

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ida ŠMID

**VNOS IZBRANIH GLIVNIH GENOV ZA
ODPORNOST KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)
PROTI KOLORADSKEMU HROŠČU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ida Šmid

**VNOS IZBRANIH GLIVNIH GENOV ZA ODPORNOST KROMPIRJA
(*Solanum tuberosum* L.) PROTI KOLORADSKEMU HROŠČU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**TRANSFORMATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) WITH
SELECTED FUNGAL GENES FOR RESISTANCE TO COLORADO
POTATO BEETLE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 21. 9. 2011 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na doktorskem študiju Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Jana Žel in za somentorico prof. dr. Kristina Gruden.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, v sodelovanju z Odsekom za biotehnologijo Inštituta »Jožef Stefan«.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut BOHANEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Jelka ŠUŠTAR VOZLIČ
Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za poljedelstvo, vrtnarstvo,
genetiko in žlahtnjenje

Član: prof. dr. JANKO KOS
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija 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.

Ida Šmid

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	60:582.930.11:595.768.1(043:3)=163.6
KG	biotehnologija/krompir/koloradski hrošč
AV	ŠMID, Ida, univ. dipl. biol.
SA	ŽEL, Jana (mentor)/GRUDEN, Kristina (somentor)
KZ	1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija
LI	2015
IN	VNOS IZBRANIH GLIVNIH GENOV ZA ODPORNOST KROMPIRJA (<i>Solanum tuberosum</i> L.) PROTI KOLORADSKEMU HROŠČU
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 120 str., 10 pregl., 34 sl., 164 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Gobe predstavljajo bogat, vendar dokaj neraziskan vir genov. Iz užitnih bazidiomicetnih gliv orjaškega dežnika (<i>Macrolepiota procera</i>) in poprhnjene livke (<i>Clitocybe nebularis</i>) so bili izolirani in biokemijsko okarakterizirani proteazni inhibitorji, ki so uvrščeni v skupino mikocipinov, iz poprhnjene livke pa še lektin CNL. Cilj doktorske naloge je bil s pomočjo tehnologije genskega inženiringa oceniti primernost teh proteinov za povečanje odpornosti krompirja (<i>Solanum tuberosum</i> L.) proti koloradskemu hrošču (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say). Izbrali smo tri gene (<i>mcp4a</i> , ki kodira makrocipin Mcp4a, <i>clt</i> , ki kodira klitocipin Clt in <i>CNL</i> , ki kodira lektin CNL), jih prilagodili za izražanje v rastlinskem ekspresijskem sistemu, klonirali v ustrezne vektorje in s transformacijo z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vnesli v krompir. Pri stabilno transformiranih linijah krompirja smo z metodo RT-qPCR določili stopnjo izražanja transgenov, rekombinantne proteine pa smo dokazali tudi s prenosom western. Transgene linije z najvišjim izražanjem rekombinantnih proteinov smo namnožili v tkivnih kulturah, nato pa jih prenesli v zemljo. S tako regeneriranimi rastlinami krompirja smo izvedli prehranjevalne teste z ličinkami koloradskega hrošča. Dieta s transgenim krompirjem, ki je izražal makrocipin ali klitocipin, je zmanjšala rast in upočasnila razvoj ličink. Pri transgenem krompirju, ki je izražal lektin CNL, zmanjšane rasti in upočasnjenega razvoja nismo opazili, vendar pa je to lahko posledica prenizkega izražanja ali posttranslacijskih modifikacij lektina CNL v transgenih rastlinah. Nadalje smo z metodo qPCR ocenili še odgovor žuželk na hranjenje s transgenim krompirjem, ki je izražal Mcp4a ali Clt, kjer smo pokazali, da izbrana proteina ne vplivata na spremembo izražanja izbranih adaptivnih encimov v prebavilu koloradskega hrošča. Makrocipin in klitocipin sta prva glivna proteazna inhibitorja, za katera je bilo pokazano, da negativno vplivata na rast in razvoj ličink koloradskega hrošča.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC 60:582.930.11:595.768.1(043:3)=163.6
 CX biotechnology/potato/Colorado potato beetle
 AU ŠMID, Ida
 AA ŽEL, Jana (supervisor)/GRUDEN, Kristina (co-supervisor)
 PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field Biotechnology
 PY 2015
 TI TRANSFORMATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) WITH SELECTED FUNGAL GENES FOR RESISTANCE TO COLORADO POTATO BEETLE
 DT Doctoral Dissertation
 NO XIV, 120 p., 10 tab., 34 fig., 164 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Mushrooms represent a rich source of novel proteins. Protease inhibitors classified as mycocypins were isolated from edible fungi parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) and clouded agaric (*Clitocybe nebularis*). Additionally, from clouded agaric lectin CNL was isolated and described. The aim of this doctoral thesis was to evaluate the potential of these proteins for protection of potato (*Solanum tuberosum* L.) against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using genetic engineering techniques. Three genes were chosen, one from parasol mushroom, *mcp4a* which codes cysteine protease inhibitor macrocypin (Mcp4a) and two genes from clouded agaric, *clt* which codes cysteine protease inhibitor clitocypin (Clt) and *CNL*, which codes lectin (CNL). Gene sequences were optimized for expression in potato and cloned into binary plasmids pMDC32 and pMDC85. Using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation procedures, genes were inserted into plant genome. Transgene expression in transformed potato lines was measured using RT-qPCR. Presence and quantity of recombinant proteins was determined by western blot analysis. Transgenic potato lines showing highest expression of recombinant proteins were propagated in plant tissue cultures and then transferred into soil. These regenerated and propagated transgenic potato lines were used in Colorado potato beetle feeding bioassays. Macrocypin and clitocypin enriched diet caused retardation of growth and development of larvae. In transgenic potato lines expressing CNL no such effect on larvae was observed, which could be due to low expression level of CNL or posttranslational modifications of CNL in transgenic potato lines. Further on we were interested in the effect of macrocypin or clitocypin enriched diet on the effect on gene expression of selected adaptive responsive genes in larval guts. Using qPCR relative expression of intestains A, B, D and E, serine protease and glycoside hydrolases GH48-1 and GH48-2 was measured in CPB larvae fed by nontransgenic and Mcp4a or Clt expressing transgenic plants. No effect of dietary macrocypin or clitocypin on gene expression of known adaptation-related digestive enzymes was observed in CPB guts. Macrocypin and clitocypin are the first fungal protease inhibitors which showed negative effect on Colorado potato beetle larval growth and development.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 KROMPIR (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	4
2.1.1 Endogena obramba rastlin pred herbivorimi škodljivci	4
2.2 KOLORADSKI HROŠČ (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> SAY)	6
2.2.1 Prebavni sistem koloradskega hrošča	8
2.2.2 Prilagoditev koloradskega hrošča na rastlinsko obrambo	9
2.2.3 Konvencionalni pristopi zatiranja koloradskega hrošča	11
2.3 GENSKO SPREMENJENE RASTLINE, ODPORNE PROTI ŽUŽELKAM	13
2.3.1 Toksini Bt iz bakterije <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.3.1.1 Razvoj odpornosti proti toksinu Bt pri občutljivih populacijah žuželk.....	15
2.3.1.2 Proteinski inženiring toksinov Bt	16
2.3.1.3 Rastline z multiplimi toksini.....	17
2.3.2 Zatiranje koloradskega hrošča z biotehnoškim pristopom	17
2.3.3 Proteazni inhibitorji	18
2.3.3.1 Uporaba PI za obvladovanje koloradskega hrošča	21
2.3.4 Lektini.....	22
2.3.5 Ostali pristopi pridobivanja rastlin, odpornih proti žuželkam.....	23
2.4 GLIVE KOT VIR FITOPROTEKTIVNIH SNOVI	24
2.4.1 Poprhnjena livka (<i>Clitocybe nebularis</i>).....	26
2.4.2 Orjaški dežnik (<i>Macrolepiota procera</i>)	27
2.4.3 Proteazni inhibitorji iz gliv	28

2.4.3.1	Klitocipin	28
2.4.3.2	Makrocipini	29
2.4.4	Lektini iz gliv	30
2.4.4.1	Lektin CNL.....	31
3	MATERIAL IN METODE.....	33
3.1	MATERIALI	33
3.1.1	Biološki material.....	33
3.1.2	Gojišča	33
3.1.3	Začetni oligonukleotidi in sonde	34
3.1.4	Uporabljena nukleotidna in aminokislinska zaporedja.....	36
3.1.5	Plazmidni vektorji	36
3.2	METODE	39
3.2.1	Priprava plazmidnih vektorjev	39
3.2.1.1	Izbor genov in prilagoditev kodona.....	39
3.2.1.2	Bioinformatične analize	39
3.2.1.3	Rekombinacija Gateway in transformacija OmniMAX™ T1 Phage-Resistant <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.1.4	Transformacija bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i> s plazmidi pMDC.....	40
3.2.1.5	PCR na osnovi kolonije	41
3.2.2	Stabilna transformacija rastlin	42
3.2.2.1	Priprava rastlinskega materiala za transformacijo.....	42
3.2.2.2	Transformacija krompirja in regeneracija transgenih rastlin.....	43
3.2.3	Preverjanje nivoja izražanja transgenov s PCR v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja	44
3.2.3.1	Izolacija RNA iz rastlinskega tkiva	44
3.2.3.2	Razgradnja genomske DNA	45
3.2.3.3	PCR v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja	46
3.2.4	Prenos western.....	47
3.2.5	Konfokalna mikroskopija	48
3.2.6	Prehranjevalni testi	48
3.2.6.1	Priprava rastlinskega materiala za prehrano ličink.....	48
3.2.6.2	Potek prehranjevalnih testov	49

3.2.7	Odziv koloradskega hrošča na hranjenje z GS hrano	50
3.2.7.1	Izolacija prebavila žuželk	50
3.2.7.2	Izolacija RNA iz prebavil ličink koloradskega hrošča	51
3.2.7.3	Razgradnja genomske DNA	51
3.2.7.4	Obratno prepisovanje.....	52
3.2.7.5	PCR v realnem času.....	52
3.2.8	Agarozna gelska elektroforeza	54
3.2.9	Spektrofotometrično določanje koncentracije in čistosti RNA	54
3.2.10	Statistične analize	55
4	REZULTATI	56
4.1	PRIPRAVA PLAZMIDNIH VEKTORJEV	58
4.1.1	Izbrani geni s prilagojenim kodonom.....	58
4.1.2	Prenos genov v destinacijska plazmida pMDC32 in pMDC85	64
4.1.3	Rekombinacija Gateway in transformacija OmniMAX™ T1 Phage-Resistant <i>Escherichia coli</i>	65
4.2	STABILNA TRANSFORMACIJA RASTLIN.....	65
4.2.1	Testiranje gensko spremenjenih linij krompirja z metodo RT-qPCR.....	66
4.2.2	Prenos western.....	69
4.2.3	Konfokalna mikroskopija	73
4.3	PREHRANJEVALNI TESTI	73
4.3.1	Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo Mcp4a.....	73
4.3.1.1	Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo Mcp4a.....	73
4.3.1.2	Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo Mcp4a z inducirano endogeno obrambo krompirja.....	78
4.3.2	Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo klitocipin	79
4.3.3	Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo lektin CNL	83
4.4	ODZIV KOLORADSKEGA HROŠČA NA HRANJENJE S TRANSGENIMI RASTLINAMI.....	85
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	88
5.1	RAZPRAVA	88
5.1.1	Izbor glivnih genov za vnos v krompir.....	89
5.1.2	Vnos genov v krompir in izbor rastlin za prehranjevalne teste.....	90

5.1.3	Prehranjevalni testi	93
5.1.3.1	Analiza vpliva makrocipina v hrani na rast in razvoj ličink.....	94
5.1.3.2	Analiza vpliva klitocipina v hrani na rast in razvoj ličink.....	95
5.1.3.3	Analiza vpliva lektina CNL v hrani na rast in razvoj ličink.....	96
5.1.4	Prilagoditev koloradskega hrošča na hranjenje s transgenimi linijami krompirja, ki izražajo Mcp4a in Clt	97
5.1.4.1	Prilagoditev koloradskega hrošča na hranjenje z makrocipinom	97
5.1.4.2	Prilagoditev koloradskega hrošča na hranjenje s klitocipinom	99
5.2	SKLEPI	100
6	POVZETEK (SUMMARY).....	103
6.1	POVZETEK	103
6.2	SUMMARY	105
7	VIRI.....	107
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Seznam začetnih oligonukleotidov za konvencionalni PCR.	34
Pregl. 2: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za qPCR.	35
Pregl. 3: Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije.....	42
Pregl. 4: Pogoji reakcije za PCR na osnovi kolonije z gensko specifičnimi in z M13 začetnimi oligonukleotidi.....	42
Pregl. 5: Seznam transformacij krompirja z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i> z vnesenimi različnimi plazmidi.	43
Pregl. 6: Pogoji reakcije za RT-qPCR s kompletom AgPath-ID™ One-Step RT PCR kit.	46
Pregl. 7: Seznam prehranjevalnih testov ličink koloradskega hrošča.	50
Pregl. 8: Pričakovane dolžine konstruktov pri pomnoževanju z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi M13 in z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.....	65
Pregl. 9: Uspešnost transformacije krompirja.	66
Pregl. 10: Pričakovane velikosti rekombinantnih proteinov v linijah krompirja transformiranih z različnimi konstrukti.....	69

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Razvojni krog koloradskega hrošča.....	7
Sl. 2: Poprhnjena livka (<i>Clitocybe nebularis</i>).....	27
Sl. 3: Orjaški dežnik (<i>Macrolepiota procera</i>).....	27
Sl. 4: Plazmidna karta vektorja pMDC32.	37
Sl. 5: Shema poteka raziskovalnega dela.	57
Sl. 6: Poravnava DNA optimizirane regije in kodirajočega dela originalne regije gena <i>mcp4a</i>	59
Sl. 7: Celotno optimizirano zaporedje gena <i>mcp4a</i> v pDONR221 vektorju.....	60
Sl. 8: Aminokislinska poravnava optimiziranega in originalnega <i>Mcp4a</i>	60
Sl. 9: Poravnava DNA optimizirane regije in kodirajočega dela originalne regije gena <i>clt</i>	61
Sl. 10: Celotno optimizirano zaporedje gena <i>clt</i> v pDONR221 vektorju.....	61
Sl. 11: Aminokislinska poravnava optimiziranega in originalnega <i>Clt</i>	62
Sl. 12: Poravnava DNA optimizirane regije in kodirajočega dela originalne regije gena <i>CNL</i>	62
Sl. 13: Celotno optimizirano zaporedje gena <i>CNL</i> v pDONR221 vektorju.....	63
Sl. 14: Aminokislinska poravnava optimiziranega in originalnega <i>CNL</i>	63
Sl. 15: Izsek zaporedja plazmida pMDC32.....	64
Sl. 16: Relativno izražanje genov <i>mcp4a</i> , <i>clt</i> in <i>CNL</i> pri transformiranih rastlinah krompirja.....	68
Sl. 17: Detekcija rekombinantnega <i>Mcp4a</i> v GS linijah krompirja s prenosom western. ..	70
Sl. 18: Detekcija rekombinantnega <i>Clt</i> v GS linijah krompirja s prenosom western.	71
Sl. 19: Detekcija rekombinantnega <i>Clt</i> v GS liniji krompirja C_L8 s prenosom western v različnih časovnih točkah.	71
Sl. 20: Detekcija rekombinantnega <i>CNL</i> v GS linijah krompirja s prenosom western	72
Sl. 21: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu novembra 2010 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata <i>Mcp4a</i>	74
Sl. 22: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu novembra 2010 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata <i>Mcp4a</i>	75

Sl. 23: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a	76
Sl. 24: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a	77
Sl. 25: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu septembra 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a	78
Sl. 26: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu septembra 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a	79
Sl. 27: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu junija 2010 z GS linijo C_L8, ki izraža Clt	80
Sl. 28: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu junija 2010 z GS linijo C_L8, ki izraža Clt	81
Sl. 29: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama C_L8 in C_X4, ki izražata Clt	82
Sl. 30: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama C_L8 in C_X2, ki izražata Clt	83
Sl. 31: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu marca 2011 z GS linijama L_X1 in L_Y3, ki izražata CNL	84
Sl. 32: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu marca 2011 z GS linijama L_X1 in L_Y3, ki izražata CNL	85
Sl. 33: Izražanje izbranih genov v črevesu ličink koloradskega hrošča, hranjenih s transgenima linijama krompirja, ki izražata Mcp4a	86
Sl. 34: Izražanje izbranih genov v črevesu ličink koloradskega hrošča, hranjenih s transgenima linijama krompirja, ki izražata Clt	87

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
35S	konstitutivni promotor iz virusa mozaika cvetače (CaMV)
AK	aminokislina
antiClt/Mcp/CNL/GFP	oznaka protiteles
BBP	skupina proteinov, ki vežejo biotin, angl. biotin binding protein
bp	bazni par, angl. base pair
BSA	goveji serumski albumin, angl. bovine serum albumine
Bt	toksin iz bakterije <i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	virus mozaika cvetače, angl. Cauliflower mosaic virus
cDNA	komplementarna DNA, angl. complementary DNA
Clt	klitocipin, angl. clitocypin
CNL	lektin, ki izvira iz <i>Clytoscibe nebularis</i> , angl. <i>Clytoscibe nebularis</i> lectin
cox	referenčni gen, kodira citokrom c oksidazo, angl. cytochrome c oxidase
CpTI	inhibitor tripsina iz črnega fižola, angl. cowpea trypsin inhibitor
Cq	cikel PCR v realnem času, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag
Cry	drugo ime za proteine Bt
cv.	sorta, angl. cultivar
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DAMP	molekulski vzorec, povezan s poškodbo, angl. damage-associated molecular pattern
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina, angl. deoxiribonucleic acid
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
E	učinkovitost pomnoževanja v reakciji PCR v realnem času
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
FAM	6-karboksi-fluorescein
gDNA	genomska DNA
GFP	zeleni fluorescentni protein, angl. green fluorescent protein
GH	glikozidhidrolaza
GS	gensko spremenjen

GSR	gensko spremenjena rastlina
IJS	Institut »Jožef Stefan«
Int	intestain
LB	Lauria-Bertani bogato gojišče
LB	levo mejno zaporedje, angl. left border
LBA4404	laboratorijski sev bakterije <i>A. tumefaciens</i>
Mcp	makrocipin, angl. Macrocyprin
mRNA	informacijska RNA, angl. messenger RNA
MS	Murashige in Skoog gojišče
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OmniMAX	laboratorijski sev bakterije <i>E. coli</i>
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PAMP	s patogenom povezan molekularni vzorec, angl. pathogen-associated molecular pattern
PCR	verižna reakcija s polimerazo, angl. polymerase chain reaction
pDONR221	plazmidni vektor
pENTR	plazmidni vektor
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PI	proteazni inhibitor
pMDC	komercialni plazmid družbe Cambia
pMDC32	plazmidni vektor za navadno prekomerno izražanje
pMDC85	plazmidni vektor za prekomerno izražanje proteina v fuziji z GFP
PRR	receptor za prepoznavo vzorcev, angl. pattern recognition receptor
PVDF	poliviniliden difluorid
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času, angl. quantitative polymerase chain reaction
RB	desno mejno zaporedje, angl. right border
rClf/Mcp/CNL	rekombinantni proteini Clf/Mcp/CNL
RNA	ribonukleinska kislina, angl. ribonucleic acid
RNaza	ribonukleaza
RT	obratno prepisovanje, angl. reverse transcription
RT-qPCR	qPCR s predhodnim korakom obratnega prepisovanja, angl. reverse transcription qPCR
SDS	natrijev dodecil sulfat
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin

TBS	raztopina Trisa in soli , angl. »Tris buffered saline«
TE	raztopina Tris in EDTA
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
UV	ultravijolična svetloba
Vip	vegetativni insekticidni proteini iz bakterije <i>Bacillus thuringiensis</i> , angl. vegetative insecticidal proteins
YM	gojišče za rast kvasovk, angl. yeast and mold broth

Standardne kratice za nukleinske baze:

A - adenin

C - citozin

G - gvanin

T – timin

Standardne enočrkovne in tričrkovne kratice za aminokisljine:

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
C	Cys	cistein
E	Glu	glutaminska kislina
Q	Gln	glutamin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
K	Lys	lizin
M	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin

1 UVOD

Glive predstavljajo bogat vir proteinov, uporabnih za različne biotehnološke aplikacije (Erjavec in sod., 2012). Za mnoge glive, ki oblikujejo plodišča (gobe), je poznano, da jih žuželke le redko napadajo in torej predstavljajo vir snovi za zaščito pred žuželkami. Te snovi so največkrat proteini in med njimi so za raziskave še posebej zanimivi tisti, ki izhajajo iz gob, ki se tradicionalno uporabljajo v prehrani, saj je s tem zmanjšano tveganje za morebiten škodljiv vpliv na človeka. Za užitno bazidiomicetno glivo poprhnjeno livko (*Clitocybe nebularis*) je že dolgo poznano, da ima močno insekticidno aktivnost (Mier in sod., 1996), ki so jo vsaj delno pripisali lektinom, predvsem lektinu CNL (Pohleven in sod., 2011). V poprhnjeni livki so prav tako odkrili in opisali proteazni inhibitor (PI) klitocipin (Brzin in sod., 2000). Klitocipin ni bil soroden nobenemu do tedaj poznanemu PI, zato so ga uvrstili v novo skupino PI, poimenovano mikocipini. Vanjo so kasneje uvrstili še PI izolirane iz orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*), ki so jih poimenovali makrocipini (Sabotič in sod., 2009). Vloga mikocipinov v poprhnjeni livki in orjaškem dežniku ni natančno poznana, a na podlagi biokemijske karakterizacije se predvideva, da imajo lahko vlogo pri zaščiti pred žuželkami.

Zaščita kulturnih rastlin pred škodljivimi žuželkami predstavlja v kmetijstvu izjemno pomembno področje. Kljub obstoju širokega repertoarja komercialno dostopnih insekticidnih sredstev je razvoj novih in učinkovitejših insekticidov še vedno zelo aktualen. Škodljivci imajo namreč veliko sposobnost prilagajanja na insekticidna sredstva, poleg tega pa je pomembna smernica v razvoju novih sredstev njihov čim manjši vpliv na okolje. Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata* Say), glavni žuželčji škodljivec krompirja, s svojo osupljivo sposobnostjo prilagajanja na insekticidna sredstva že dolgo igra pomembno vlogo pri razvoju insekticidov (Alyokhin in sod., 2008). Za zaščito rastlin pred škodljivci z insekticidnimi sredstvi obstaja več načinov. Prvi in zaenkrat najbolj uveljavljen način je aplikacija insekticidov na rastline v obliki škropiv ali s prašenjem. Drugi način zaščite rastlin pred škodljivci pa je z uporabo gensko spremenjenih rastlin (GSR), ki same sintetizirajo proteine, ki jim omogočijo zaščito pred škodljivcem. Gojenje GSR je v svetovnem merilu že od njihovega prvega pojava na trgu leta 1995 v porastu in med njimi velik delež predstavljajo prav rastline, odporne proti žuželkam (Clive, 2014). Nedavna

metaanaliza vpliva GSR je potrdila velike agronomske in gospodarske prednosti pridelovanja GSR v primerjavi z netransgenimi rastlinami (Klümper in Qaim, 2014).

Namen doktorskega dela je bil preučiti primernost proteinov iz bazidiomicetnih gliv poprhnjene livke in orjaškega dežnika za zaščito rastlin pred žuželkami s pomočjo uporabe tehnologije genskega spreminjanja rastlin. Za vnos genov smo izbrali modelno rastlino krompir (*Solanum tuberosum* L.) in za preverjanje učinkovitosti transgenih proteinov koloradskega hrošča.

1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE

- Izbrati gene iz bazidiomicetnih gliv poprhnjene livke (*C. nebularis*) in orjaškega dežnika (*M. procera*), primerne za zaščito krompirja pred koloradskim hroščem.
- Pripraviti ustrezne konstrukte za vnos izbranih genov v krompir sorte Désirée s pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.
- V stabilno transformiranih rastlinah dokazati izražanje izbranih genov z metodo PCR v realnem času ter potrditi prisotnost proteinov s prenosom western.
- Izvesti prehranjevalne teste ličink koloradskega hrošča z izbranimi transgenimi linijami.
- Ovrednotiti insekticidni potencial vseh treh izbranih proteinov.

1.2 HIPOTEZE

- V poprhnjeni livki (*C. nebularis*) in orjaškem dežniku (*M. procera*) se nahajajo geni, ki so primerni za zaščito rastlin pred žuželkami.
- Pričakujemo, da bomo izbrane gene, katerih zaporedja bomo prilagodili rastlinskemu ekspresijskemu sistemu in jih klonirali v primerne ekspresijske vektorje nato s stabilno transformacijo s pomočjo bakterije *A. tumefaciens* uspešno izrazili v krompirju.

- Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) in z metodo prenosa western lahko med transgenimi rastlinami izberemo tiste, ki imajo najvišjo stopnjo izražanja transgenov.
- GSR so primeren sistem za vrednotenje primernosti glivnih genov za zaščito krompirja pred koloradskim hroščem.
- Izbrani geni bodo vsaj delno vplivali na povečano odpornost krompirja proti koloradskemu hrošču.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR (*Solanum tuberosum* L.)

Krompir je enoletnica iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*), kamor so uvrščene mnoge kulturne rastline, na primer paradižnik (*Lycopersicon esculentum*), paprika (*Capsicum annuum*), jajčevac (*Solanum melongena*) in tobak (*Nicotiana tabacum*). Krompir v višino zraste do 100 cm in v zemlji naredi gomolje, ki jih uporabljamo v prehrani, kot krmo ali za proizvodnjo škroba.

Krompir izvira iz južne Amerike (območje Čila in Peruja), od koder se je v času Kolumba razširil v kolonialno Evropo, nato pa se razširil po celem svetu. Danes predstavlja za pšenico, koruzo in rižem četrto najpomembnejšo poljščino. Svetovna letna pridelava krompirja je 311 milijonov ton, pridelujejo pa ga na 19 milijonih ha. Povprečen pridelek je 16,4 t/ha, vendar pa le ta med državami variira med 2 in 44 t/ha. Poznanih je preko 3000 sort, ki se razlikujejo v velikosti in obliki gomoljev, v barvi lupine in mesa gomoljev, glede na strukturo mesa gomoljev, glede na okus ter glede na čas pridelave (Vreugdenhil in sod., 2007).

Krompir je poljščina, ki je zelo dovzetna za različne škodljivce ter virusne, bakterijske in glivne bolezni. Količina uporabljenih pesticidov v pridelavi krompirja presega količino, ki jo uporabijo za ostale poljščine, zato je pridelava krompirja draga in okolju neprijazna (Sasson, 1998).

2.1.1 Endogena obramba rastlin pred herbivorimi škodljivci

Rastline so v svojem okolju nenehno izpostavljene različnim patogenom (virusi, bakterije, glive) in ektoparazitom (žuželke, uši in ostali škodljivci, ki se prehranjujejo z rastlinskim tkivom). Za hitro in občutljivo zaznavo škode, ki jo povzročajo tako mikroorganizmi kot ektoparaziti, uporabljajo transmembranske receptorje za prepoznavo vzorcev (PRR, angl. pattern recognition receptor). Rastlinske molekule PRR zaznavajo s patogenom povezane molekulske vzorce (PAMP, angl. pathogen-associated molecular pattern) ali molekulske

vzorke, povezane s poškodbo (DAMP, angl. damage-associated molecular pattern) (Zipfel, 2014).

Za zaščito pred rastlinojedimi žuželkami imajo rastline razvite direktne in indirektne obrambne mehanizme. Direktni mehanizmi za zaščito so mehanske prepreke (npr. listni laski) ter sinteza obrambnih spojin, med indirektne pa štejemo hlapne organske spojine (volatile) in izvencvetni nektar, ki privabijo parazitoide in plenilce rastlinojedih žuželk (Chen, 2008). Nekateri obrambni mehanizmi so inducibilni, saj se vklopijo šele ob napadu žuželk oziroma mehanski poškodbi tkiva, kar rastlina zazna preko molekul PRR (Ferry in sod., 2004; Gaquerel in sod., 2009; Zipfel, 2014). Rastline so sposobne ločiti mehansko poškodbo od napada rastlinojedih žuželk, saj zaznajo prisotnost patogena tudi preko oralnih izločkov žuželk- elicitorjev, ki so konjugati maščobnih kislin z aminokislinami. Temu primerno nato prilagodijo svoj odziv (Bonaventure in sod., 2011; Lawrence in sod., 2008; Mori in Yoshinaga, 2011). Zaenkrat je poznanih in okarakteriziranih le malo žuželčjih elicitorjev in še manj rastlinskih molekul PRR, ki te elicitorje prepoznajo (Zipfel, 2014).

Rastlinske molekule PRR aktivirajo imunski odgovor rastlin preko lokalne in sistemske inducirane obrambe. Obramba rastlin pred herbivorimi žuželkami poteče preko signalnih poti, ki vključujejo sistemin, jasmonat, oligogalakturonsko kislino in vodikov peroksid. Osrednjo vlogo pri akumulaciji transkriptov ima jasmonska kislina. Pri tobaku se kot odgovor na napad žuželke prepíše približno 500 različnih mRNA. Odgovor rastlin na napad žuželk poleg indukcije genov, ki omogočijo obrambo rastlin, vključuje tudi zmanjšano transkripcijo genov, ki omogočajo rast. V zaščito rastline, ki je sprožena ob ranitvi, so vključeni različni metaboliti, med njimi so najboljše proučeni PI, ki onemogočijo prebavo rastlinskega tkiva, sekundarni metaboliti, ki služijo direktni obrambi rastlin- to so toksini in repelenti in hlapne molekule, ki služijo indirektni obrambi rastlin (Bolter in sod., 1997; Ferry in sod., 2004; Fidantsef in Bostock, 1998; Mithöfer in Boland, 2012; Rivard in sod., 2004).

Pomen PI v rastlinski obrambi pred rastlinojedimi žuželkami sta v sedemdesetih letih prejšnjega tisočletja odkrila že Green in Ryan (1972). Opazila sta, da se po napadu žuželk

v krompirjevih in paradižnikovih listih močno poveča vsebnost PI, ter da je PI moč inducirati tudi z mehansko poškodbo listov. Da je odziv na napad žuželk močnejši od odziva na mehansko poškodbo, so pokazali na krompirjevih rastlinah, na katerih so se hranile gosenice *Manduca sexta*. Poleg povečanja produkcije PI, je bila v teh rastlinah v primerjavi z mehansko poškodbo povečana tudi sinteza fenolnih spojin ter hlapnih organskih spojin (Korth & Dixon, 1997).

2.2 KOLORADSKI HROŠČ (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Koloradski hrošč spada v red Coleoptera (hrošči) in družino Chrysomelidae (listni hrošči) in je eden izmed najpomembnejših škodljivcev krompirja v mnogih področjih sveta. V Evropo je iz svoje prvotne domovine Severne Amerike prispel kot »slepi potnik«, najprej v Francijo, nato pa se je razširil po vsej Evropi (Vrabl, 1992).

Hrošč je dolg okoli 10 mm, je jajčaste oblike, na trebušni strani sploščen, hrbtna stran pa je polkroglasto izbočena. Temeljna barva telesa je rumeno oranžna, po telesu pa ima številne črne pege in črte. Med očmi na glavi ima črno pego, na vratnem ščitcu 7 do 12 črnih peg. Na pokrovcah ima 10 podolžnih črnih prog. Jajčeca so oranžne barve, podolgovata, valjasta, dolga 1,2 mm; navadno je v skupinah 12 do 80 jajčec. Ličinka ima mehko telo z odebeljenim in dokaj izbočenim zadkom, je svetlo do temno rdečkaste ali oranžno rdeče barve, ima črno glavo, noge in ščitek na hrbtni strani predprsja. Na bočnih straneh telesa ima po dve vrsti črnih pik. Ličinka ima 4 razvojne stadije in ves razvoj v naših podnebnih razmerah traja od 14 do 22 dni; v tem času vsaka ličinka poje skupaj 28 do 30 cm² listja. Buba je umazano rdeče barve, dolga približno 10 mm in je zakopana v tleh približno 30 cm globoko. Po približno 14 dneh se izležejo mladi hrošči, ki kmalu pridejo na prosto. Celoten razvoj od jajčeca do hrošča traja 40 do 60 dni, v optimalnih pogojih pa celo samo 21 dni (Vrabl, 1992). Razvojni krog koloradskega hrošča prikazuje slika 1.

Koloradski hrošč napada liste zelo sorodnih kmetijsko pomembnih rastlinskih vrst iz družine razhudnikovk (Solanaceae), predvsem krompir, lahko pa se hrani še na jajčevcu (*S. melongena*), paradižniku (*L. esculentum*) ter tudi na njihovih divje rastočih sorodnikih *S. nigrum* (črni razhudnik) in *S. dulcamara* (grenkoslad) (Vrabl, 1992).

Pri nas ima koloradski hrošč navadno dva rodova na leto. Hroščki prezimijo v zemlji, proti koncu aprila ali v začetku maja pa pridejo na površje in iščejo krompirišča. Če temperatura naraste čez 20 °C, hrošči tudi letajo. Da bi lahko spolno dozoreli, se morajo dopolnilno hraniti; ena sama samica lahko poje 20 cm² listne površine dnevno. Čim intenzivnejša je prehrana, tem hitrejšje in številnejše je odlaganje jajčec. Ena samica lahko odloži skupaj 400 do 800 jajčec. Jajčeca odlagajo na spodnjo stran krompirjevega listja v skupine. Razvoj jajčec traja od 5 do 12 dni, pri nas se prve ličinke pojavijo konec maja ali v začetku junija, množično pa od sredine do konca junija. V zelo ugodnih letih se lahko pojavi še tretji rod hroščev. V splošnem hrošči drugega rodu povzročijo ekonomsko manjšo škodo, saj je krompir v tem času bujen in gomolji že razviti. Zgodnje sorte krompirja bolj trpijo zaradi poškodb koloradskega hrošča kot pozne (Vrabl, 1992).



Slika 1: Razvojni krog koloradskega hrošča.

Levo zgoraj: jajca odložena na spodnjo stran lista, sredina zgoraj: pravkar izležene ličinke, desno zgoraj: ličinke četrte razvojne faze pri prehranjevanju, levo spodaj: buba, desno spodaj: odrasli koloradski hrošč. Foto (I. Šmid).

Figure 1: Colorado potato beetle life cycle.

Top left: eggs on the bottom side of leaf surface, top middle: first instars larvae, top right: fourth instars larvae, bottom left: pupae, bottom right: adult Colorado potato beetle. Photo (I. Šmid).

2.2.1 Prebavni sistem koloradskega hrošča

Prebavilo žuželk je sestavljeno iz prednjega, srednjega in zadnjega črevesa. Za večji del prebave hrane je odgovorno srednje črevo, ki je s peritrofno membrano ločeno v dva predela, endoperitrofni in ektoperitrofni prostor. Peritrofno membrano sestavljajo hitinski matriks in proteoglikani, ki jih izločajo epiteljske celice prebavil. V membrani so 7-9 nm velike pore, skozi katere selektivno prehajajo prebavni encimi in oligomerni produkti prebavljenih hranilnih polimerov (Terra in Ferreira, 1994). Peritrofna membrana služi kot zaščitna pregrada pred poškodbami črevesne stene ter preprečuje vdor patogenih mikroorganizmov ter omogoča ektoperitrofno kroženje prebavnih encimov in s tem omogoča bolj učinkovito prebavo (Terra in Ferreira, 2005). Pri hroščih je predpostavljen model peristaltiki nasprotnega kroženja vode v prebavilu, pri katerem se delno prebavljena hranila in prebavni encimi prenašajo iz zadnjega dela srednjega črevesa v slepo črevo, kjer se velik del prebavnih encimov reciklira, kar pomeni, da se izločijo nazaj v želodec ali endoperitrofni prostor na začetku srednjega črevesa. Prebavni sistem hroščev se razlikuje tako po kemijskih lastnostih (pH, redoks potencial, vsebnost površinsko aktivnih snovi) kot po kvalitativni in kvantitativni sestavi prebavnih proteinov. pH vrednost je lahko različna v različnih delih črevesa, kar omogoča optimalno delovanje različnih prebavnih encimov. Pri večini hroščev je pH v sprednjem delu srednjega črevesa kisel, v zadnjem pa nevtralen ali rahlo bazičen. V družini Chrysomelidae (listni hrošči), v katero spada tudi koloradski hrošč, je v srednjem črevesu pH rahlo kisel (5.2–6.0) (Terra in Ferreira, 1994). V prebavilih ličink koloradskega hrošča je pH v prednjem črevesu okrog 7.0 in se postopoma zmanjšuje do vrednosti 5.4 v zadnjem delu srednjega črevesa (Krishnan in sod., 2007).

V prebavilih izražajo rastlinojedi hrošči različne prebavne encime, ki jim omogočajo prebavo rastlinskega tkiva. Med najbolj preučevane prebavne encime hroščev spadajo prebavne proteaze, amilaze, celulaze in poligalakturonaze (Gomez-Zurita in Galian, 2005). Za rastlinojede hrošče so omejujoč faktor za rast in razvoj predvsem aminokislina, saj ima rastlinsko tkivo nizko vsebnost proteinov. Za prebavo proteinov pri rastlinojedih hroščih so v največji meri odgovorne cisteinske in aspartatne proteaze, v manjši meri pa še serinske proteaze in metaloproteaze (Brunelle in sod., 1999; Green in Ryan, 1972; Michaud in sod, 1993; Novillo in sod., 1997; Purcell in sod., 1992; Thie in Houseman, 1990; Wolfson in

Murdock, 1987). V endoperitrofnem prostoru prebavne proteaze razgradijo rastlinske proteine do peptidov, ki preidejo skozi peritrofno membrano v ektoperitrofni prostor, kjer jih dokončno razgradijo eksopeptidaze (pretežno aminopeptidaze), vezane na membrano epitelijskih celic srednjega črevesa (Terra in Ferreira, 2005). Posebnost prebavil rastlinojedih hroščev v primerjavi z drugimi žuželkami je, da pri prebavi sodelujejo tudi celulaze in pektinaze, ki jim omogočajo prebavo celuloze in pektina, ki sta eni glavnih komponent rastlinske celične stene (Shen in sod., 2003). V transkriptomu prebavil koloradskega hrošča so identificirali transkripte desetih celulaz, sedem iz družine glikozid hidrolaz 45 (GH45) in tri iz družine glikozid hidrolaz 48 (GH48) ter deset pektinaz iz družine glikozid hidrolaz 28 (GH28), kar kaže, da imajo genske družine prebavnih encimov koloradskega hrošča veliko predstavnikov, kar je najverjetneje ključnega pomena pri prilagoditvi na rastlinske obrambne mehanizme (Pauchet in sod., 2010).

