžine 408 bp za *gus* oz. 641 bp za *hptII* gen (preglednica 2). PCR reakcijsko mešanico smo pripravljali v brezprašni komori na ledu. V 0,5 ml PCR epruvete smo odpipetirali 5 µl DNA, koncentracije 20 ng/µl in centrifugirali do 1000 obratov/min ter dodali 20 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 1 × PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8.3], 0,1 mM vsakega

deoksinukleotid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 mM ustreznega specifičnega začetnega oligonukleotida (preglednica 2) in 1 enoto encima Taq polimeraze (Fermentas, Nemčija) ter sterilno destilirano vodo. Reakcijsko mešanico in DNA smo pretresli z roko in nato še na hitro centrifugirali do 1.000 obratov/min. PCR reakcija je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp[®], PCR System 9700, PE Applied Biosystems po temperaturnem vzorcu (Lakshmi in sod., 1998):

- 94 °C, 5 minut - začetna denaturacija DNA,
- 94 °C, 1 minuta in 35 ponavljajočih se ciklov - nadaljnja denaturacija DNA v kombinaciji z:
 - prileganje začetnih oligonukleotidov 1 minuto pri 58 °C,
 - izgradnja fragmentov DNA 1,5 minute pri 72 °C,
- končno izdolgevanje fragmentov 5 min pri 72 °C.

Pred nadaljnjo analizo smo vzorce hranili pri 12 °C.

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja parov začetnih oligonukleotidov za posamezen transgen in dolžina namnoženega fragmenta (bp)

Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'	Pričakovana dolžina fragmenta
GUS3a-for GUS3b-rev	GGC GAA CAG TTC CTG ATT AAC TTC GTT GGC AAT ACT CCA CAT	408 bp
Hyg-for Hyg2-rev	ATG ACC GCT GTT ATG CGG CCA TTG AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG ACG	641 bp

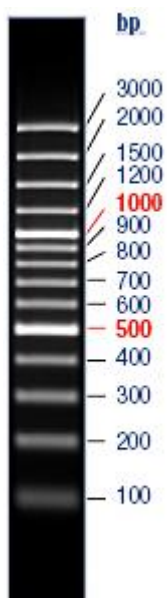
Začetni oligonukleotidi so bili izdelani na osnovi specifičnega nukleotidnega zaporedja plazmida in sintetizirani pri MWG Bitech AG (Ebersberg, Nemčija).

3.6.4 Elektroforetska analiza fragmentov DNA

V PCR reakciji namnožene fragmente DNA smo ločili v 1,4 % agaroznem gelu v vodoravni elektroforetski posodi. Zatehtali smo 0,7 g agaroze (SeaKem LE agarosa, Cambrex, ZDA) in pretresli v steklenico ter dolili 1 × TBE puffer 50 ml [89 mM Tris, 89 mM borna kislina, 2 mM EDTA]. Agarozo smo stopili v mikrovalovni pečici z mešanjem in pred dodajanjem etidijevega bromida ohladili na 58 °C. Dodali smo 2,5 µl etidijevega bromida iz založne raztoine 10 mg/ml. Raztopino smo prelili v model z vstavljenima glavnikoma. Po približno 20 minutah, smo odstranili glavnike in model položili v vodoravno elektroforetsko posodo in prelili z 1 × TBE pufrom.

Pomnoženim DNA fragmentom smo dodali 5 µl nanašalnega barvila [12,5 % (w/v) ficol 400, 0,2 % (w/v) bromfenol modro, 6,7 % (v/v) 10 × TBE], premešali s centrifugiranjem do 1.000 obratov/min in 17 µl vzorca nanесли v odprtine agaroznega gela. Poleg vzorcev s

pomnoženimi transgenimi fragmenti smo na gel nanesli še kontrolni vzorec (netransformiran tobak), slepi vzorec (DNA nadomeščena s sterilno destilirano H₂O), ustrezní čisti plazmid (izoliran iz *E. coli*) in velikostni standard (Fermentas, Nemčija) s 14 različno dolgimi DNA fragmenti: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 bp (slika 4).



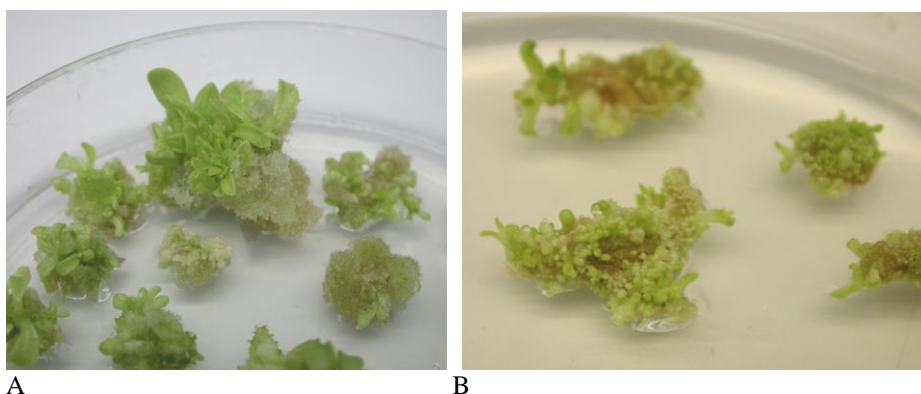
Slika 4: Dolžinski standard s 14 DNA fragmenti od 3.000 do 100 bp

Elektroforeza je potekala pri 120 V, približno 2 uri. Gel z namnoženimi in nenemnoženimi fragmenti smo pregledali pod UV svetlobo (302 nm). Za poznejšo analizo in arhiviranje rezultatov smo gele fotografirali s polaroidnim fotoaparatom.

4 REZULTATI

4.1 REGENERACIJA TOBAKA PO TRANSFORMACIJI

Po transformaciji listnih izsečkov tobaka se je že po desetih dneh začel formirati kalus in po 14 dneh globularne strukture oz. zametki za regenerante na MSr gojišču. Po štirih tednih so se začeli pojavljati regeneranti na kontrolnih izsečkih (slika 5A). Po šestih tednih so se regeneranti začeli pojavljati tudi na izsečkih na selekcijskem MSr gojišču, ki so bili transformirani, netransformirane celice izsečkov so propadale, vidne so bile nekroze (slika 5B).



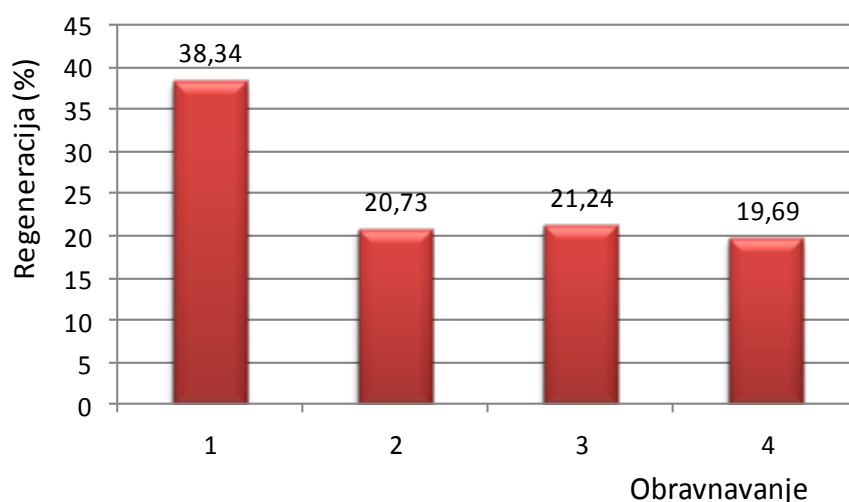
Slika 5: Regeneracija listnih izsečkov: A – kontrola brez selekcije; B – po transformaciji na selekcijskem gojišču s 25 mg/l higromicina

Preglednica 4: Število nastalih regenerantov po transformaciji listnih izsečkov tobaka z *A. t.* pCAMBIA1301

Ponovitev	Obnavanje				Skupno
	1	2	3	4	
1	15	12	5	17	49
2	24	4	7	6	41
3	20	13	7	4	44
4	0	3	8	8	19
5	4	5	8	0	17
6	11	3	6	3	23
Skupno	74	40	41	38	193

Število in odstotek vitalnih regenerantov po obravnavanjih in ponovitvah je predstavljeno v preglednici 4 in sliki 6. Od 240 inkubiranih izsečkov v bakterijski suspenziji z *A. t.* pCAMBIA1301 in inokuliranih na MSr selekcijsko gojišče je nastalo skupno 193 regenerantov. Od tega je na izsečkih, ki so bili samo 10 minut inkubirani z *A. t.* nastalo kar

74 regenerantov oz. 38,48 %. Na izsečkih, ki so bili na 5 minutni inkubaciji v kombinaciji s 5 minutnim ultrazvokom, je nastalo 40 oz. 20,73 % regenerantov. Pri 3. obravnavanju, ki je bilo sestavljeno iz 5 minutne inkubacije v kombinaciji s 5 minutnim vakuumom, je nastalo 41 oz. 21,24 % regenerantov. Po 4. obravnavanju, ki je vključevalo inkubacijo s 5 minutnim ultrazvokom in 5 minutnim vakuumom, je nastalo 38 oz. 19,69 % regenerantov (preglednica 4 in slika 6).

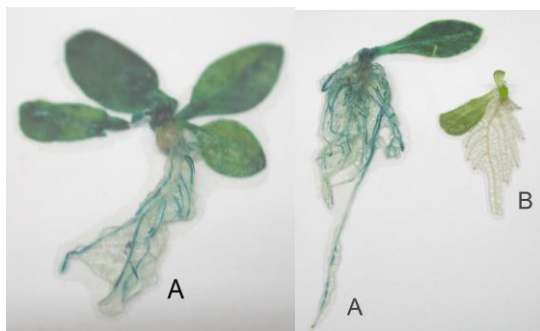


Slika 6: Odstotek regeneracije po transformaciji listnih izsečkov tobaka z *A. t.* pCAMBIA10301

4.2 IZRAŽANJE *hptII* in *gus* GENA V REGENERANTIH TOBAKA

Nastale regenerante z dvema listoma smo predstavili na selekcijsko MSr gojišče s 25 mg/l higromicina v petrijevke. Regeneranti, ki so začeli po 10 dneh propadati smo jih predstavili na sveže MSr gojišče brez selekcije. Pri teh regenerantih smo opazili, da *hptII* gen, ki daje transformantom selekcijsko odpornost na higromicin ne deluje, ker niso bili sposobni razgrajevati higromicin v gojišču. Po 10 do 14 dneh so na gojišču brez selekcije začeli normalno rasti in oblikovati korenine.