2.2.2 Prilagoditev koloradskega hrošča na rastlinsko obrambo

Koloradski hrošč je, glede na spekter gostiteljskih rastlin, specialist in se uspešno razvija le na nekaterih rastlinah iz rodu *Solanum*. Izvira iz južne Mehike, prehod iz divjih vrst gostiteljskih rastlin na kultiviran krompir pa naj bi se zgodil šele v 19. stoletju v Severni Ameriki, od koder se je zelo hitro razširil v druge dele sveta. Prehod na krompir za hrošča ni zahteval velikih fizioloških sprememb, saj gre za taksonomsko sorodne rastline s podobnimi obrambnimi mehanizmi (Horton in Kapinera, 1988). Gostiteljske rastline so imele velik vpliv na evolucijo koloradskega hrošča. Posledica koevolucije hrošča z rastlinami iz rodu *Solanum*, za katere je poznano, da vsebujejo toksične glikoalkaloide, je njegov širok repertoar detoksifikacijskih encimov, ki mu omogoča hitro prilagoditev tudi na kemične insekticide (Alyokhin in sod., 2008).

Poškodba listov, ki jih povzročijo žuželke, sprožijo v rastlinah obrambni odgovor, ki se med drugim kaže v indukciji in povečani sintezi antinutritivnih in toksičnih faktorjev, vendar pa so rastlinojede žuželke sposobne hitre in učinkovite prilagoditve na rastlinsko obrambo. Najbolj preučena prilagoditev žuželk je prilagoditev na PI, katerih sinteza se inducira pri rastlinah ob napadu žuželk. PI so del rastlinske obrambe in delujejo tako, da v žuželčjih prebavilih preprečujejo učinkovito razgradnjo zaužitih proteinov, kar zmanjša asimilacijo aminokislin iz rastlinskega materiala. Posledica so lahko počasnejša rast in

razvoj ter zmanjšana stopnja preživetja ličink. Žuželke se na ta obrambni odgovor rastlin prilagodijo s spremembami v izražanju prebavnih proteaz ali z zaužitjem večje količine rastlinskega materiala, kar jim omogoča normalno rast in razvoj (Zhu-Salzman in Zeng, 2008). Mehanizmi prilagoditve žuželčjih prebavil na PI v hrani so povišano izražanje obstoječih, na PI občutljivih proteaz (Chi in sod., 2009; Moon in sod., 2004; Zhu-Salzman in sod., 2003), indukcija »adaptivnih« na PI neobčutljivih proteaz (Ahn in sod., 2004; Bolter in Jongsma, 1995; Bown in sod., 1997; Gruden in sod., 1998; Jongsma in sod., 1995; Koo in sod., 2008; Mazumdar-Leighton in Broadway, 2001; Zhu-Salzman in sod., 2003), preklop iz enega tipa (npr. cisteinskih) prebavnih proteaz na drug tip (npr. serinskih) (Oppert in sod., 2005; Oppert in sod., 2010) in aktivacija proteaz, ki proteolitično cepijo in tako inaktivirajo PI (Ahn in sod., 2004; Gruden in sod., 2003; Michaud in sod., 1995; Zhu-Salzman in sod., 2003). Hitra kvantitativna in/ali kvalitativna prilagoditev kapacitete prebavnih proteaz določene vrste žuželk, ki vzpostavi adaptacijo na proteazne inhibitorje v hrani, omogoči normalen potek razvoja in rasti žuželk (Jongsma in sod., 1995).

Biokemijske in molekularne študije prilagoditve ličink koloradskega hrošča na rastlinsko obrambo so bile osredotočene na spremembe proteazne aktivnosti prebavil in izražanja genov za prebavne proteaze. Za razgradnjo zaužitih proteinov koloradski hrošč uporablja predvsem cisteinske proteaze, prisotne pa ima tudi aspartatne proteaze in v manjši meri še serinske in metaloproteaze (Bolter in Jongsma, 1995; Novillo in sod., 1997; Wolfson in Murdock, 1987). V krompirjevih listih se kot del endogene obrambe krompirja pred herbivorimi žuželkami poveča vsebnost PI. Ličinke se na povečano vsebnost PI v krompirjevih listih prilagodijo (adaptirajo) s povečano produkcijo glavnih prebavnih proteaz in s povečano produkcijo cisteinskih proteaz neobčutljivih na proteazne inhibitorje (Bolter in Jongsma, 1995; Gruden in sod., 1998). Tri adaptivne cisteinske proteaze, ki so jih izolirali iz prebavil koloradskega hrošča, prilagojenega na endogeno obrambo krompirja, so poimenovali intestaini. Intestaini imajo različne substratne specifičnosti in inhibitorne profile, eden od njih je celo sposoben cepitve cistatina (Gruden in sod., 2003). Nadalje so intestaine klasificirali v skupine A, B in C, ter ugotovili, da je izražanje genov, skupin A in C, ob prilagajanju na endogeno obrambo krompirja dvakrat povišano (Gruden in sod., 2004). Petek in sod. (2012) so nadalje potrdili, da se koloradski hrošč na endogeno obrambo krompirja prilagodi s sintezo adaptivnih prebavnih proteaz. Poleg intestainov

skupin A, B in C so izolirali še transkripte intestainov, ki so jih poimenovali intestaini skupin D in E. Tudi izražanje intestainov skupine D je ob inducirani obrambi krompirja povišano. Ugotovili so tudi, da se koloradski hrošč ne prilagodi zgolj na nivoju adaptivnih prebavnih proteaz intestainov, temveč tudi na nivoju ostalih metabolitov. Ob prilagoditvi na endogeno obrambo krompirja se v prebavilu koloradskega hrošča poviša tudi izražanje serinskih proteaz ter genov, ki kodirajo kimotripsin, celulaze družine GH45, alfa-amilaze, poligalakturonaze in defenzinov. V prilagoditev koloradskega hrošča na endogeno obrambo krompirja so vključeni tudi geni, ki kodirajo proteine, ki vežejo juvenilne hormone (juvenile hormone binding protein-like, JHBP-like). Hkrati pa je v prebavilu ličink koloradskega hrošča znižano izražanje celulaze GH48-1 (Petek in sod., 2012).

Petek in sod. (2012) so v poskusu ličinke koloradskega hrošča hranili s krompirjem, v katerem so z metil jasmonatom predhodno inducirali endogeno obrambo. Metil jasmonat je spojina, ki v rastlinah aktivira isto signalno pot kot napad herbivorih žuželk. V prebavilu ličink koloradskega hrošča, hranjenih s tako prilagojenim krompirjem, so opazovali spremembe v izražanju genov. Ugotovili so, da v veliki meri sovpadajo s spremembami, ki jih povzroči prisotnost dodanih PI v hrani ličink (Chi in sod., 2009; Govind in sod., 2010; Moon in sod., 2004; Oppert in sod., 2010). Podobne spremembe v izražanju genov so najverjetneje posledica tega, da je povečano izražanje PI najvplivnejši del odgovora endogene rastlinske obrambe. Druga možnost, ki razlaga opisani pojav pa je, da se pri ličinkah ob neugodnih prehranskih razmerah sproži ista regulatorna pot, ki vodi v spremenjeno sintezo prebavnih encimov (Petek in sod., 2012).

2.2.3 Konvencionalni pristopi zatiranja koloradskega hrošča

Najpogostejši način zatiranja koloradskega hrošča je uporaba kemičnih insekticidov, saj je prav koloradski hrošč v največji meri odgovoren za razvoj industrije pesticidov. Samo v ZDA je trenutno registriranih več kot 30 insekticidnih snovi za zatiranje koloradskega hrošča. Vendar pa je koloradski hrošč sposoben izredno hitre prilagoditve na kemične insekticide in je tudi razvil odpornost proti velikemu številu (□50) registriranih sintetičnih insekticidov različnih kemijskih skupin, ki se uporabljajo za varstvo krompirja pred tem škodljivcem (Alyokhin in sod., 2008; Whalon in sod., 2014). Zato se pojavlja potreba po učinkovitejšem nadzoru koloradskega hrošča in iskanju alternativnih načinov zatiranja.

Mehanizmi odpornosti koloradskega hrošča proti kemičnim insekticidom so: povišan metabolizem s povečanim izražanjem esteraz, karboksilesteraz in monooksigenaz, neobčutljivost tarčnih mest, zmanjšanje penetracije in povečano izločanje insekticidov. Visoka predispozicija za razvoj odpornosti pri koloradskemu hrošču je posledica mnogih dejavnikov. Prvi je ta, da se hrošči hranijo le z rastlinami iz družine Solanaceae, ki vsebujejo v listih toksične glikoalkaloide – koloradski hrošč je v koevoluciji s svojo rastlino razvil sposobnost detoksifikacije ali pa tolerance do toksinov. Drugi dejavnik, ki vpliva na razvoj odpornosti koloradskega hrošča, je visoka rodnost, kar poveča verjetnost pojava naključnih mutacij ter hkrati zagotavlja hitro razširitev za hrošča ugodnih mutacij. Tretji dejavnik pa je, da se koloradski hrošč na vseh stopnjah razvoja hrani z isto rastlino, kar zmanjša velikost možnih pribežališč, kjer bi občutljivi osebki lahko preživeli (Alyokhin in sod., 2008).

Za preprečevanje pojava odpornosti proti insekticidom so v uporabi priporočila za ravnanje z njimi. Glavne točke priporočil so: uporaba insekticidov z različnim načinom delovanja v zaporednih letih, pomen pravilnega odmerjanja insekticidov, uporaba pribežališč brez nanosa insekticidov, spremljanje učinkovitosti insekticidov ter hkratna uporaba nekemičnih načinov za zatiranje (Alyokhin in sod., 2008). Poleg kemičnih insekticidov se namreč uporabljajo še drugi načini obvladovanja koloradskega hrošča, ki vključujejo kolobarjenje, klasično pobiranje ličink in odraslih žuželk na polju in zgodnejše/poznejše sajenje krompirja (Alyokhin in sod., 2008; Weber in Ferro, 1995). Prav tako so preizkušali pridobiti odpornejše sorte krompirja s križanjem z divjimi sorodniki krompirja (Rangarajan in sod., 2000).

Koloradskega hrošča v naravi uničujejo nekatere ptice, majhni sesalci in plazilci ter nekatere žuželke. Od zajedavcev se pojavljajo muhe goseničarke in nekatere glive (Vrabl, 1992). Biološke metode vključujejo uporabo teh naravnih sovražnikov, to je plenilcev, parazitov in patogenih organizmov. Plenilci so običajno žuželke različnega ali istega reda, ki se prehranjujejo z jajci in ličinkami (Coll in sod., 1994), s čimer razredčijo populacijo hroščev in zmanjšajo škodo na listih. Paraziti so običajno tudi žuželke, ki parazitirajo na jajcih ali ličinkah koloradskega hrošča (Gelman in sod., 2000). Nematode običajno preživijo v ličinkah, redkeje v odraslih žuželkah in jih izčrpajo do smrti (Berry in sod.,

1997). Pomembni patogeni organizmi so predvsem glive, ki okužijo jajca ali ličinke (Long in sod., 1998). Poleg entomopatogene glive *Beauveria bassiana* se kot biološki insekticid, smrtonosen za ličinke koloradskega hrošča, uporablja tudi bakterija *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Lacey in sod., 1999).

2.3 GENSKO SPREMENJENE RASTLINE, ODPORNE PROTI ŽUŽELKAM

Koloradski hrošč je le ena izmed mnogih žuželk, ki v kmetijstvu povzročajo škodo in predstavljajo velik strošek pri pridelavi poljščin. Nabor raziskav, usmerjenih v odpornost proti žuželkam s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA, je širok. Gene, zanimive za vnos v poljščino, ki jo želimo izboljšati, lahko določimo z opazovanjem strategij, ki jih za zaščito uporabljajo drugi organizmi. Večina tovrstnih raziskav uporablja gene drugih rastlin ali bakterij, redkeje tudi živali in gliv. Prednost uporabe GSR odpornih proti škodljivcem je v zmanjšani porabi fitofarmaceutskih sredstev, ki lahko poleg zaščite rastlin predstavljajo tveganje za okolje in netarčne organizme (Alyokhin in sod., 2008; Christou in sod., 2006; Gatehouse in sod., 2011; Gatehouse, 2008).

Vzgoja odpornejših sort je sicer že dolgo eden pomembnejših ciljev klasičnih žlahtniteljskih programov, kjer se izkoriščajo naravni mehanizmi odpornosti rastlin proti škodljivim žuželkam. Te mehanizme lahko razdelimo v tri sklope: morfološke prepreke za žuželke (npr. dlakavost listov), prisotnost repelentov (odvrčanje žuželk) in vsebnost strupenih snovi (odvrčanje ali toksičnost za žuželke) (Bohanec, 2004). Vendar pa so klasične metode žlahtnjenja v primerjavi s tehnologijo rekombinantne DNA veliko počasnejše in omogočajo le prenos genov med sorodnimi sortami rastlin.

GSR so v svetovnem merilu že dobro uveljavljene. Leta 2013 so rastle na 1,75 M km², kar glede na definicijo kmetijskih zemljišč organizacije FAO (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations), predstavlja približno 12 % površin, namenjenih pridelavi rastlin (Clive, 2014). GSR odporne proti žuželkam predstavljajo eno izmed najbolj uveljavljenih in razširjenih skupin GSR prisotnih na tržišču (Gatehouse, 2008; Vasconcelos in Oliveira, 2004). Tovrstne rastline, poleg povečanja pridelka, omogočajo manjšo uporabo pesticidov in znižajo stroške pridelave. Izmed celotnih površin z GSR so leta 2012 rastline odporne proti žuželkam rastle na 15 % površin (26,1 M ha), na katerih

rastejo GSR, na 26 % površin (43,7 M ha) pa so rastle rastline, ki so bile hkrati odporne proti žuželkam in tolerantne na herbicide, ali pa so imele vnesenih več genov za odpornost proti žuželkam (Clive, 2012).

Do sedaj je za pridelavo GSR najbolj uveljavljena strategija za odpornost rastlin proti žuželkam z vnosom genov izoliranih iz različnih podvrst bakterije *B. thuringiensis* (geni Bt). Vendar pa z geni Bt ni mogoče pridobiti odpornosti proti vsem škodljivim žuželkam. Prav tako se že pojavlja odpornost proti toksinu Bt, zato je področje raziskav mnogo širše in obsega prenos rastlinskih genov za lektine, proteazne inhibitorje in mnoge druge gene (Ferry in sod., 2004; Tabashnik in sod., 2013; Vandenborre in sod., 2011).

V nadaljevanju so tako predstavljeni različni pristopi za pridobitev odpornosti GSR proti žuželkam, s poudarkom na doslej najbolj uveljavljeni strategiji z uporabo toksina Bt, ki predstavlja pomembno izhodišče za nove raziskave in aplikacije. Predstavljeni so še PI, lektini, inhibitorji α -amilaz in nekateri ostali metaboliti, ki lahko povečajo odpornost proti žuželkam pri GSR.

2.3.1 Toksini Bt iz bakterije *Bacillus thuringiensis*

Bakterija *B. thuringiensis* v obdobju sporulacije tvori insekticidni kristalni protein, ki je sestavljen iz ene ali več proteinskih podenot, ki jih imenujemo protoksini, proteini Cry ali proteini Bt. Ena glavnih prednosti proteinov Bt za uporabo je njegova neškodljivost za ljudi, sesalce in večino neciljnih organizmov. Proteini Bt ne delujejo insekticidno proti vsem žuželkam, temveč proti škodljivcem redov Lepidoptera (npr. koruzna vešča), Coleoptera (npr. koloradski hrošč) in Diptera. Poznanih je mnogo (>50) različnih proteinov Bt iz mnogo podvrst *B. thuringiensis* (Bohanec, 2004).

Pri hranjenju ličink s spori *B. thuringiensis* insekticidni kristalni protein pod vplivom visokega pH prebavnih sokov in črevesnih proteaz razpade na protoksine. Proteaze nato specifično cepijo protoksine na več proteinskih podenot, od katerih manjši polipeptidi nosijo toksično aktivnost proteina Bt in določajo njegovo specifičnost za žuželke posameznih vrst. Toksini se vežejo na receptorje v zunanem delu epitelne membrane črevesa žuželke ter inducirajo nastanek ionskih kanalov ali pa nespecifičnih por v

membrani. Posledica je propad črevesa, žuželka se preneha hraniti in odmre (Bohanec, 2004).

Leta 1985 so v Plant Genetic System, Ghent v Belgiji kot prvo podjetje proizvedli transgeno rastlino tobakovca, odporno proti določenim žuželkam, ki so občutljive na toksin Bt. GSR z ekspresijo genov iz bakterije *B. thuringiensis* so danes že v komercialni uporabi. Prve transgene rastline, koruza z ekspresijo toksina CryIA(b) (Maximizer™ iz Novartisa), bombaž z ekspresijo CryIA(c) (Bollgard™, Monsanto), ter krompir z vstavljenim CryIIIA (Newleaf™, Monsanto) so bile že leta 1995 v ZDA odobrene za prodajo na trgu (Maagd in sod., 1999). GS krompir, ki ga je Monsanto tržil pod imenom NewLeaf, so leta 2000 umaknili iz tržišča (Romeis, 2006), površina pridelovanja GS koruze in bombaža z vstavljenimi geni, ki kodirajo različne toksine Bt, pa se od leta 1995 naprej vsako leto povečuje (Clive, 2014)

Bakterija *B. thuringiensis* v fazi vegetativne rasti proizvaja tudi proteine Vip (angl. vegetative insecticidal proteins, vegetativni insekticidni proteini). Proteini Vip imajo širši insekticidni spekter kot proteini Cry. Proteini Vip in Cry imajo le delno homologna zaporedja. Tudi proteini Vip so se izkazali uporabni za vnos v rastline (Christou in sod., 2006).

2.3.1.1 Razvoj odpornosti proti toksinu Bt pri občutljivih populacijah žuželk

Ugotovili so, da občutljive populacije žuželk lahko hitro postanejo odporne proti toksinu Bt, saj naj bi bilo za pridobitev odpornosti potrebno le manjše število mutacij. Nekateri avtorji trdijo, da je za odpornost potreben le en gen, drugi pa predvidevajo, da gre za kvantitativno lastnost in da je pojav odpornih žuželk malo verjeten pojav (Christou in sod., 2006).

Izdelane so različne strategije za ravnanje s tveganjem razvoja odpornosti s skupnim ciljem zmanjšanja verjetnosti fiksacije recesivnih genov za odpornost proti proteinu Bt v populaciji občutljivih škodljivcev. Med te strategije štejemo:

- uporaba pribežališč (netransgene rastline poleg transgenih),

- strategija visoke koncentracije toksina v rastlini (povečanje ekspresije proteina Bt, primer je transformacija plastidov- tu je ekspresija mnogo višja, prednost je, ker se plastidno kodirane lastnosti prenašajo po ženski liniji in tako cvetni prah ne vsebuje transgena, težava je v tem, da transformacije plastidov niso stabilne),
- uporabo različnih promotorjev (npr. tkivno specifično izražanje toksina),
- »piramido toksinov« (v rastlini je več genov, ki kodirajo toksine- rezistenca se težje razvije, poleg tega so rastline tako odporne proti širšemu spektru škodljivcev- ni toliko škode zaradi sekundarnih škodljivcev) (Bohanec, 2004; Gatehouse, 2008).

Kljub intenzivni uporabi GSR z vnesenim toksinom Bt, je večina škodljivcev še vedno občutljivih nanj. K taki učinkovitosti so seveda pripomogle prej navedene strategije. Kljub vsemu pa se pojavljajo posamezne odporne populacije škodljivih žuželk – leta 2005 šele ena odporna populacija ene vrste žuželk, leta 2013 pa že 5 populacij odpornih vrst škodljivcev izmed 13 preiskovanih škodljivcev (Tabashnik in sod., 2013). Potreba po iskanju novih insekticidnih sredstev za vnos v rastline tako še vedno ostaja aktualna, prav tako pa razvoj metod za preprečevanje pojava odpornosti pri škodljivcih.

2.3.1.2 Proteinski inženiring toksinov Bt

Proteinski inženiring Cry toksinov so uporabili za študij delovanja teh proteinov, hkrati pa so na ta način dobili mnoge nove rekombinantne proteine. Pri toksinih Bt, sestavljenih iz treh domen, so z zamenjavami teh domen med različnimi toksini Bt pridobili nove toksine Bt z novimi insekticidnimi lastnostmi (Gatehouse, 2008).

Drugi pristop povečanja insekticidnosti toksinov Bt proti tarčnim organizmom je z usmerjeno mutagenezo. Ključna vloga domene II pri tridomenskih proteinih Cry je vezava na žuželčje receptorje, zato je ta domena, še posebej zanka v tej domeni, pogosto tarča usmerjene mutageneze. Primer je mutacija gena, ki kodira protein Cry1Ab, s katero so za kar 40-krat povečali toksičnost za ličinke molja *Lymantria dispar* (Rajamohan in sod., 1996). Drug primer je, ko so z mutacijo toksina Cry1Aa dobili iz toksina, specifičnega proti ličinkam komarja toksin, ki je deloval insekticidno proti metuljem (Liu in Dean, 2006).

Na tržišču je prisotna koruza MON863, ki je odporna proti hrošču *Diabrotica virgifera*, ki vsebuje modificiran gen, ki kodira protein CryBb1. Nemodificiran CryBb1 deluje toksično na mnoge hrošče, vendar pa proti hrošču *D. virgifera* ne deluje zadostno, da bi ga pri koruzi komercialno uporabili. S specifično mutagenozo so ustvarili mnogo variant proteina, ki je imel povečano sposobnost tvorjenja kanalčkov. Mutacije so bile usmerjene v povečano hidrofobičnost domene I, povečanje mobilnosti heliksov v domeni I, povečanje mobilnosti in fleksibilnosti zank v domeni I in v še nekatere tarče. S temi mutacijami so pridobili protein z 8-kratnim povečanjem toksičnosti proti zelenemu organizmu, ki je bil primeren za vnos v koruzo (English, 2004).

2.3.1.3 Rastline z multiplimi toksini

Razvoj na področju rastlinske biotehnologije omogoča hkraten vnos več genov v rastlino, poleg tega pa postaja vse širši tudi spekter rastlin, ki jih je mogoče transformirati (tudi enokaličnice). Hkraten vnos lahko omogoča odpornost rastline proti več škodljivcem hkrati, vedno pogosteje pa vnos več genov hkrati omogoča poleg odpornosti proti žuželkam še toleranco na herbicide. Primer je koruza, v katero so hkrati vnesli šest genov, ki ji omogočajo odpornost proti žuželkam reda Lepidoptera in hrošču *Diabrotica virgifera* ter dva gena, ki omogočata toleranco na herbicide (Gatehouse, 2008).

Pri bombažu s hkrati vnesenima genom Cry1Ac, ki kodira toksin Bt in genom, ki kodira inhibitor tripsina iz črnega fižola (CpTI, angl. cowpea trypsin inhibitor), so ugotovili, da dva vnesena gena povečata odpornost bombaža proti molju *Helicoverpa armigera* v laboratorijskih pogojih v primerjavi z linijo, ki izraža le toksin Bt. Ko pa so primerjali transgeni liniji v poljskih poskusih, med njima ni bilo statistično značilnih razlik (Cui in sod., 2011).

2.3.2 Zatiranje koloradskega hrošča z biotehnoškim pristopom

Krompir je bil eden izmed prvih komercialno dostopnih GSR. Tehnologija rekombinantne DNA je že omogočila pripravo transgenega krompirja odpornega proti koloradskemu hrošču z vnosom gena *cryIIIa*, ki nosi zapis za toksin Bt, ki izvira iz bakterije *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Pri tem GS krompirju se razvoj ličink ustavi v prvi stopnji

(Perlak in sod., 1993). Za GS krompir z vstavljenim genom *cryIIIA*, z imenom NewLeaf®, je podjetje Monsanto dobilo dovoljenje za pridelavo in trženje v ZDA že leta 1995. Poleg krompirja New Leaf®, sta bila od leta 1997 komercialno dostopni še različici NewLeaf Y®, ki ima poleg zapisa za toksin Bt še gen za odpornost proti krompirjevemu virusu Y in NewLeaf Plus®, ki ima poleg zapisa za toksin Bt še zapis za odpornost proti virusu PLVR (angl. potato leaf roll virus). Sorte NewLeaf® so bile najhitreje sprejete sorte krompirja v zgodovini ZDA, vendar so jih že leta 2000 umaknili iz tržišča. Razlogov za umik iz tržišča je bilo mnogo, med njimi je bil najbrž odločilna premajhna rast trga, prav tako je na umik vplival sočasen prihod novega zelo učinkovitega insekticida imidakloprida, McDonald'sova odločitev o prepovedi GSR v njihovih restavracijah ter mednarodne trgovske ovire. V tem času je bil GS krompir v ZDA gojen šele na 3 %, kar je še dodatno vplivalo na odločitev o prenehanju prodaje NewLeaf® kultivarjev (Grafius in Douches, 2008). Za NewLeaf® kultivarje so potrdili, da nimajo škodljivih vplivov na ljudi, živali in rastline (Lawson in sod., 2001; Mullins in sod., 2006). Kljub umiku GS linij krompirja iz tržišča biotehnološki pristop ostaja eden izmed najobetavnejših pristopov za pripravo odpornih sort krompirja.

2.3.3 Proteazni inhibitorji

Žuželke za razgradnjo proteinov uporabljajo različne skupine prebavnih proteaz, zato je en izmed možnih načinov zaščite rastlin pred škodljivci uporaba PI, ki preprečijo normalno razgradnjo proteinov v hrani. Dodatek PI v hrani žuželk lahko povzroči upočasnjeno rast in razvoj ličink, zmanjša plodnost, v nekaterih primerih pa poveča umrljivost žuželk (Bolter in Latoszek-Green, 1997; Wolfson in Murdock, 1987).

PI so pri rastlinah zelo pogosti, največkrat se pojavljajo v semenih in založnih organih, kjer lahko predstavljajo 1-10 % vseh proteinov. Njihova molekulska masa je od 4-80 kDa. Večina PI, ki se pojavljajo v založnih organih rastlin, ne zavira delovanja rastlinskih proteaz, ampak so specifične za živalske ali mikrobne proteaze (Gatehouse, 1994). Rastlinski PI lahko torej delujejo kot endogena obramba rastlin pred patogenimi, parazitskimi in herbivorimi organizmi. Delujejo tarčno proti virulentnim faktorjem fitopatogenih bakterij, gliv, parazitov in virusov ali pa delujejo tarčno proti prebavnim proteazam herbivorih škodljivcev (npr. žuželk, pršic, polžev) in jim na ta način preprečijo

dostop do organskega dušika, ki ga potrebujejo za rast in razvoj (Haq in sod., 2004; Ryan, 1990). Signal, ki sproži sintezo PI, je ranitev in hranjenje žuželk z rastlinskim tkivom. Sinteza inhibitorjev se sproži preko oktadekanojske poti, ki katalizira razpad linolenske kisline (linoleic acid) in nastanek jasmonske kisline, kar inducira ekspresijo PI (Haq in sod., 2004).

PI so primarni produkti genov in so kot taki odlični kandidati za vnos v rastline z namenom odpornosti proti žuželkam. Najbolj raziskani so geni, ki izvirajo iz rastlin. PI so lahko aktivni tudi proti nematodnim, virusnim, bakterijskim in glivnim patogenom in bi tako lahko omogočili hkratno odpornost proti mnogim patogenom. Prednost PI je tudi v tem, da nimajo toksičnih in škodljivih učinkov na sesalce (Haq in sod., 2004).

PI na podlagi homologij, topoloških značilnost (disulfidni mostički) in reaktivnega mesta razdelimo v več skupin. Do danes odkriti PI so specifični za 4 skupine proteaz in jih na podlagi aminokisline v reaktivnem centru ločimo na serinske, cisteinske, aspartatne in metalo-proteazne inhibitorje. PI delujejo tako, da tvorijo stabilne komplekse s tarčnimi proteazami in na ta način blokirajo njihovo delovanje, lahko pa tudi spremenijo ali onemogočijo dostop do aktivnega mesta encima. Najbolj raziskana skupina PI, ki izvirajo iz rastlin, so inhibitorji serinskih proteaz, ki jih delimo na več družin: sojino (Kunitzova), Bowman-Birkovo, krompirjevo I in II in še nekatere. PI sojine (Kunitzove) skupine imajo molekulsko maso 18-22 kDa, eno ali dve polipeptidni verigi, nizko vsebnost cisteina (ponavadi 4 Cys ostanki in 2 disulfidna mostička) in eno reaktivno mesto. PI Bowman-Birkove skupine pa imajo nižjo molekulsko maso (8-10 kDa), visok delež cisteina in dve reaktivni mesti. Druga najbolj raziskana skupina so inhibitorji cisteinskih proteaz. Odkrili in raziskali so jih pri mnogih rastlinah, npr. pri fižolu, krompirju, zelju, ambroziji, korenju, papaji, avokadu, kostanju, sončnici, rižu, pšenici, koruzi, soji in sladkornem trsu. Od do sedaj preizkušenih transgenih rastlin z vnesenimi PI, so se kot najbolj obetavni izkazali prav inhibitorji cisteinskih proteaz. To pa najbrž zato, ker imajo rastlinojede žuželke v prebavnem traktu najpogosteje prisotne te proteaze. Inhibitorji aspartatnih proteaz so precej slabo proučeni, ker so zelo redki. Pri krompirju so odkrili inhibitor aspartatne proteaze katepsina D. Tudi inhibitorji metaloproteaz so pri rastlinah precej redki. Primer so

inhibitorji metalo-karboksipeptidaz pri paradižniku in krompirju (Haq in sod., 2004; Lawrence in Koundal, 2002).

Prvi gen rastlinskega izvora, s katerim so uspešno transformirali rastlino z namenom povečane odpornosti proti žuželkam, je bil gen, ki kodira inhibitor tripsina. Gen za inhibitor tripsina CpTI so izolirali iz črnega fižola (*Vigna unguiculata*). CpTI je protein iz 80 aminokislinskih ostankov, ki je učinkovit antimetabolit, saj deluje proti širokemu spektru škodljivcev: proti mnogim metuljem (Lepidoptera), kobilicam (Orthoptera) in hroščem (Coleoptera). Deluje tako proti škodljivcem na polju, kot tudi proti škodljivcem, ki se prehranjujejo s shranjenimi pridelki. Pri vnosu gena za CpTI s konstitutivnim promotorjem CaMV 35S, je v transformiranih rastlinah protein predstavljal do 1 % topnih proteinov. Transgeni tobak je ob napadu ličinke *Heliothis virescens*, ki je eden glavnih škodljivcev na tobaku, ostal skorajda nepoškodovan, netransformirane rastline pa so ličinke popolnoma uničile. S prehranjevalnim testom so pokazali, da CpTI ni toksičen za sesalce (Gatehouse, 1994).

PI, katere so vnesli v rastline z namenom povečane odpornosti proti herbivorom, so večinoma rastlinskega, nekateri pa tudi živalskega izvora (Haq in sod., 2004). Primer živalskega inhibitorja, ki so ga vnesli v tobak, je inhibitor tripsina iz vranice goveda. Le ta je v prehranjevalnem poskusu z ličinkami *Helicoverpa armigera*, kjer je inhibitor predstavljal 0,5 % topnih proteinov, zmanjšal stopnjo preživetja in rast ličink (Christeller in sod., 2002).

Kljub temu, da so se transgene rastline, ki izražajo PI, v prehranjevalnih testih v laboratorijskih poskusih pogosto izkazale za odpornejše v primerjavi z netransgenimi, je zaenkrat edini komercialni primer uporabe PI za zaščito v obliki GSR bombaž, ki ima poleg toksina Bt vnesen še gen, ki kodira CpTI in nudi zaščito pred ličinkami metuljev. Razloga, ki vplivata na pomanjkanje učinkovitosti do sedaj poznanih PI, sta njihova nizka specifičnost in prilagodljivost prebavnih sokov herbivorih žuželk. Prilagodljivost prebavnih sokov je posledica genetske raznolikosti proteaz. Kljub vsemu imajo PI potencial za komercialno uporabo kot učinkoviti insekticidni proteini. Adaptacijo žuželk nanje je namreč mogoče zmanjšati z uporabo z mutagenozo spremenjenih PI, uporabimo

pa lahko tudi PI z multiplimi funkcijami, ki bi poleg vpliva na prebavne procese, vplivali še na druge procese. Možen pa je tudi hkraten vnos večih PI ali vnos PI v kombinaciji z drugimi proteini, ki omogočajo zaščito pred žuželkami (npr. lektini) (Christou in sod., 2006; Gatehouse, 2011).

Primer sočasne uporabe dveh PI so v nedavni raziskavi pokazali Quilis in sod. (2014), ki so pripravili GS riž, ki je izražal fuzijski gen, ki je kodiral dva PI. Prvi PI je inhibiral žuželčje serinske proteaze in izhaja iz koruze, drugi PI pa je bil karboksipeptidazni inhibitor iz krompirja. Izražanje fuziranega gena je bilo regulirano z inducibilnim promotorjem. GS riž, ki je izražal fuzirana proteina, je bil odporen proti metulju *Chilo suppressalis*, ki je eden glavnih žuželčjih škodljivcev na rižu. Ta raziskava predstavlja novo strategijo za zaščito rastlin pred žuželkami s PI.

2.3.3.1 Uporaba PI za obvladovanje koloradskega hrošča

Uporaba PI iz različnih rastlinskih in živalskih virov za obvladovanje koloradskega hrošča, se je izkazala za bolj ali manj uspešno. Tako so za oryzacistatin pokazali, da *in vitro* inhibira prebavne proteaze koloradskega hrošča (Michaud in sod., 1996). Ličinke koloradskega hrošča, ki so jih hranili z listi transgenega krompirja, ki je izražal oryzacistatin I, so pokazale do 20 odstotno višjo umrljivost v primerjavi s kontrolo, odvisno od stopnje izražanja oryzacistatina v transgeni rastlini (Lecardonnell in sod., 1999). Po drugi strani transgeni krompir, ki izraža oryzacistatin I, ni imel vpliva na odrasle koloradske hrošče, nasprotno, zaradi prehranjevalnega stresa, so le-ti v primerjavi s kontrolnimi hrošči zaužili nekajkrat večjo površino listov (Brunelle in sod., 2004). Inhibitorji cisteinskih proteaz iz soje in proregija cisteinske proteaze IV iz papaje so se prav tako izkazali za dobre inhibitorje prebavnih proteaz koloradskega hrošča (Lalitha in sod., 2005; Visal in sod., 1998). Tudi transgeni krompir, ki izraža cistatin iz ječmena, je povzročil pri ličinkah koloradskega hrošča zmanjšano pridobivanje teže (Alvarez-Alfageme in sod., 2007). Ekvistatin, inhibitor cisteinskih proteaz tiropinskega tipa iz morske vetrnice *Actinia equina*, se je izkazal kot učinkovit inhibitor adaptivnih prebavnih proteaz. V prehranjevalnih testih je močno vplival na rast ličink ter povzročil do 50 odstotno višjo umrljivost. Priprava transgenega krompirja, ki bi izražal ekvistatin, se ni

posrečila, saj je v rastlini prišlo do njegove razgradnje (Gruden in sod., 1998; Outchkourov in sod., 2003). Za začetno hidrolizo proteinov pri koloradskem hrošču so odgovorne aspartatne proteaze, podobne katepsinu D. Da bi preverili vpliv inhibicije te začetne hidrolize, so pripravili transgeni krompir, ki izraža inhibitor katepsina D iz paradižnika. Ličinke koloradskega hrošča, ki so se hranile na tem krompirju, so se hitro prilagodile na prisotnost inhibitorja v hrani (Brunelle in sod., 2004). Nadaljnje študije so pokazale, da hibridni inhibitor sestavljen iz inhibitorja aspartatnih proteaz iz paradižnika in inhibitorja cisteinskih proteaz cistatina II iz koruze, učinkovito inhibira oba tipa proteaz, kar nakazuje novo strategijo načrtovanja široko-spektralnih hibridnih inhibitorjev za učinkovito obvladovanje koloradskega hrošča (Brunelle in sod., 2005). Tudi inhibitorji serinskih proteaz živalskega izvora so pokazali negativen učinek na rast ličink koloradskega hrošča. Ličinke, ki so se hranile z listi transgenega krompirja, ki je izražal dva inhibitorja serinskih proteaz iz puščavske kobilice, so rasle počasneje od kontrolnih ličink (Konrák in sod., 2005). PI žuželčjega izvora so tako obetavni kandidati za potencialno uporabo pri zaščiti rastlin. Prav tako so za piramidenje PI za zaščito pred koloradskim hroščem uporabili gena *OCI* in *OCII* iz riža, kjer so pokazali da ima hkratna transformacija z dvema genoma aditivni efekt (Cingel in sod., 2014).

2.3.4 Lektini

Lektini so ubikvitarni (gliko)proteini, ki se specifično vežejo na ogljikove hidrate (Lam in Ng, 2011). Pri rastlinah predstavljajo obrambno vlogo pred žuželkami in patogenimi mikroorganizmi (Peumans in Van Damme, 1995). Za mnoge rastlinske lektine so pokazali, da delujejo insekticidno na žuželke iz redov Coleoptera, Homoptera, Diptera in Lepidoptera. Delujejo kot antimetabolni proteini, ki zavirajo prebavne procese žuželk, poleg tega pa jih encimi, prisotni v gastrointestinalnem traktu žuželk, ne morejo razgraditi. Lektini vežejo sladkorje in porušijo ravnovesje metabolizma z zaviranjem encimatskega delovanja posredno ali neposredno preko vezave glikoziliranih prebavnih encimov ali glikoziliranih receptorjev na epiteljskih celicah prebavnega trakta žuželk. Posledica tega so lahko številni škodljivi lokalni in sistemski učinki. Lokalni učinki lektinov so vpliv na deljenje ali izgubo črevesnih epiteljskih celic, poškodovanje luminalne membrane črevesnega epitelijskega, motenje prebave in absorpcije hranil, vplivi na spremembe v bakterijski flori in na imunsko stanje v prebavnem traktu. Sistemski učinki so prekinitev

metabolizma ogljikovih hidratov, lipidov in proteinov, povečanje in/ali atrofija notranjih tkiv in organov in sprememba hormonalnega in imunskega stanja. Če živali zaužijejo velike količine lektinov, lahko to ogrozi njihovo zdravje in rast (Michiels in sod., 2010; Vasconcelos in Oliveira, 2004).