Z GUS testom smo testirali vseh 129 regenerantov, ki so uspešno rasli na selekcijskem gojišču in 64 regenerantov, ki so bili zaradi propadanja iz selekcijskega gojišča prestavljeni na neselekcijsko gojišče. Od 129 regenerantov, ki so rasli na selekcijskem gojišču pri 1 oz. 0,8 % regenerantov z GUS testom nismo zasledili prisotnosti encima β -glukuronidaze in pri 3 oz. 4,5 % regenerantov iz neselekcijskega gojišča (slika 7). Pri nekaterih regenerantih izražanje *gus* transgena ni bilo enakomerno po izbranih delih listov, stebel in korenin ter tudi ne na vseh delih, a smo jih kljub temu šteli za pozitivne.

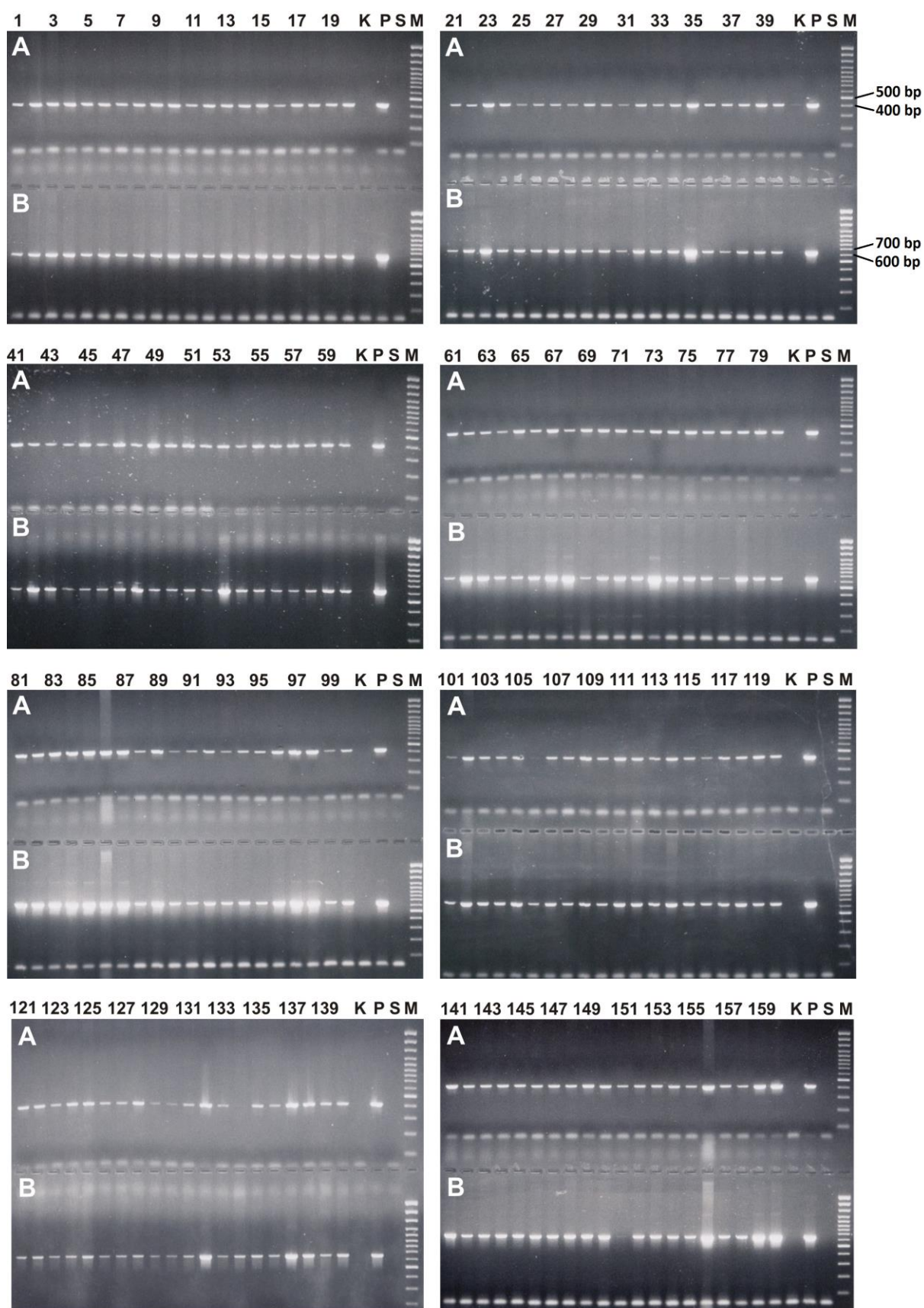
Slika 7: Fenotipsko izražanje *gus* gena: A – transformiran tobak; B – natransformiran tobak

4.3 DNA ANALIZA TRANSGENOV

S PCR analizo smo testirali vseh 193 regenerantov in ugotovili velik odstotek prisotnosti namnoženih fragmentov značilnih za markerski *gus* in selekcijski *hptII* transgen. Regenerantov z namnoženimi fragmenti značilnimi za oba transgena je bilo 188 (97,4 %). Fragmenti značilni za *gus* gen so se namnožili pri 189 (97,9 %) regenerantih in fragmenti značilni za *hptII* gen so se namnožili pri 191 (98 %) regenerantih in smo pri 1 (0,5 %) regenerantu se niso namnožili fragmenti značilni za oba transgena. Pri 3 (1,6 %) regenerantih se niso namnožili fragmenti značilni za *gus* transgen in pri 1 (0,5 %) regenerantu se niso namnožili fragmenti značilni za *hptII* transgen (preglednica 5 in slika 8).

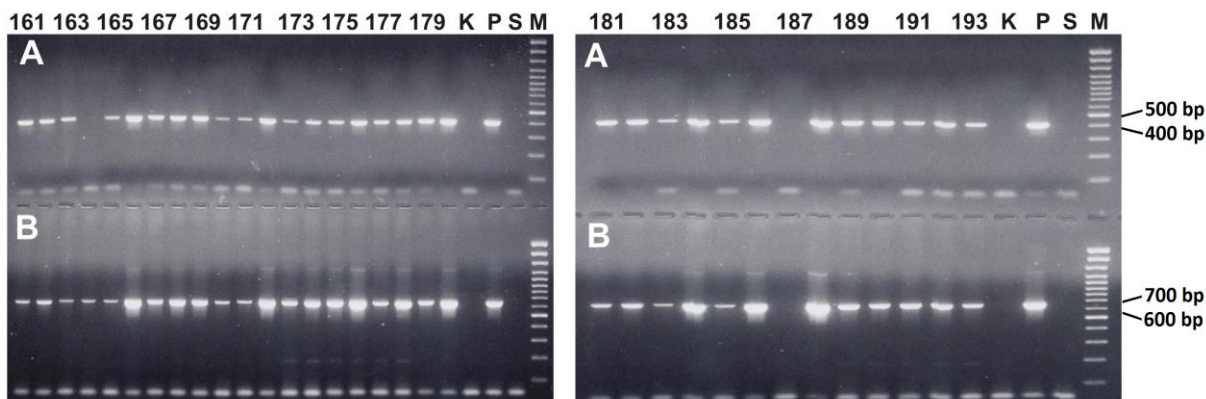
Preglednica 5: Število in odstotek transgenov tobaka po transformaciji izsečkov z *A. t.* pCAMBIA1301 pri katerih se s PCR reakcijo niso namnožili fragmenti značilni za transgena

Število analiziranih regenerantov	Število in odstotek regenerantov brez transgenov							
	<i>gus in hptII</i>		<i>gus</i>		<i>hptII</i>		skupno	
	število	odstotek	število	odstotek	število	odstotek	število	odstotek
193	1	0,5	3	1,6	1	0,5	5	2,6



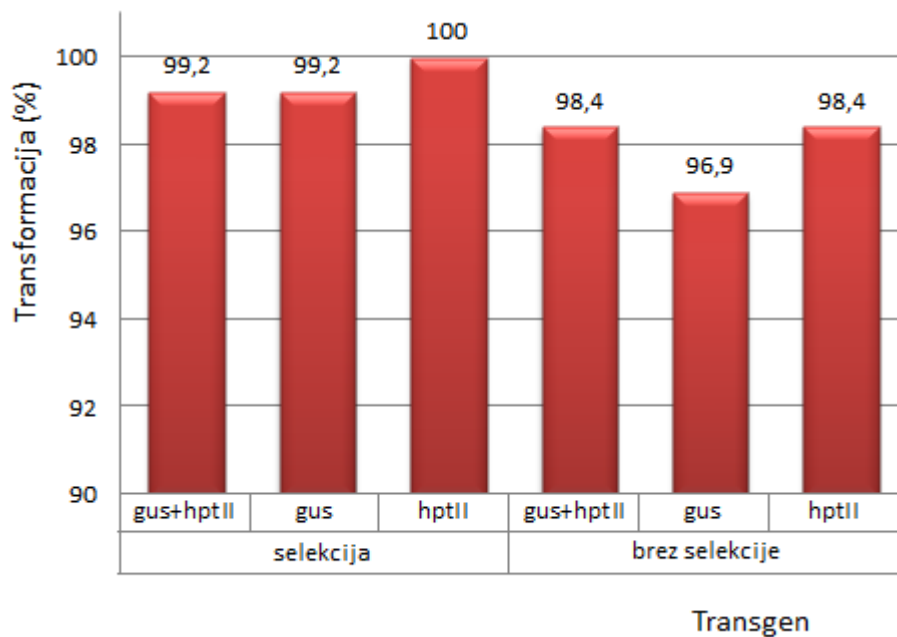
se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 8: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov: 1 do 129 - transformiran tobak gojen s selekcijo, 130 do 193 transformiran tobak gojen brez selekcije, K - netransformiran tobak, P - plazmid pCambia1301, S - slepi vzorec, M - velikostni standard s 14 različno dolgimi DNA fragmenti; A - fragmenti dolžine 408 bp značilni za markerski *gus* gen; B - fragmenti dolžine 641 bp značilni za selekcijski *hptII* gen

Na selekcijskem gojišču so se namnožili fragmenti značilni za *hptII* gen pri vseh regeneranti, medtem ko na neselekcijskem gojišču 2 regeneranta nista imela prisotne fragmente značilne za *hptII* gen. Pri enem od njiju z oznako 187 se niso namnožili fragmenti značilni za oba transgena, tako *gus* in *hptII* (slika 8).



Slika 9: Odstotek transgenov tobaka na selekcijskem in neselekcijskem MSr gojišču pri katerih so s PCR reakcijo namnožili značilni fragmenti