Uspešno je bilo pridobljenih že mnogo transgenih rastlin (pšenica, riž, tobak, krompir), ki so izražale lektine, ki so izvirali iz različnih organizmov. Transgene rastline so povečale smrtnost ali upočasnile rast in razvoj žuželk. Pomemben podatek pri izbiri lektinov je ta, da le-ti niso škodljivi za netarčne organizme (Lam in Ng, 2011; Vasconcelos in Oliveira, 2004). Primer rastlinskega lektina, uporabljenega za GSR, je lektin GNA iz zvončka (*Galanthus* sp.), izražen v rižu, ki je postal delno odporen proti žuželki *Nilaparvata lugens* in še nekaterim žuželkam iz reda polkrilcev (Miao in sod., 2011; Rao in sod., 1998). Za GS riž z izraženim GNA so pokazali, da le ta nima neželenih posledic za podgane, a za odobritev za trženje so potrebne nadaljnje raziskave (Poulsen in sod., 2007). Podobno so delno odpornost različnih transgenih rastlin proti polkrilcem pridobili z vnosom gena ASA-L, ki kodira lektin v listih česna (*Allium sativum*). V transgenih rastlinah preizkušajo še insekticidni potencial lektinov WGA (angl. wheat germ agglutinin) iz pšenice in lektin ACA (angl. *A. cepa* agglutinin) iz čebule (Vandenborre in sod., 2011; Vishwanathreddy in sod., 2014).

2.3.5 Ostali pristopi pridobivanja rastlin, odpornih proti žuželkam

GSR s povečano odpornostjo proti žuželkam so pridobili z vnosom mnogih genov različnih izvorov, ki kodirajo proteine z različnimi načini delovanja. Nekateri izmed teh insekticidnih proteinov so inhibitorji α -amilaz, insekticidni protein toksin A iz bakterije *Photorhabdus luminescens*, bakterijske holesterol oksidaze (Gatehouse, 2008), avidin iz kokošjega jajca (Cooper in sod., 2009; Kramer in sod., 2000). Prav tako so z namenom povečane odpornosti proti žuželkam v rastlinah uspeli izraziti več genov hkrati, ter na ta način v GSR vnesli novo metabolno pot (npr. sinteza hidrogen cianida v navadnem repnjakovcu) ali pa z metodo RNAi onemogočili sintezo hlapnih spojin, ki služijo zaščititi rastline pred žuželkami (Gatehouse, 2008).

2.4 GLIVE KOT VIR FITOPROTEKTIVNIH SNOVI

Glive razvrščamo v več razredov. Glive, ki oblikujejo plodišča uvrščamo v razreda zaprtotrošnic in prostotrošnic. Ascomycetes (zaprtotrošnice, askomicete) obsegajo poleg užitnih mavrahov in gomoljk (tartufov), še večino kvasovk in plesni. Poznanih je okoli 60000 vrst zaprtotrošnic. Basidiomycetes (prostotrošnice, bazidiomicete) pa obsegajo predvsem gobe, pa tudi parazitske rje in sneti ter nekaj vrst kvasovk. Bazidiomicete ali prostotrošnice so pomembna skupina gliv z več ko 30000 znanimi vrstami. Delijo se v tri skupine: Agaricomycotina ter Pucciniomycotina in Ustilagomycotina, ki vključujeta znane rastlinske parazite rje in sneti (Kirk, 2008; Gunde-Cimerman, 1996).

Mnoge glive so za žuželke strupene in predstavljajo potencialen vir genov za vnos v rastline. Vir toksičnosti za žuželke so lahko različne molekule: amatoksini in falotoksini iz zelene mušnice (*Amanita phalloides*), ibotenična kislina (ibotenic acid) iz več vrst gliv iz rodu *Amanita*, L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) iz gliv *Strobilomyces strobilaceus* in *Hygrocybe conica* ter nukleozid klitocin (clitocine) iz glive *Lepista inversa*. Insekticidne spojine v glivah so tudi proteini: lektini, PI, hemolizini in lipoksigenaze. V raziskavi vodotopnih ekstraktov iz 14 gliv, ki tvorijo plodišča, so ugotovili, da je večina insekticidnosti posledica proteinov. Za prenos v rastline z namenom odpornosti proti žuželkam so zaradi odpornosti proti proteolitični razgradnji najprimernejši lektini in hemolizini (Wang in sod., 2002). Glive torej predstavljajo bogat vir raznolikih proteinov, izmed katerih pa so v primerjavi z rastlinskimi in živalskimi proteini le redki identificirani in okarakterizirani. Za proteinske ekstrakte in za očiščene proteine iz gliv je bilo pokazano, da imajo antibakterijsko, antivirusno, antiparazitsko, antitumorsko, imunomodulatorno, insekticidno ali nematotoksično delovanje (Erjavec in sod., 2012).

Mnogih gob, na primer predstavnik rodu *Clitocybe* in *Cantharellus*, žuželke nikoli ali le redko napadajo (Wang in sod., 2002). Mnoge gobe, ki kažejo močne insekticidne lastnosti, niso strupene za ljudi in se pogosto celo uporabljajo v prehrani, zaradi česar predstavljajo pomemben vir novih možnih insekticidov. Ena izmed gob, ki je pokazala direktno toksičnost za modelne žuželke, je bila gliva poprhnjena livka (Mier in sod., 1996; Wang in sod., 2002). Gobe torej predstavljajo vir spojin, ki bi jih lahko uporabili tudi za zaščito rastlin.

Insekticidne snovi, ki so bile najdene v gobah, večinoma predstavljajo proteine, pri čemer so Wang in sodelavci (2002) največjo vlogo pripisali lektinom in hemolizinom. Prvi protein, ki je bil izoliran iz gobe in je kazal insekticidno aktivnost proti modelnim žuželkam, je bil lektin XCL iz rdečebetne polstenke (*Xerocomus chrysenteron*) (Trigueros in sod., 2003). Od glivnih proteinov so lektini med najbolj raziskanimi in med njimi je veliko takih, ki imajo unikatne molekularne in fiziološke značilnosti, saj so raznoliki v strukturi, glikozilaciji in specifičnosti za vezavo na ogljikove hidrate (Erjavec in sod., 2012).

Prostotrosnice so poleg lektinov kot potencialnih fitoprotektivnih snovi tudi vir PI (Sabotič in Kos, 2012). Poznana sta le dva inhibitorja cisteinskih proteaz makrocipin in klitocipin, ki ne kažeta strukturne podobnosti z živalskimi in rastlinskimi PI (Sabotič in sod., 2007a, 2009), poleg njiju pa še nekaj inhibitorjev serinskih proteaz iz prostotrosnic. Opisani so PI pri gobah *Pleurotus ostreatus* (Kojima in sod., 2005), *Lentinus edodes* (Odani in sod., 1999), *Trametes vesicolor* (Zuchowski in Grzywnowicz, 2006) in družina inhibitorjev, specifičnih za tripsin, za katero je značilno beta-triperesno zvitje (Avanzo in sod., 2009; Sabotič in sod., 2012). Doslej v gobah še niso opisali aspartatnih proteaz ali metalo-proteaz (Rawlings, 2010).

Poleg lektinov in PI so v užitni gobi *Pleurotus cornucopiae* odkrili tudi insekticidno učinkovino tamavidin, ki deluje podobno kot avidin (Takakura in sod., 2009). Bleuler-Martinez in sodelavci (2012) so pokazali, da ima tamavidin toksičen učinek na različne patogene: *Caenorhabditis elegans*, vinsko mušico in *Acanthamoeba* sp. Tamavidin je uvrščen v skupino proteinov, ki vežejo biotin ali proteinov BBP (angl. biotin binding protein), ki je esencialna molekula za mnoge organizme. Nedostopnost biotina zaradi vezave na tamavidin prepreči rast patogenim organizmom (Bleuler-Martinez in sod., 2012). Že prej so pokazali, da ima tudi protein tamavidin, izražen v transgenem rižu, inhibitorni učinek tudi na rast nekaterih fitopatogenih gliv (Takakura in sod., 2012; Wohlschlager in sod., 2011). Kljub visoki insekticidni učinkovitosti proteinov, ki vežejo biotin iz različnih virov (avidin iz jajc, streptavidin iz bakterij), pa je uporaba le teh za zaščito v obliki transgenih rastlin omejena na področje industrijsko uporabnih rastlin, na primer rastlin namenjenih za biogoriva, vlakna ali v gozdarstvu. Biotin je namreč

esencialna molekula za vse živali, torej tudi za netarčne organizme, kot so čebele in druge koristne žuželke ter za ljudi (Christeller in sod., 2010).

Vsem trem skupinam proteinov iz gliv (lektinom, PI in BBP), za katere je bilo pokazano, da predstavljajo obrambo pred predatorji in paraziti pri glivah, je skupna odsotnost signalnega zaporedja za sekrecijo, nizka molekulska masa, odpornost proti oksidaciji in visokim temperaturam ter proteolizi in izražanje v trosnjakih gob. PI in BBP učinkujejo na predatorje in parazite tako, da po zaužitju v prebavilu omejijo dostop do hranila (PI z inhibicijo proteaz omejijo dostopnost aminokislin, BBP pa dostopnost biotina) (Bleuler-Martinez in sod., 2012; Bleuler-Martínez in sod., 2011; Sabotič in sod., 2012). Glivni lektini po do sedaj poznanih podatkih učinkujejo bolj neposredno, saj se vežejo na specifične glikopeptide na površini epiteljskih celic fungivorov in jih tako poškodujejo (Butschi in sod., 2010; Wohlschlager in sod., 2011).

V naših poskusih smo uporabili gene iz dveh bazidiomicetnih gliv, poprhnjene livke in orjaškega dežnika. Obe glivi vsebujeta proteine, uvrščene v družino mikocipinov, poprhnjena livka pa še lektin CNL. Za te proteine smo na podlagi objavljene literature predvideli, da bi lahko izraženi v krompirju, vplivali na povišano odpornost proti koloradskemu hrošču.

2.4.1 Poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*)

Poprhnjena livka ali meglenka (*C. nebularis*) (slika 2) je prostotrosnica (Basidiomycetes) iz rodu livk (*Clitocybe*), družine kolobarničark (Tricholomataceae) in reda lističark (Agaricales). Je precej velika goba (premer klobuka do 18 cm), površino klobuka ima poprhnjeno in žametno. Klobuk je sprva polkrožen, z močno spodvihanim robom, kasneje zravnin in v sredini udrt. Pod klobukom ima trosovnico iz gostih rumenkastih lističev, ki so poraščeni po betu. Je brez ovojnice in obročka. Pogosto raste na preperem listju, v velikih skupinah, pozno v jesen (oktober-november). Pri nas raste predvsem na Krasu in v Istri. Je le pogojno užitna (Pace, 1981; Poler, 1990).



Slika 2: Poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*). Foto (J. Sabotič).

Figure 2: Clouded agaric (*Clitocybe nebularis*). Photo (J. Sabotič).

2.4.2 Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*)

Orjaški dežnik (*M. procera*) (slika 3) je prostotrosnica (Basidiomycetes) iz rodu dežnikov (*Macrolepiota*), družine kukmark (Agaricaceae) in reda lističark (Agaricales). Velik klobuk s premerom 10-26 cm, ki je jajčast pri mladi gobi in se pozneje razpre kot dežnik, prekriva debela rjavkasta koža, razpadajoča na krpe in luske, ki se proti robu manjšajo. Ima dolg, rjavo marogast, votel bet, ki je proti dnu močno odebeljen, lističe pri mladih gobah pokriva zastiralce ali obroček, ki pri starejših gobah ostane premakljiv po betu. Orjaški dežnik raste posamično ali v skupinah v gozdovih, zlasti ob robovih v travi, na gozdnih travnikih, od sredine poletja pa vse do pozne jeseni. Orjaški dežnik je užiten (Pace, 1981; Poler, 1990).



Slika 3: Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*). Foto (B. Šmid).

Figure 3: Parasol mushroom (*Macrolepiota procera*). Photo (B. Šmid).

2.4.3 Proteazni inhibitorji iz gliv

Poznanih je mnogo PI iz vseh evkariontskih organizmov, le pri glivah so zaenkrat precej slabo okarakterizirani in maloštevilni. Le redki PI so bili izolirani v zadostnih količinah in biokemijsko okarakterizirani. Poznana sta inhibitorja endogene serinske proteaze A iz glive *Pleurotus ostreatus* in inhibitor tripsina/kimotripsina iz glive *Lentinus edodes*. Sabotič in sodelavci (2007b) so ugotovili, da vsebujejo prostotrosnice presenetljivo raznolike in številne proteaze in proteazne inhibitorje s posebnimi lastnostmi, ki jih pomembno razlikujejo od proteaz in njihovih inhibitorjev iz drugih virov. Opisali so nov tip inhibitorja cisteinskih proteaz iz poprhnjene livke in orjaškega dežnika ter jih uvrstili v novo družino inhibitorjev imenovano mikocipini. V družino mikocipinov spadajo PI makrocipini in klitocipin. To so proteini, ki so obstojni pri visokih temperaturah in ekstremnih pH, njihov profil inhibicije proteaz pa se razlikuje od tistih pri drugih družinah cisteinskih proteaz (Sabotič in sod., 2006, 2009).

Fiziološka vloga PI iz prostotrosnic še ni povsem poznana, predvideva pa se, da imajo PI pomembno obrambno vlogo pred žuželkami in parazitskimi mikroorganizmi, ki napadajo gobe (Brzin in sod., 2000; Odani in sod., 1999; Zuchowski in Grzywnowicz, 2006), nekateri pa imajo verjetno regulatorno vlogo v znotrajceličnih proteolitičnih procesih (Dohmae in sod., 1995).

2.4.3.1 Klitocipin

Inhibitor cisteinskih proteaz iz poprhnjene livke, so poimenovali klitocipin (angl. *C. nebularis* cysteine protease inhibitor ali clitocypine). Za klitocipin je značilna temperaturna obstojnost, odpornost proti denaturacijskim agensom in proteolitski razgradnji ter reverzibilnost zvijanja. Klitocipin je bil prvi okarakteriziran inhibitor cisteinskih proteaz iz gliv. Z do takrat poznanimi PI ne kaže podobnosti v zaporedju aminokislin. Kljub ugotovitvi, da je klitocipin inhibitor cisteinskih proteaz, je njegova fiziološka vloga še nepoznana. Možne vloge so zaščita pred napadom žuželk, patogenov in virusov ali vloga pri regulaciji endogene proteolize (Sabotič in sod., 2007a).

V prehranjevalnih testih, kjer so ličinke koloradskega hrošča hranili z naravnim in rekombinantnim klitocipinom, pridobljenim z izražanjem v bakteriji *Escherichia coli*, so

ugotovili, da klitocipin negativno vpliva na rast in razvoj ličink, ki je odvisen od koncentracije in starosti ličink ob izpostavitvi klitocipinu. Ugotovili so, da je insekticidni učinek klitocipina večji, če so izpostavljene mlajše ličinke in če je njegova koncentracija višja (Sabotič, 2007).

2.4.3.2 Makrocipini

Makrocipini (angl. *M. procer*a cysteine protease inhibitor ali macrocypin) so inhibitorji cisteinskih proteaz, izolirani iz orjaškega dežnika. Makrocipine kodira družina genov, ki jo na podlagi zaporedij razdelimo v pet skupin. Znotraj posamezne skupine je podobnost zaporedja aminokislinskih ostankov večja kot 90 %, med skupinami pa je podobnost med 75 % in 86 %. Na aminokislinsko zaporedje makrocipinov lahko sklepamo iz podatkov genomskih zaporedij ali pa iz zaporedij cDNA. Podatki o razlikah v promotorskih in nekodirajočih zaporedjih kažejo, da je izražanje makrocipinov uravnavaano na različnih stopnjah. Makrocipini so učinkoviti inhibitorji proteaz iz papainske družine (družina C1 po MEROPS klasifikaciji), kot so na primer papain in cisteinske katepsinske endopeptidaze, prav tako pa inhibirajo katepsine B in H, ki imajo tako endopeptidazno kot eksopeptidazno aktivnost. Raznolikost v zaporedjih vpliva na inhibicijsko aktivnost makrocipinov ter na različnost inhibicijskih profilov. Vsi makrocipini imajo podobne osnovne biokemijske lastnosti in so stabilni pri visokih temperaturah in ekstremnih pH (Sabotič in sod., 2009).

Makrocipini niso podobni drugim družinam PI, zato domnevamo, da je mehanizem inhibicije tarčnih cisteinskih proteaz pri makrocipinih edinstven. Kristalna struktura makrocipina je razkrila motiv vezave na cisteinske proteaze podobne papainu, ki na zaenkrat še nepoznan način ovira dostop do katalitičnih aminokislinskih preostankov proteaze. Makrocipini imajo β -triperesno zvitje, ki je v obliki drevesaste strukture z dvema zankama v koreninski regiji, deblom sestavljenim iz 6-verižnega beta sodčka in dvema plastema zank (6+3) v regiji krošnje. Z usmerjenimi mutacijami je bilo pokazano, da dve zanki, ki vežeta cisteinske katepsine, spadata v spodnjo plast krošnje, medtem ko je ena sama zanka iz regije krošnje odgovorna za inhibicijo tripsina ali asparaginske endopeptidaze. Te zanke predstavljajo mnogostransko površino, ki bi potencialno lahko vezala tudi druge razrede proteaz. Prav zaradi možne hkratne vezave različnih skupin proteaz imajo PI, ki imajo β -triperesno zvitje, še posebej mikocipini, veliko potencialno

vrednost za zaščito rastlin proti žuželkam, ki se na PI v hrani prilagajajo s sintezo adaptivnih proteaz (Renko in sod., 2010).

Makrocipini najbolj inhibirajo cisteinske proteaze iz papainske družine. Endopeptidaze iz te družine močno inhibirajo vsi testirani makrocipini. Katepsin B, ki je ekso- in endopeptidaza, je šibko inhibiran z Mcp1 in Mcp4. Mcp3 in Mcp4 učinkovito inhibirata tudi katepsin H, ki ima prav tako ekso- in endopeptidazno aktivnost. Poleg cisteinskih proteaz iz družine C1 pa Mcp1 in Mcp3 prav tako inhibirata tudi cisteinske proteaze iz družine C13, to je asparaginske endopeptidaze. Cisteinsko proteazo legumain inhibirajo vsi makrocipini razen enega predstavnika (Mcp4), ki namesto tega šibko inhibira serinsko proteazo tripsin (Sabotič in sod., 2009).

2.4.4 Lektini iz gliv

Kot je že bilo omenjeno, so lektini ubikvitarni proteini. Poleg rastlinskih postajajo zaradi svojih specifičnih lastnosti vse pomembnejši tudi lektini, ki se pojavljajo v glivah. So zelo raznoliki, lahko so monomerni, dimerni, trimerni, tetramerni, pentamerni ali heksamerni, z molekulsko maso od 15 do 90 kDa in vsebnostjo sladkorjev od 0 do 30 %. Lektini iz gliv se razlikujejo tudi v izoelektričnih točkah in specifičnosti v vezavi na ogljikove hidrate. Najpogosteje se vežejo na ogljikove hidrate, ki vsebujejo galaktozo, laktozo in N-acetilglukozamin, redkeje pa fukoza, rafinozo, N-glikolneuraminsko kislino (N-glycolyneuraminic acid) in N-acetil-D-laktozamin. Najbolje so okarakterizirani lektini iz gliv rodu *Agaricus* in naslednjih vrst: *Amanita pantherina*, *Boletus satanas*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hericiium erinaceum*, *Ischnoderma resinosum*, *Lactarius deterrimus*, *Laetiporus sulphureus*, *Tricholoma mongolicum* in *Volvariella volvacea*. Študije lektinov so bile usmerjene predvsem v imunomodulatorne in antitumorske/citotoksične lastnosti lektinov, ne pa v toksičnost za žuželke. Vloge lektinov v glivah so raznolike. Vplivali naj bi na dormanco, rast in morfogenezo, morfološke spremembe ob infekcijah s paraziti, imeli pa naj bi tudi vlogo pri molekularni spoznavi ob vzpostavitvi mikorize (Khan in Khan, 2011; Wang in sod., 1998).

Lektini naj bi imeli pri glivah vlogo pri morfogenezi in razvoju, saj je njihovo izražanje časovno in prostorsko regulirano. Pogosto se izražajo v trosnjakih, kjer predstavljajo precejšen del topnih proteinov. Vendar pa dejstvo, da v gobah ne najdemo ligandov, na katere bi se ti lektini vezali ter dejstvo, da so se trosnjaki kljub deleciji ali pa znižanju ravni izražanja normalno razvili, zavračata endogeno vlogo lektinov pri gobah (Bleuler-Martínez in sod., 2011; Nowrousian in Cebula, 2005), kar je v podporo teoriji, da imajo tako kot pri rastlinah tudi pri gobah lektini, ki so izraženi v citoplazmi celic plodišča, zaščitno vlogo proti predatorjem in parazitom (Bleuler-Martínez in sod., 2011; Rohlf s in sod., 2007; Spitteller, 2008).

Pokazali so, da imajo nekateri lektini iz askomicet ali bazidiomicet nematocidno, insekticidno in/ali amebocidno aktivnost. Poleg tega so pokazali še, da je izražanje dveh lektinov z nematotoksično aktivnostjo pri glivi *Coprinopsis cinerea* inducirano ob napadu fungivorega nematoda (Bleuler-Martínez in sod., 2011).

Za mnoge lektine rastlinskega izvora je bila ugotovljena insekticidna učinkovitost, kar pa se tiče gobjega izvora so insekticidnost do sedaj pripisali šele nekaj lektinom. Prvi je lektin iz gobe rdečebetne polstenke (*Xerocomus chrysenteron*) poimenovan XCL (angl. *Xerocomus chrysenteron* lectin), za katerega so pokazali, da ima insekticidno delovanje na vinsko mušico (*D.melanogaster*), uš *Acyrtosiphon pisum* in na listne uši (Jaber in sod., 2007; Trigueros in sod., 2003). Druga dva lektina z insekticidnim delovanjem sta aglutinin iz glive *Rhizoctonia solani* (Hamshou in sod., 2010a) in aglutinin iz glive *Sclerotinia sclerotiorum* (Hamshou in sod., 2010b). Četrty pa je lektin iz glive *Sclerotium rolfsii*, poimenovan SRL (angl. *Sclerotium rolfsii* lectin), za katerega so ugotovili, da ima močno insekticidno aktivnost proti molju *Spodoptera litura*. SRL je tudi odporen proti proteolizi s prebavnimi proteazami v prebavilu ličink (Vishwanathreddy in sod., 2014).

2.4.4.1 Lektin CNL

Iz poprhnjene livke so izolirali lektin CNL, ki je podoben ricinu B. Tako kot PI iz te glive, je tudi lektin obstojen pri visokih temperaturah in ekstremnih pH ter odporen proti razgradnji s proteazami. Molekulska masa proteina je 15,9 kDa, izoelektrična točka 4,3, pod nedenaturirajočimi pogoji tvori homodimerno strukturo. CNL ima imunomodulatorne

lastnosti (Pohleven in sod., 2009). Za proteinski ekstrakt poprhnjene livke, za lektin CNL in še nekatere druge lektine iz poprhnjene livke so pokazali, da delujejo insekticidno na vinsko mušico ter deluje negativno na rast in razvoj ličink koloradskega hrošča. Učinek lektina je odvisen od njegove koncentracije. Delovanje lektinov ni natančno poznano, predvideva se, da je insekticidno delovanje posledica vezave na specifične glikozilirane tarčne receptorje v prebavnem traktu žuželk, kar povzroči poškodbe prebavnega sistema (Pohleven in sod., 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Biološki material

Za transformacijo smo uporabili krompir (*Solanum tuberosum* L. cv Désirée) v tkivni kulturi (zbirka Nacionalnega inštituta za biologijo). Transformirane rastline krompirja smo nato uporabili v prehranjevalnih testih ličink koloradskega hrošča.

Za kloniranje izbranih genov smo uporabili kemijsko kompetentne bakterije OmniMAX™ T1 Phage-Resistant *E. coli* (Invitrogen, ZDA) ter elektrokompetentne bakterije *A. tumefaciens*, sev LBA4404 (Invitrogen, ZDA).

V prehranjevalnem testu 1 smo uporabili ličinke koloradskega hrošča izležene iz jajčec, nabranih na njivi krompirja, gojenega brez uporabe pesticidov, v vseh nadaljevalnih prehranjevalnih testih pa jajca koloradskega hrošča, naročena iz gojilnice (French Agricultural Research, Inc., Lamberton, MN, ZDA) (preglednica 7).

3.1.2 Gojišča

Za gojenje krompirja v tkivni kulturi smo uporabili gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962), ki smo mu prilagodili pH na 5,7–5,8, dodali agar in ga avtoklavirali pri 120 °C in 1,1 bar. Za selekcijo transformiranih poganjkov smo v MS gojišča dodali antibiotik higromicin (20 mg/L) in za rast poganjkov hormon zeatin ribozid (1 mg/L).

Za gojenje bakterije *E. coli* Omnimax smo uporabili komercialno S.O.C. gojišče (Invitrogen, ZDA) in gojišče LB, za bakterije *A. tumefaciens* pa YM gojišče. Po umeritvi vrednosti na pH 7,0 smo za pripravo trdnih gojišč dodali agar in raztopino avtoklavirali 20 minut pri 120 °C in 1,1 bar. V gojišči LB in YM za selekcijo transformant smo po avtoklaviranju in ohlajanju dodali s filtriranjem sterilizirana antibiotika higromicin in kanamicin v končni koncentraciji 50 mg/L.

3.1.3 Začetni oligonukleotidi in sonde

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri pripravi in analizi transformiranih bakterij s konvencionalnim PCR, so navedeni v preglednici 1. Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za analizo izražanja transgenov v GS linijah krompirja ter za analizo izražanja prebavnih encimov v prebavilu ličink koloradskega hrošča z metodo qPCR, so navedeni v preglednici 2. Oligonukleotidni začetniki so bili načrtovani za pomnoževanje specifičnih genov. Izjema so začetni oligonukleotidi M13, ki nalegajo na zaporedje vektorja in smo jih uporabili za pomnoževanje vstavljenih genov pri kontroli ustreznosti plazmidov po rekombinaciji. Če ni navedeno drugače, smo oligonukleotide načrtovali s programom Primer Express (Applied Biosystems, ZDA) in jih naročili pri podjetju Eurofins MWG (Nemčija).

Preglednica 1: Seznam začetnih oligonukleotidov za konvencionalni PCR.

Table 1: The list of PCR primers.

Tarčni gen	ime	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Koncentracija v reakciji (nM)	vir
	M13F	GTAAAACGACGGCCAG	250	Fermentas
	M13R_pUC	CAGGAAACAGCTATGAC	250	Fermentas
Klitocipin	Cl _t _F	CACCATGGCTTCTCTTGAAGATGG	250	*
	Cl _t _R	TTTCACGTGTGAACCTCCAAGC	250	
Makrocipin 4a	Mcp4a_F	CACCATGGCCTTAGAAGATGGT	250	*
	Mcp4a_R	TTTCCTTATATTCAGAAATAAACCAACGTGG	250	
<i>C. nebularis</i> lectin	Cnl_F	CACCATGTCTATAACTCCAGGAACT	250	*
	Cnl_R	TAACTGCAGAAACAGATTCAAATGCC	250	

* Začetne oligonukleotide smo pripravili v tej doktorski nalogi.

Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za qPCR.**Table 2: The list of qPCR primers and probes.**

Tarčni protein/gen	Ime	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Koncentracija v reakciji (nM)	vir
Citokrom oksidaza	COX-F	CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA	900	Weller, 2000
	COX-R	CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG	900	
	COX-S	FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-TAMRA	250	
Klitocipin	Clt_F	TTTCTTACGACCAATTAGAGCAAAATGC	900	Custom designed by Applied Biosystems, ZDA
	Clt_R	GCACCAGCTGTAAAATGTATTCCTT	900	
	Clt_S	FAM-CCCCAGCAATCACTG-TAMRA	300	
Makrocipin 4A	Mcp4a_F	AGTCCTACTGAGATTGGTGTTC	900	Custom designed by Applied Biosystems, ZDA
	Mcp4a_R	GCCAAACACAGGTATATCCAGTCT	900	
	Mcp4a_S	FAM-CCTCAGCCTTAATTCT-TAMRA	300	
<i>C. nebularis</i> lektin	CNL_F	TGGACTTTAGTTCAATTGCCCCATA	900	Custom designed by Applied Biosystems, ZDA
	CNL_R	CCGTCAACAAGATTATCATCCCTAAC	900	
	CNL_S	FAM-CAAGCAGTTAATCCCC-TAMRA	300	
18S komplet		komercialno dostopen komplet, zaporedje ni na voljo.	1x	Applied Biosystems
Ld_ser_prot	Ld_ser_prot_S1A_F	GAGGTGGACTTAATCCTGAGACTGA	300	Petek, 2012
	Ld_ser_prot_S1A_R	ACTGCCCTTTCCACCTTCT	300	
Intestaini D	IntD_F	TTCAGGAACAATCAGCGGAAA	900	Petek, 2012
	IntD_R	CAGACCACTGGGATGCCTT	900	
Intestaini E	IntE_F	CATGACGAACGCTTTCAAATATATC	300	Petek, 2012
	IntE-R	CTGCAGGAACCACTCTTCT	300	
Intestaini A	IntA_F	GARTCCTTGRTGATCAATGTTATTTTG	300	Šmid, 2013
	IntA_R	AAAATTTCTTTCCATTGGCTTAC	300	
	IntA_S	FAM-CATGGATCACGCTGTTCTTGTGTTGG-TAMRA	150	
Intestaini B	IntB_F	TTTGAGTGAACAGCAGCTATTGG	300	Šmid, 2013
	IntB_R	AGCTCATCAGCCTCCATGT	300	
	IntB_P	FAM-TGTTCCAACCTTACGGTAATGATGATTGCG-TAMRA	150	
Celulaza GH48-1	GH48-1_F	GTTGACGGATGTTGACAACGTT	300	Šmid, 2013
	GH48-1_R	ACCAGGTCCTGCCAAGCA	300	
	GH48-1_P	FAM-ACGGTTTCGGCAACTCTCTGGC-TAMRA	150	
Celulaza GH48-2	GH48-2_F	GGCGGTCCTGCTCCAAA	300	Šmid, 2013
	GH48-2_R	GTTCCCTGGGCAATAGCGATA	300	
	GH48-2_P	FAM-TCACCTACCATCGTTTCTGGCAACAGTGTG-TAMRA	150	

3.1.4 Uporabljena nukleotidna in aminokislinska zaporedja

Nukleotidna in aminokislinska zaporedja, ki smo jih uporabili za vnos v krompir, so dostopna v nukleotidni banki GenBank, in sicer:

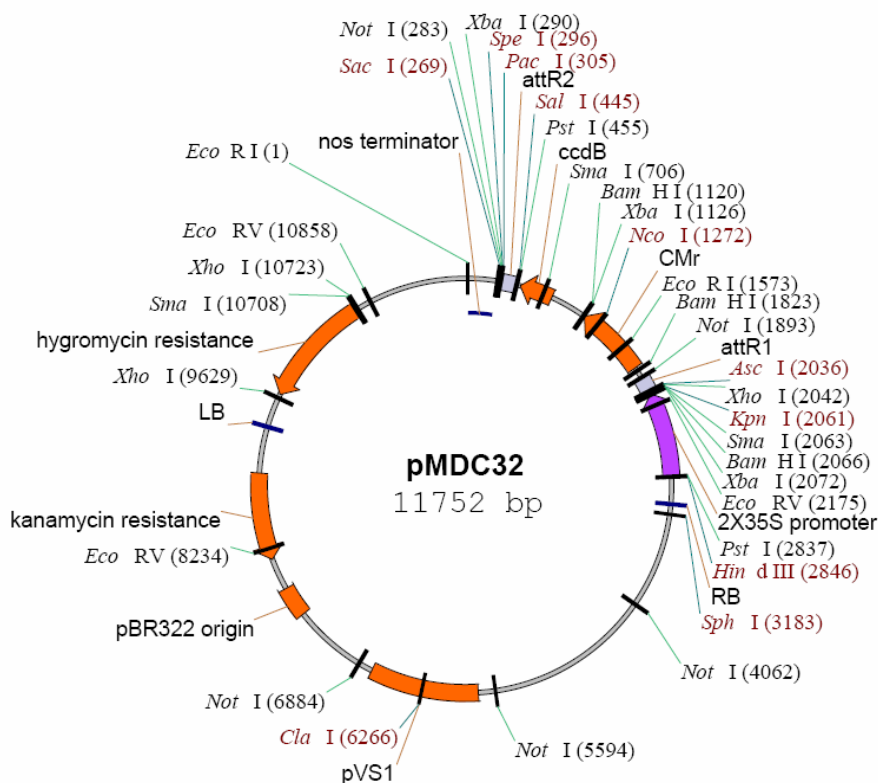
- Zaporedje gena *mcp4a*, ki kodira makrocipin Mcp4a iz orjaškega dežnika, pod številko GenBank: FJ495248.1.
- Zaporedje gena *clt*, ki kodira PI klitocipin iz poprhnjene livke, pod številko GenBank: AF298881.1.
- Zaporedje gena *CNL*, ki kodira ricinu B podoben lektin iz poprhnjene livke, pod številko GenBank: EU682006.1.

3.1.5 Plazmidni vektorji

Za kloniranje izbranih genov smo uporabili sintetično naročena zaporedja, vstavljena v vstopne vektorje pDONR221 (Invitrogen, ZDA) ter na osnovi rekombinacije Gateway transgen iz vstopnih vektorjev prenesli v destinacijska vektorja pMDC32 (za navadno prekomerno izražanje) in pMDC85 (za izražanje proteina v fuziji z GFP) (Curtis in Grossniklaus, 2003).

Vektorji pMDC so binarni plazmidi, kar pomeni, da jih lahko pomnožujemo tako v bakteriji *E. coli* kot v bakteriji *A. tumefaciens*. Izvirajo iz pCambia T-DNA in imajo ohranjeni regiji za prenos dela plazmida v rastlino. V T-DNA, ki se prenese, so vključeni elementi, potrebni za izražanje vstavljenega gena in za selekcijo transformant. Plazmid pMDC85 je enak pMDC32 plazmidu, le da ima za attR2 mestom dodan *gfp* gen in je zato tudi 710 bp večji. Po prepisu gena v protein tako dobimo C-terminalno fuzijo našega proteina z reporterskim proteinom GFP. Ta omogoča sledenje izražanja proteinov s pomočjo fluorescentnega mikroskopa. Shema plazmida pMDC32 je prikazana na sliki 4.

Da smo ob pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi M13 lahko ocenili velikost pričakovanih produktov PCR reakcije, smo potrebovali zaporedji plazmidov pMDC32 in pMDC85, ki sta dostopni v podatkovni bazi inštituta National Center of Biotechnology Information (NCBI).



Slika 4: Plazmidna karta vektorja pMDC32.

Ob posredovani transformaciji z bakterijo *A. tumefaciens* se v rastlino prenese del plazmidne DNA od desnega (RB, angl. right border) do levega mejnega zaporedja (LB, angl. left border). Konstrukt med tema regijama vsebuje 2×35S promotor za konstitutivno izražanje v rastlini, mesto rekombinacije (attR1 in attR2), gen *ccdB*, nos terminator ter zapisa za odpornost proti antibiotikoma higromicinu in kloramfenikolu (CmR). Želeni gen z rekombinacijo Gateway® vstavimo med mesti attR1 in attR2 ter z njim zamenjamo gen za odpornost proti kloramfenikolu in gen *ccdB*. Slednji kodira toksičen protein, kar ob transformaciji plazmidne mešanice v bakterijo *E. coli*, sev Omnimax, preprečuje rast bakterij, ki vsebujejo nezrekombiniran plazmid. Ker gre za binarni plazmid, ima pMDC32 dve mesti ori (angl. origin of replication): pBR322 za pomnoževanje v bakteriji *E. coli* in pVS1 za pomnoževanje v bakteriji *A. tumefaciens*. Zapis za odpornost proti kanamicinu se uporablja med kloniranjem, v rastlino pa se ne prenese, saj se nahaja za LB mestom. T-DNA, ki se prenese v rastlino, se začne pri desnem mejnem zaporedju T-DNA (RB) in se prenese vse do levega mejnega zaporedja (LB). Konstrukt, ki se prenese v rastlinski genom, vsebuje promotor 2×35S za konstitutivno izražanje v rastlini, vneseni gen, nos terminator ter zapis za odpornost proti selekcijskemu antibiotiku higromicinu. S poševnim tiskom so prikazana restrikcijska mesta specifičnih nukleaz.

Figure 4: Scheme of the pMDC32 plasmid.

T-DNA region of pMDC32 is transferred into transformed plant during *Agrobacterium*-mediated transformation. T-DNA region extends from right border (RB) to left border (LB). T-DNA consists of 2×35S promoter, cauliflower mosaic virus 35S promoter for constitutive expression in plant; *CmR*, chloramphenicol

resistance gene; *ccdB*, gene for counter selection in regular cloning host; attR1 and attR2, recombination sites of λ phage excisionase; nos terminator, terminator of nopaline synthase gene and hygromycin resistance gene. During Gateway® recombination gene of interest is inserted between attR1 and attR2 site and replaces genes *ccdB* and *CmR*. pMDC plasmid is binary plasmid and therefore contains two origins of replication (ori): pBR322, for replication in *E. coli*; and pVS1, for replication in *A. tumefaciens*. Kanamycin resistance gene is used during cloning procedure. It is located after LB site and is therefore not transferred into transformed plant. T-DNA sequence which is transferred into plant during transformation starts at RB and stops at LB. Construct which is transferred into plant genome consists of 2X35S promoter, gene of interest, nos terminator and hygromycin resistance gene. Restriction sites of the pMDC32 plasmid are shown in italics.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava plazmidnih vektorjev

3.2.1.1 Izbor genov in prilagoditev kodona

Za vnos v rastline smo izbrali tri glivne gene. Gen, ki kodira PI makrocipin (*mcp4a*), izvira iz orjaškega dežnika, iz poprhnjene livke pa izvirata gena, ki kodirata PI klitocipin (*clt*) in lektin (*CNL*).

Zaradi različne uporabe kodonov pri glivah in rastlinah (Gustafsson in sod., 2004) smo pri podjetju GenScript naročili prilagoditev nukleotidnih zaporedij ekspresijskemu sistemu krompirja. Poleg tega smo nukleotidnemu zaporedju kodirajoče regije vsakega izmed prilagojenih genov na 5' koncu dodali štiri nukleotide (CACC), ki bi nam omogočili usmerjeno kloniranje preko pENTR/D-TOPO® vektorja (Invitrogen, ZDA) v primeru, da nam direktno kloniranje iz pDONR221 vektorja v pMDC vektorje ne bi uspelo. Da bi omogočili fuzijo izbranih genov z zeleno fluorescentnim proteinom (GFP) v primeru kloniranja v plazmid pMDC85, smo izbranim nukleotidnim zaporedjem na 3' koncu izbrisali stop kodone ter zaradi ohranitve bralnega okvirja vstavili dodatni nukleotid (izbrali smo A in tako dobili AK lizin). Tako načrtovane gene s prilagojenim kodonom smo naročili pri družbi GenScript (ZDA), kjer so sintetizirali prilagojene gene in jih pripravili v obliki pDONR221 vektorjev, ki so kompatibilni z Gateway® sistemom kloniranja. Priprava prilagojenih zaporedij je opisana v poglavju 4.1.1.

3.2.1.2 Bioinformatične analize

Da bi lahko določili pričakovane dolžine PCR produktov pri preverjanju vnesenih genov v izbrane plazmide, smo zapis plazmidov preuredili v obliko, ki nam omogoča ročno obdelavo zaporedij. Orodje, ki omogoča prenos DNA v ustrezen zapis, je Filter DNA na spletni strani Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>).

3.2.1.3 Rekombinacija Gateway in transformacija OmniMAX™ T1 Phage-Resistant *Escherichia coli*

Prilagojena nukleotidna zaporedja so bila pripravljena v liofilizirani obliki vektorjev pDONR221, ki smo jih resuspendirali v TE pufru in jih uporabili za vstavljanje gena v ekspresijske plazmide pMDC: pMDC32 za povišano izražanje gena in pMDC85 za fuzijo gena z GFP (Curtis in Grossniklaus, 2003).

S kompletom Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, ZDA) smo po navodilih proizvajalca v posamezni rekombinazni reakciji prenesli enega izmed izbranih genov (*mcp4a*, *clt*, *CNL*) iz pDONR221 plazmida v pMDC32 in pMDC85 plazmid. Z rekombinacijsko mešanico smo po navodilih proizvajalca transformirali kemijsko kompetentne celice OmniMAX™ T1 Phage-Resistant *E. coli* (Invitrogen, ZDA), s čimer smo selekcionirali pravilne rekombinantne vektorje. Po selekciji na ploščah LB s higromicinom in kanamicinom (50 µg/mL) smo ustreznost transformiranih bakterij potrdili z reakcijo PCR na kolonijah (glej poglavje 3.2.1.5). Rezultat reakcij so bili plazmidi pMDC32_*mcp4a*, pMDC32_*clt*, pMDC32_*CNL*, pMDC85_*mcp4a*, pMDC85_*clt* in pMDC85_*CNL* v bakterijah *E. coli*. Iz kolonij bakterij *E. coli* z vnesenimi plazmidi smo nato plazmidno DNA izolirali s kompletom Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, ZDA). Hkrati smo pripravili trajne bakterijske kulture z vnesenimi plazmidi v 30 % glicerolu in jih shranili na -80 °C.

3.2.1.4 Transformacija bakterije *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidi pMDC

Plazmide pMDC32_*mcp4a*, pMDC32_*clt*, pMDC32_*CNL*, pMDC85_*mcp4a*, pMDC85_*clt* in pMDC85_*CNL* smo elektroporirali v bakterijo *A. tumefaciens* sev LBA4404 (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca s pomočjo elektroporatorja Eppendorf 2510. V epruveto s kompetentnimi celicami smo dodali 1 µl posameznega plazmida in mešanico prenesli v ohlajeno kiveto. Elektroporirali smo z napetostjo 2 kV, s časom izpostavljenosti 4-6 ms. Takoj po elektroporaciji smo dodali 1 mL YM gojišča (pripravljen po navodilih ElectroMAX™ *A. tumefaciens* LBA4404 cells, Invitrogen, ZDA) in suspenzijo prenesli v centrifugirko. Bakterijsko suspenzijo smo inkubirali 3 h pri 30 °C na stresalniku (225 rpm). Po končani inkubaciji smo suspenzijo bakterij enakomerno razmazali na selekcijsko YM

gojišče s higromicinom (50 µg/mL) in kanamicinom (50 µg/mL) ter jih 2 dni inkubirali na 30 °C.

Transformirane bakterije smo pregledali s PCR na kolonijah s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (za prisotnost vstavljenega gena) in univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi M13 (za preverjanje ustreznosti binarnega plazmida), kot je opisano v poglavju 3.2.1.5. Bakterije *A. tumefaciens* z vstavljenimi plazmidi smo namnožili v tekočem LB gojišču s higromicinom (50 µg/mL) pri 30 °C ter jih shranili v trajnih kulturah v 25 % glicerolu pri -80 °C in jih kasneje uporabili za transformacijo rastlin.

3.2.1.5 PCR na osnovi kolonije

Za potrditev prisotnosti genov *mcp4a*, *clt* in *CNL* v destinacijskih plazmidih pMCD32 in pMDC85 v celicah bakterije *E.coli* in bakterije *A. tumefaciens* smo uporabili PCR metodo na osnovi kolonije. Pod aseptičnimi pogoji smo se posamezne kolonije dotaknili z nastavkom in jo prenesli v 100 µL ddH₂O ter celice lizirali 10 min pri 95 °C. Nato smo 1 µL liziranih celic prenesli v PCR reakcijo.

Reakcijsko mešanico (preglednica 3) smo pripravili s polimerazo Immolase (Invitrogen, ZDA) in reakcijo izvedli po postopku, opisanem v preglednici 4. Reakcijo PCR smo izvedli na aparaturi GeneAmp[®] PCR 9700. Zaporedje uporabljenih začetnih oligonukleotidov je navedeno v preglednici 1.

Tako pridobljene PCR produkte smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo, kot je opisano v poglavju 3.2.7.

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije.
Table 3: Reaction mixture for colony PCR.

Komponenta	Volumen
10x Immo Buffer	2,0 µL
50 mM MgCl ₂	0,6 µL
Mešanica dNTP (10 mM)	1,0 µL
F začetni oligonukleotid (10 µM)	2,0 µL
R začetni oligonukleotid (10 µM)	2,0 µL
Polimeraza Immolase (5 enot/µL)	0,2 µL
ddH ₂ O brez nukleaz	11,2 µL
Matrična DNA	1,0 µL
Σ	20 µL

Preglednica 4: Pogoji reakcije za PCR na osnovi kolonije z gensko specifičnimi in z M13 začetnimi oligonukleotidi.

Table 4: Reaction conditions for colony PCR with gene specific and M13 primers.

Temperatura	Čas	
95 °C	10 min	
95 °C	30 s	} 35 ciklov
55/60* °C	30 s	
72 °C	2/3 min*	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

*Pogoji pri pomnoževanju z M13 začetnimi oligonukleotidi.

3.2.2 Stabilna transformacija rastlin

3.2.2.1 Priprava rastlinskega materiala za transformacijo

Rastline krompirja sorte Désirée smo razmnožili z nodijsko kulturo in gojili na MS gojišču (10 mL gojišča v posamezni epruveti) v rastni komori. MS gojišču smo umerili pH na 5,7–5,8 ter ga avtoklavirali pri 120 °C in 1,1 bar (Murashige in Skoog, 1962). Pogoji v rastni komori za tkivne kulture so bili: temperatura 19 ± 2 °C v času osvetljevanja in 17 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov 70–90 µmol m⁻²s⁻¹ (žarnice Osram L36/W77) in

fotoperioda 16 h svetlobe in 8 h teme. Stebelne internodije tako vzgojenih rastlin krompirja smo uporabili za transformacijo s kokultivacijo z bakterijo *A. tumefaciens*.

3.2.2.2 Transformacija krompirja in regeneracija transgenih rastlin

Stebelne internodije rastlin krompirja sorte Désirée, gojene v tkivnih kulturah, smo transformirali po protokolu Visser in sod. (1989). Za transformacijo smo uporabili bakterijo *A. tumefaciens* LBA4404 z vstavljenimi posameznimi plazmidi pMDC32_*mcp4a*, pMDC32_*clt*, pMDC32_*CNL*, pMDC85_*mcp4a*, pMDC85_*clt* in pMDC85_*CNL*. Da bi pridobili zadosti transgenih linij, smo transformacijo večkrat ponovili (preglednica 5). Sprva je bila regeneracija transgenih rastlin na selekcijskih gojiščih zelo počasna. Poganki iz transformiranih stebelnih internodijev so se pojavili šele 3-6 mesecev po transformaciji. Kasneje smo ugotovili, da so se plošče s transformiranimi stebelnimi internodiji ovite v mikropor (Tosama, SI) preveč izsuševale, kar je bil vzrok počasne rasti. Zato smo v nadaljevanju plošče ovijali s parafilmom (Bemis, ZDA), ki bolj tesni, ter s tem povečali vlago v gojiščih. Tako sta se hitrost in uspešnost regeneracije povečala, poganki so zrastle 2 meseca po transformaciji.

Preglednica 5: Seznam transformacij krompirja z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* z vnesenimi različnimi plazmidi.

Table 5: A list of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of potato with different plasmid constructs.

Oznaka	Datum transformacije	Vstavljen plazmid	Število transformiranih stebelnih internodijev
Transformacija 1	December 2008	pMDC32_ <i>clt</i>	800
Transformacija 2	Oktober 2009	pMDC32_ <i>CNL</i>	800
		pMDC85_ <i>CNL</i>	400
		pMDC85_ <i>mcp4a</i>	400
Transformacija 3	November 2009	pMDC32_ <i>mcp4a</i>	800
		pMDC85_ <i>mcp4a</i>	200
		pMDC32_ <i>clt</i>	800
		pMDC85_ <i>clt</i>	400
Transformacija 4	Junij 2010	pMDC32_ <i>clt</i>	300
		pMDC32_ <i>CNL</i>	300

Poganjki iz transformiranih stebelnih internodijev iz posamezne transformacije niso zrastle sočasno, temveč smo jih zbirali skozi daljše časovno obdobje, to je od pojava prvih poganjkov pa vse dokler nismo pridobili zadostnega števila transgenih linij z zadostnim izražanjem transgenov. Poganjke, ki so zrastle iz transformiranih stebelnih internodijev na selekcijskih gojiščih z dodanimi hormoni za rast poganjkov, smo prenesli v gojišče MS z antibiotiki higromicinom (20 mg/L, za selekcijo transformant) in vancomicinom (200 mg/L) ter klaforanom (200 mg/L) za preprečitev morebitnih bakterijskih in glivnih okužb regeneriranih rastlin. Kjer so iz poganjkov zrastle zakoreninjene rastline, smo le-te razmnožili z nodijsko kulturo na MS gojišču v rastni komori za tkivne kulture. Tako smo pridobili transgene linije krompirja z vnesenimi konstrukti.

3.2.3 Preverjanje nivoja izražanja transgenov s PCR v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja

Uspešnost transformacije in nivo izražanja transgenov smo preverili z metodo PCR v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja (RT-qPCR), prisotnost in kvantitativno oceno rekombinantnih proteinov pa smo določili s prenosom western.

3.2.3.1 Izolacija RNA iz rastlinskega tkiva

Celokupno RNA (RNA) iz rastlinskega tkiva smo izolirali po postopku innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena). Postopek izolacije se začne z inkubacijo homogeniziranega rastlinskega materiala (listi krompirja) v liznem pufri. Le-ta vsebuje gvanidijev izotiocianat, ki inaktivira RNaze. Sledi odstranjevanje grobih delcev na kolonah Spin filter D, precipitacija proteinov s 70 % etanolom, vezava RNA na silikagelno membrano kolone Spin filter R, spiranje nečistoč in nazadnje elucija RNA v ddH₂O. Priporočeni postopek proizvajalca smo spremenili v več korakih, ki so opisani v nadaljevanju.

RNA smo izolirali iz 100-300 mg rastlinskega tkiva, kateremu smo dodali 500 µL liznega pufra RL, segretega na 56 °C. Po 5 minutni inkubaciji pri 56 °C in vmesnim mešanjem, smo lizat nanegli na kolono Spin filter D in centrifugirali 5 min. Po dodatku etanola, prenosu na kolono Spin filter R in trikratnem spiranju s pufroma HS in LS, smo kolono centrifugirali 4 min pri 10000 g. Nato smo na kolono nanegli 50 µL ddH₂O brez RNaz

(segrete na 56 °C) in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. RNA smo nato eluirali z 1-minutnim centrifugiranjem pri 6000 g.

Celokupno RNA smo izolirali tudi po avtomatiziranem postopku MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Ambion) po navodilih proizvajalca, s spremembo prvega koraka, kjer smo 100-300 mg rastlinskega tkiva dodali 300 µL Lysis/Binding Solution ter nato centrifugirali 5 min pri polni hitrosti. Nadaljnji koraki so sledili proizvajalčevemu protokolu. Izolirano RNA smo shranili pri -80 °C. Kljub uporabi različnih postopkov izolacije, nismo pričakovali razlik v kakovosti izolirane RNA. Kvaliteto izolirane RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (glej poglavje 3.2.8) in spektrofotometrično (glej poglavje 3.2.9).

3.2.3.2 Razgradnja genomske DNA

Da bi odstranili genomsko DNA (gDNA), ki je kot stranski produkt ostala v vzorcih po izolaciji RNA in lahko moti nadaljne delo, smo gDNA razgradili z DNazo I (Deoxyribonuclease I, amplification grade, Invitrogen, ZDA).

Pripravili smo 11,5 µL reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- ~1 µg RNA v ddH₂O
- 0,1 µL DNaze I
- 1 µL pufra
- ddH₂O brez RNaz do končnega volumna 10 µL

Vzorci smo 15 min inkubirali pri sobni temperaturi, nato smo DNazo inaktivirali z EDTA v končni koncentraciji 2 mM in 10 min inkubirali pri 65 °C. Kvaliteto in količino RNA smo nato preverili z agarozno gelsko elektroforezo (glej poglavje 3.2.8) ali spektrofotometrično (3.2.9).

Pri vzorcih, izoliranih z MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Ambion), smo korak razgradnje genomske DNA opustili, saj je ta reakcija že del avtomatizirane izolacije RNA.

3.2.3.3 PCR v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja

Vse reakcije PCR v realnem času smo izvedli na inštrumentu ABI PRISM 9700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA) v optičnih ploščicah formata 384, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems, ZDA).

Za vsak vzorec smo vzporedno izvedli reakcijo za določanje količine cDNA oziroma izražanja genov *mcp4a*, *clt* ali *CNL* in referenčnega gena. Za detekcijo izražanja *mcp4a*, *clt* in *CNL* smo uporabili mešanico ABI Custom Expression (mešanica začetnih oligonukleotidov in sonde skupaj). Kot referenčni gen smo uporabili *cox* specifične začetne oligonukleotide in sondo, ki pomnožujejo gen za citokrom oksidazo (Weller in sod., 2000). Podatki o uporabljenih začetnih oligonukleotidih in sondah so zbrani v preglednici 2. V vseh reakcijah smo za pomnoževanje uporabili TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA). Delovanje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje genov *mcp4a*, *clt* in *CNL* smo najprej preverili na plazmidni DNA z zapisom za posamezen gen.

Izražanje genov *mcp4a*, *clt* in *CNL*, ki smo jih vnesli v krompir, smo preverjali z metodo RT-qPCR. Z uporabo kompleta AgPath-ID™ One-Step RT PCR kit (Ambion, ZDA) smo izvedli reverzno transkripcijo in PCR reakcijo v isti reakcijski mešanici. Reakcijske mešanice za posamezne amplikone smo pripravili v mikrocentrifugirkah v količini, ki je zadostovala za vse reakcije. Reakcijo PCR smo izvajali v končnem volumnu 5 µL. Pogoje reakcije RT-qPCR opisuje preglednica 6.

Preglednica 6: Pogoji reakcije za RT-qPCR s kompletom AgPath-ID™ One-Step RT PCR kit.

Table 6: RT-qPCR reaction conditions with AgPath-ID™ One-Step RT PCR kit.

Temperatura	Čas	Reakcija
48 °C	30 min	Obratno prepisovanje
95 °C	10 min	} 40 ciklov Začetna denaturacija/aktivacija polimeraze PCR
95 °C	15 s	
60 °C	1 min	

Pri vsakemu vzorcu smo analizirali izbran transgen (*mcp4a*, *clt* ali *CNL*) in referenčni gen (*cox*). Rezultate smo analizirani z uporabo SDS 2.1 programa (Applied Biosystems) po

avtomatski prilagoditvi bazne krivulje in ročni nastavitvi mejne vrednosti fluorescence. Po izvozu podatkov smo nadaljnja preračunavanja opravili v Excelu. Vsak vzorec smo analizirali v dveh različnih koncentracijah (10x, 100x), da smo lahko opazili morebitno inhibicijo pomnoževanja in v dveh paralelkah. Kot negativno kontrolo smo za vsak amplikon izvedli reakcijo brez dodane RNA.

Relativno količino RNA smo izračunali z $\Delta\Delta Cq$ metodo (Livak in Schmittgen, 2001). Vrednost $\Delta\Delta Cq$ opisuje razliko med povprečno vrednostjo ΔCq vzorca, ki nas zanima, in ΔCq za referenčni vzorec. Za oceno izražanja mRNA za *mcp4a*, *clt* in *CNL* glede na *cox* smo $\Delta\Delta Cq$ izračunali po enačbi (1).

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{testirani gen}} - \Delta Cq_{\text{cox}} \quad \dots (1)$$

Razliko v ravni izražanja genov *mcp4a*, *clt* in *CNL* nato izračunamo po enačbi (2).

$$\text{Razlika v ravni izražanja genov} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad \dots (2)$$

Na koncu smo izražanje genov *mcp4a*, *clt* in *CNL* v transgenih rastlinah predstavili relativno glede na izražanje referenčnega gena *cox*.

3.2.4 Prenos western

Prenos western smo naredili na Odseku za biotehnologijo Instituta »Jožef Stefan« (IJS). Za izolacijo proteinov smo uporabili 200 mg rastlinskega materiala posamezne linije. Rastlinski material smo homogenizirali z uporabo homogenizatorja Qiagen Tissuelyser in resuspendirali v 500 μL pufra (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15 mM DTT). Po 30 minutah inkubacije na 0 °C smo vzorce centrifugirali. 30 μL supernatanta smo nanesti v posamezno jamico na gelu. Proteina smo ločili z gelsko elektroforezo SDS-PAGE (12 % ločevalni gel). Po elektroforezi smo proteine prenesli na PVDF membrano (Imobillon transfer membrane). Membrano smo blokirali s TBS pufrom (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) z dodanim 5 % mlekom v prahu brez maščob. Vzorce smo nato inkubirali s primarnimi protitelesi (redčenimi 1:10000 z antiMcp, 1:5000 za antiClt, 1:5000 za antiCNL, 1:1000 za antiGFP) preko noči na 4 °C, nato je sledilo 7 spiranj s pufrom TBST

pri 25 °C in inkubacija s sekundarnimi protitelesi, redčenimi 1:20000 oz. 1:10000 za GFP. Kot primarna protitelesa za detekcijo makrocipina oziroma klitocipina smo uporabili kunčji antiserum proti Mcp, Clt oziroma CNL, kot sekundarna protitelesa pa kozji imunoglobulin proti kunčjim protitelesom, konjugiran s hrenovo peroksidazo (Goat anti-Rabbit IgG, Dianova). Pri detekciji GFP smo uporabili primarna protitelesa antiGFP 8B-2) (Santa Cruz Biotechnology, ZDA), kot sekundarna protitelesa pa kozji imunoglobulin proti mišjim protitelesom konjugiran s hrenovo peroksidazo (Goat anti-Mouse IgG, Dianova). Detekcija je potekala s kemoluminiscentnim detekcijskim testom (Lumilight, Roche). Za preverjanje velikosti proteinov smo uporabili lestvico PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, ZDA). Za pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantne proteine (rClT 60 ng; rMcp 10 ng; rCNL 100 ng).

3.2.5 Konfokalna mikroskopija

Za opazovanje fluorescence smo uporabili konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Preparate smo pripravili iz svežega materiala tako, da smo dele rastlin iz tkivnih kultur potopili v kapljico imerzijskega olja, jo pokrili z drugim krovnim stekelcem in robove zlepili z brezbarvnim lakom. Preparate smo pregledali v roku ene ure. Uporabljali smo program Leica Microsystems AF Lite pri nastavitvah: ekscitacija 488 nm ter emisije 505-520 nm (PMT1), 587-787 nm (PMT2) in bela svetloba (PMT trans).

3.2.6 Prehranjevalni testi

3.2.6.1 Priprava rastlinskega materiala za prehrano ličink

Ko smo imeli v tkivni kulturi namnoženih zadosti transgenih linij krompirja, smo nodije predstavili na gojišče za koreninjenje (40 mL MS gojišča v plastičnih petrijevkah) in jih gojili v rastni komori. Po 10 dneh smo rastlinice presadili v lončke z zemljo in jih štiri tedne vzgajali v rastni komori (Kambič) pri pogojih: relativna zračna vlaga 75 ± 2 %, temperatura 20 ± 2 °C v času osvetljevanja in 18 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov $120\text{--}150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (žarnice Osram L36/W77) in fotoperioda 16 h svetlobe in 8 h teme. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo. Tako vzgojene rastline smo uporabili v prehranjevalnih testih z ličinkami koloradskega hrošča.

3.2.6.2 Potek prehranjevalnih testov

V prehranjevalnih testih z ličinkami koloradskega hrošča smo uporabili štiri tedne stare izbrane transgene linije krompirja. Za kontrolo smo uporabili netransformirane linije krompirja (nt).

3.2.6.2.1 Prehranjevalni testi brez inducirane obrambe krompirja

Rastlinam smo odrezali cel nadzemni del in ga potisnili v mikrocentrifugirke, ki so vsebovale redek agar (0,5 %). Nanje smo položili jajčeca koloradskega hrošča. Vse skupaj smo tekom poskusa hranili v velikih steklenih petrijevkah v inkubatorju (Kambič) v temi na 28 °C. Rastline smo vsakodnevno zamenjali s svežimi, da bi zmanjšali vpliv inducirane obrambe krompirja na ličinke. Ko so bile ličinke stare 3 dni, smo iz vsake testirane linije krompirja izbrali 14 do 20 reprezentativnih ličink, jim določili skupno maso ter nadaljevali s poskusom. Od 4. dneva po izleganju naprej smo vsakodnevno spremljali maso posameznih ličink in stopnjo preživetja. Rast in preživetje ličink smo spremljali od 8 do 12 dni. Seznam prehranjevalnih testov navaja preglednica 7.

3.2.6.2.2 Prehranjevalni test z inducirano endogeno obrambo krompirja

V dodatnem prehranjevalnem testu smo želeli simulirati poskus z vključeno inducirano obrambo krompirja in se na ta način bolj približati pogojem na polju. V ta namen smo v velik steklen akvarij dali po 8 rastlin krompirja tako, da so se njihovi listi med sabo stikali, ter ga pokrili z mrežo. Na stranski 2 rastlini smo dali jajca koloradskega hrošča. Akvariji so bili ves čas poskusa v rastni komori (glej poglavje 3.2.2.1), kjer so se ličinke zaradi nižje temperature razvijale počasneje kot v prejšnjih poskusih. Rastline smo zalivali vsak drugi dan z vodovodno vodo. Peti dan po izleganju smo iz posamezne testirane linije pobrali vse ličinke, izbrali 20 reprezentativnih in jih vrnili nazaj v akvarij na že delno pojedene rastline (induciran obrambni odgovor). Del rastlin pa smo nadomestili s svežimi. Ličinke smo stekali in prešteli še 7, 9 in 12 dni po izleganju, ko smo tudi del rastlin nadomestili s svežimi. Poskusi so bili narejeni septembra 2011.

Preglednica 7: Seznam prehranjevalnih testov ličink koloradskega hrošča.

V preglednici so navedene oznake in datumi prehranjevalnih testov ter imena testiranih linij, s katerimi so bile hranjene ličinke koloradskega hrošča. Oznaka nt pomeni kontrolo (netransgen krompir), ostale oznake pa označujejo transgene linije krompirja.

Table 7: List of Colorado potato beetle larvae feeding trials.

The table below shows labels and dates of the feeding trials. Tested potato lines which were fed to Colorado potato beetle are listed. Symbol nt indicates nontransgenic potato line while other symbols indicate different transgenic lines.

Oznaka	Datum prehranjevalnega testa	Testirane linije krompirja
Test 1	Junij 2010	C_L8 nt
Test 2	November 2010	M_A2 M_E2 nt
Test 3	Marec 2011	L_X1 L_Y3 nt
Test 4	Maj 2011	M_A2 M_E2 C_L8 C_X4 nt
Test 5	September 2011	M_A2 M_E2 nt

3.2.7 Odziv koloradskega hrošča na hranjenje z GS hrano

3.2.7.1 Izolacija prebavila žuželk

Iz ličink, vključenih v prehranjevalni test 4, smo 8 dni po izvalitvi, v četrti razvojni stopnji ličink, izolirali prebavilo. Ličinke smo anestezirali na ledu, secirali in izolirali črevo, iz njega odstranili vsebino, ga sprali z ddH₂O, popivnali preostalo vodo na filter papirju ter vzorec zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C. Združevali smo vzorce iz dveh ali treh ličink skupaj.

3.2.7.2 Izolacija RNA iz prebavil ličink koloradskega hrošča

RNA iz črevc ličink smo izolirali s pomočjo reagenta trizol (Invitrogen, ZDA), ki omogoča izolacijo RNA iz celic in tkiv. Med homogenizacijo vzorca trizol ohranja integriteto RNA, medtem ko razgrajuje celice in njene komponente. Omogoča izolacijo večjih količin RNA različnih vrst (daljših ali krajših molekul).

Zamrznjenemu tkivu (črevo ličink) smo dodali 100 μL reagenta trizol in ga homogenizirali ter nato dodali še 900 μL reagenta trizol. Vsebino v epici smo premešali ter centrifugirali 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 g). Supernatant smo prenesli v centrifugirko MaXtract (MaXtract High Density Tubes, QIAGEN) in ga 5 min inkubirali pri sobni temperaturi ter mu nato dodali 200 μL kloroforma, vsebino premešali in 5 min inkubirali pri sobni temperaturi. Sledilo je 5 min centrifugiranje (4 $^{\circ}\text{C}$, 14000 g). Supernatant smo prenesli v novo epico in pri tem pazili, da nismo zraven prenesli tudi gela. Dodali smo 500 μL absolutnega izopropanola in vsebino premešali ter jo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 13200 g). Po centrifugiranju smo iz centrifugirke odlili supernatant in bili pozorni, da nismo s tem odstranili tudi peleta na dnu centrifugirke. Peletu smo dodali 1000 μL 75 % etanola, pripravljenega z ddH₂O in vsebino dobro premešali ter jo centrifugirali 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 13200 g). Po centrifugiranju smo iz centrifugirke previdno odlili etanol ter vzorec sušili pri sobni temperaturi, dokler ni izhlapel ves etanol (~30 min). Pelet smo raztopili v 30 μL ddH₂O brez RNaz in po raztapljanju vzorec inkubirali 10 min pri 65 $^{\circ}\text{C}$ ter mu na koncu dodali 2 μL RNaznega inhibitorja in ga shranili pri – 80 $^{\circ}\text{C}$. Kvaliteto tako očiščene RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (glej poglavje 3.2.8), koncentracijo RNA pa smo izmerili spektrofotometrično (glej poglavje 3.2.9).

3.2.7.3 Razgradnja genomske DNA

DNazno reakcijo smo izvedli tako, kot je opisano v poglavju 3.2.3.2., le da smo prilagodili sestavo reakcijskih mešanic. 20 μL reakcijske mešanice za ekspresijo genov v prebavilu koloradskih hroščev je vsebovala:

- ~3,3 μg RNA v ddH₂O,
- 0,66 μL DNaze I,
- 2 μL pufra,
- ddH₂O brez RNaz do končnega volumna 20 μL .

3.2.7.4 Obratno prepisovanje

Za obratno prepisovanje smo uporabili komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Archive, Applied Biosystems, ZDA). 12,5 µl RNA raztopljene v ddH₂O iz reakcijske mešanice iz DNazne reakcije (3.2.7.3) smo 5 min denaturirali pri 80 °C. Po denaturaciji smo RNA postavili na led in ji dodali reakcijsko mešanico z 2.5 µL 10× RT pufra, 2.5 µL 10× RT naključnih začetnih oligonukleotidov, 1 µL 25× dNTP, 4.25 µL ddH₂O, 1.25 µL reverzne transkriptaze MultiScribe™ (50 U/µL) in 1 µL RNazina (Applied Biosystems, ZDA). Reakcija RT je potekala 10 min pri 25 °C in nato 120 min pri 37 °C. Reakcijo smo izvedli v aparaturi GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems, ZDA). cDNA smo shranili pri – 20 °C in jo uporabili za analizo izražanja genov pri odzivu koloradskega hrošča na prisotnost transgena v krompirju z metodo kvantitativnega PCR v realnem času.

3.2.7.5 PCR v realnem času

Vse reakcije PCR v realnem času smo izvedli na inštrumentu ABI PRISM 9700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA) v optičnih ploščicah formata 384, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems, ZDA). Reakcijo smo izvedli pri univerzalnih pogojih pomnoževanja: 2 min pri 50 °C in 10 min pri 95 °C (aktivacija polimeraze) ter nato 40 ciklov pri pogojih: 10 s pri 95 °C in 1 min pri 60 °C. Pri reakciji s kemijo SYBR Green pa je bil na koncu dodan še korak talitvene krivulje (segrevanje iz 60 °C do 95 °C, hitrost spreminjanja temperature 0,02 °C/s, 5 meritev/°C), s čimer detektiramo razpad dvoverižnih produktov z namenom detekcije potencialnih nespecifičnih produktov pomnoževanja.

Za vsak vzorec smo vzporedno izvedli reakcijo za določanje količine cDNA oziroma izražanja izbranih genov in referenčnega gena. TaqMan kemijo smo uporabili za določanje amplikonov *intestaini A*, *intestaini B*, *celulaza GH48-1*, *celulaza 48-2* in genu za 18S ribosomsko RNA, SYBR kemijo pa smo uporabili pri amplikonih *intestaini D*, *intestaini E* in *Ld_ser-prot*. Za vzorce, kjer je bila uporabljena kemija TaqMan, smo za pomnoževanje uporabili TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA), za vzorce s SYBR kemijo pa smo uporabili Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA).

Za pripravo reakcijskih mešanic za PCR smo uporabili začetne oligonukleotide in sonde v optimiziranih koncentracijah, ki so navedene v preglednici 2, kjer so navedena tudi njihova zaporedja in vir. Reakcijske mešanice za posamezne amplikone smo pripravili v mikrocentrifugirkah v količini, ki je zadostovala za vse reakcije. Reakcijo PCR smo izvajali v končnem volumnu 5 μ L.

Vsak vzorec smo testirali z vsemi sedmimi amplikoni in z amplikonom za endogeno kontrolo, genom za 18S ribosomsko RNA (za pomnoževanje smo uporabili komplet Human 18S rRNA, Applied Biosystems, ZDA). Vse vzorce smo testirali v dveh paralelkah in v dveh redčenjih, da smo lahko opazili morebitno inhibicijo pomnoževanja. Kot negativno kontrolo smo za vsak amplikon izvedli reakcijo brez produkta RT.

Začetno analizo podatkov smo izvedli v programu SDS 2.3 (Applied Biosystems, ZDA). Na vsaki ploščici smo prav tako z optimalnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov za vse uporabljene amplikone pomnoževali združeno cDNA (mešanica cDNA različnih posameznih vzorcev) v seriji petih redčin ter tako pripravili umeritvene krivulje. Iz dobljenih vrednosti smo izračunali učinkovitost pomnoževanja po enačbi (3), kjer je (k) naklon linearne regresijske premice med logaritmiranimi vrednostmi količine tarče in Cq vrednostmi (Pfaffl, 2001).

$$E = (10^{(1/k)})^{-1} \quad \dots (3)$$

Učinkovitost pomnoževanja je vrednost med 0 oz. 0 % (do pomnoževanja ni prišlo) in 1 oz. 100 % (vse molekule tarčne RNA se v enem ciklu reakcije PCR podvojijo). 100-odstotna učinkovitost ustreza naklonu $k = -3.33$. Določili smo tudi korelacijski koeficient (R^2) in linearni razpon meritev, to je razpon koncentracij oz. faktorjev redčitve, pri katerih so vrednosti Cq v linearnem odnosu z \log_{10} koncentracijami tarčne RNA. Preko primerjave dobljenih Cq vrednosti posameznih vzorcev in serije redčin smo izračunali absolutno število kopij tarčne DNA (na podlagi relativnega števila kopij, ki smo ga pripisali vzorcem iz serije redčin). Ker smo vsak vzorec testirali v dveh redčenjih, smo preverili koeficient variacije izračunanega števila kopij tarčne DNA za vsako redčitev. V primeru, ko je bil koeficient variacije med redčinama večji od 35 %, vzorca nismo uporabili za nadaljnje

analize. Z uporabo umeritvenih krivulj smo tako izračunali število kopij tarčnega gena in to normalizirali glede na število kopij endogene kontrole. Kot normalizacijski gen smo uporabili gen za 18S ribosomsko RNA (sistem Human 18S rRNA, Applied Biosystems, ZDA).

3.2.8 Agarozna gelska elektroforeza

Za ugotavljanje velikosti pomnoženih DNA fragmentov (PCR produktov) in plazmidov ter za ugotavljanje kvalitete RNA v posameznih fazah dela smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo.

Pripravili smo 0,5 % ali 1 % gel, tako da smo agarozo segrevali v pufru TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Ko se je agarozna popolnoma stopila, smo raztopino nekoliko ohladili in dodali še etidijev bromid (0,75 μ L). Raztopino smo razlili na nosilec za gel in pustili 30 min, da se je gel strdil.

RNA ali DNA vzorec smo pred nanosom na gel zmešali z nanašalno raztopino v razmerju 2 μ L vzorca, 5 μ L nanašalne raztopine (200 μ L 6x Loading Dye (Fermentas), 500 μ L glicerol, 500 μ L ddH₂O) in 5 μ L ddH₂O brez RNaz. 12 μ L tako pripravljene mešanice smo nanесли v vdolbinice gela. Kot kontrolo smo v eno progo na gelu nanесли 0,7 μ L označevalca velikosti DNA 100 bp (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, ZDA), zmešanega z enako količino nanašalne raztopine in ddH₂O kot pri vzorcih.

RNA smo ločevali 20 minut pri napetosti 80 V, DNA pa 30 minut pri napetosti 100 V. Uporabljali smo napajalnik POWER/PAC 1000 (BIO-RAD). Po koncu elektroforeze smo nukleinske kisline detektirali s pomočjo UV transiluminatorja pri valovni dolžini 254 nm in gel slikali s sistemom GelDoc Mega (s programom UVI Photo MW, Biosystematica).

3.2.9 Spektrofotometrično določanje koncentracije in čistosti RNA

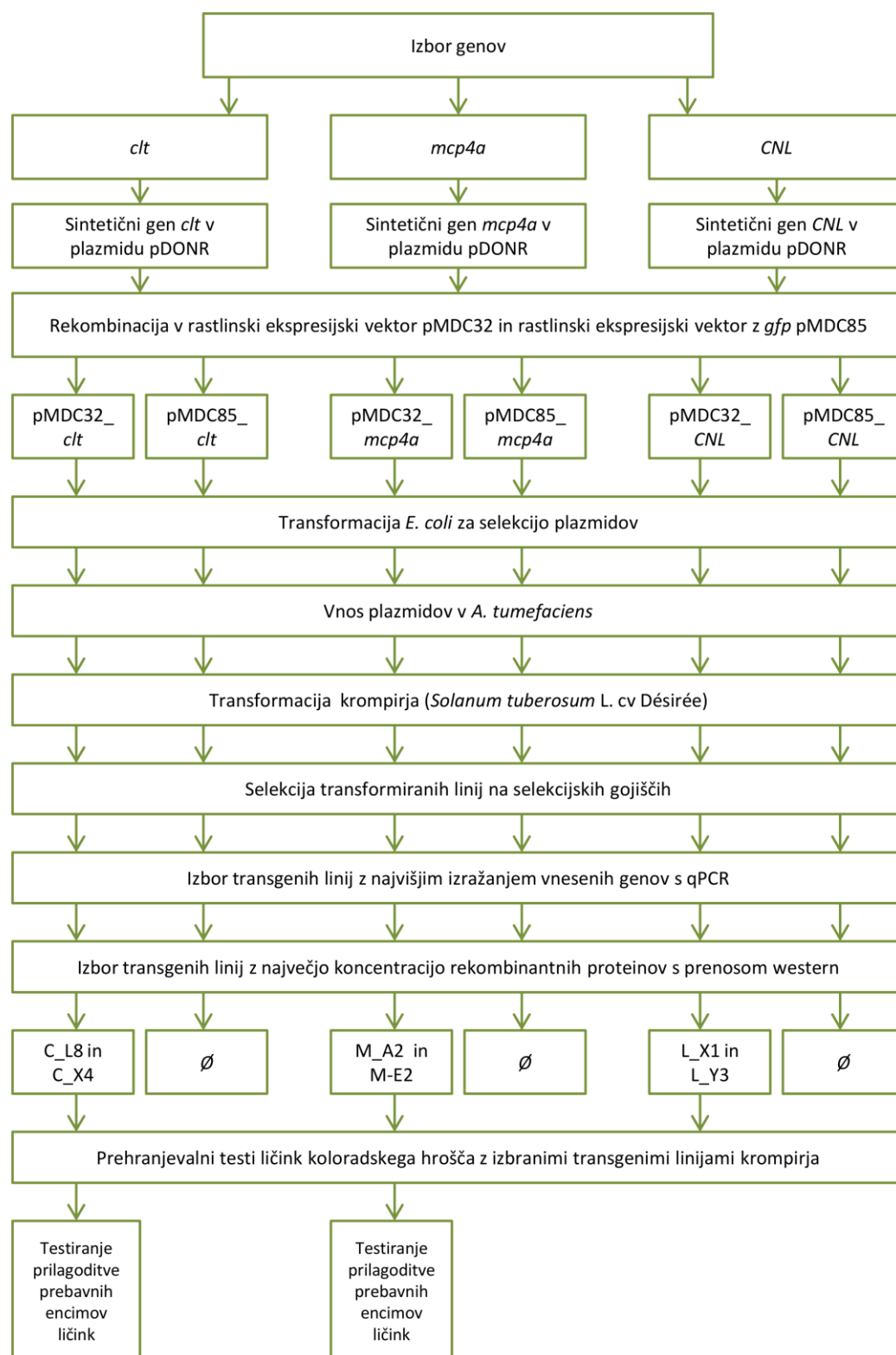
Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000. Čistost RNA smo ocenili iz razmerja absorbanc A₂₆₀/A₂₈₀ in A₂₆₀/A₂₃₀. Optimalne vrednosti za obe razmerji sta med 1.8 in 2.2. Za določanje koncentracije in čistosti smo uporabili 1.5 μ L posameznega vzorca.