Na selekcijskem gojišču smo potrdili prisotnost in fenotipsko izražanje obeh transgenov, tako *gus* in *hptII* pri 99,2 % regenerantih. Prav toliko regenerantov je imelo prisoten *gus* transgen ter vsi so imeli selekcijski *hptII* transgen. Na neselekcijskem gojišču je bilo 98,4 % regenerantov s potrjenima obema transgenoma in 96,9 % s samo *gus* ter 98,4 % s samo *hptII* transgenom. Pri teh regenerantih je bil *hptII* transgen utišan oz. se ni izražal, saj so na selekcijskem gojišču propadali (slika 9).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z gensko tehnologijo, med katerimi je tudi transformacija, lahko spremenimo genski zapis in posledično fenotip rastline. V ta namen se uporabljajo različne tehnike od transformacije do izražanja transgenov v rastlini. Listne izsečke tobaka 'Havana 38' smo gojili en dan pred kokultivacijo in nato še 4 dni kokultivacije na regeneracijskem MSr (Murashige in Skoog, 1962) gojišču s 100 μ M acetosiringonom, z namenom izboljšati transformacijo. Ob poškodbi rastlinske celice z *A. t.* rastlina sintetizira polifenolne snovi, med katerimi sta acetosiringon in hemiacetosiringon, ki na nivoju regulacije delovanja bakterijskih genov na plazmidu in kromosomu vplivata na izrez enoverižne T-DNA, potovanje po bakterijski in rastlinski celici in naključno vgraditev na enega od rastlinskih kromosomov. Po izrezu enoverižne T-DNA iz plazmida imata pomembno vlogo pri ponovni izgradnji T-DNA. O ugodnem vplivu dodanega acetosiringona v gojišče na transformacijo poročajo Caligari in sod. (1993).

Dele listov tobaka smo transformirali v bakterijski suspenziji *A. t.* sev LBA4404 z binarnim vektorjem pCAMBIA1301, ki ima v T-DNA regiji lociran markerski *gus* gen in selekcijski *hptIII* gen. Oba transgena sta bila opremljena s promotorjem CaMV 35S, ki omogoča izražanje po celi rastlini. Z oemnjenim transformacijskim sistemom smo želeli Optimizirati transformacijo in ugotoviti razlike med štirimi vključenimi obravnavanji inkubacije.

Deset dni po transformaciji se je začel na izsečkih formirati kalus in po 14 dneh globularne strukture oz. zametki za regenerante ter po šestih tednih regeneranti. Velik odstotek regenerantov je nastal po poti direktne somatske organogeneze, brez vmesne faze kalusa. V pojavu posameznih faz organogeneze med obravnavanji nismo zasledili razlik. O podobnem časovnem pojavljanju posameznih faz regeneracije pri tobaku po transformaciji poroča Hren (2007); medtem ko o zelo uspešni direktni somatski organogenezi listnih izsečkov tobaka poročajo Stolarz in sod. (1991) ter Caligari in sod. (1993).

Na izsečkih, ki so bili samo 10 minut inkubirani v bakterijski suspenziji *A. t.* je nastalo največ 38,48 % regenerantov. Pri ostalih treh obravnavanjih, ki so imela vključeno še kombinacijo vakuuma in ultrazvoka pa od 19,6 do 21,24 % (preglednica 4 in slika 6). Dodani postopki vakuum in ultrazvok so verjetno preveč poškodovali tkivo - celice izsečka, kar se je negativno odražalo na odstotku transformacije in tudi regeneracije. Sposobnost transformacije in regeneracije imajo mlajše in vitalne celice, brez večjih poškodb, ki imajo ohranjene funkcije.

Po štirih dneh inkubacije in kokultivacije smo izsečke predstavili na regeneracijsko MSr gojišče s selekcijskim antibiotikom higromicin 25 mg/l in antibiotikom timentin 150 mg/l, ki je uspešno zatrl namnoževanje bakterije *A. t.* Pri spremljanju kulture nismo opazili negativnega vpliva timentina na regeneracijo listnih izsečkov in na regenerante. O podobnem vplivu timentina pri zaustavitvi rasti bakterije *A. t.* in pozitivnem učinku na rastline poročajo Cheng in sod. (1998). Transformanti z izraženim *hptIII* genom na selekcijskem MSm gojišču v kombinaciji s timentinom so bili normalno veliki, brez nekroz, zato smo nedelovanje oz. utišanje *hptIII* transgena hitro opazili.

Z namenom potrditi zanesljivo izražanje selekcijskega *hptIII* gena smo v drugi subkultivaciji regenerante predstavili na enkrat večjo koncentraciji higromicina (50 mg/l), kot je priporočena za tobak. Priporočena koncentracija selekcijskega agensa mora preprečiti regeneracijo in rast netransformiranih celic oz. regenerantov. Istočasno pa mora omogočiti rast in koreninjenje transformiranih regenerantov. Podobne vplive različnih selekcijskih agensov na rastline navajajo De Block in sod. (1987); Joersbo in sod. (1996); Park in sod. (1998). Selekcija 25 mg/l higromicina v MSr gojišču ni absolutno preprečila nastanek netransformiranih regenerantov. Ti so verjetno rasli v bližini transformiranih regenerantov, ki so uspešno razgradili higromicin. Po subkultivaciji pa je bilo očitno, da so regeneranti, pri katerih *hptIII* gen ni deloval, propadali. Samo pri dveh oz. 1 % regenerantov se v PCR analizi niso namnožili fragmenti dolžine 641 bp značilni za *hptIII* gen in od tega pri enem oz. 0,5 % tudi fragmenti dolžine 408 bp značilni za *gus* gen. Oba regeneranta sta bila po neuspešni rasti na selekciji predstavljena na neselekcijsko gojišče.

Pri treh oz. 1,6 % regenerantov se niso namnožili fragmenti značilni za *gus* gen, so se pa namnožili fragmenti značilni za *hptIII* gen in od teh sta dva regeneranta imela utišan *hptIII* transgen, saj sta bila zaradi slabe rasti na selekcijskem MSr gojišču predstavljena na neselekcijsko gojišče.