3.2.10 Statistične analize

Analizo podatkov prehranjevalnih testov smo opravili s Studentovim t-testom v programu Excel. Maso ličink, hranjenih s kontrolnim, netransgenim krompirjem, smo primerjali z maso ličink hranjenih s transgeno linijo krompirja. Prav tako smo s Studentovim t-testom opravili analizo podatkov pri izražanju izbranih genov v črevesu ličink koloradskega hrošča. Primerjali smo izražanje izbranega gena pri ličinkah hranjenih s kontrolnim netransgenim krompirjem in izražanje gena pri ličinkah hranjenih s transgeno linijo krompirja. Uporabili smo dvostranski Studentov t-test z enakimi variancami.

4 REZULTATI

S pomočjo GSR smo preučili insekticidni potencial treh glivnih proteinov. Dva izbrana proteina sta inhibitorja cisteinskih proteaz makrocipin in klitocipin, tretji pa je lektin CNL. Gene, ki kodirajo izbrane proteine, smo prenesli v modelno rastlino krompir, učinkovitost GSR pa preverili v prehranjevalnih testih z ličinkami koloradskega hrošča. Potek raziskovalnega dela shematsko predstavlja slika 5.



∅-transgenih linij nismo pridobili

Slika 5: Shema poteka raziskovalnega dela.
Figure 5: Schematic representation of research workflow.

4.1 PRIPRAVA PLAZMIDNIH VEKTORJEV

Ker smo želeli v rastlinah krompirja doseči izražanje izbranih treh proteinov, smo morali najprej pripraviti ustrezne plazmidne vektorje, zaporedja genov pa prilagoditi glede na pogostost uporabe kodonov pri krompirju.

4.1.1 Izbrani geni s prilagojenim kodonom

Zaporedja kodirajočih regij izbranih genov iz orjaškega dežnika in poprhnjene livke, ki so dostopna v bazi podatkov GenBank, smo prilagodili ekspresijskemu sistemu krompirja tako, kot prikazujejo slike 6, 7, 9, 10, 12 in 13. Na slikah 8, 11 in 14 so prikazane aminokislinske poravnave optimiziranih in originalnih proteinov, ki so identične.

Prilagojena zaporedja so bila umetno sintetizirana in vstavljena v plazmidne vektorje pDONR221 (pDONR221_*mcp4a*, pDONR221_*clt*, pDONR221_*CNL*). V rekombinazni reakciji smo jih prenesli v plazmida pMDC32 in pMDC85. Plazmid pMDC85 je enak pMDC32 plazmidu, le da ima za attR2 mestom dodan *gfp* gen, ki kodira zeleni fluorescenčni protein (GFP, angl. green fluorescent protein) in je zato tudi 710 bp večji. Po prepisu gena v protein tako dobimo C-terminalno fuzijo našega proteina z reporterskim proteinom GFP. Ta omogoča sledenje izražanja proteinov s pomočjo fluorescentnega mikroskopa.

Za vnos vsakega izmed izbranih genov (*mcp4a*, *clt*, *CNL*) v vektorja pMDC32 in pMDC85 smo uporabili isti pDONR221 plazmid. Da smo pri vnosu gena v plazmid pMDC85 omogočili fuzijo izbranih genov z genom *gfp*, smo morali izbranim vnesenim genom odstraniti stop kodon ter dodati nukleotid, da je pri prepisovanju v mRNA odprt bralni okvir ostal pravilen in je prišlo do fuzije izbranega gena z genom *gfp*. Ker smo za vnos genov v vektor pMDC32 uporabili isti pDONR221 plazmid, je bil zaradi odstranitve stop kodona bralni okvir izbranih genov podaljšan za 54 nukleotidov, saj se v zaporedju plazmida pMDC32 po vstavitvi izbranega gena v rekombinacijsko mesto šele takrat pojavi stop kodon. Posledica tega je bila, da so bili ob transformaciji rastlin z vektorjem pMDC32 sintetizirani proteini daljši za 18 AK (KGWARRPSFLVQSGSIIP). Predvidevali smo, da dodatne AK ne bodo vplivale na funkcionalnost proteinov, saj so mesta, ključna za delovanje izbranih treh proteinov, na N-terminalnem koncu. Kjer je bil izbran destinacijski

vektor pMDC85 (fuzija izbranega proteina z GFP), smo med fuziranima proteinoma dobili peptidni mostiček.

```

Optim. 5 ATGGCCTTAGAAGATGGTTTTTATACTATTAGACACTTGGTTGAAGGTCAACATCCTTCA
Orig. 5 ATGGCACTTGAAGACGGTTTCTACACCATTGCGCCACCTTGTGAGGGCCAACATCCAAGC

Optim. 65 ATACCTGGTGGAATGTATGCTTCATCAAAAGATGGCAAGGATGAACCAGTGACAGCAGAG
Orig. 65 ATTCGGGTGGCATGTATGCGTCCTCCAAGGACGGTAAGGACGAACCTGTGACCGCCGAA

Optim. 125 CCACTCGGACCTCATAGTAAGATCAGATGGTGGATAGCTGCAGCTCCAGAAAGCTGGAGAT
Orig. 125 CCTCTCGCCCCCATAGCAAGATCCGATGGTGGATCGCCGCTGCCCCCGAGGCTGGGGAC

Optim. 185 GATATGTACACAATTACTGAATTCCGTGCTGATAAGTCAATACCAGGTCAATGGGCAAGG
Orig. 185 GATATGTACACCATCACGGAGTTCCGGGCCGACAAATCCATACCAGGACAGTGGGCTCGC

Optim. 245 AGTCCTACTGAGATTGGTGTTCCAGTTTACCTTTATGATAGAATTAAGGCTGAGGAGACT
Orig. 245 TCCCTACCGAGATAGGGGTGCCAGTGTATTTGTATGATAGAATTAAGGCTGAGGAGACT

Optim. 305 GGATATACCTGTGTTTGGCGAATTCAGCCCACTTATGAAGGAGTTGGGGGAGTGTACAAC
Orig. 305 GGTTACACCTGTGTATGGAGGATCCAACCCACCTACGAGGGTGTGGTGGCGTCTATAAC

Optim. 365 ATTATGGGAAATAGTAGGATTGGTTCAACAGACTGGGCCGACTTAAGAGGTGAAGATGGA
Orig. 365 ATCATGGGAACTCTCGCATTGGATCAACCGATTGGGCCGATTTACGTGGGGAGGACGGA

Optim. 425 AAACCTCAAGTTTACTAAGCCTGTTCCTGTGATTCCAAATGTTTATATTCCACGTTGG
Orig. 425 AAGCCCCAAGTTTACACGAAGCCCGTTCGGTTATACCGAATGTGTATATTCCCCGTTGG

Optim. 485 TTTATTTCTGAAATATAAAGGAA
Orig. 485 TTTATCTCAGAATATAAAGGAATAG

```

Slika 6: Poravnava DNA optimizirane regije in kodirajočega dela originalne regije gena *mcp4a*.

Zamenjani kodoni so označeni z rdečo barvo. S sivo barvo je osenčen stop kodon v originalnem zaporedju, ki smo ga zaradi fuzije z genom *gfp* odstranili.

Figure 6: DNA alignment of optimized and original region of *mcp4a* gene.

The replaced codons are marked with red colour. Gray shaded stop codon in the original region was removed due to fusion with *gfp* gene.

```
CACCATGGCCTTAGAAGATGGTTTTTATACTATTAGACACTTGGTTGAAGGTCAACATCC
TTCAATACCTGGTGGAAATGTATGCTTCATCAAAGATGGCAAGGATGAACCAGTGACAGC
AGAGCCACTCGGACCTCATAGTAAGATCAGATGGTGGATAGCTGCAGCTCCAGAAGCTGG
AGATGATATGTACACAATTACTGAATCCGTGCTGATAAGTCAATACCAGGTCAATGGGC
AAGGAGTCCTACTGAGATTGGTGTCCAGTTTACCTTTATGATAGAATTAAGGCTGAGGA
GACTGGATATACCTGTGTTTGGCGAATTCAGCCCACTTATGAAGGAGTTGGGGGAGTGTA
CAACATTATGGGAAATAGTAGGATTGGTTCAACAGACTGGGCCGACTTAAGAGGTGAAGA
TGGAAAACCTCAAGTTTACACTAAGCCTGTTCTGTGATCCAAATGTTTATATTCCACG
TTGGTTTTTTCTGAATATAAGGAAA
```

Slika 7: Celotno optimizirano zaporedje gena *mcp4a* v pDONR221 vektorju.

Dolžina zaporedja je 506 bp, odstotek GC pa 42,29. Sivo osenčeno so označeni 4 dodani nukleotidi CACC na 5' koncu in A na 3' koncu zaporedja (ki nam omogoča fuzijo z GFP v primeru kloniranja v plazmid pMDC85).

Figure 7: Optimized region of *mcp4a* gene which was provided in pDONR221 plasmid.

The length of the gene sequence is 506 bp, GC content is 42,29 %. 4 added nucleotides CACC at 5' and A (which enables GFP fusion where the sequence is cloned into pMDC85 vector) at 3' end are gray shaded.

```
Optim. 1 MALEDGFYTI RHLVEGQHPSIPGGMYASSKDGKDEPVTAEPLGPHSKIRWWIAAAPEAGD
Orig. 1 MALEDGFYTI RHLVEGQHPSIPGGMYASSKDGKDEPVTAEPLGPHSKIRWWIAAAPEAGD

Optim. 61 DMYTITEFRADKSIPGQWARSPTEIGVPVYLYDRIKAEETGYTCVWRIQPTYEGVGGVYN
Orig. 61 DMYTITEFRADKSIPGQWARSPTEIGVPVYLYDRIKAEETGYTCVWRIQPTYEGVGGVYN

Optim. 121 IMGNSRIGSTDWADLRGEDGKQPQVYTKPVPVIPNVYIPRWFISEYKE
Orig. 121 IMGNSRIGSTDWADLRGEDGKQPQVYTKPVPVIPNVYIPRWFISEYKE
```

Slika 8: Aminokislinska poravnava optimiziranega in originalnega *Mcp4a*.

Figure 8: Amino acid alignment of optimized and original *Mcp4a*.

```

Optim. 5 ATGGCTTCTCTTGAAGATGGAACCTATAGGTTGCGAGCTGTTACCACATCTAATCCAGAT
Orig. 5 ATGGCTTCTCTTGAGGATGGTACATATCGCTTGAGAGCGGTCACCACAAGCAACCCCGAC

Optim. 65 CCCGGAGTTGGGGGAGAATACGCTACTGTAGAGGGAGCACGTCAACCAGTAAAGGCAGAA
Orig. 65 CCCGGTGTGGGTGGGGAGTATGCTACCGTAGAAGGTGCTCGCCAACCCGTCAAGGCCGAA

Optim. 125 CCTAGTACACCTCCATTCTTCGAACGTCAAATTTGGCAAGTTACTAGGAACAGTGATGGT
Orig. 125 CCTAGCAGCCTCCCTTCTTTGAGCGACAAATCTGGCAGGTCACTCGGAATCCGACGGC

Optim. 185 CAATCTACCATAAAAATATCAAGGACTTAATGCTCCATTTGAATATGGATTTCTTACGAC
Orig. 185 CAATCCACCATCAAATATCAAGGGTTGAACGCCCTTTTGAGTACGGATTCTCTTATGAT

Optim. 245 CAATTAAGAGCAAAATGCTCCAGTGATTGCTGGGGATCCCAGGAATACATTTTACAGCTG
Orig. 245 CAACTCGAGCAGAATGCACCCGTCATCGCTGGAGACCCAAAGGAATACATTTCTTACGCTT

Optim. 305 GTGCCATCTACTACTGATGTATACATTATTAGAGCACCTATTCAGAGAGTAGGTGTTGAT
Orig. 305 GTCCCTTCTACTACCGATGTTTATATCATAAGGGCCCTATACAGCGTGTCCGGCGTAGAC

Optim. 365 GTGGAGGTGGGTGTTCAAGGTAACAATCTGTTTATAAGTTCTTTCTGTAGATGGATCA
Orig. 365 GTTGAAGTTGGTGTACAGGGGAACAATCTGTTTATAAAATTTTCCCTGTTGATGGTTCT

Optim. 425 GCGGGAGATAGGCCTGCTTGGAGGTTTCACACGTGAA
Orig. 425 GGTGGGACAGACCCGCTTGGAGATTACCCGGGAGTAA

```

Slika 9: Poravnava DNA optimizirane regije in kodirajočega dela originalne regije gena *clt*.

Zamenjani kodoni so označeni z rdečo barvo. S sivo barvo je osenčen stop kodon v originalnem zaporedju, ki smo ga zaradi fuzije z genom *gfp* odstranili.

Figure 9: DNA alignment of optimized and original region of *clt* gene.

The replaced codons are marked with red colour. Gray shaded stop codon in the original region was removed due to fusion with *gfp* gene.

```

CACCATGGCTTCTCTTGAAGATGGAACCTATAGGTTGCGAGCTGTTACCACATCTAATCC
AGATCCCGGAGTTGGGGGAGAATACGCTACTGTAGAGGGAGCACGTCAACCAGTAAAGGC
AGAACCTAGTACACCTCCATTCTTCGAACGTCAAATTTGGCAAGTTACTAGGAACAGTGA
TGGTCAATCTACCATAAAAATATCAAGGACTTAATGCTCCATTTGAATATGGATTTTCTTA
CGACCAATTAGAGCAAAATGCTCCAGTGATTGCTGGGGATCCCAGGAATACATTTTACA
GCTGGTGGCATCTACTACTGATGTATACATTATTAGAGCACCTATTCAGAGAGTAGGTGT
TGATGTGGAGGTGGGTGTTCAAGGTAACAATCTTGTATAAGTTCTTTCTGTAGATGG
ATCAGGCGGAGATAGGCCTGCTTGGAGGTTTCACACGTGAAA

```

Slika 10: Celotno optimizirano zaporedje gena *clt* v pDONR221 vektorju.

Dolžina zaporedja je 461 bp, odstotek GC pa 43,38. Sivo osenčeno so označeni 4 dodani nukleotidi CACC na 5' koncu in A na 3' koncu zaporedja (ki nam omogoča fuzijo z GFP v primeru kloniranja v plazmid pMDC85).

Figure 10: Optimized region of *clt* gene which was provided in pDONR221 plasmid.

The length of the gene sequence is 461 bp, GC content is 43,38 %. 4 added nucleotides CACC at 5' and A (which enables GFP fusion where the sequence is cloned into pMDC85 vector) at 3' end are gray shaded.

```

Optim. 1 MASLEDGTYRLRAVTTSNPDPGVGGEYATVEGARQPVKAEPSTPPFFERQIWQVTRNSDG
Orig.  1 MASLEDGTYRLRAVTTSNPDPGVGGEYATVEGARQPVKAEPSTPPFFERQIWQVTRNSDG

Optim. 61 QSTIKYQGLNAPFEYGFSDQLEQNAPVIAGDPKEYILQLVPSTTDVYIIRAPIQRVGVD
Orig.  61 QSTIKYQGLNAPFEYGFSDQLEQNAPVIAGDPKEYILQLVPSTTDVYIIRAPIQRVGVD

Optim. 121 VEVGVQGNLNVYKFFPVDGSGGDRPAWRFTRE
Orig.  121 VEVGVQGNLNVYKFFPVDGSGGDRPAWRFTRE

```

Slika 11: Aminokislinska poravnava optimiziranega in originalnega Clt.

Figure 11: Amino acid alignment of optimized and original Clt.

```

Optim. 5 ATGTCTATAACTCCAGGAACCTTATAATATTACCAATGTTGCATATACAAATAGACTTATT
Orig.  5 ATGTCTATTACTCCTGGAACCTACAACATAACCAATGTTGCTTACACCAACAGGCTCATC

Optim. 65 GATCTCACAGGTTCAAATCCAGCTGAAAATACACTCATTATTGGTCATCATTTGAACAAA
Orig.  65 GACCTAACTGGTAGCAATCCTGCAGAGAACACACTTATTATCGGTCACCACCTCAATAAA

Optim. 125 ACCCCAAGTGGCTACGGAAATCAGCAGTGGACTTTAGTTCAATTGCCCATACTACTATA
Orig.  125 ACACCTTCGGGCTATGGAAATCAGCAGTGGACGCTTGTTCAGCTGCCTCATACCACAATC

Optim. 185 TACACTATGCAAGCAGTTAATCCCCAAAGTTATGTAAGGGTTAGGGATGATAATCTTGTT
Orig.  185 TATACAATGCAGGCCGTCATCCACAGTCGTATGTCCGCGTCAGAGACGACAACCTTGTA

Optim. 245 GACGGAGCTGCTCTTGTTGGCTCTCAACAACTACTCCAGTGTCTATTGAGTCAGCTGGT
Orig.  245 GATGGTGCCGCGCTTGTGGGAGTCAGCAGCCTACTCCAGTTTCCATCGAAAGCGCTGGA

Optim. 305 AATTCTGGCCAATTCAGGATAAAGATTCTAATCTAGGATTAGCTCTTACACTGCCTAGT
Orig.  305 AACAGCGGCAATTCAGAATCAAGATTCCAACCTTAGGTCTCGCTTTGACCTCCCCTCC

Optim. 365 GATGCTAACTCAACCCCTATAGTTCTCGGAGAAGTTGACGAACTTCTACTAATCAACTA
Orig.  365 GACGCGAATAGCACGCCCATCGTGCTCGGGGAGGTGGATGAGACCAGCACAAACCAGCTT

Optim. 425 TGGGCATTTGAATCTGTTCTGTCAGTT
Orig.  425 TGGGCCTTCGAATCTGTTCCGCTGTGTGA

```

Slika 12: Poravnava DNA optimizirane regije in kodirajočega dela originalne regije gena CNL.

Zamenjani kodoni so označeni z rdečo barvo. S sivo barvo je osenčen stop kodon v originalnem zaporedju, ki smo ga zaradi fuzije z genom *gfp* odstranili.

Figure 12: DNA alignment of optimized and original region of CNL gene.

The replaced codons are marked with red colour. Gray shaded stop codon in the original region was removed due to fusion with *gfp* gene.

```
CACCATGTCTATAACTCCAGGAACCTATAATATTACCAATGTTGCATATACAAATAGACT
TATTGATCTCACAGGTTCAAATCCAGCTGAAAATACACTCATTATTGGTCATCATTGAA
CAAACCCCAAGTGGCTACGGAAATCAGCAGTGGACTTTAGTTCAATTGCCCCATACTAC
TATATACACTATGCAAGCAGTTAATCCCCAAAGTTATGTAAGGGTTAGGGATGATAATCT
TGTTGACGGAGCTGCTCTTGTGGCTCTCAACAACCTACTCCAGTGTCTATTGAGTCAGC
TGTAATTCTGGCCAATTCAGGATAAAGATTCCTAATCTAGGATTAGCTCTTACACTGCC
TAGTGATGCTAACTCAACCCCTATAGTTCTCGGAGAAGTTGACGAACTTCTACTAATCA
ACTATGGGCATTTGAATCTGTTTCTGCAGTTA
```

Slika 13: Celotno optimizirano zaporedje gena *CNL* v pDONR221 vektorju.

Dolžina zaporedja je 452 bp, odstotek GC pa 39,38. Sivo osenčeno so označeni 4 dodani nukleotidi CACC na 5' koncu in A na 3' koncu zaporedja (ki nam omogoča fuzijo z GFP v primeru kloniranja v plazmid pMDC85).

Figure 13: Optimized region of *CNL* gene which was provided in pDONR221 plasmid.

The length of the gene sequence is 452 bp, GC content is 39,38 %. 4 added nucleotides CACC at 5' and A (which enables GFP fusion where the sequence is cloned into pMDC85 vector) at 3' end are gray shaded.

Optim.	1	MSITPGTYNITNVAYTNRLIDL TGSNPAENTLI IGHHLNKTPSGYGNQQWTLVQLPHTTI
Orig.	1	MSITPGTYNITNVAYTNRLIDL TGSNPAENTLI IGHHLNKTPSGYGNQQWTLVQLPHTTI
Optim.	61	YTMQAVNPQSYVRVRRDDNLVDGAALVGSQQPTPVSIESAGNSGQFRIKIPNLGLALTLPS
Orig.	61	YTMQAVNPQSYVRVRRDDNLVDGAALVGSQQPTPVSIESAGNSGQFRIKIPNLGLALTLPS
Optim.	121	DANSTPIVLGEVDETSTNQLWAFESVSAV
Orig.	121	DANSTPIVLGEVDETSTNQLWAFESVSAV

Slika 14: Aminokislinska poravnava optimiziranega in originalnega *CNL*.

Figure 14: Amino acid alignment of optimized and original *CNL*.

4.1.2 Prenos genov v destinacijska plazmida pMDC32 in pMDC85

Da smo lahko določili pričakovane dolžine PCR produktov pri preverjanju vnesenih genov v plazmida pMDC32 in pMDC85, smo zapis plazmidov pMDC32 in pMDC85 preuredili v obliko, ki nam omogoča ročno obdelavo zaporedij. Ko smo pridobili zapis v ustrezni obliki, smo poiskali in označili vsa pomembna zaporedja (slika 15), dodali zapis za naš gen, označili naleganje začetnih oligonukleotidov in izračunali pričakovane dolžine konstruktov, ki so navedene v preglednici 8.

```

caggaaacagctatgaccatgattacgaattcagtaacatagatgacaccgcgcgataatattcctagttgcgcgctatatttgttttctatcgcgtat
taaagtataaattgcgggactctaataaaaacccatctcataaataacgcatgattacatgtaattattacatgcttaacgtaattcaacagaaatt
atatgataatcatcgcaagaccggcaacaggattcaatcttaagaaactttatggcaaatgtttgaacgatCGGGGAAATTCGAGCTCCACCGC
GGTGGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTTAATTAAGGAATTATCGAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGAACGAGAAAACGT
AAAATGATATAAATATCAATATATTAATTAGATTTTGCATAAAAAACAGgenAAAATCTAATTTAATATATTGAT
TTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAGCTTTTTGTACAACTTGTGATAGCTTGGCGGCCTCGAGGGGGGGCCCGG
TACCCGGGGATCCTCTAGgatcgaggtcctctcaaatgaaatgaactccttatatagaggaagggcttgcgaaggatagtggtgattgtg
gtcatcccttacgtcagtgagatcacatcaatccactgtcttgaagacgtggttgaacgtctctttttccacgatgctcctcgtgggtgggggtc
catctttgggaccactgtcggcagaggcatctcaacgatggccttctttatcgcaatgatggcattgtaggagccacctcctttccactatcttca
caataaagtacagatagctggcaatggaatccgaggaggttccggatattacccttggtaaagctcaattgccttggcttctgagactg
tatctttgatattttggagtagacaagtgtgctgctccacatgttatcacatcaatccactgtcttgaagacgtggttgaacgtctctttttccac
gatgctcctcgtgggtgggggtccatctttgggaccactgtcggcagaggcatcttcaacgatggccttctttatcgcaatgatggcattgtaggag
gccacctcctttccactatcttcacaataaagtacagatagctggcaatggaatccgaggaggttccggatattacccttggtaaagctca
attgccttggcttctgagactgtatctttgatattttggagtagacaagtgtgctgctccacatgttgacctgaggcacgccaagcttggcact
ggccgtcgttttac

```

Slika 15: Izsek zaporedja plazmida pMDC32.

Označeni sta mesti naleganja univerzalnih začetnih oligonukleotidov M13 (poudarjena s sivo). Označeni sta tudi regiji attR1 (velike podčrtane črke), mesto gena po rekombinaciji in regija attR2 (velike nepodčrtane črke). Promotor 35S je označen s poševnim tiskom.

Figure 15: A fragment of the pMDC32 plasmid sequence.

Sequences to which M13 primers anneal are gray shaded. AttR1 and attR2 recombination sites are labelled (attR1 with uppercased and attr2 with uppercased underlined letters). 35S promoter is labelled in italics.

Preglednica 8: Pričakovane dolžine konstruktov pri pomnoževanju z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi M13 in z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.

Dolžine nukleotidov so podane v bp.

Table 8: Expected construct lengths (bp) in amplification with universal M13 primers and gene-specific primers.

Vneseni gen	M13 na pMDC32	M13 na pMDC85	Gensko specifični začetni oligonukleotidi
<i>mcp4a</i>	1853	2587	506
<i>clt</i>	1808	2542	461
<i>CNL</i>	1799	2533	452

4.1.3 Rekombinacija Gateway in transformacija OmniMAX™ T1 Phage-Resistant *Escherichia coli*

Prilagojena nukleotidna zaporedja smo z rekombinacijo prenesli iz pDONR221 v plazmida pMDC32 in pMDC85. Tako smo pridobili 6 različnih pMDC konstruktov: pMDC32_*mcp4a*, pMDC32_*clt*, pMDC32_*CNL*, pMDC85_*mcp4a*, pMDC85_*clt*, pMDC85_*CNL*. Z njimi smo transformirali bakterije OmniMAX™ T1 Phage-Resistant *E. coli* (Invitrogen, ZDA), kjer smo z metodo PCR na osnovi kolonije potrdili prisotnost ustreznih genov. Iz tako potrjenih kolonij smo izolirali plazmide in jih z elektroporacijo vnesli v bakterijo ElectroMAX™ *A. tumefaciens* LBA4404, kjer smo prisotnost ustreznih genov ponovno potrdili z metodo PCR na osnovi kolonije.

4.2 STABILNA TRANSFORMACIJA RASTLIN

Z bakterijo *A. tumefaciens* LBA4404 z vstavljenimi posameznimi plazmidi pMDC32_*mcp4a*, pMDC32_*clt*, pMDC32_*CNL*, pMDC85_*mcp4a*, pMDC85_*clt* in pMDC85_*CNL* smo transformirali stebelne internodije rastlin krompirja sorte Désirée. Sprva so poganjki iz transformiranih stebelnih internodijev rastli zelo počasi, nato pa smo postopek regeneracije optimizirali tako, da smo petrijevke s stebelnimi internodiji začeli ovijati v parafilm (Bemis, ZDA) in ne več v mikropor (Tosama, SI). Tako so se gojišča za regeneracijo počasneje izsuševala in poganjki so rastli mnogo hitreje. Pri nekaterih petrijevkah s transformiranimi stebelnimi izsečki je kljub antibiotikom v gojišču in delu v laminariju prišlo do okužb, kar je vplivalo na zmanjšano število pridobljenih transgenih rastlin. Največjo uspešnost transformacije so imeli stebelni internodiji, transformirani s

plazmidoma pMDC32_CNL (8,5 %) in pMDC85_CNL (13 %), stebelni internodiji transformirani z ostalimi plazmidi pa so imeli približno 3 % uspešnost transformacije. Število regeneriranih transgenih linij, ki so zrastle na selekcijskih gojiščih s higromicinom in uspešnost transformacije sta prikazana v preglednici 9.

Preglednica 9: Uspešnost transformacije krompirja.

Število transformiranih izsečkov, število regeneriranih transgenih rastlin in uspešnost transformacije pri transformaciji z različnimi konstrukti.

Table 9: Potato reformation rate.

Number of transformed explants, number of regenerated transgenic potato plants and transformation rate in transformation with different constructs.

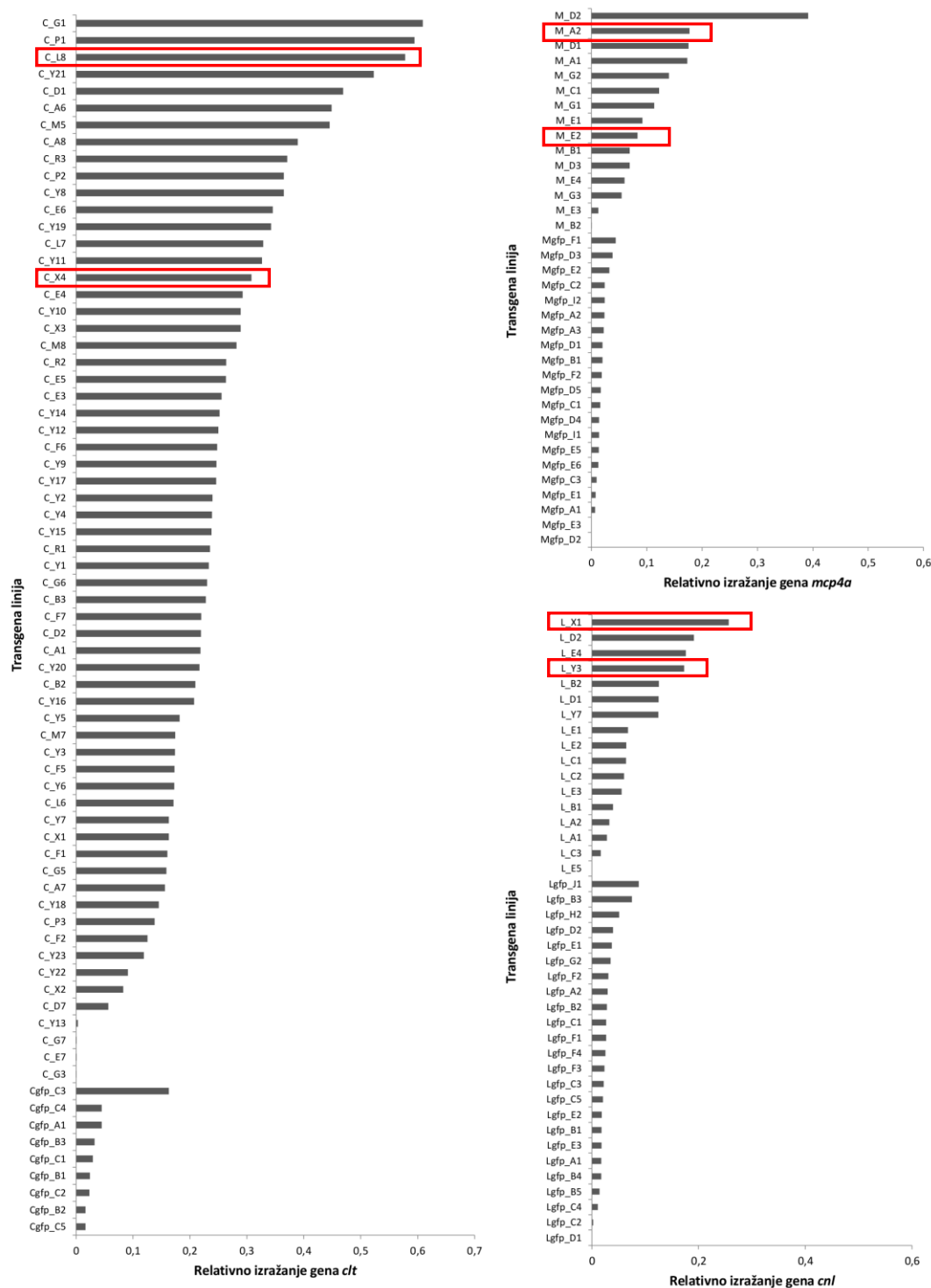
Vstavljen konstrukt	Število transformiranih izsečkov	Skupno število regeneriranih rastlin	Uspešnost transformacije (%)
<i>mcp4a</i>	800	15	1,9
<i>mcp4a-gfp</i>	600	21	3,5
<i>clt</i>	1900	63	3,3
<i>clt-gfp</i>	400	9	2,3
<i>lec</i>	1100	94	8,5
<i>lec-gfp</i>	400	52	13

Pri transgenih rastlinah smo z metodo RT-qPCR preverili izražanje vnesenih genov in pri linijah z najvišjo ekspresijo nato s prenosom western preverili prisotnost rekombinantnih proteinov in ocenili količino le-teh. Pri zadnji transformaciji pa smo zaradi časovne optimizacije dela večje število transgenih rastlin (z vnesenim genom *CNL* in *CNL_gfp*) preverili le s prenosom western.

4.2.1 Testiranje gensko spremenjenih linij krompirja z metodo RT-qPCR

Pri linijah, ki so zrastle na selekcijskih gojiščih, smo z metodo RT-qPCR analizirali stopnjo izražanja transgena. Največ transgenih linij smo sicer pridobili pri transformacijah s plazmidoma pMDC32_CNL (94 linij) in pMDC85_CNL (52 linij), vendar pa smo izražanje na RNA nivoju preverili le pri nekaterih izmed njih. Tako smo izražanje s qPCR preverili pri 63 GS linijah, transformiranih s plazmidom pMDC32_ *clt*, 24 GS linijah

transformiranih s pMDC85_*CNL*, 21 GS linijah transformiranih s pMDC85_*mcp4a*, 17 GS linijah transformiranih s pMDC32_*CNL*, 15 GS linijah transformiranih s pMDC32_*mcp4a* in 9 GS linijah transformiranih s pMDC85_*clt*. Rezultati relativnega izražanja transgenov glede na izražanje endogene kontrole *cox* so prikazani na sliki 16.



Slika 16.: Relativno izražanje genov *mcp4a*, *clt* in *CNL* pri transformiranih rastlinah krompirja.

Oznake transgenih rastlin so M (za rastline, v katere smo vnesli konstrukt *mcp4a*), C (za *clt*) in L (za *CNL*), gfp pa označuje linije, kjer je bil izbran gen vnesen skupaj z genom *gfp*. Z rdečimi okvirji so označene transgene linije krompirja, ki smo jih uporabili v prehranjevalnih testih.

Figure 16: Relative expression of *mcp4a*, *clt* and *CNL* in transgenic potato lines.

Symbol M stands for transgenic lines transformed with *mcp4a*, C for *clt*, L for *CNL*, whereas *gfp* indicates lines transformed with construct where gene of interest was fused with *gfp*. Transgenic potato lines used in feeding bioassays are framed with red rectangles.

4.2.2 Prenos western

Pri linijah krompirja, ki so najbolj izražale transgene, smo s prenosom western določili prisotnost rekombinantnih proteinov. Pri nekaterih linijah z vnesenim genom *CNL* in *CNL_gfp* pa smo določili prisotnost rekombinantnih proteinov s prenosom western brez predhodne analize izražanja na RNA nivoju. V preglednici 10 so navedene pričakovane velikosti proteinov (z in brez GFP), število linij testiranih s prenosom western in število linij, pri katerih smo pokazali prisotnost rekombinantnih proteinov.

Preglednica 10: Pričakovane velikosti rekombinantnih proteinov v linijah krompirja transformiranih z različnimi konstrukti.

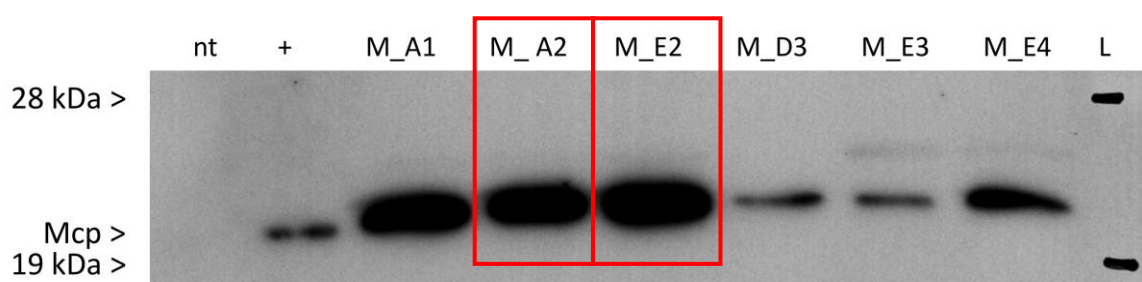
Table 10: Expected recombinant protein size in potato lines transformed with different constructs.

Vstavljen konstrukt	Velikost proteina	Število testiranih transgenih linij	Število pozitivnih linij
<i>mcp4a</i>	20,75	8	7
<i>mcp4a-gfp</i>	48,40	15	0
<i>clt</i>	18,82	27	5
<i>clt-gfp</i>	46,47	4	0
<i>lec</i>	17,98	48	3
<i>lec-gfp</i>	45,63	7	0

Na slikah 17, 18, 19 in 20 so prikazani rezultati prenosa western pri izbranih transgenih linijah krompirja. Dokazali smo prisotnost proteinov Mcp4a, Clt in CNL v linijah, transformiranih s konstrukti pMDC32. Pri linijah, transformiranih s konstrukti pMDC85, pa s prenosom western nismo zasledili rekombinantnih fuzijskih proteinov ustreznih velikosti. Pri linijah transformiranih s plazmidom pMDC85_ *clt* nismo zasledili nobenih proteinov, na katere bi se vezala protitelesa, pri linijah transformiranih s plazmidom pMDC85_ *CNL* pa smo s prenosom western detektirali proteine (slika 20A), ki pa niso bili

ustreznih velikosti. Pri linijah, transformiranih s konstruktom pMDC85_*mcp4a*, smo sicer zaznali nespecifične proteinske produkte, ki smo jih preverili še s protitelesi za GFP, vendar prisotnosti GFP nismo potrdili.