Kar 62 oz. 32 % regenerantov je imelo potrjeno z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) vgrajen *hptIII* gen, ki je bil utišan, saj niso bili sposobni razgrajevati higromicin, imelo pa je funkcionalen *gus* gen, razen dveh oz. 1 %, pri katerih je bil tudi *gus* gen utišan (slika 8 in 9). Od 129 regenerantov, ki so uspešno rasli na selekcijskem gojišču pri 1 oz. 0,8 % regenerantov z GUS testom nismo zasledili prisotnosti encima β -glukuronidaze in pri 3 oz. 4,5 % regenerantov iz neselekcijskega gojišča (slika 7).

Nesposobnost izražanja transgena (pojava lastnosti) je lahko povezano z vgradnjo v predel kromosoma, ki je transkripcijsko neaktiven, ali prisotnosti nastalih mutacij, ki lahko povzročijo utišanja genov. Nastale delecije in tudi insercije v transgenih so zasledili Hiei in sod. (1997) ter Kohli in sod. (1999) pri rižu, Yao in sod. (1995) pri jablani ter Mercuri in sod. (2000) pri ameriški vijolici. Pri regenerantih, ki so začeli propadati na selekcijskem gojišču smo želeli ugotoviti ali celoten genski konstrukt z obema transgenoma ne

funkcionira oz. se ne izraža. To smo dokazali z reševanjem 64 oz. 33,2 % propadajočih regenerantov na gojišče brez selekcije, od katerih se pri enem regenerantu niso namnožili fragmenti značilni za *hptII* in tudi ne za *gus* gen (slika 8). Pri vseh ostalih smo ne glede na obravnavanje dobili velik odstotek GUS pozitivnih regenerantov, kljub temu, da so slabo rasli oz. so propadali na gojišču s higromicinom. V teh primerih del genskega konstrukta s *hptII* genom ni funkcioniral, ker rastline niso bile sposobne razgraditi higromicin. Katera od navedenih težav je bila prisotna pri naših regenerantih je težko ugotoviti brez temeljite nadaljnje molekulske analize, lahko pa z naših opažanj potrdimo, da je prišlo do neizražanja oz. utišanja transgenov.

Od skupno 193 analiziranih regenerantov s PCR metodo, samo pri 5 oz. 2,6 % nismo zasledili fragmentov značilnih za transgena. Kar pri 62 oz. 32 % regenerantov s PCR analizo potrjeno vgrajenim *hptII* transgenom, se ta ni izražal. Medtem ko smo pri *gus* transgenu ugotovili 100 % skladnost med izražanjem *gus* transgena in prisotnostjo namnoženih fragmentov s PCR analizo. Samo pri 4 oz 5,3 % regenerantih z GUS testom nismo zasledili prisotnosti encima β -glukuronidaze in pri teh se tudi niso namnožili fragmenti značilni za *gus* transgen. Pri analizi z GUS testom smo šteli za fenotipsko pozitivne vse regenerante, tudi tiste pri katerih smo zasledili samo točkovno, himerno izražanje v posameznih tkivih lista, stebela ali korenin.

5.2 SKLEPI

Po transformaciji listnih izsečkov tobaka je na selekcijskem MSr gojišču na 240 izsečkih nastalo 193 vitalnih regenerantov, kar je 80,4 % regeneracija.

Največ 38,48 % regenerantov je nastalo na izsečkih, ki so bili inkubirani 10 minut samo v bakterijski suspenziji z *Agrobacterium tumefaciens*

Pri ostalih treh obravnavanjih, kjer sta bila v inkubacijo še vključena ultrazvok in vakuum ali kombinacija obeh je nastalo manj od 19,6 do 21,24 % regenerantov.

Koncentracija 150 mg/l antibiotika timentin je zatrla razmnoževanje bakterije *A. t.* in ni imela negativnih posledic na nastanek transformantov.

Na selekcijskem gojišču z dodanim higromicinom 50 mg/l so se v PCR reakciji namnožili fragmenti značilni za selekcijski *hptII* in markerski *gus* gen pri 99,2 % regenerantih, prav toliko jih je imelo potrjen samo *gus* gen in vseh 100 % je imelo prisotne fragmente značilne samo za *hptII* gen.

Na neseleksijskem gojišču je imelo 98,4 % regenerantov namnožene fragmente značilne za oba transgena in prav toliko za samo *hptII* gen ter 96,9 % samo za *gus* gen.

Kar pri 32 % regenerantih s PCR analizo potrjeno vgrajenim *hptII* transgenom, se ta ni izražal, imeli pa so funkcionalen *gus* gen, razen 2 oz. 1 %, pri katerih je bil tudi *gus* gen utišan.

Samo pri 5,3 % regenerantih z GUS testom nismo zasledili prisotnosti encima β -glukuronidaze in pri teh se tudi niso namnožili fragmenti značilni za *gus* transgen. Tako smo pri *gus* genu ugotovili 100 % skladnost med izražanjem *gus* gena in prisotnostjo namnoženih fragmentov.

6 POVZETEK

Približno 1 cm² velike dele listov tobaka sorte 'Havana 38' smo v brezprašni komori po 10 inokulirali čez noč na regeneracijsko MSr (Murashige in Skoog, 1962) gojišče z dodanim 100 µM acetosiringonom (slika 3), ki naj bi po inkubaciji z bakterijo *A. t.* pospešil transformacijo. Zaradi možnosti okužbe in izgube vode smo pokrov in spodnji del petrijevke obdali s parafilmom. V poskus je bilo vključenih 240 izsečkov, 60 za vsako od štirih obravnavanj.

Naslednji dan smo liste tobaka transformirali s posredno metodo z vektorskim sistemom bakterije *A. t.* sev LBA4404 in plazmidom pCAMBIA1301 s 4 postopki: 1) 10 minutna inkubacija samo v bakterijski suspenziji z občasnim mešanjem, 2) 5 minutna kombinacija z ultrazvokom, 3) 5 minutna kombinacija z vakuumom in 4) 5 minutna kombinacija z ultrazvokom in nadaljevanje 5 minut z vakuumom. Listne izsečke smo po 10 minutni inkubacije z *A. t.* v brezprašni komori rahlo osušili in jih za 4 dni inokulirali nazaj na MSr gojišče s 100 µM acetosiringonom. Po 4 dneh kokultivacije smo listne izsečke sprali z raztopino antibiotika timentin, 200 mg/l in jih rahlo osušili v brezprašni komori. Nato smo jih inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče z dodanim selekcijskim antibiotikom higromicin, 25 mg/l in timentin, 150 mg/l za uničitev *A. t.* Nastale regenerante smo subkultivirali na mikropropagacijsko MSm gojišče s povečano koncentracijo higromicina, 50 mg/l in enako timentina, 150 mg/l v petrijevke premera 9 cm in višine 2 cm.

Na selekcijskem MSr gojišču je na 240 izsečkih nastalo 193 regenerantov, kar je 80,4 % regeneracija. Največ 74 oz. 38,48 % smo jih dobili po obravnavanju v katerem smo listne izsečke inkubirali 10 minut samo v bakterijski suspenziji z *A. t.* Po ostalih treh obravnavanjih smo dobili manj regenerantov. Po obravnavanju 3, kombinacija inkubacije z *A. t.* in vakuuma, 41 oz. 21,24 % regenerantov. Skoraj enako 40 oz. 20,73 % regenerantov je nastalo pri obravnavanju 2, inkubacija z *A. t.* in ultrazvoka in namjmanj 38 oz. 19,6 % regenerantov pri kombinaciji ultrazvoka in vakuuma (preglednica 4 in slika 6).

Od 193 regenerantov, subkultiviranih na selekcijsko MSm gojišče, je po 10 do 14 dneh, 64 začelo propadati in smo jih prestavili na gojišče brez selekcije, z namenom ugotoviti fenotipsko izražanje *hptII* in tudi *gus* transgena.

Pri vseh regenerantih, na selekcijskem in tudi na neselekcijskem gojišču, kateri so imeli razvite liste in korenine, smo s histokemičnim GUS testom testirali izražanje *gus* gena in to v listih, steblih in koreninah. Prav tako smo pri vseh opravili tudi DNA analizo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in na podlagi pomnoženih fragmentov značilnih za posamezni transgen potrdili prisotnost transgena v genomu nastalih regenerantov.

Velik odstotek regenerantov je imelo namnožene fragmente značilne za vnešene transgene

tako na selekcijskem kot neselekcijskem gojišču. Na selekcijskem gojišču so se namnožili fragmenti, dolžine 408 bp značilni za *gus* gen in fragmenti dolžine 641 bp značilni za selekcijski *hptII* gen pri 99,2 % regenerantov, prav toliko regenerantov je imelo potrjen samo *gus* gen in vseh 100 % regenerantov je imelo namnožene fragmente značilne za *hptII* gen. Na neselekcijskem gojišču je 98,4 % imelo namnožene fragmente značilne za oba transgena in prav toliko za samo *hptII* gen ter 96,9 % samo za *gus* gen (slika 8 in 9).

Od skupno 193 analiziranih regenerantov s PCR metodo, samo pri 5 oz. 2,6 % nismo zasledili fragmentov značilnih za transgena. Kar pri 62 oz. 32 % regenerantov s PCR analizo potrjeno vgrajenim *hptII* transgenom, se ta ni izražal, imelo pa je funkcionalen *gus* gen, razen dveh oz. 1 %, pri katerih je bil tudi *gus* gen utišán. Medtem ko smo pri *gus* transgenu ugotovili 100 % skladnost med izražanjem *gus* transgena in prisotnostjo namnoženih fragmentov s PCR analizo. Samo pri 4 oz 5,3 % regenerantih z GUS testom nismo zasledili prisotnosti encima β -glukuronidaze in pri teh se tudi niso namnožili fragmenti značilni za *gus* transgen.

Iz naših ugotovitev lahko potrdimo, da o uspešnosti transformacije lahko govorimo takrat, ko zasledimo na DNA nivoju prisotnost transgena in tudi njegovo fenotipsko izražanje. Najbolj zanesljivi dokaz uspešnosti je, ko se transformirana lastnost prenese oz. deduje na potomce, kar pa v naši nalogi nismo spremljali.

7 VIRI

- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 22: 8711-8721.
- Caligari P.D.S., Yapabandara Y.M.H.B., Paul E.M., Perret J., Roger P., Dunwell J.M. 1993. Field performance of derived generations of transgenic tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 875-879.
- Cambia. 1997. pCAMBIA vector release manual version 3.05. Camberra, Center for the application of molecular biology to international agriculture: 6 str.
- Cheng Z.M., Schnurr J.A., Kapaun J.A. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*, 17: 646-649.
- 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.
- Clive J. 2008. Global status of commercialized biotech/GM crops. The international service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAAA) <http://www.isaaa.org/kc/bin/briefs34/es/index.htm> (5.11.2009).
- Clive J. 2014. Global status of commercialized biotech/GM crops. The international service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAAA) <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/pdf/b49-execsum-english.pdf> (14.6.2016)
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V., Rao Movva N., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO Journal*, 6, 9: 2513-2518.
- Deblaere R., Reynaerts A., Höfte H., Hernalsteens J.P., Leemans J., Van Montagu M. 1987. Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology*, 153: 277-292.
- Directive 2001/18/EC of the European Parliament & of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms & repealing Council Directive 90/220/EEC
- Fisher D.K., Gultinan M.J. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 3: 278-289.
- Galun E., Breiman A. 1998. Transgenic plants. With an appendix on intellectual properties & commercialisation of transgenic plants by John Barton. London, Imperial College Press: 376 str.
- Guan Z.J., Guo B., Huo Y.L., Guan Z.P., Dai J.K., Wei Y.H. 2013. Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 2817-2840
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 10: 446-451.