Največjo koncentracijo rekombinantnega proteina smo detektirali pri linijah, ki so izražale *Mcp4a*: M_A1, M_A2 in M_E2. Pri teh linijah smo koncentracijo ocenili na 0,01 % teže lista. Protein smo zasledili še v 4 linijah, vendar v nižjih koncentracijah in v manj čisti obliki (M_E3 ima poleg *Mcp* lise prisoten še približno 2 kDa večji protein) (slika 17).



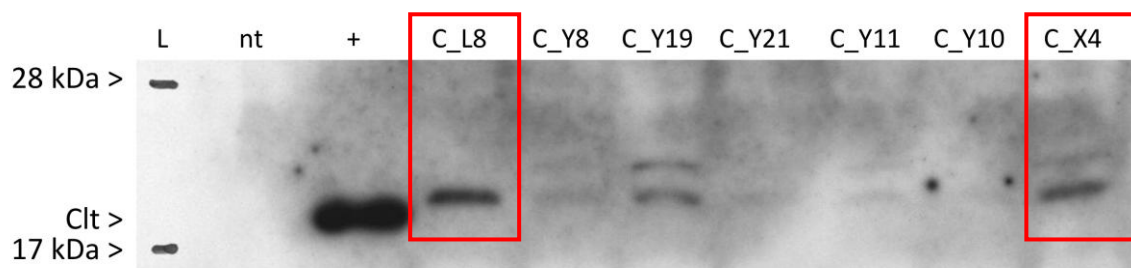
Slika 17: Detekcija rekombinantnega *Mcp4a* v GS linijah krompirja s prenosom western.

Z nt je označena negativna kontrola (nt – netransgena rastlina), + označuje pozitivno kontrolo (rekombinantni *Mcp*, 10 ng), L pa lestvico proteinov. Z rdečimi okvirji sta označeni transgeni liniji krompirja, ki smo ju uporabili v prehranjevalnih testih.

Figure 17: Anti *Mcp* immunoblot analysis of selected transgenic potato lines.

Nt, nontransgenic control; +, recombinant *Mcp*(10 ng) as positive control; L, protein ladder. Transgenic potato lines used in feeding bioassays are framed with red rectangles.

Pri linijah, ki so izražale *Clt* (slika 18), smo največ proteina detektirali pri liniji C_L8, kjer smo koncentracijo ocenili na 0,001 % teže lista. Vsebnost *Clt* smo s prenosom western pokazali še pri linijah C_19 in C_X4, vendar pa je bil pri obeh linijah poleg *Clt* prisoten še 2 kDa večji protein. *Clt* smo zaznali še pri dveh linijah (C_Y8 in C_Y11), vendar v zelo majhnih koncentracijah. Pri transgeni liniji C_L8, ki je izražala *Clt*, smo prenos western ponovili v več časovnih točkah (slika 19). Ugotovili smo, da se je izražanje klitocipina na proteinskem nivoju zmanjševalo skozi čas.

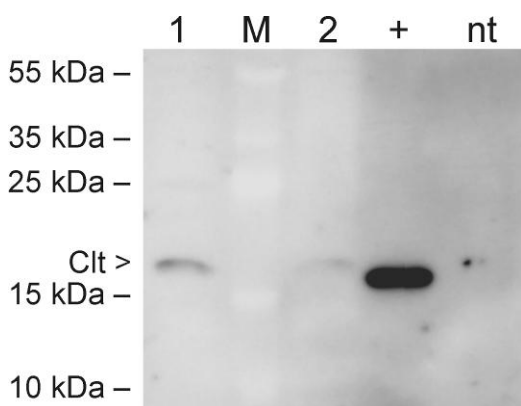


Slika 18: Detekcija rekombinantnega Clt v GS linijah krompirja s prenosom western.

L označuje lestvico proteinov, z nt je označena negativna kontrola (nt – netransgena rastlina), + označuje pozitivno kontrolo (rekombinantni Clt, 60 ng). Z rdečimi okvirji sta označeni transgeni liniji krompirja, ki smo ju uporabili v prehranjevalnih testih.

Figure 18: Anti Clt immunoblot analysis of selected transgenic potato lines.

L, protein ladder; nt, nontransgenic control; +, recombinant Clt (60 ng) as positive control. Transgenic potato lines used in feeding bioassays are framed with red rectangles.



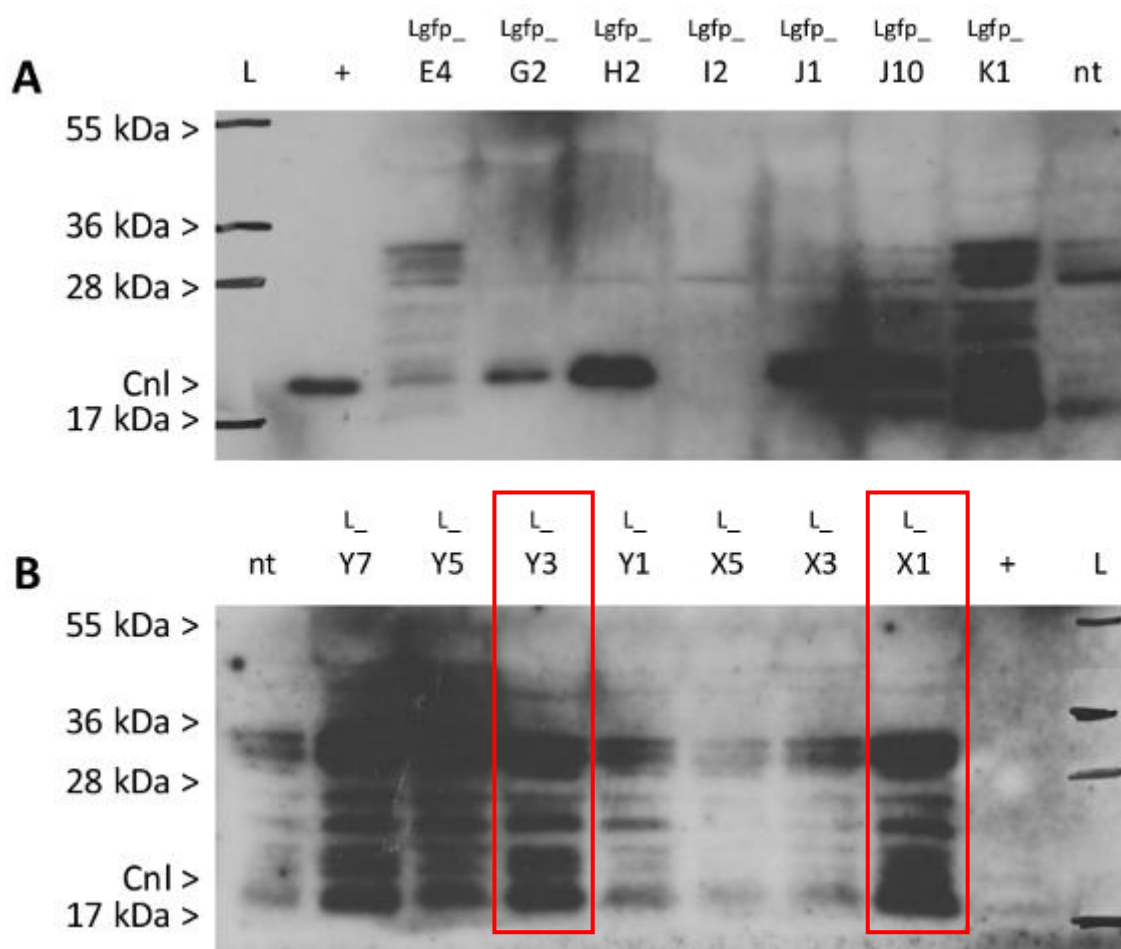
Slika 19: Detekcija rekombinantnega Clt v GS liniji krompirja C_L8 s prenosom western v različnih časovnih točkah.

Vzorec 1 predstavlja izražanje Clt v liniji C_L8 takoj po regeneraciji, vzorec 2 pa izražanje 7 tednov kasneje. M označuje lestvico proteinov, + označuje pozitivno kontrolo (rekombinantni Clt, 60 ng), z nt je označena negativna kontrola (nt – netransgena rastlina). Ekspresijo klitocipina 1 leto kasneje prikazuje slika 18.

Figure 19: Anti Clt immunoblot analysis of transgenic potato line C_L8 at different times.

Lane 1, C_L8 transformant soon after recovery; M, protein ladder; lane 2, C_L8 transformant 7 weeks later, nt, nontransgenic control; +, recombinant Clt (50 ng) as positive control. Expression of clitocypin in C_L8 one year later is shown in Figure 18.

Pri linijah, transformiranih s konstruktom pMDC32, smo CNL s prenosom western potrdili le pri štirih (slika 20B), a pri nobeni izmed njih protein ni bil prisoten samo v čisti obliki – prisotni so bili še večji produkti, ki so verjetno glikozilirane oblike proteina. Slika 20A pa prikazuje rezultate prenosa western pri linijah, transformiranih s konstruktom pMDC85_CNL. S prenosom western smo zaznali lise, vendar niso ustrezale pričakovanim velikostim. Pri linijah Lgfp_H2, Lgfp_G2 in Lgfp_J1 so bili prisotni produkti v velikosti čistega proteina CNL (18 kDa), ne pa v velikosti fuzijskega proteina (46 kDa).



Slika 20. Detekcija rekombinantnega CNL v GS linijah krompirja s prenosom western.

Z nt je označena negativna kontrola (nt – netransgena rastlina), + označuje pozitivno kontrolo (rekombinantni lektin CNL, pri A 100 ng, pri B pa 50 ng), L pa lestvico proteinov. Z rdečimi okvirji sta označeni transgeni liniji krompirja, ki smo ju uporabili v prehranjevalnem testu.

Figure 20: Anti CNL immunoblot analysis of selected transgenic potato lines.

Nt, nontransgenic control; +, recombinant CNL (100 ng in panel A, 50 ng in panel B) as positive control; L, protein ladder. Transgenic potato lines used in feeding bioassay are framed with red rectangles.

4.2.3 Konfokalna mikroskopija

S konfokalnim mikroskopom smo opazovali liste krompirja transformirane s konstrukti pMDC85, vendar fluorescence gfp nismo opazili. Listi transgene linije so izgledali enako kot kontrolni listi.

Ker nam prisotnosti GFP ni uspelo pokazati niti na proteinskem nivoju s prenosom po westernu (glej poglavje 4.2.2) niti s slikanjem s konfokalnim mikroskopom, smo delo s transgenimi linijami z vstavljenimi konstrukti pMDC85_mcp4a, pMDC85_clt in pMDC85_CNL zaključili.

4.3 PREHRANJEVALNI TESTI

Za prehranjevalne teste smo na podlagi rezultatov, pridobljenih z RT-qPCR in prenosom western, izbrali po 2 transgeni liniji, ki sta izražali proteine brez GFP. Izbrali smo liniji M_A2 in M_E2, ki izražata makrocipin Mcp4a, liniji C_L8 in C_X4, ki izražata klitocipin in liniji L_X1 in L_Y3, ki izražata lektin CNL. Kot kontrolo smo uporabili netransformiran krompir (nt).

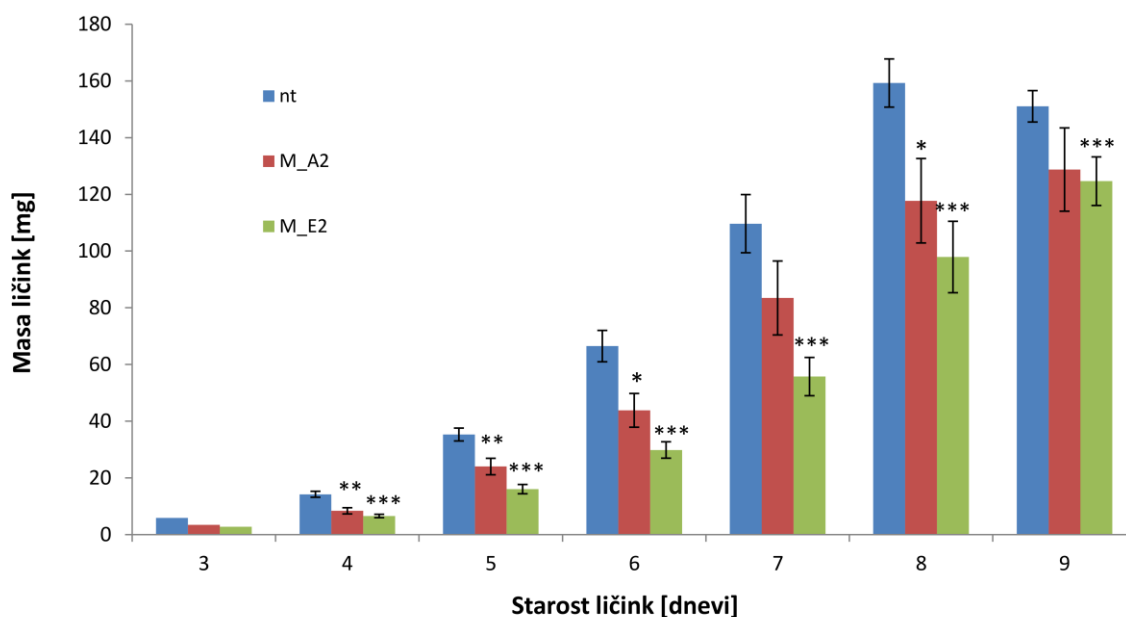
Glede na razpoložljivost transgenih linij smo v obdobju 15 mesecev izvedli 5 prehranjevalnih poskusov. Prehranjevalni testi 1-4 (preglednica 7) so bili izvedeni z neinduciranim krompirjem, prehranjevalni testi 5 pa z induciranim krompirjem. Poskuse z linijami M_A2, M_E2 smo izvedli 3-krat, poskuse z linijo C_L8 2-krat in poskuse z linijami C_X4, L-X1 in L_Y3 enkrat. Prehranjevalni testi so bili izvedeni, kot je opisano v poglavju 3.2.6.2, spremljali pa smo maso in stopnjo preživetja ličink. Rezultati prehranjevalnih poskusov so navedeni glede na transgen, ki so ga izražale GSR in ne kronološko.

4.3.1 Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo Mcp4a

4.3.1.1 Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo Mcp4a

V prehranjevalne teste novembra 2010 in maja 2011 smo vključili liniji M_A2 in M_E2, ki sta na RNA in proteinskem nivoju pokazali, da imata največje izražanje proteina Mcp4a. Ličinke, hranjene z obema transgenima rastlinama, so imele v obeh prehranjevalnih testih

nižjo maso od ličink, gojenih na kontrolnem krompirju (sliki 21 in 23). Razlika je bila statistično značilna od 5. dneva naprej, v novembrskem poskusu pri ličinkah, hranjenih z obema transgenima linijama, v majskem le pri hranjenju ličink z linijo M_E2. Razlika med kontrolno skupino in skupino, hranjeno z linijo M_A2, sicer ni bila statistično značilna, vendar je bila masa ličink, hranjenih z linijo M_A2, ves čas poskusa nižja od ličink, hranjenih z netransgenim krompirjem (slika 23). Poleg razlike v teži smo v poskusu novembra 2010 opazili tudi upočasnjjen razvoj ličink, hranjenih s transgenim krompirjem, saj iz 8. na 9. dan še pridobivajo maso, medtem ko ličinke iz kontrolne skupine najvišjo maso dosežejo že 8. dan. Tega pojava pri prehranjevalnih testih maja 2011 nismo mogli opaziti, saj smo teste zaključili 8 dni po izleganju, ko je kontrolna skupina ličink dosegla 4. razvojno fazo in s tem dosegla najvišjo maso. Takrat smo iz ličink izolirali prebavilo za analizo izražanja prebavnih proteaz. Pri deležu preživetja ličink (sliki 22 in 24) v nobenem izmed prehranjevalnih testov ni bilo razlik.



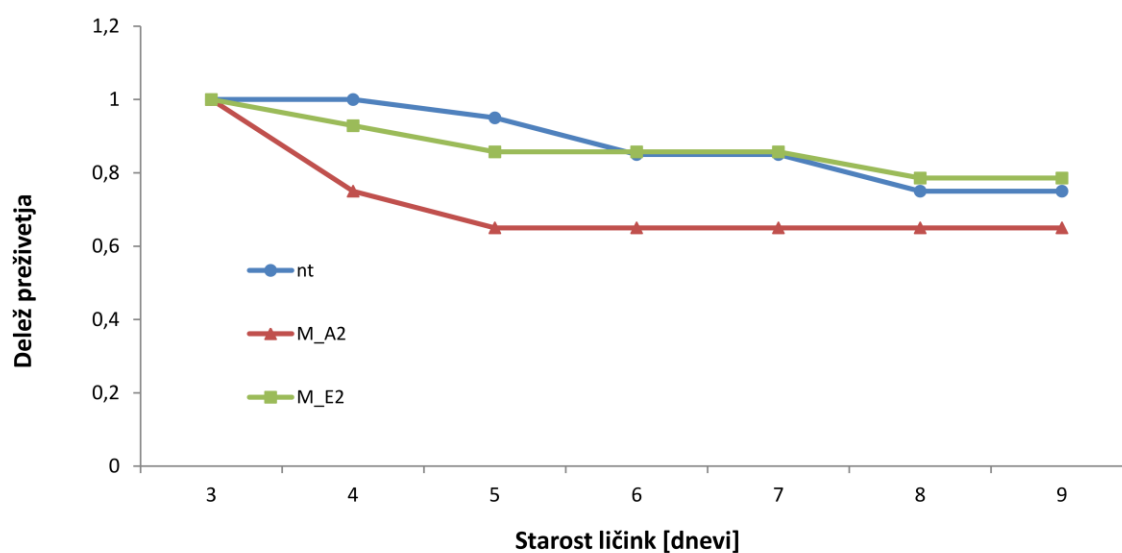
Slika 21: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu novembra 2010 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata *Mcp4a*.

Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama M_A2 in M_E2, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt). Masa ličink je bila spremljana od 3. - 9. dneva po izleganju. Z oklepajem je označena standardna napaka, z zvezdico pa statistično značilna razlika med ličinkami hranjenimi s transgeno linijo in

netransgenim krompirjem, izračunana s Studentovim t-testom (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). 3. dan smo ličinke tehtali skupaj, zato standardna napaka ni podana.

Figure 21: Colorado potato beetle larval growth in feeding bioassay with transgenic potato lines M_A2 and M_E2 in November 2010.

Larvae were fed with Mcp4a expressing transgenic potato lines M_A2 and M_E2 or with nontransgenic control (nt). Larval weight was measured from 3rd until 9th day after hatching. Error bars indicate standard errors; asterisks indicate statistically significant differences between control and test groups determined by Student's t test (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$). On 3rd day all larvae in tested group were weighted together and consequently standard error could not be applied.

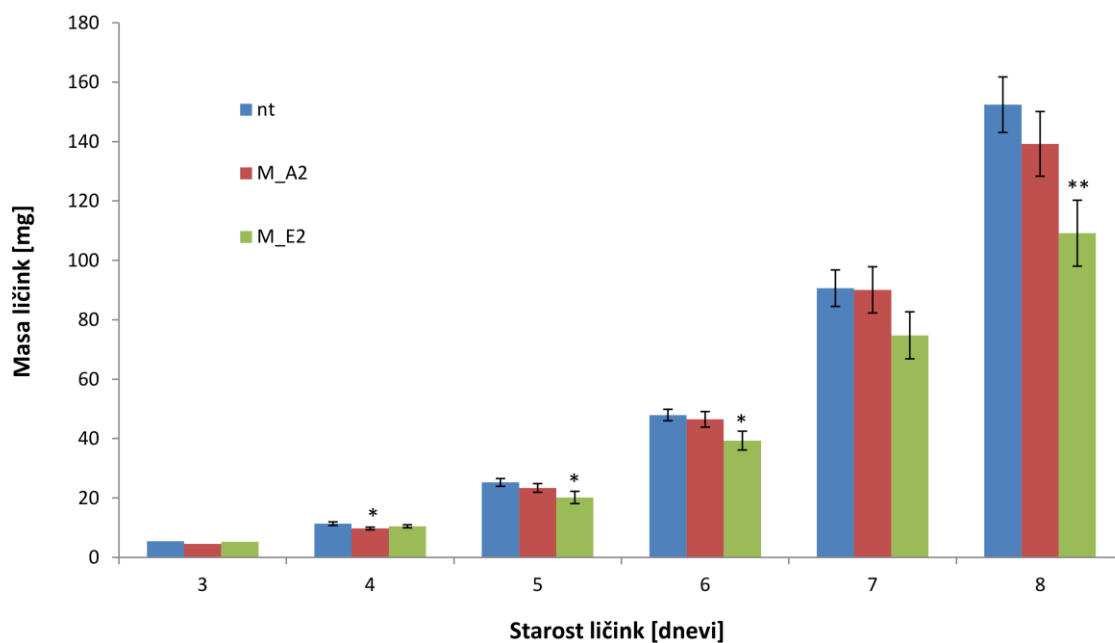


Slika 22: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu novembra 2010 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a.

Testne ličinke so bile hranjene z GS linijama M_A2 in M_E2, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt).

Figure 22: Colorado potato beetle larval survival rate in feeding bioassay with transgenic potato lines M_A2 and M_E2 in November 2010.

Larvae were fed with Mcp4a expressing transgenic potato lines M_A2 and M_E2 or with nontransgenic control (nt).

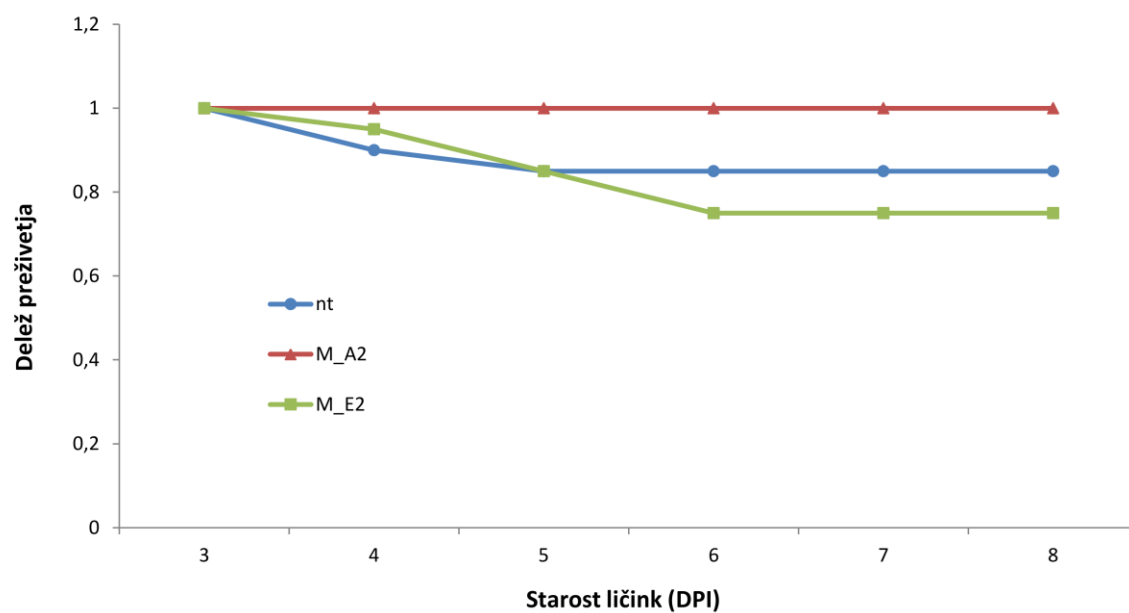


Slika 23: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a.

Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama M_A2 in M_E2, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt). Masa ličink je bila spremljana od 3. - 8. dneva po izleganju. Z oklepajem je označena standardna napaka, z zvezdico pa statistično značilna razlika med ličinkami hranjenimi s transgeno linijo in netransgenim krompirjem, izračunana s Studentovim t-testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Figure 23: Colorado potato beetle larval growth in feeding bioassay with transgenic potato lines M_A2 and M_E2 in May 2011.

Larvae were fed with Mcp4a expressing transgenic potato lines M_A2 and M_E2 or with nontransgenic control (nt). Larval weight was measured from 3rd until 8th day after hatching. Error bars indicate standard errors; asterisks indicate statistically significant differences between control and test groups determined by Student's t test (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$). On 3rd day all larvae in tested group were weighted together and consequently standard error could not be applied.



Slika 24: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a.

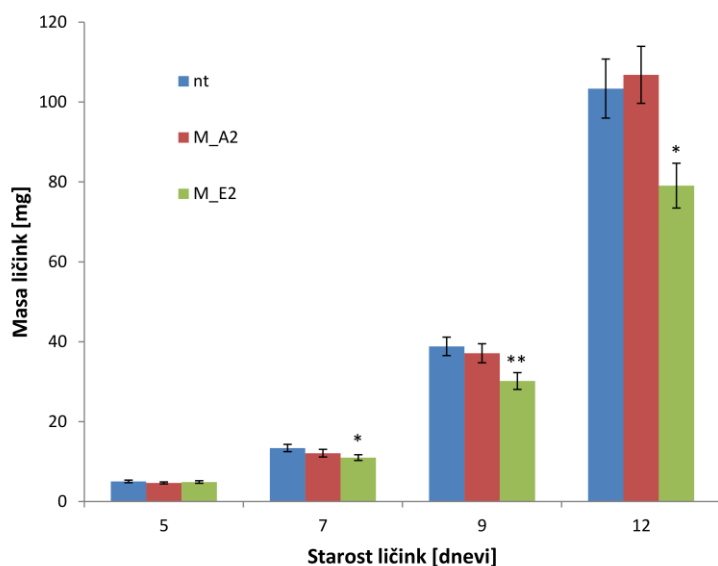
Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama M_A2 in M_E2, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt).

Figure 24: Colorado potato beetle larval survival rate in feeding bioassay with transgenic potato lines M_A2 and M_E2 in May 2011.

Larvae were fed with Mcp4a expressing transgenic potato lines M_A2 and M_E2 or with nontransgenic control (nt).

4.3.1.2 Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo Mcp4a z inducirano endogeno obrambo krompirja

V krompirju se po napadu žuželk inducira obrambni odgovor, ki rastlini omogoči zaščito pred škodljivci. Da bi prehranjevalne teste približali tem pogojem, smo septembra 2011 izvedli še dodatne prehranjevalne teste, v katerih smo preverili učinkovitost Mcp4a v kombinaciji z endogenim obrambnim mehanizmom krompirja. Pokazali smo (slika 25), da je bila masa ličink hranjenih s transgeno linijo krompirja M_E2 tudi v tem primeru statistično značilno nižja, medtem ko se masa ličink hranjenih s transgeno linijo krompirja M_A2 ni statistično značilno razlikovala od kontrolne skupine ličink. Ličinke se v deležu preživetja med seboj niso razlikovale (slika 26).

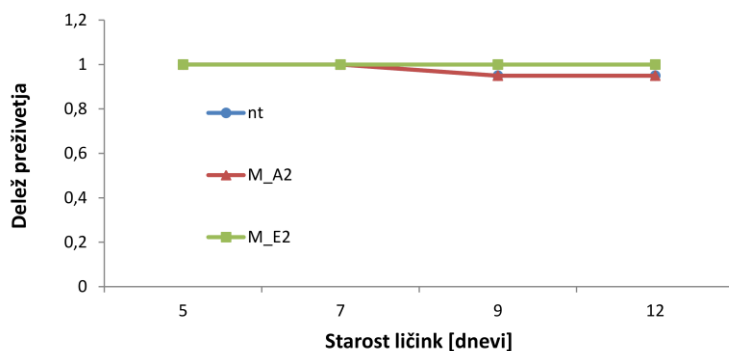


Slika 25: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu septembra 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata Mcp4a.

Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama M_A2 in M_E2, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt). Masa ličink je bila spremljana od 5. - 12. dneva po izleganju. Z oklepajem je označena standardna napaka, z zvezdico pa statistično značilna razlika med ličinkami hranjenimi s transgeno linijo in netransgenim krompirjem, izračunana s Studentovim t-testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Figure 25: Colorado potato beetle larval growth in feeding bioassay with transgenic potato lines M_A2 and M_E2 in September 2011.

Larvae were fed with Mcp4a expressing transgenic potato lines M_A2 and M_E2 or with nontransgenic control (nt). Larval weight was measured from 5th until 12th day after hatching. Error bars indicate standard errors; asterisks indicate statistically significant differences between control and test groups determined by Student's t test (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).



Slika 26: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu septembra 2011 z GS linijama M_A2 in M_E2, ki izražata *Mcp4a*.

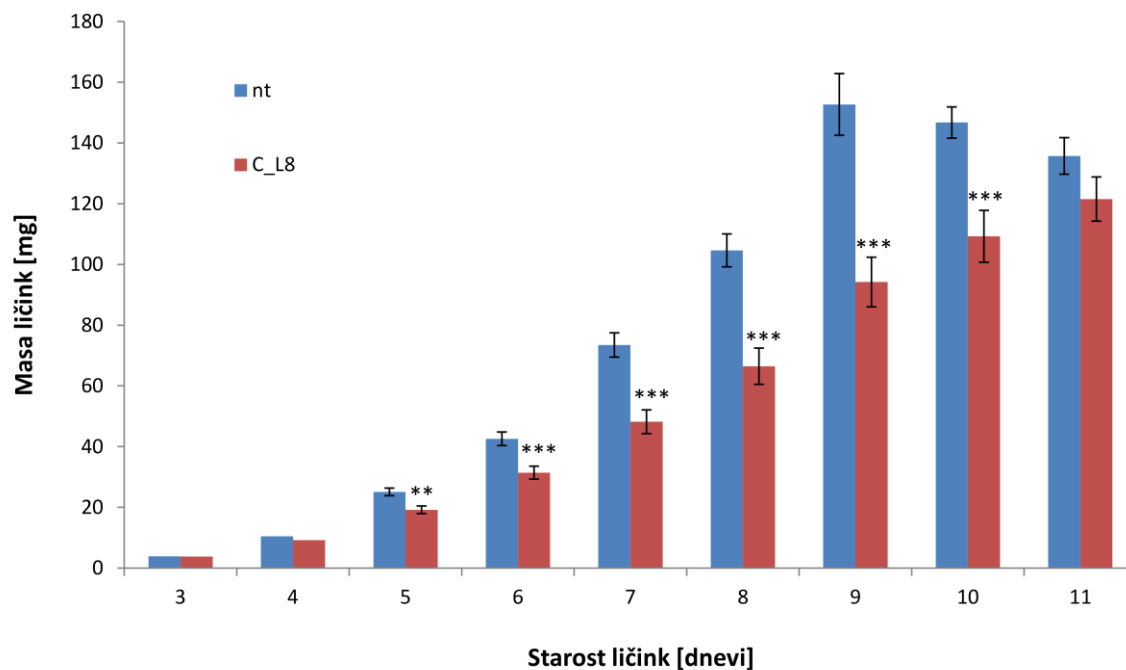
Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama M_A2 in M_E2, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt).

Figure 36: Colorado potato beetle larval survival rate in feeding bioassay with transgenic potato lines M_A2 and M_E2 in September 2011.

Larvae were fed with *Mcp4a* expressing transgenic potato lines M_A2 and M_E2 or with nontransgenic control (nt).

4.3.2 Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo klitocipin

V prehranjevalne teste z GS linijami, ki izražajo klitocipin, smo junija 2010 vključili le transgeno linijo C_L8, ki je bila edina linija, kjer smo do takrat dokazali izražanje gena *clt*, tako na RNA nivoju, kot tudi na proteinskem nivoju s prenosom western. Ličinke za te prehranjevalne teste smo nabrali na polju. Spremljali smo maso ličink in stopnjo preživetja (sliki 27 in 28). Ličinke, hranjene s transgeno linijo krompirja C_L8, so imele od 4. dneva naprej pa do konca prehranjevalnih testov, razen 11 dan po izleganju, statistično značilno nižjo maso od ličink hranjenih s kontrolnim krompirjem. Poleg tega so imele tudi upočasnen razvoj, saj so najvišjo maso dosegle šele 2 dni za ličinkami hranjenimi s kontrolnim krompirjem. Izražanje klitocipina ni povzročilo povečane umrljivosti ličink, nasprotno, ličinke hranjene s kontrolnim krompirjem so imele večjo smrtnost. Povečana smrtnost ličink se je pojavila šele po tem, ko so ličinke hranjene s kontrolnim krompirjem že dosegle najvišjo maso in bi se morale preobraziti v bubo. Ličinke so najverjetneje začele umirati zato, ker razmere niso bile primerne za preobrazbo v bubo. Ravno zaradi tega pojava smo prehranjevalne teste maja 2011 ponovili.

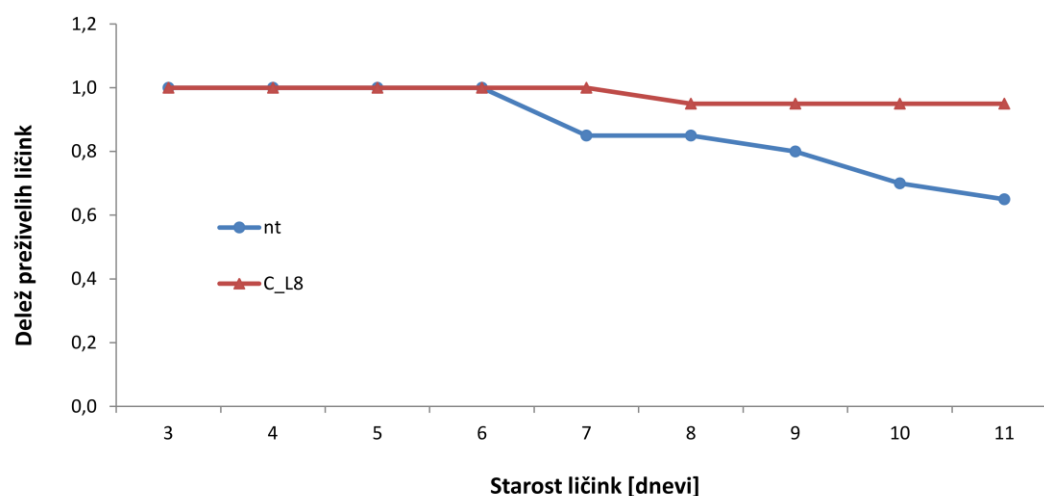


Slika 27: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu junija 2010 z GS linijo C_L8, ki izraža Clt.

Testne ličinke so bile hranjene s transgeno linijo C_L8, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt). Masa ličink je bila spremljana od 3.-11. dneva po izleganju. Označena je standardna napaka, z zvezdico pa statistično značilna razlika med ličinkami hranjenimi s transgeno linijo in netransgenim krompirjem, izračunana s Studentovim t-testom (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). 3. in 4. dan smo ličinke tehtali skupaj, zato standardna napaka ni podana.

Figure 27: Colorado potato beetle larval growth in feeding bioassay with transgenic potato line C_L8 in June 2010.

Larvae were fed with Clt expressing transgenic potato line C_L8 or nontransgenic control (nt). Larval weight was measured from 3rd until 11th day after hatching. Error bars indicate standard errors; asterisks indicate statistically significant differences between control and test groups determined by Student's t test (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$). On 3rd and 4th day all larvae in tested group were weighted together and consequently standard error could not be applied.



Slika 28: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu junija 2010 z GS linijo C_L8, ki izraža Clt.

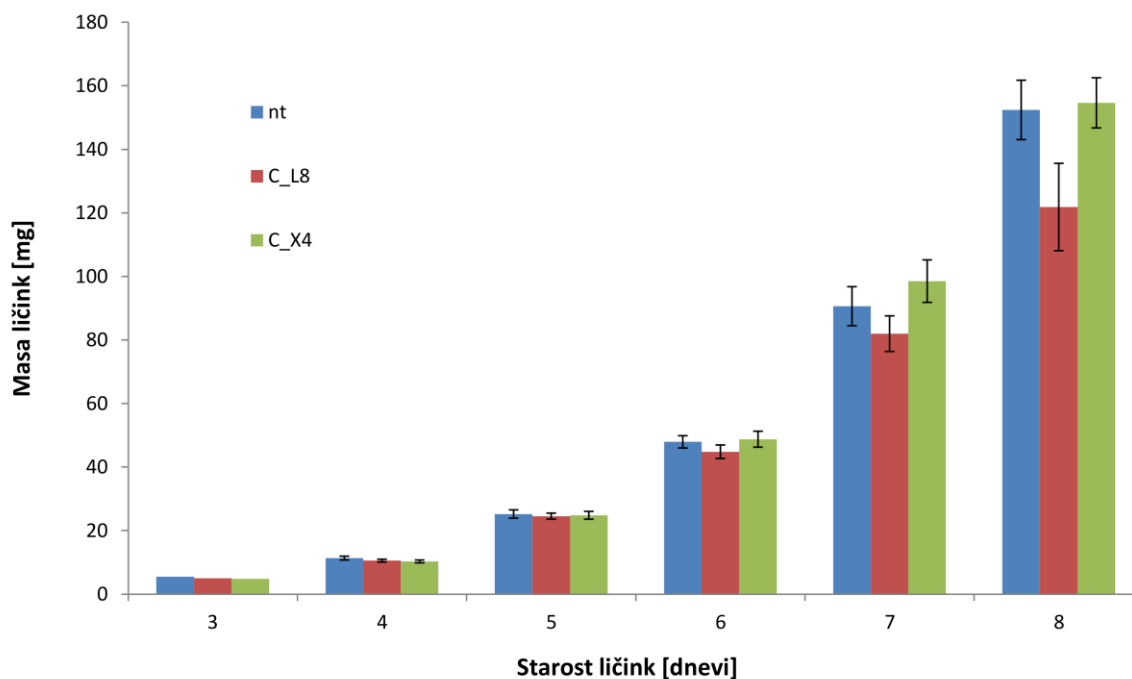
Testne ličinke so bile hranjene s transgeno linijo C_L8, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt).

Figure 28: Colorado potato beetle larval survival rate in feeding bioassay with transgenic potato line C_L8 in June 2010.

Larvae were fed with Clt expressing transgenic potato line C_L8 or nontransgenic control (nt).