- Henry R.J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. London, Chapman & Hall: 258 str.
- 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.
- Hiei Y., Komari T., Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 35: 205-218.
- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223: 496-498.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- Hren N. (2007). Transformacija tobaka (*Nicotiana tabacum* L.) z *Agrobacterium tumefaciens*. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Oddelek za agronomijo: 32
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6, 13: 3901-3907.
- Joersbo M., Okkels F.T. 1996. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports*, 16: 219-221.
- Jones J.D., Goldsbrough P.B., Weller S.C. 1996. Stability and expression of amplified EPSPS genes in glyphosate resistant tobacco cells and plantlets. *Plant Cell Reports*, 15, 6: 431-436.
- Kohli A., Gahakwa D., Vain P., Laurie D. A., Christou P. 1999. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 208: 88-97.
- Komari T. 1989. Transformation of callus cultures of nine plants species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Science*, 60: 223-229.
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo*, 59: 63-66
- Lakshmi Sita G., Sreenivas G.L., Bhattacharya A. 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4, 3-4: 189-195
- Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., Lopez J., Olivera-Flores M.T., Gomez-Lim M., Tapia-Perez G. 2010. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine*, 30: 5551-5556
- Loc N.H., Bach N.H., Kim T.G., Yang M.S. 2010. Tissue culture and expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic *Peperomia pellucida*. *Protein Expression and Purification*, 72: 82-86
- Ma S., Wang A. 2012. *Molecular Farming in Plants: An Overview*. V: *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*. Ma S., Wang A. (eds.) 1st ed. Springer Netherlands, Springer Science+Business Media B.V.: 1-2

- Mercuri A., De Benedetti L., Burchi G., Schiva T. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of African violet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 39-46.
- Moravec T., Schmidt M.A., Herman E.M., Woodford-Thomas T. 2007. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*, 25: 1647-1657
- Murashige T., Skoog H. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
- 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, 6: 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.
- Patti T., Bembi B., Cristin P., Mazzarol F., Secco E., Pappalardo C., Musetti R., Martinuzzi M., Versolatto S., Cariati R., Dardis A., Marchetti S. 2012. Endosperm-specific expression of human acid beta-glucosidase in a waxy rice. *Rice: Springer Open Journal*, 5, doi: 10.1186/1939-8433-5-34, 15 str.
- Potrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology*, 8: 535-542
- Raspor P. 1996. *Biotehnologija in razvoj*. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 781-794.
- Roberts C.S., Rajagopal S., Smith L.A., Nguyen T.A., Yang W., Nugroho S., Ravi K.S., Cao M.L., Vijayachandra K., Patell V., Harcourt R.L., Dransfield L., Desamero N., Slamet I., Keese P., Kilian A., Jefferson R.A. 1997. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. V: *pCambia Vector release manual version 3.05*. Cambia, Canberra, Australia, 6 str. (Navodila za uporabo) http://www.cambia.org.au/main/r_et_camvec.htm (15.5.2008).
- Sarma K.S., Sunilkumar G., Balamani V., Veluthambi K. 1995. GUS activity and generation of transformed shoot buds are highly correlated in *Agrobacterium*-transformed tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter* 13, 3: 377-382.
- 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.
- Stolarz A., Macewicz J., Lörz H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 137: 347-357.
- Sunilkumar G., Vijayachandra K., Veluthambi K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. *Plant Science*, 141: 51-58.

- Tanaka A., Mita S., Ohta S., Kyojuzuka J., Shimamoto K., Nakamura K. 1990. Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and efficient splicing of the intron. *Nucleic Acids Research*, 18, 23: 6767-6770.
- Transformation (genetics). 2012. Corporation: Online Encyclopedia, Thesaurus, Dictionary definitions and more.
http://dictionary.sensagent.com/Transformation_%28genetics%29/en-en/ (22. 6.2016)
- 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.
- Yao J.L., Cohen D., Atkinson R., Richardson K., Morris B. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Reports* 14, 7: 407-412.
- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi. 2005. Ur. l. RS, št. 23/05
- Zakon o spremembah in dopolnitvah Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi. 2010. Ur. l. RS, št. 21/2010
- 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, 12: 2143-2150.
- Zgodovina tobaka 2004
<http://kadilci.net/o-cigaretah/> (15.5.2007).
- Zhang S.Z., Zhang G.L., Rong T.Z., Pan L., Zhou P., Zhang Y.G. 2011. Transformation of two *VPI* Genes of O- and Asia 1-type foot-and-mouth disease virus into maize. *Agricultural Sciences in China*, 10, 5: 661-667
- Zhou Y., Hao W., Zhao Q., Chen Y.D., Chen Y.H., Tao Y., Bai H.X. 2014. Recent advances in transgenic plant-derived vaccines. *Medicinal Plant*, 5, 3: 57-60
- Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23, 1: 11-28.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Zlati LUTHAR za vso njeno pomoč in strokovno vodenje, podporo in prijazne besede pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Jerneju JAKŠETU in predsedniku komisije za zagovor prof. dr. Gregorju OSTERCU za pregled diplomske naloge.