V naslednjih prehranjevalnih testih z GS linijami, ki so izražale klitocipin, smo maja 2011 ponovili poskus s transgeno linijo C_L8 in dodali v prehranske teste še v nadaljnjih transformacijah pridobljeno linijo C_X4, ki pa je imela na proteinskem nivoju precej slabši nivo izražanja kot linija C_L8 (slika 17A). Pridobivanje mase ličink je prikazano na sliki (slika 29). Skupina ličink, hranjenih z linijo C_L8, je imela skozi ves čas poskusa nižjo maso, vendar razlika ni bila statistično značilna. S prenosom western (slika 19) smo pokazali, da se izražanje transgena na proteinskem nivoju skozi čas zmanjšuje. Transgene rastline smo predstavljali v sveža gojišča vsake 6-8 tednov, kar pomeni, da smo rastline linije C_L8 med prvim in drugim prehranjevalnim testom predstavili vsaj petkrat. Predvidevamo torej lahko, da je zmanjšanje razlike v teži med ličinkami hranjenimi z GS linijo C_L8 in kontrolnim krompirjem glede na prvi prehranjevalni test posledica nižje ekspresije transgena v liniji C_L8 v drugem prehranjevalnem testu. Masa kontrolne skupine ličink in masa skupin ličink, hranjenih z linijo C_X4, se nista razlikovali, kar je najverjetneje posledica slabe ekspresije proteina pri tej transgeni liniji (saj je bila ekspresija pri liniji C_X4 še nižja kot pri liniji C_L8). Skupine ličink se niso razlikovale v deležu preživetja (slika 29). Da bi lahko opazovali adaptacijo ličink koloradskega hrošča na

prisotnost klitocipina v prehrani, smo iz ličink pri tem prehranjevalnem poskusu izolirali prebavilo. Prehranjevalne teste smo zaključili osem dni po izleganju, ko je kontrolna skupina ličink dosegla 4. razvojno stopnjo.

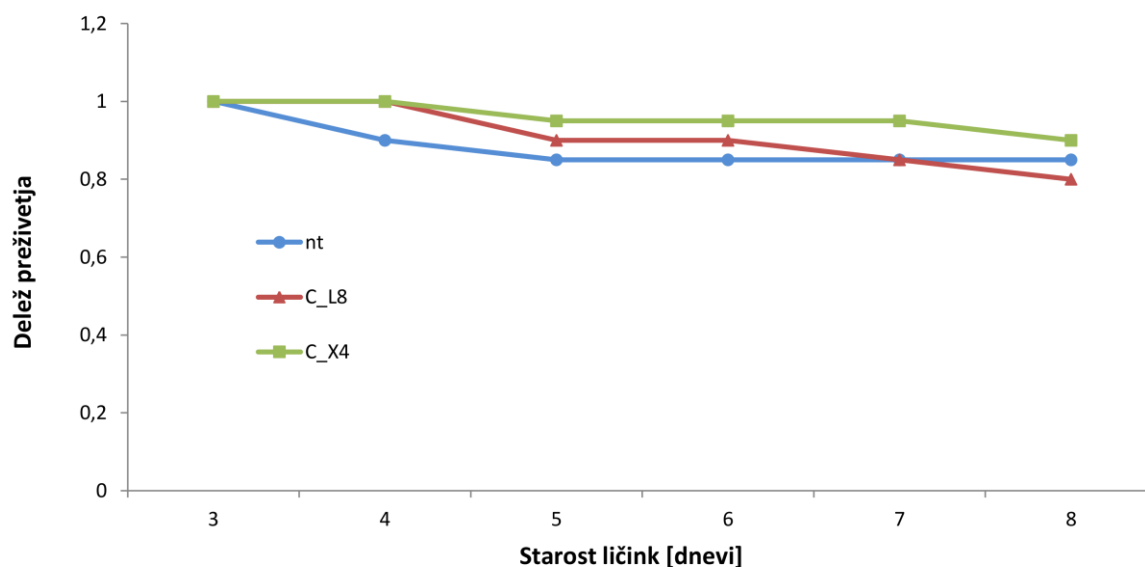


Slika 29: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama C_L8 in C_X4, ki izražata Clt.

Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama C_L8 in C_X4, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt). Masa ličink je bila spremljana od 3. - 8. dneva po izleganju. Z oklepajem je označena standardna napaka. 3. dan smo ličinke tehtali skupaj, zato standardna napaka ni podana.

Figure 29: Colorado potato beetle larval growth in feeding bioassay with transgenic potato lines C_L8 and C_X4 in June 2010.

Larvae were fed with Clt expressing transgenic potato lines C_L8 and C_X4 or with nontransgenic control (nt). Larval weight was measured from 3rd until 8th day after hatching. Error bars indicate standard errors. On 3rd day all larvae in tested group were weighted together and consequently standard error could not be applied.



Slika 30: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu maja 2011 z GS linijama C_L8 in C_X2, ki izražata Clt.

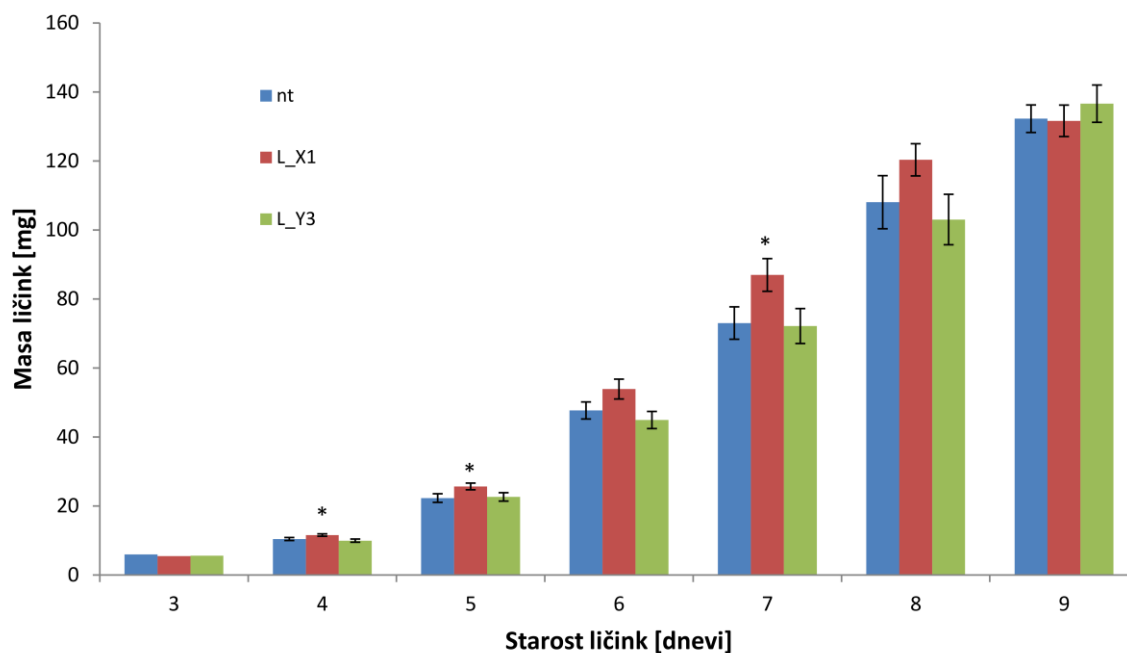
Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama C_L8 in C_X4, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt).

Figure 30: Colorado potato beetle larval survival rate in feeding bioassay with transgenic potato lines C_L8 and C_X4 in June 2010.

Larvae were fed with Clt expressing transgenic potato lines C_L8 and C_X4 or with nontransgenic control (nt).

4.3.3 Prehranjevalni testi z GS linijami, ki izražajo lektin CNL

V prehranjevalne teste z GS linijami, ki izražajo lektin CNL, smo vključili transgeni liniji L_X1 in L_Y3. Maso ličink smo spremljali dokler kontrolne ličinke niso dosegle 4. razvojne stopnje, rezultati so prikazani na sliki (slika 31). Med skupinami ličink ni bilo statistično značilnih razlik. Skupine ličink se prav tako med seboj niso razlikovale v deležu preživetja (slika 32). Ker transgeni liniji L_X1 in L_Y3 v tem prehranjevalnem testu nista imeli negativnega vpliva na rast in preživetje ličink koloradskega hrošča in ker zaradi časovnega okvira naloge nismo mogli ponavljati transformacij ter tako poskušali dobiti transgenih linij s povečano ekspresijo, smo delo z lektinom CNL na tej stopnji zaključili.

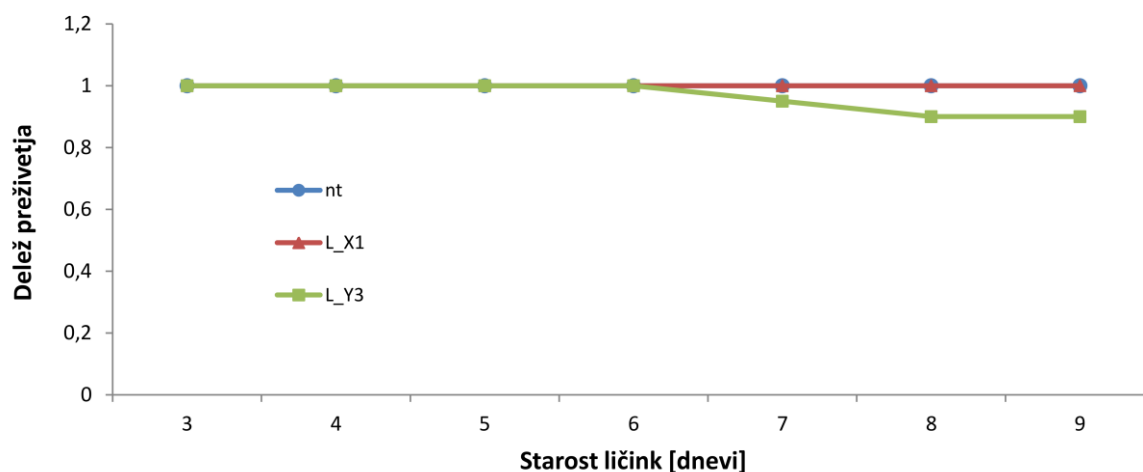


Slika 31: Masa ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu marca 2011 z GS linijama L_X1 in L_Y3, ki izražata CNL.

Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama L_X1 in L_Y3, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt). Masa ličink je bila spremljana od 3. - 9. dneva po izleganju. Z oklepajem je označena standardna napaka, z zvezdico pa statistično značilna razlika med ličinkami hranjenimi s transgeno linijo in netransgenim krompirjem, izračunana s Studentovim t-testom (* $p \leq 0,05$).

Figure 31: Colorado potato beetle larval growth in feeding bioassay with transgenic potato lines L_X1 and L_Y3 in March 2011.

Larvae were fed with CNL expressing transgenic potato lines L_X1 and L_Y3 or with nontransgenic control (nt). Larval weight was measured from 3rd until 9th day after hatching. Error bars indicate standard errors; asterisks indicate statistically significant differences between control and test groups determined by Student's t test (*, $p < 0.05$).



Slika 32: Delež preživetja ličink koloradskega hrošča v prehranjevalnem poskusu marca 2011 z GS linijama L_X1 in L_Y3, ki izražata CNL.

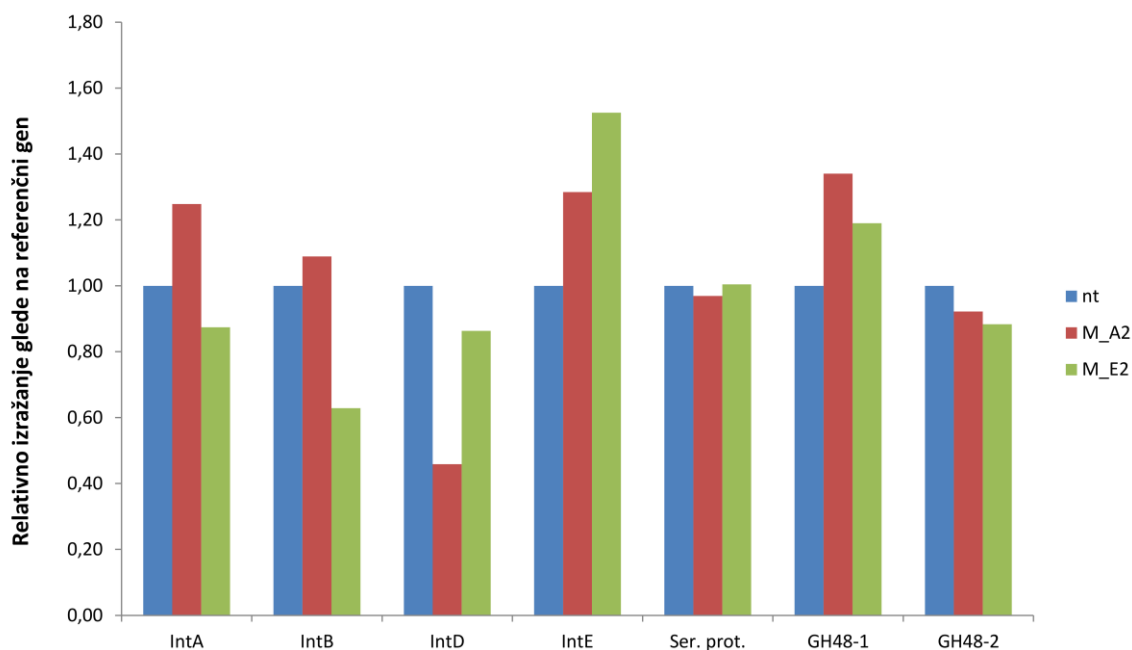
Testne ličinke so bile hranjene s transgenima linijama L_X1 in L_Y3, kontrolne pa z netransgenim krompirjem (nt).

Figure 32: Colorado potato beetle larval survival rate in feeding bioassay with transgenic potato lines L_X1 and L_Y3 in March 2011.

Larvae were fed with CNL expressing transgenic potato lines L_X1 and L_Y3 or with nontransgenic control (nt).

4.4 ODZIV KOLORADSKEGA HROŠČA NA HRANJENJE S TRANSGENIMI RASTLINAMI

Da bi preverili odziv ličink koloradskega hrošča na hranjenje s transgenim krompirjem, smo s qPCR preverili nivo izražanja adaptivnih prebavnih encimov v prebavilu. Preverjali smo izražanje intestainov A, B, D in E, serinske proteaze in celulaz GH48-1 in GH48-2. Ugotovili smo (slika 33), da se ličinke koloradskega hrošča na makrocipin v prehrani ne prilagodijo s spremenjenim izražanjem testiranih adaptivnih prebavnih proteaz (razlika v izražanju ni bila statistično značilna za nobenega izmed testiranih genov). Do enakega rezultata smo prišli tudi pri ličinkah hranjenih s klitocipinom (slika 34).

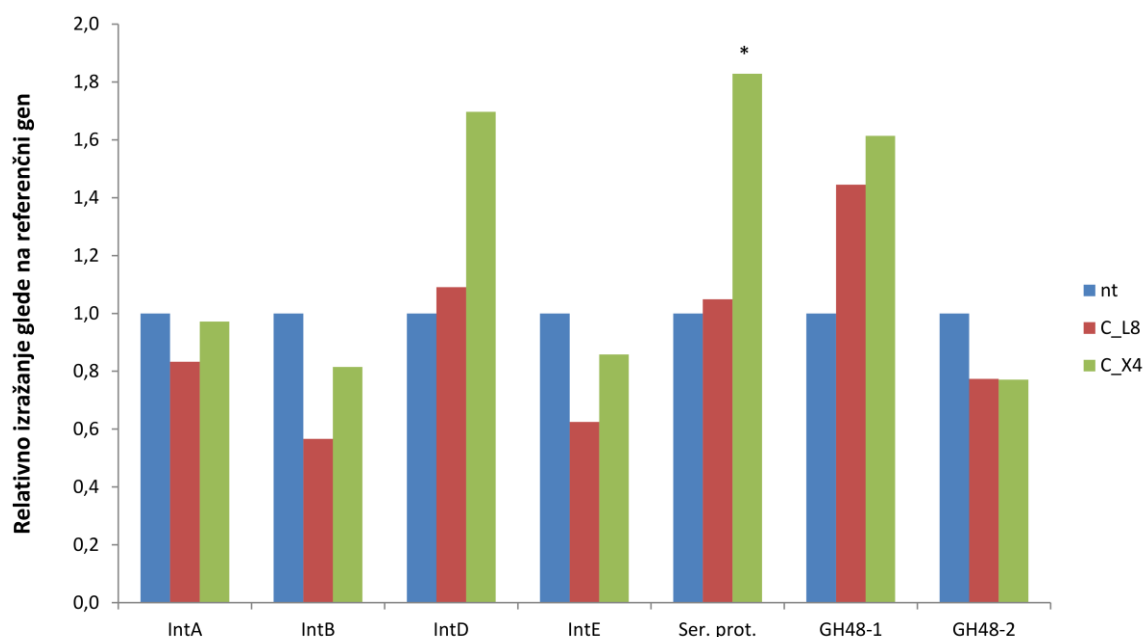


Slika 33: Izražanje izbranih genov v črevesu ličink koloradskega hrošča, hranjenih s transgenima linijama krompirja, ki izražata *Mcp4a*.

V prebavilu ličink koloradskega hrošča hranjenih z GS linijama M_A2 in M_E2 smo izmerili relativne vrednosti izražanja intestainov A, B, D in E (IntA, IntB, IntD, IntE), serinske proteaze (Ser. prot.) in celulaz GH48-1 in GH48-2. Relativne vrednosti izražanja so pri vsakem genu normirane glede na relativno izražanje kontrolnih ličink gojenih na netransgenem krompirju (nt).

Figure 33: Expression of digestive enzyme genes in Colorado potato beetle larval guts fed with transgenic potato lines which express *Mcp4a*.

Relative expression of intestains A, B, D, and E (IntA, IntB, IntD, IntE), serine protease (Ser. prot.) and glycoside hydrolases GH48-1 and GH48-2 was measured in CPB larvae fed nontransgenic (nt) and *Mcp4a* expressing transgenic plants (independent transgenic potato lines M_A2 and M_E2). Relative expression values of each gene were normalized to the relative expression of the same gene in control larvae.



Slika 34: Izražanje izbranih genov v črevesu ličink koloradskega hrošča, hranjenih s transgenima linijama krompirja, ki izražata Clt.

Relativne vrednosti izražanja so pri vsakem genu normirane glede na relativno izražanje kontrolnih ličink gojenih na netransgenem krompirju (nt). Rezultati statističnega testiranja, izračunani s Studentovim t-testom, so označeni z zvezdico (* $p \leq 0,05$).

Figure 34: Expression of digestive enzyme genes in Colorado potato beetle larval guts fed with transgenic potato lines which express Clt.

Relative expression of intestains A, B, D, and E (IntA, IntB, IntD, IntE), serine protease (Ser. prot.) and glycoside hydrolases GH48-1 and GH48-2 was measured in CPB larvae fed nontransgenic (nt) and Clt expressing transgenic plants (independent transgenic potato lines C_L8 and C_X4). Relative expression values of each gene were normalized to the relative expression of the same gene in control larvae.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V prihajajočih desetletjih se bo človeška družba soočala z velikimi izzivi. Z večanjem števila prebivalstva in višanjem življenjskega standarda v državah v razvoju se povečuje potreba po količini pridelane hrane. Za pridelavo zadostne količine pridelkov je rastline potrebno zaščititi pred škodljivci, kar omogoča uporaba insekticidov ali uporaba proti škodljivcem odpornih sort rastlin. Odporne sorte rastlin je mogoče pridobiti s pomočjo klasičnih žlahtnjiteljskih metod ali z uporabo metod genskega inženiringa. Najpogosteje je za zaščito GSR pred škodljivci uporabljena skupina genov, ki kodirajo različne toksine Bt iz bakterije *B. thuringiensis*. GS poljščine, na primer koroza in bombaž, v katere so bili vneseni različni geni *cry*, ki kodirajo toksine Bt, pridelujejo na obsežnih območjih v mnogo državah. Zanimanje za iskanje novih insekticidnih učinkovin je kljub dosedanji uspešni zaščiti poljščin proti škodljivcem z uporabo toksinov Bt vedno večje. Toksini Bt namreč ne nudijo zaščite proti vsem rastlinskim škodljivcem, poleg tega pa se pojavlja tudi odpornost proti tem toksinom. Zato je potreba po iskanju novih, predvsem naravnih, insekticidnih učinkovin za zaščito rastlin vedno večja. Potencialne nove insekticidne učinkovine so v obliki GSR lako uporabljene samostojno ali v kombinaciji, saj sočasna uporaba več insekticidnih učinkovin upočasni razvoj odpornosti pri žuželkah.

Ob iskanju novih insekticidnih učinkovin je pomembno dobro poznavanje mehanizmov in učinkovin, ki jih rastline uporabljajo za zaščito pred žuželkami. Pri obrambi rastlin pred žuželkami in patogenimi mikroorganizmi imajo pomembno vlogo lektini in PI (Habib in Fazili, 2007; Peumans in Van Damme, 1995), ki delujejo kot antimetabolni proteini, saj zavirajo prebavne procese žuželk. Medtem ko lektini vežejo sladkorje in porušijo ravnovesje metabolizma z zaviranjem encimatskega delovanja posredno ali neposredno preko vezave glikoziliranih prebavnih encimov ali glikoziliranih receptorjev na epitelijskih celicah prebavnega trakta, PI delujejo neposredno na prebavne proteolitične encime in povzročijo zmanjšanje razpoložljivih aminokislin, potrebnih za njihovo rast in razvoj (Habib in Fazili, 2007; Vasconcelos in Oliveira, 2004).

Glive predstavljajo bogat vir potencialnih snovi za zaščito rastlin. Mnoge gobe kažejo močne insekticidne lastnosti, a niso strupene za ljudi, zaradi česar predstavljajo pomemben vir novih možnih insekticidov. Trosnjakov mnogih gob, kot na primer predstavnik redov *Lepista* (razvrščen tudi kot *Clitocybe*) in *Cantharellus*, žuželke nikoli ne napadajo. Gobi, ki sta pokazali direktno toksičnost za modelne žuželke, sta užitni prostotrosnici poprhnjena livka in orjaški dežnik (Pohleven in sod., 2011; Wang in sod., 2002). Insekticidne snovi, ki so bile najdene v gobah, večinoma predstavljajo proteine, pri čemer imajo največjo vlogo verjetno lektini (Mier in sod., 1996). Poleg lektinov so potencialno zaščitno vlogo proti žuželkam pripisali tudi skupini inhibitorjev cisteinskih proteaz poimenovani mikocipini, ki izvirajo iz prostotrosnic orjaškega dežnika in poprhnjene livke (Renko in sod., 2010). Prvi protein, ki je bil izoliran iz gobe in je kazal insekticidno aktivnost proti modelnim žuželkam je bil lektin iz rdečebetne polstenke (*Xerocomus chrysenteron*) (Trigueros in sod., 2003).

5.1.1 Izbor glivnih genov za vnos v krompir

Na podlagi pregleda literature smo se odločili, da bomo preizkusili primernost izbranih glivnih genov za zaščito krompirja proti koloradskemu hrošču. Krompir je bil izbran za testno rastlino, ker predstavlja eno izmed najpomembnejših kulturnih rastlin tako v Sloveniji, kot v svetu in je hkrati ena izmed modelnih rastlin za rastlinske transformacije (Vreugdenhil in sod., 2007). Za testno žuželko pa smo izbrali enega izmed krompirjevih najpomembnejših škodljivcev, koloradskega hrošča, ki je zaradi svoje sposobnosti prilagajanja na insekticide v veliki meri odgovoren za razvoj industrije insekticidov (Alyokhin in sod., 2008).

V sodelovanju z Odsekom za biotehnologijo IJS smo izbrali tri glivne gene, ki izvirajo iz bazidiomicet. Prva dva gena kodirata inhibitorja cisteinskih proteaz, poimenovana makrocipin in klitocipin, tretji gen pa kodira lektin CNL. Makrocipin izvira iz orjaškega dežnika, klitocipin in lektin CNL pa iz poprhnjene livke. Za makrocipine je bilo že prej ugotovljeno, da *in vitro* inhibirajo delovanje mnogih ne-žuželčjih cisteinskih proteaz (Renko in sod., 2010), iz česar smo sklepali, da lahko inhibirajo tudi delovanje žuželčjih cisteinskih proteaz *in vivo* in bi jih torej lahko uporabili za inhibicijo njihove rasti. Prav tako smo za vnos v krompir izbrali tudi klitocipin, ki spada v isto družino PI kot

makrocipin. Za lektin CNL pa je bilo pokazano, da ima insekticidni učinek na vinsko mušico (Pohleven in sod., 2011).

Izmed makrocipinskih zaporedij smo na podlagi inhibicijskega profila izbrali zaporedje Mcp4a, ki ga kodira gen *mcp4a*. Izmed treh opisanih in okarakteriziranih makrocipinov (Mcp1, Mcp3 in Mcp4) ima Mcp4 edini poleg inhibicijske aktivnosti na cisteinske proteaze še inhibicijsko aktivnost proti serinskim proteazam (Sabotič in sod., 2009), ki so poleg cisteinskih proteaz prav tako prisotne v prebavilu koloradskega hrošča (Bolter in Jongsma, 1995; Novillo in sod., 1997; Wolfson in Murdock, 1987).

5.1.2 Vnos genov v krompir in izbor rastlin za prehranjevalne teste

Zaporedjem izbranih treh glivnih genov smo z namenom čim boljše ekspresije v krompirju prilagodili genski kod (Poglavje 4.1.1). Tako prilagojena zaporedja so sintetizirali in vstavili v vektorje pri podjetju GenScript, mi pa smo jih nato z rekombinazno reakcijo vnesli v destinacijska vektorja pMDC32 in pMDC85, ki vsebujeta 2×35S promotor za konstitutivno izražanje v rastlini, nos terminator ter zapis za odpornost proti selekcijskemu antibiotiku higromicinu. V primeru plazmida pMDC85 se v istem bralnem okvirju kot transgen nahaja še zapis za protein GFP, ki je uporaben pri študiju prisotnosti in lokalizacije fuzijskih proteinov (Poglavji 4.1.2 in 4.1.3).

S tako pripravljenimi konstrukti smo stabilno transformirali krompir sorte Désirée (Poglavje 4.2). Uspešnost transformacije je med konstrukti variirala med 1,9 in 13 %, kar je primerljivo s podatki, ki jih navajajo avtorji metode (Visser in sod., 1989). Uspešnost transformacije bi bila nekoliko višja, če ne bi prišlo do okužbe nekaterih plošč. Uspešnost transformacije, kjer sta bila v konstrukt vključena zapisa za Clt in Mcp4a, je bila nižja kot uspešnost pri konstrukt z zapisom za CNL. Vzrok za višjo uspešnost regeneracije je v tem, da smo pri slednjih najdlje časa zbirali poganjke na selekcijskih gojiščih. Poganjki iz transformiranih stebelnih internodijev se namreč niso pojavili sočasno, temveč smo jih zbirali daljše časovno obdobje. Pri njih smo sproti preverjali izražanje transgenov na RNA nivoju in prisotnost rekombinantnih proteinov. Pri linijah, transformiranih z *clt* in *mcp4a*, smo dokaj hitro pridobili linije z zadostnim izražanjem na proteinskem nivoju ter smo zato

prenehali zbirati nove poganjke, pri *CNL* pa ne in smo zato nadaljevali z zbiranjem transgenih poganjkov.

Pri transgenih linijah smo z metodo qPCR določili izražanje transgenov v krompirju. Nadalje smo s prenosom western pri linijah z najvišjim izražanjem genov, ki v primerjavi z netransgenim krompirjem niso imele spremenjenega fenotipa, potrdili še prisotnost proteinov in ocenili njihovo koncentracijo. Tako smo med drugim zavrgli počasi rastočo linijo M_D2, čeprav je imela dvakrat višje izražanje *mcp4a* kot linija M_A2, ki je bila kasneje uspešno uporabljena v prehranjevalnih testih z ličinkami koloradskega hrošča. Pri transformacijah z različnimi konstrukti smo pridobili po 9-94 transgenih linij (preglednica 9). S PCR v realnem času smo pri skoraj vseh transgenih linijah, ki so zrastle na selekcijskih gojiščih s higromicinom, potrdili prisotnost transgena. Relativni nivo izražanja transgenov glede na izražanje endogene kontrole *cox* je variiral od 0 (pri nekaterih linijah, kjer nismo zaznali izražanja gena) do 0,6 pri *Clf*, 0,4 pri *Mcp4a* in 0,2 pri *CNL*. Pri vseh linijah, transformiranih s konstruktom pMDC85, ki vsebuje zapis za GFP, je bil relativni nivo izražanja transgenov pri linijah z najvišjim izražanjem za 3 do 10-krat manjši kot pri konstruktju brez GFP.

Prisotnost rekombinantno izraženih proteinov v transgenih linijah krompirja z najvišjo ekspresijo na RNA nivoju smo potrdili s prenosom western. Pri linijah M_A2 in M_E2, ki sta na proteinskem nivoju izkazali največjo stopnjo izražanja *Mcp4a*, smo ocenili, da rekombinantni protein predstavlja 0,01 % mase lista. *Clf* je v liniji C_L8, ki je bila najmočnejša linija z izražanjem klitocipina, predstavljal 0,001 % listne mase. Izražanja *CNL* v transgenih linijah nismo mogli natančno oceniti, ker se je s prenosom western pokazalo mnogo proteinov različnih velikosti, ki so se med seboj prekrivali (slika 20B). Glede na to, da se je protitelo, specifično za razpoznavo *CNL*, vezalo tudi na proteine večjih mas, predvidevamo, da gre za glikozilirane oblike proteina. Lise, večje od pričakovanih velikosti, smo zaznali tudi s prenosom western proteinskih ekstraktov transgenih linij, ki izražajo makrocipin (slika 17) in klitocipin (slika 18). Odstopanja v velikostih proteinov so lahko posledica posttranslacijskih modifikacij. V rastlinski celici potekajo posttranslacijske modifikacije, med katere spada tudi glikozilacija (Gomord in Faye, 2004; Kusnadi in sod., 1997).

Ob predpostavki, da je delež proteinov v krompirjevih listih 3 % (Crusciol in sod., 2009), rekombinantni Mcp4a v linijah M_A2 in M_E2, kjer je bila s prenosom western ocenjena koncentracija 0,01 % mase lista, predstavlja 0,3 % vseh topnih proteinov, pri liniji C_L8, kjer je bila s prenosom western ocenjena 10 krat manjša koncentracija, pa rekombinantni Clt predstavlja 0,03 % vseh topnih proteinov. Ocenjeno je, da lahko učinek PI na herbivore žuželke opazimo, kadar se hranijo s transgenimi rastlinami, kjer rekombinantni protein predstavlja med 0,5 – 1,5 % topnih proteinov (Jongsma in Bolter, 1997), kar je s heterologno produkcijo v rastlinah mogoče pridobiti (Kusnadi in sod., 1997; Schuler in sod., 1998). Z optimizacijo izražanja pri vseh treh izbranih genih bi bilo torej mogoče povečati izražanje proteinov ter s tem doseči večji učinek na herbivore žuželke. Možnosti optimizacije izražanja transgenov v rastlinah opisujejo Ulrich in sod. (2015), ki parametre, ki jih je možno optimizirati, delijo na notranje in zunanje lastnosti. Med optimizacijo notranjih lastnosti štejemo spremembe v strukturi mRNA (uporaba kodonov in delež GC) in primarni strukturi proteinov, med optimizacijo zunanjih lastnosti pa štejemo gostiteljsko rastlino, vektorski sistem, pogoje gojenja transgenih rastlin, itd.

Za linijo C_L8 smo kasneje ugotovili, da se je izražanje klitocipina na proteinskem nivoju s časom zmanjševalo (slika 19). Rastline smo po regeneraciji na selekcijskih gojiščih gojili na MS gojiščih, kjer ni bilo več selekcijskega pritiska. Zmanjšanje izražanja je lahko posledica utišanja ali proteolitične razgradnje rekombinantnega proteina (Doran, 2006; Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009; Vance in Vaucheret, 2001). Tudi pri transgenih rastlinah, ki izražajo toksin Bt, so opazili, da je izražanje toksina odvisno od starosti transgenih rastlin, rastlinskega tkiva in okoljskih dejavnikov (Dong in Li, 2007).

Pri mnogih linijah, transformiranih s plazmidom pMDC85, smo z reakcijo RT-qPCR potrdili izražanje transgenov. Kljub temu pri nobeni izmed njih s prenosom western nismo pokazali prisotnost proteinov v pričakovani obliki, to je v fuzirani obliki z GFP. Vzrokov za to je lahko več. Možno je, da je bilo izražanje na proteinskem nivoju prenizko in torej pod mejo detekcije, ki jo omogoča prenos western. Drugi možen vzrok za to je lahko neuspešnost translacije ali posttranslacijske modifikacije, posledica katerih je odsotnost proteinov. Tretji možni vzrok pa je napaka v zaporedju vstavljenega konstrukta.

Pri transgenih linijah Cgfp_C1 in Cgfp_C2, transformiranih s konstruktom pMDC85_ *clt*, je bila s prenosom western pokazana prisotnost proteina velikega 33 kDa, kar je 14 kDa več kot Clt (19 kDa). Pričakovana velikost fuziranega proteina Clt z GFP je bila 46,5 kDa. Da bi preverili, ali gre za pričakovan protein z GFP, smo s prenosom western s protitelesi specifičnimi za GFP pri teh dveh linijah preverili prisotnost GFP, vendar proteina GFP nismo zaznali. Prisotnost GFP smo pri naključno izbranih linijah transformiranih s konstruktom pMDC85_ *mcp4a* preverjali tudi s konfokalnim mikroskopom, vendar fluorescence proteina GFP nismo zaznali. Zaradi časovnega okvira doktorskega dela in uspešnosti prehranjevalnih testov s transgenimi rastlinami, ki so izražale rekombinantne proteine brez GFP, nismo ponavljali transformacije s konstrukti v plazmidu pMDC85, temveč smo se intenzivneje posvetili delu s transgenimi linijami, ki so izražale *Mcp4a* (liniji M_A2 in M_E2), *Clt* (linija C_L8) in *CNL* (liniji L_X1 in L_Y3).

5.1.3 Prehranjevalni testi

Za prehranjevalne teste smo na podlagi rezultatov, pridobljenih z RT-qPCR in prenosom western izbrali po 2 transgeni liniji s posameznim vnesenim genom. Izbrali smo liniji M_A2 in M_E2, ki izražata *Mcp4a*, linijo C_L8 in kasneje še linijo C_X4, ki izražata *Clt* in liniji L_X1 in L_Y3, ki izražata *CNL*. Pri linijah L_X1 in L_Y3 je bil protein *CNL* deloma prisoten v različnih glikoziliranih oblikah. Kot kontrolo smo povsod uporabili netransformiran krompir (nt).

V vseh prehranjevalnih testih so se ličinke izvalile na transgenih rastlinah oziroma pri kontrolni skupini na netransgenem krompirju. Tako so bile že od izvalitve naprej, ko so ličinke najbolj občutljive, izpostavljene vplivu rekombinantnega proteina v hrani. Da je odvisnost učinka prisotnosti PI v hrani odvisna od starosti ličink ob prvi izpostavitvi PI, so pokazali že v primeru hranjenja z orizacistatinom I (Michaud in sod., 1995) in sojacistatinu N (Liu in sod., 2004), prav tako pa so to potrdili pri ličinkah hranjenih z naravnim in rekombinantnim klitocipinom (Sabotič, 2007). Pri vseh prehranjevalnih testih, razen pri zadnjem, smo liste, s katerimi smo hranili ličinke, vsak dan zamenjali, da smo se izognili induciranju endogene rastlinske obrambe. Pri zadnjem prehranjevalnem testu pa smo želeli prehranjevalne teste približati pogojem na polju in smo ličinke ves čas poskusa imeli na istih rastlinah v steklenih akvarijih. Težo ličink smo spremljali od tretjega dneva po

izvalitvi dokler niso dosegle četrte razvojne stopnje. Ob prvem in v nekaterih prehranjevalnih testih še drugem tehtanju smo določili le skupno maso vseh ličink, saj so bile ličinke zelo majhne, kasneje pa smo tehtali vsako posebej.

5.1.3.1 Analiza vpliva makrocipina v hrani na rast in razvoj ličink

V prvem prehranjevalnem testu s transgenima linijama M_A2 in M_E2, ki sta izražali Mcp4a, je izražanje le tega povzročilo statistično značilno zmanjšanje teže ličink v primerjavi z ličinkami, hranjenimi z netransgenim krompirjem (slika 21). V drugem prehranjevalnem testu pa je bila razlika statistično značilna le pri ličinkah, hranjenih s transgeno linijo M_E2 (slika 23). Zmanjšanje razlike pri hranjenju s transgeno linijo M_A2 je najverjetneje posledica nižjega izražanja transgena, saj so bili ti prehranjevalni testi izvedeni pol leta kasneje. Pri izražanju klitocipina pri transgeni liniji C_L8 smo namreč pokazali, da se količina proteina skozi čas zmanjšuje (slika 19), kar se je najverjetneje dogajalo tudi pri linijah, ki so izražale Mcp4a. Poleg tega smo pri prvih prehranjevalnih testih z linijama M_A2 in M_E2 novembra 2010 opazili tudi, da se ličinke, hranjene s transgenim krompirjem, razvijajo počasneje od ličink hranjenih z netransgenim krompirjem, saj so največjo maso dosegle vsaj en dan prej kot ličinke, hranjene s transgenim krompirjem. Ta pojav smo opazili že pri klitocipinu (slika 27), prav tako so ga opazili pri ličinkah koloradskega hrošča, hranjenega s transgenim krompirjem, ki je izražal različne proteazne inhibitorje, na primer cistatin iz ječmena (Alvarez-Alfageme in sod., 2007), inhibitor katepsina D iz paradižnika (Brunelle in sod., 2004) in PI iz kobilice (Kondrák in sod., 2005). V drugih prehranjevalnih testih upočasnjenega razvoja nismo mogli opazovati, saj smo prehranjevalne teste končali takoj, ko so ličinke, hranjene z netransgenim krompirjem, dosegle četrto razvojno stopnjo in ličinke, hranjene s transgeno hrano, še niso dosegle najvišje mase. Ko so ličinke, hranjene s kontrolnim krompirjem, dosegle četrto razvojno stopnjo, smo namreč iz vseh ličink izolirali prebavila za študij ekspresije prebavnih encimov.

Pri deležu preživetja med ličinkami, hranjenimi s kontrolnim in transgenim krompirjem ni bilo velikih odstopanj, le v prvem prehranjevalnem testu so imele ličinke hranjene z linijo M_A2 zmanjšan delež preživetja (65 % po 9 dneh) v primerjavi s kontrolnimi (75 % po 9 dneh). Povečano umrljivost so opazili že pri ličinkah koloradskega hrošča, hranjenih s

transgenim krompirjem, ki je izražal equistatin (Outchkourov in sod., 2003), kjer je bila količina rekombinantnega proteina primerljiva s količino pri linijah M_A2 in M_E2. Relativno majhen učinek PI na preživetje ličink koloradskega hrošča je lahko posledica prilagoditve koloradskega hrošča na prisotnost PI v hrani ali prenizke koncentracije PI, da bi lahko inhibirala vse tarčne proteaze. Koncentracijsko odvisen odgovor so tako pokazali pri hranjenju ličink z inhibitorjem E-64, kjer se je ob povečevanju koncentracije inhibitorja E-64 zmanjšalo pridobivanje mase ličink in preživetje, razvoj pa upočasnili (Bolter in Latoszek-Green, 1997).

Sočasno z izvajanjem raziskovalnega dela, objavljenega v tej doktorski nalogi, so sodelavci iz IJS ličinke hranili z rekombinantnimi proteini proizvedenimi v *E. coli*, kot je opisano v Sabotič in sod. (2009). Ob hranjenju z rekombinantni proteini Mcp1, Mcp3 in Mcp4, proizvedenimi v *E. coli*, se je Mcp1 presenetljivo izkazal za bolj učinkovitega za zaščito pred koloradskim hroščem kot Mcp4. Na podlagi inhibicijskega profila smo namreč pričakovali, da bo za zaščito pred koloradskim hroščem primernejši Mcp4. Na podlagi rezultatov prehranjevalnih testov s transgenimi rastlinami, ki so izražale Mcp4a in rezultatov prehranjevalnih testov z rekombinantnimi proteini rMcp1, rMcp3 in rMcp4, rezultati katerih so skupaj objavljeni v članku (Šmid in sod., 2013), smo se odločili, da uporabo makrocipinov zaščitimo s patentno prijavo (PCT/EP2012/065373). V nadalje bi bilo tako vsekakor zanimivo preizkusiti tudi učinkovitost Mcp1, izraženega v transgenih rastlinah.

5.1.3.2 Analiza vpliva klitocipina v hrani na rast in razvoj ličink

V prvem prehranjevalnem testu smo uporabili le eno do tedaj pridobljeno transgeno linijo C_L8, pri kateri smo izražanje ocenili na 0,001 % listne teže. Ličinke, hranjene s transgeno linijo, so imele v primerjavi z ličinkami, hranjenimi na kontrolni netransgeni liniji krompirja, statistično značilno zmanjšano težo skozi ves čas poskusa (slika 27). Hkrati so imele tudi upočasnjen razvoj, saj so največjo maso dosegle šele dva dni za kontrolno skupino ličink. Velikih razlik v stopnji preživetja med testiranima linijama nismo opazili (slika 28).

Da bi čim boljše okarakterizirali insekticidni potencial transgenih linij, ki izražajo klitocipin, smo v nadaljnji transformaciji želeli pridobiti še dodatne transgene linije. Kljub velikemu številu tako pridobljenih transgenih linij, nam ni uspelo pridobiti take, ki bi imela višjo ali podobno stopnjo izražanja kot linija C_L8. Poleg tega smo ugotovili tudi to, da se je izražanje v transgeni liniji C_L8 skozi čas zmanjševalo (slika 19).

Kljub nižjemu izražanju klitocipina smo ponovili prehranjevalne teste s transgenima linijama C_L8 in novo pridobljeno linijo C_X4. Skupine ličink, hranjenih s transgenima linijama in skupina ličink, hranjenih s kontrolnim krompirjem, se niso statistično značilno razlikovale v masi (slika 29). Zmanjšanje razlike med prvim in drugim prehranjevalnim testom lahko razložimo z zmanjšanim izražanjem klitocipina v transgeni liniji C_L8. Kljub temu pa lahko opazimo, da so ličinke, hranjene z linijo C_L8, imele ves čas poskusa nekoliko nižjo težo od ličink, hranjenih s kontrolno skupino ličink. Razlik med ličinkami, hranjenimi z linijo C_X4 in kontrolno skupino ličink pa nismo opazili. Prav tako nismo opazili razlik v deležu preživetja med vsemi tremi skupinami ličink (slika 30).

5.1.3.3 Analiza vpliva lektina CNL v hrani na rast in razvoj ličink

Izražanje lektina CNL v krompirju je bilo zahtevno in le delno uspešno. CNL se namreč ni izražal v taki obliki, kot je poznano v glivi, temveč je bil različno glikoziliran. Glikozilacijski vzorec je namreč različen pri različnih organizmih. Kljub temu smo z dvema transgenima linijama izvedli prehranjevalne teste (Poglavje 4.3.3), kjer pa nismo opazili ne razlik v stopnji preživetja, niti razlik v pridobivanju mase. Prav zato prehranjevalnih testov z linijami krompirja, ki so izražale lektin, nismo nadaljevali. Kljub temu, da nismo pokazali insekticidnega delovanja lektina CNL na koloradskega hrošča, pa so Pohleven in sod. (2011) istočasno pokazali, da ima insekticidno delovanje tako na vinsko mušico (*D. melanogaster*), kot tudi na ličinke koloradskega hrošča, kjer je njegov učinek koncentracijsko odvisen. Vzrok za neučinkovitost CNL, izraženega v transgenem krompirju, na ličinke koloradskega hrošča je tako lahko posledica I.) premajhnega izražanja v transgenih rastlinah, ki smo jih pridobili ali II.) izražanju neučinkovite oblike proteina CNL zaradi glikozilacije.

5.1.4 Prilagoditev koloradskega hrošča na hranjenje s transgenimi linijami krompirja, ki izražajo Mcp4a in Clt

Koloradski hrošč je sposoben izjemno hitre prilagoditve na prisotnost PI v hrani (Bolter in Jongasma, 1995; Gruden in sod., 1998), zato smo želeli preveriti ali se ob hranjenju s transgenim krompirjem, ki je izražal Mcp4a ali Clt, spremeni izražanje nekaterih prebavnih encimov. Za testiranje smo izbrali prebavne encime, ki so vključeni v adaptacijo ličink koloradskega hrošča na hranjenje s krompirjem z induciranim endogenim obrambnim mehanizmom (Petek in sod., 2012).

5.1.4.1 Prilagoditev koloradskega hrošča na hranjenje z makrocipinom

V sodelovanju z Odsekom za biotehnologijo IJS smo zaradi negativnega učinka makrocipina na ličinke koloradskega hrošča želeli natančneje proučiti delovanje makrocipina. Z afinitetno kromatografijo so na IJS določili tarče v prebavilu koloradskega hrošča, na katere deluje makrocipin. Pri afinitetni kromatografiji je bil na monolitni nosilec vezan Mcp1. Po spiranju kolone so bili vezani proteini izprani in analizirani s SDS-PAGE gelsko elektroforezo, posamezne proteinske lise pa nato izrezane iz gela in analizirane z masno spektrometrijo (ESI-MS-MS). Z uporabo te metode je bilo razkritih več potencialnih tarčnih molekul iz prebavil ličink koloradskega hrošča, na katere se veže makrocipin. Te molekule so intestaini, glikozid hidrolaze iz družine 48 in diapavzni protein 1 (Šmid in sod., 2013).

Da bi še natančneje okarakterizirali insekticidno delovanje makrocipina na prebavne proteaze v prebavilu ličink koloradskega hrošča, so na Odseku za biotehnologijo IJS izvedli teste inhibicije različnih skupin prebavnih proteaz. Ker cisteinske proteaze predstavljajo prevladujoč delež prebavne proteolitične aktivnosti v prebavilu ličink koloradskega hrošča (Gruden in sod., 1998) in so makrocipini družina inhibitorjev cisteinskih proteaz, so najprej preverili ali makrocipin inhibira cisteinske proteaze *in vitro*. Proteinski ekstrakt iz prebavila ličink koloradskega hrošča je bil po obarjanju z acetonom frakcioniran z gelsko filtracijo, nato pa v posamezni frakciji merjena proteolitična aktivnost na substrate, ki jih cepijo cisteinske proteaze: Z-Phe-Arg-pNa, Z-Arg-Arg-pNA in pGlu-Phe-Leu-pNA. Nobeden izmed makrocipinov (Mcp1, Mcp3, Mcp4) ni inhibiral aktivnosti prebavnih proteaz na substrata Z-Phe-Arg-pNa in Z-Arg-Arg-pNA, vsi

makrocipini so imeli le šibko inhibitorno delovanje za razgradnjo substrata pGlu-Phe-Leu-pNA, pa še to le pri najvišjih koncentracijah inhibitorja. Glede na učinkovitost makrocipina kot inhibitorja rasti ličink koloradskega hrošča in glede na rezultate afinitetne kromatografije smo predvidevali, da morda makrocipin poleg cisteinskih proteaz deluje inhibitorno še na druge encime. Ugotovili so, da dodatek makrocipinov vpliva na znižano splošno proteolitično aktivnost, nima pa inhibitornega delovanja na serinske in aspartatne proteaze, prav tako ne vpliva na celulazno, ksilanazno in pektinazno aktivnost encimov iz prebavila koloradskega hrošča.

Tarče makrocipina v prebavilu ličink koloradskega hrošča so torej poleg cisteinskih proteaz še skupina proteinov, ki niso neposredno vključeni v prebavo. Mehanizem delovanja na ličinke je torej več nivojski, posledica česar sta upočasnjena rast in razvoj ličink koloradskega hrošča.

Ličinke koloradskega hrošča so s spremenjeno ekspresijo prebavnih proteaz sposobne učinkovite prilagoditve na prisotnost PI, ki jih ob napadu sintetizirajo napadene rastline (Gruden in sod., 2004; Petek in sod., 2012). Z namenom, da bi ugotovili ali so te ličinke prav tako sposobne prilagoditi na prisotnost makrocipina v hrani, smo preverili izražanje izbranih prebavnih encimov pri ličinkah četrte razvojne stopnje hranjenih s transgenima linijama M_A2 in M_E2 ter pri kontrolni skupini ličink hranjenimi z netransgenim krompirjem. Z metodo qPCR smo preverili izražanje intestainov A, B, D in E, serinske proteaze in dveh glikozid hidrolaz (GH48-1 in GH48-2). Ugotovili smo, da pri ličinkah hranjenih s transgenim krompirjem, ki izraža makrocipin, ni prišlo do prilagoditve na nivoju izražanja izbranih prebavnih encimov. V prebavilu ličink, hranjenih s transgenim krompirjem, se ni povišalo izražanje nobenega izmed izbranih transkriptov (slika 33).

Nespremenjeno izražanje proteaz ob prisotnosti makrocipina v prehrani ličink koloradskega hrošča predstavlja v primerjavi s podatki, objavljenimi v literaturi, izjemo. Pri ličinkah hroščev, hranjenih z različnimi PI, so namreč opazili prilagoditve na nivoju prebavnih proteaz. Pri hranjenju z inhibitorjem cisteinskih proteaz iz soje so pri ličinkah hrošča *Diabrotica undecimpunctata* opazili povišano ekspresijo cisteinskih in aspartatnih proteaz (Liu in sod., 2004), pri ličinkah hrošča *Callosobruchus maculatus* pa so opazili

povišano ekspresijo cisteinskih in karboksilnih peptidaz (Chi in sod., 2009). Prav tako je do prilagoditve s spremenjenim izražanjem mnogih proteaz pri ličinkah hrošča *Tribolium castaneum*, hranjenih z dodatkom inhibitorjev cisteinskih ali serinskih proteaz (Oppert in sod., 2010).

5.1.4.2 Prilagoditev koloradskega hrošča na hranjenje s klitocipinom

Klitocipin je uvrščen med mikocipine, družino inhibitorjev cisteinskih proteaz. Na Odseku za biotehnologijo IJS so preverjali inhibitorno aktivnost klitocipina na delovanje proteaz iz ekstrakta prebavil ličink koloradskega hrošča, kjer so potrdili, da ima klitocipin inhibitorno delovanje na celokupno proteolitično aktivnost ekstrakta prebavila. To so pripisali predvsem inhibitornemu delovanju na cisteinske proteaze (Šmid in sod., 2014).

V prebavilu ličink koloradskega hrošča se ob dodatku PI I) lahko poveča izražanje občutljivih cisteinskih proteaz, II) pride do izražanja na PI neobčutljivih (adaptivnih) cisteinskih proteaz, III) pride do izražanja proteaz drugih katalitičnih skupin, IV) se izražajo proteaze, ki cepijo PI ali pa V) pride do kompenzacije s prerazporeditvijo metabolitov (Brunelle in sod., 2004; Gruden in sod., 2003, 2004; Jongsma in Bolter, 1997; Petek in sod., 2012). Da bi preverili, ali do take prilagoditve pride tudi pri ličinkah, hranjenih s klitocipinom, smo preverili delovanje nekaterih adaptivnih prebavnih encimov in proteaz. Izbrali smo intestaine A, B, D in E, serinske proteaze in glikozid hidrolazi (GH48-1 in GH48-2), za katere vemo, da so lahko vključeni v adaptacijo ličink koloradskega hrošča (Petek in sod., 2012; Šmid in sod., 2013). Z metodo qPCR smo preverili izražanje teh encimov v prebavilu ličink 4. razvojne stopnje, izoliranih 8. dan po izleganju v prehranjevalnih testih maja 2011. V teh prehranjevalnih testih je bil nivo izražanja klitocipina v transgeni liniji C_L8 že toliko zmanjšan, da njegova prisotnost v transgeni hrani v primerjavi z ličinkami, hranjenimi z netransgeno hrano, ni povzročila statistično značilne razlike v masi (slika 29). Ugotovili smo, da v prebavilu ličink ni prišlo do prilagoditve na nivoju izražanja izbranih adaptivnih encimov: prebavnih proteaz (intestainov A, B, D in E in serinske proteaze) in glikozid hidrolaz (GH48-1 in GH48-2) (slika 34). To je lahko posledica dejstva, da v prebavilu ličink koloradskega hrošča ne pride do adaptacije na nivoju izbranih adaptivnih prebavnih encimov ob prisotnosti klitocipina v hrani, ali pa posledica tega, da je bilo izražanje klitocipina pri transgenih

linijah prenizko, da bi lahko vplivalo na nivo izražanja izbranih adaptivnih prebavnih encimov.

5.2 SKLEPI

Namen doktorskega dela je bil preučiti izbrane gene iz gliv za zaščito krompirja pred koloradskim hroščem. Najprej smo izbrali primerne gene iz dveh bazidiomicet, ki oblikujeta plodišča, orjaškega dežnika (*M. procera*) in poprhnjene livke (*C. nebularis*). Izbranim trem genom *mcp4a* (kodira Mcp4a), *clt* (kodira Clt) in *CNL* (kodira lektin CNL) smo najprej prilagodili zaporedje za izražanje v kromprju ter jih nato s kloniranjem vnesli v vektorje, primerne za izražanje v krompirju. S transformacijo s pomočjo bakterije *A. tumefaciens* smo tako pripravljene konstrukte vnesli v krompir sorte Désirée. Po regeneraciji in karakterizaciji transgenih linij smo izbrali linije z največjim izražanjem izbranih proteinov in z njimi izvedli prehranjevalne teste s koloradskim hroščem ter tako ovrednotili njihov insekticidni potencial. Poleg tega smo z metodo qPCR preverili izražanje adaptivnih prebavnih encimov v prebavilu ličink koloradskega hrošča hranjenih s transgenim krompirjem, ki je izražal Mcp4a ali Clt. S tem smo dosegli vse cilje ter potrdili zastavljene hipoteze, ki smo si jih zadali v okviru doktorske naloge.

- Na podlagi pregleda literature smo izbrali tri gene iz gliv, ki oblikujeta plodišča. Prva gliva je orjaški dežnik, druga pa poprhnjena livka, obe se uporabljata tudi za prehrano ljudi, kar zmanjša verjetnost negativnih vplivov za človeka v primeru uporabe proteinov iz teh dveh gliv za zaščito pred žuželkami. Dva izmed izbranih genov kodirata inhibitorja cisteinskih proteaz makrocipin in klitocipin, en pa lektin CNL.
- Vsem trem genom smo prilagodili zaporedje, saj ima krompir drugačno uporabo kodonov kot glive. Na ta način je izboljšano izražanje transgenov v ciljni rastlini. Pripravili smo ustrezne plazmidne vektorje in jih s pomočjo transformacije z bakterijo *A. tumefaciens* vnesli v krompir sorte Désirée. Vse tri gene smo uspešno izrazili v transgenih rastlinah, kar smo potrdili z metodo RT-qPCR. Pri rastlinah z najvišjim izražanjem transgena smo nadalje določili prisotnost in ocenili količino rekombinantnega proteina s prenosom western. Rekombinantni protein smo

zasledili pri rastlinah transformiranih z genom *mcp4a*, kot tudi pri tistih z *clt* in *CNL*. S transgenimi rastlinami, pri katerih smo s prenosom western določili najvišjo količino rekombinantnih proteinov, smo izvedli prehranjevalne teste z ličinkami koloradskega hrošča ter tako ovrednotili pesticidni potencial izbranih treh proteinov.

- Makrocipin *Mcp4a*, inhibitor cisteinskih proteaz iz orjaškega dežnika, izražen v krompirju (kjer je predstavljal 0,01 % mase), se je v prehranskih testih z ličinkami koloradskega hrošča izkazal za najučinkovitejšega izmed treh testiranih glivnih genov. Pri ličinkah, ki so se hranile s transgenimi rastlinami, je namreč povzročil upočasnen razvoj in statistično značilno znižanje mase. Prehranjevanje ličink s transgenim krompirjem pa ni vplivalo na stopnjo preživetja. Vzrok za to je bila najverjetneje premajhna količina rekombinantnega PI v hrani, da bi lahko inhibiral delovanje vseh tarčnih encimov. Z določanjem izražanja adaptivnih prebavnih encimov ličink koloradskega hrošča z metodo qPCR smo pokazali, da se izražanje izbranih adaptivnih prebavnih proteaz pri ličinkah, hranjenih s transgenim krompirjem, ki izraža makrocipin, ne spremeni. To je izjemno velikega pomena, saj je bilo doslej znano, da se ličinke koloradskega hrošča prilagajajo na PI v hrani ter na ta način zmanjšajo njihov učinek. Makrocipin torej predstavlja PI, ki ne povzroči prilagoditve v prebavilu ličink koloradskega hrošča in kot tak predstavlja možen način zaščite krompirja proti koloradskemu hrošču, predvsem v kombinaciji z že poznanimi pristopi za zaščito krompirja.
- Klitocipin *Clt*, inhibitor cisteinskih proteaz iz poprhnjene livke, se je v prehranskih testih prav tako izkazal za primerne za zaščito pred koloradskim hroščem. Zaradi težav z doseganjem zadostne ekspresije (največja stopnja izražanja je bila 0,001 % mase) smo njegovo insekticidno delovanje lahko pokazali le pri eni transgeni liniji. Pri hranjenju s to transgeno linijo so imele ličinke koloradskega hrošča upočasnen razvoj in statistično značilno znižanje mase. V nadaljevanju smo ugotovili, da se količina izraženega proteina v tej transgeni liniji zmanjšuje. Klitocipin se je torej prav tako izkazal za potencialno uporabnega za zaščito krompirja pred koloradskim hroščem, vendar pa je najprej potrebna optimizacija izražanja v krompirju. Tako

kot pri makrocipinu, bi tudi pri klitocipinu največji učinek najverjetneje dosegli s kombiniranjem s katerim od že poznanih pristopov za zaščito proti koloradskemu hrošču, na primer v kombinaciji s toksinom Bt.

- Oba glivna PI sta še posebej uporabna zaradi svoje visoke odpornosti proti visokim temperaturam in spremembi pH, prav tako sta odporna proti proteolitični razgradnji. Poleg uporabnosti obeh PI v obliki transgenih rastlin, je pri obeh mogoča tudi uporaba v obliki rekombinantnih proteinov proizvedenih v bakteriji *E. coli*, uporabljenih kot insekticidno sredstvo. Za povečano učinkovitost tako makrocipina kot klitocipina bi bila seveda mogoča tudi sočasna uporaba z ostalimi PI ali insekticidnimi sredstvi (npr. toksinom Bt).
- Za lektin CNL iz poprhnjene livke pa se je izkazalo, da predstavlja njegovo izražanje v krompirju velik izziv. Zaradi posttranslacijskih modifikacij, med katerimi je prav za lektine značilna glikozilacija, smo pri pridobljenih transgenih linijah krompirja ugotovili, da vsebujejo rekombinanten protein v različnih glikoziliranih oblikah. Pri hranjenju ličink koloradskega hrošča s temi transgenimi linijami nismo opazili negativnega učinka za rast in razvoj ličink koloradskega hrošča.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Škodljivci predstavljajo v kmetijstvu veliko težavo, ki močno zmanjša količino pridelka kulturnih rastlin. Izguba pridelkov zaradi škodljivcev se zmanjša z uporabo pesticidov ali z uporabo odpornih sort kulturnih rastlin, vzgojenih s pomočjo klasičnega križanja ali z uporabo tehnologije genskega inženirstva. Le-ta že omogoča razvoj sort odpornih proti različnim žuželkam. Najuspešnejši primer so GSR, ki vsebujejo insekticidne toksine iz talne bakterije *B. thuringiensis*. Kljub velikemu naboru pesticidnih sredstev in uspehu GSR odpornih proti škodljivcem je povpraševanje po novih insekticidnih učinkovinah še vedno zelo aktualno. Proti že obstoječim insekticidom se namreč lahko pojavi odpornost, prav tako se pojavlja potreba po iskanju naravnejših insekticidnih sredstev.

Glive predstavljajo bogat, a slabo raziskan vir številnih naravnih substanc, ki jih lahko uporabimo za izboljšavo rastlin. Med drugim so na Odseku za biotehnologijo IJS iz gliv, ki oblikujejo plodišča, izolirali več genov, ki kodirajo proteine z insekticidno aktivnostjo. Čeprav zelo obetavni, ti in podobni proteini do sedaj še niso bili uporabljeni za izboljšavo rastlin, zato so rezultati objavljeni v okviru te doktorske naloge zelo pomembni tako za temeljno kot aplikativno znanje na tem področju. V doktorski nalogi smo proučili primernost nekaterih nedavno odkritih proteinov iz gliv za izboljšavo odpornosti krompirja proti koloradskemu hrošču, ki predstavlja najhujšega škodljivca na krompirju. Proučili smo, ali so ti proteini primerni za zaščito krompirja pred koloradskim hroščem.

V preliminarnih testih z delno očiščenimi proteinskimi ekstrakti iz prostotrosnice poprhnjena livka (*C. nebularis*) so na modelnem organizmu koloradskem hrošču pokazali insekticidne učinke ali upočasnjeno rast in razvoj ličink koloradskega hrošča. Iz poprhnjene livke so nato izolirali in okarakterizirali inhibitor cisteinskih proteaz klitocipin (Clt) in lektin CNL. Iz bazidiomicetne glive orjaški dežnik (*M. procera*) pa je bila izolirana in okarakterizirana družina inhibitorjev cisteinskih proteaz, imenovana makrocipini, ki so strukturno podobni klitocipinu iz poprhnjene livke. Vsi trije proteini so bili natančno okarakterizirani na genetskem in biokemijskem nivoju.

Koloradski hrošč, modelni organizem na področju zaščite rastlin proti žuželkam, se prehranjuje s krompirjem, zato smo ga uporabili za testno rastlino. Poleg tega je transformacija krompirja v tkivni kulturi dobro uveljavljena, regeneracija in razmnoževanje transgenih rastlin pa relativno preprosta, saj se krompir razmnožuje vegetativno.

Da bi dosegli čim večjo produkcije glivnih proteinov v testni rastlini, smo zaporedja preoblikovali glede na uporabo kodonov pri krompirju. Naročili smo sintetične gene in jih z rekombinantnim kloniranjem prenesli v Gateway vektorje za ekspresijo v rastlinah. Uporabili smo konstitutivni promotor 35S in nos terminator, kot selekcijski marker pa uporabili zapis za odpornost proti antibiotikom.

Tako pripravljene konstrukte smo s stabilno transformacijo z bakterijo *A. tumefaciens* vnesli v krompir. Izražanje rekombinantnih genov v transgenih rastlinah smo določili z metodo RT-qPCR, nadalje pa smo s prenosom western določili še izražanje na proteinskem nivoju.

Pri tako izbranih transgenih rastlinah smo v prehranskih poskusih testirali njihovo učinkovitost pri zaščiti proti koloradskemu hrošču. V prehranjevalnih testih smo ugotovili, da sta oba inhibitorja cisteinskih proteaz iz družine mikocipinov, torej makrocipin iz orjaškega dežnika in klitocipin iz poprhnjene livke, primerna za zaščito rastlin pred koloradskim hroščem. Učinkovitosti lektina CNL za zaščito proti koloradskemu hrošču zaradi težav pri postopku transformacije in zaradi posttranslacijskih modifikacij v krompirju nismo mogli dodobra okarakterizirati. Uporabo makrocipinov, kot zaščitne snovi proti herbivorim žuželkam, smo zaščitili tudi s patentno prijavo.

6.2 SUMMARY

Insect pests pose one of the major threats in agriculture. Crop losses due to pest infestations are reduced by use of resistant varieties and pesticides. Resistant varieties can be obtained using classical breeding techniques or technology of genetic engineering. Insect resistant genetically modified plants have been among the first commercialized genetically modified plants. Insect resistant genetically modified plants that produce insecticide proteins which originate from bacterium *Bacillus thuringiensis* have been on the market since 1995 and are among the most successful genetically modified plants. Demand for new insecticidal agents is still highly topical although many synthetic pesticides have already been produced and although Bt toxin producing transgenic plants are insect resistant. New insecticidal agents are needed because insect resistance against existing insecticide may develop and also new natural insecticides with fewer side effects are preferred.

Fungi represent a rich, but poorly explored source of many natural substances, which could be used for crop improvement. At the Department of Biotechnology at Institute “Jožef Stefan” many mushroom genes with insecticide activity have been isolated and biochemically characterized. Although very promising, those proteins have hitherto not been used for crop improvement. That is why the results published in this doctoral dissertation are important for basic and applicative knowledge on this field. In this dissertation the suitability of some recently discovered protein for protection of potato against Colorado potato beetle was examined.

In preliminary studies it was shown that crude protein extracts from clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) showed insecticide activity towards model organism Colorado potato beetle and retardation in growth and development of its larvae. Further on lectin CNL and cysteine protease inhibitor clitocypin have been isolated from clouded agaric. From parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) family of cysteine protease inhibitors structurally similar to clitocypin was isolated. It was termed macrocypins. All three mentioned fungal proteins (CNL, clitocypin and macrocypin) have been precisely investigated on the genetic and biochemical level.

Colorado potato beetle is one of the model organisms in the area of plant protection against insect herbivores. It primarily feeds on potato, that is why potato was chosen for testing of insecticide activity of selected fungal genes. Another argument for selection of potato as testing plant is that plant transformation of potato in tissue culture is well established and plant regeneration and vegetative reproduction is relatively simple.

To achieve high expression of fungal genes in transgenic potato plants, sequences of selected genes were adjusted regarding to potato codon usage. Synthetic genes were ordered and cloned into Gateway compatible vectors appropriate for plant expression. Genes were expressed under the constitutive 35S promoter, nos terminator was used and antibiotic resistance gene was used as a selection marker. Constructs were introduced into potato explants with *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Expression of inserted genes in transgenic plants was determined using RT-qPCR. Among transgenic lines with highest RNA expression recombinant protein levels were determined with western blot.

Transgenic plants with highest expression of recombinant proteins were used in feeding trials of Colorado potato beetle larvae. In bioassays it was shown that both cysteine protease inhibitors macrocypin and cliticypin are suitable for plant protection against Colorado potato beetle, as they both cause growth and development retardation of Colorado potato beetle larvae. Use of macrocypins as a protection agent against insect herbivores was protected by a patent application. The efficiency of dietary lectin CNL in a form of transgenic plants against Colorado potato larvae was not fully characterized due to problems in the transformation procedure.

7 VIRI

- Ahn J.-E., Salzman R.A., Braunagel S.C., Koiwa H., Zhu-Salzman K. 2004. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 13, 6: 649–657
- Alvarez-Alfageme F., Martinez M., Pascual-Ruiz S., Castanera P., Diaz I., Ortego F. 2007. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Research*, 16: 1–13
- Alyokhin A., Baker M., Mota-Sanchez D., Dively G., Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research*, 85, 6: 395–413
- Avanzo P., Sabotič J., Anžlovar S., Popovič T., Leonardi A., Pain R.H., Kos J., Brzin J. 2009. Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete *Clitocybe nebularis* with regulatory and defensive functions. *Microbiology*, 155: 3971–3981
- Berry R.E., Liu J., Reed G. 1997. Comparison of endemic and exotic entomopathogenic nematode species for control of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 90, 6: 1528–1533
- Bleuler-Martínez S., Butschli A., Garbani M., Wälti M.A., Wohlschlager T., Potthoff E., Sabotič J., Pohleven J., Lüthy P., Hengartner M.O., Aebi M., Künzler M. 2011. A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. *Molecular Ecology*, 20, 14: 3056–3070
- Bleuler-Martinez S., Schmieder S., Aebi M., Künzler M. 2012. Biotin-binding proteins in the defense of mushrooms against predators and parasites. *Applied Environmental Microbiology*, 78, 23: 8485–8487
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Bolter C.J., Dicke M., van Loon J.J.A., Visser J.H., Posthumus M.A. 1997. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 4: 1003–1023
- Bolter C.J., Jongsma M.A. 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Journal of Insect Physiology*, 41, 12: 1071–1078
- Bolter C.J., Latoszek-Green M. 1997. Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83: 295–303

- Bonaventure G., VanDoorn A., Baldwin I.T. 2011. Herbivore-associated elicitors: FAC signaling and metabolism. *Trends in Plant Science*, 16, 6: 294–299
- Bown D.P., Wilkinson H.S., Gatehouse J.A. 1997. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 7: 625–638
- Brunelle F., Cloutier C., Michaud D. 2004. Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 55, 1: 103–113
- Brunelle F., Girard C., Cloutier C., Michaud D. 2005. A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60, 1: 20–31
- Brunelle F., Nguyen-Quoc B., Cloutier C., Michaud D. 1999. Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 42, 1: 88–98
- Brzin J., Rogelj B., Popovič T., Štrukelj B., Ritonja A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 26: 20104–20109
- Butschi A., Titz A., Wälti M. A., Olieric V., Paschinger K., Nöbauer K., Guo X., Seeberger P.H., Wilson I.B.H., Aebi M., Hengartner M.O., Künzler M. 2010. *Caenorhabditis elegans* N-glycan core beta-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. *PLoS Pathogens*, 6, 1: e1000717
- Chen M.-S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15, 2: 101–114
- Chi Y.H., Salzman R.A., Balfe S., Ahn J.-E., Sun W., Moon J., Yun D.-J., Lee S.Y., Higgins T.J.V, Pittendrigh B., Murdock L.L., Zhu-Salzman K. 2009. Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin-costs and benefits of counter-defence. *Insect Molecular Biology*, 18, 1: 97–110
- Christeller J.T., Burgess E.P.J., Mett V., Gatehouse H.S., Markwick N.P., Murray C., Malone L.A., Wright M.A., Philip B.A., Watt D., Gatehouse L.N., Lövei G.L., Shannon A.L., Phung M.M., Watson L.M., Laing W.A. 2002. The expression of a mammalian proteinase inhibitor, bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. *Transgenic Research*, 11, 2: 161–173
- Christeller J.T., Markwick N.P., Burgess E.P.J., Malone L.A. 2010. The use of biotin-binding proteins for insect control. *Journal of Economic Entomology*, 103, 2: 497–508
- Christou P., Capell T., Kohli A., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. 2006. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science*, 11, 6: 302–308

- Cingel A., Savić J., Čosić T., Zdravković-Korać S., Momčilović I., Smigocki A., Ninković S. 2014. Pyramiding rice cystatin OCI and OCII genes in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) for resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Euphytica*, 198, 3: 425–438
- Clive J. Executive summary, Brief 44, Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops □: 2012. 2013. ISAAA: 18 str.
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/executivesummary/pdf/Brief%2044%20-%20Executive%20Summary%20-%20English.pdf> (18. nov. 2014)
- Clive J. Executive summary, Brief 46, Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops □: 2013. 2014. ISAAA: 20 str.
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/pdf/Brief%2046%20-%20Executive%20Summary%20-%20English.pdf> (18. nov. 2014)
- Coll M., Garcia de Mendoza L., Roderick G.K. 1994. Population structure of a predatory beetle: the importance of gene flow for intertrophic level interactions. *Heredity*, 72: 228–236
- Cooper S.G., Douches D.S., Grafius E.J. 2009. Combining engineered resistance, avidin, and natural resistance derived from *Solanum chacoense* bitter to control Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 102, 3: 1270–1280
- Crusciol C.A.C., Pulz A.L., Lemos L.B., Soratto R.P., Lima G.P.P. 2009. Effects of silicon and drought stress on tuber yield and leaf biochemical characteristics in potato. *Crop Science*, 49, 3: 949-954
- Cui J., Luo J., Van Der Werf W., Ma Y., Xia J. 2011. Effect of pyramiding Bt and CpTI genes on resistance of cotton to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. *Journal of Economic Entomology*, 104, 2: 673-684
- Curtis M.D., Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, 133, 2: 462-469
- Dohmae N., Takio K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y. 1995. The complete amino acid sequences of two serine proteinase inhibitors from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 316, 1: 498-506
- Dong H. Z., Li W. J. 2007. Variability of Endotoxin Expression in Bt Transgenic Cotton. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 1: 21–29
- Doran P. M. 2006. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology*, 24, 9: 426–432

- English L. 2004. Coleopteran-resistant transgenic plants and methods of their production. USA patent application US 20040033523 A1: 265 str.
- Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreo T., Sabotič J. 2012. Proteins of higher fungi--from forest to application. *Trends in Biotechnology*, 30, 5: 259–273
- Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 2: 155–161
- Fidantsef A.L., Bostock R.M. 1998. Characterization of potato tuber lipoxygenase cDNAs and lipoxygenase expression in potato tubers and leaves. *Physiologia Plantarum*, 10: 257-271
- Gaquerel E., Weinhold A., Baldwin I.T. 2009. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphigidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VIII. An unbiased GCxGC-ToFMS analysis of the plant's elicited volatile emissions. *Plant Physiology*, 149, 3: 1408–1423
- Gatehouse A.M.R., Ferry N., Edwards M.G., Bell H. A. 2011. Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 366: 1438–1452
- Gatehouse A.M.R., Hilder V.A. 1994. Genetic manipulation of crops for insect resistance. V: *Molecular biology in crop protection*. Marshall G., Walters D. (eds.). London, Chapman in Hall: 177-201
- Gatehouse J.A. 2008. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. *Plant Physiology*, 146, 3: 881–887
- Gatehouse J.A. 2011. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Current Protein and Peptide Science*, 12, 5: 409-416
- Gelman D.B., Rojas M.G., Kelly T.J., Hu J.S., Bell R.A. 2000. Ecdysteroid and free amino acid content of eggs of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, 182: 172–182
- Gomez-Zurita J., Galian J. 2005. Current knowledge on genes and genomes of phytophagous beetles (Coleoptera: Chrysomeloidea, Curculionoidea): a review. *European Journal of Entomology*, 102, 4: 577–597
- Gomord V., Faye L. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 2: 171–181
- Govind G., Mittapalli O., Griebel T., Allmann S., Böcker S., Baldwin I.T. 2010. Unbiased transcriptional comparisons of generalist and specialist herbivores feeding on progressively defenseless *Nicotiana attenuata* plants. *PLoS One*, 5, 1: e8735

- Grafius E.J., Douches D.S. 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified potato cultivars in IPM. V: Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Romeis J., Shelton A.M., Keneddy G.G. (eds.). Berlin, Springer Science+Business Media: 195–221
- Green T.R., Ryan C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175, 4023: 776–777
- Gruden K., Kuipers A.G.J., Guncar G., Slapar N., Strukelj B., Jongsma M.A. 2004. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 4: 365–375
- Gruden K., Popovič T., Cimerman N., Križaj I., Štrukelj B. 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, “intestains”, enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defence mechanism. *Biological Chemistry*, 384, 2: 305–310
- Gruden K., Štrukelj B., Popovič T., Lenarčič B., Bevec T., Brzin J., Kregar I., Herzog-Velikonja J., Stiekema W.J., Bosch D., Jongsma M.A. 1998. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 8: 549–560
- Gunde-Cimerman N. 1996. Nitaste glive. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 95-111
- Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 7: 346–353
- Habib H., Fazili K.M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2, 3: 68-85
- Hamshou M., Van Damme E.J.M., Smaghe G. 2010a. Entomotoxic effects of fungal lectin from *Rhizoctonia solani* towards *Spodoptera littoralis*. *Fungal Biology*, 114, 1: 34–40
- Hamshou M., Smaghe G., Shahidi-Noghabi S., De Geyter E., Lannoo N., Van Damme E.J. M. 2010b. Insecticidal properties of *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin and its interaction with insect tissues and cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 12: 883–890
- Haq S.K., Atif S.M., Khan R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431, 1: 145–159
- Horton D.R., Capinera J.L., Chapman P.L. 1988. Local differences in host use by two populations of the Colorado potato beetle. *Ecology*, 69, 3: 823-831

- Jaber K., Francis F., Paquereau L., Fournier D., Haubruge E. 2007. Effect of a fungal lectin from *Xerocomus chrysenteron* (XCL) on the biological parameters of aphids. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72, 3: 629–638
- Jongsma M.A., Bakker P.L., Peters J., Bosch D., Stiekema W.J. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 17: 8041–8045
- Jongsma M.A., Bolter C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43, 10: 885–895
- Khan F., Khan K.I. 2011. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. *International Journal of Biological Chemistry*, 5, 1: 1-20.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. Wallingford, CABI: 640 str.
- Klümper W., Qaim M. 2014. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS One*, 9, 11: e111629
- Kojima S., Iwahara A., Yanai H. 2005. Inhibitor-assisted refolding of protease: a protease inhibitor as an intramolecular chaperone. *FEBS Letters*, 579, 20: 4430–4436
- Kondrák M., Kutas J., Szenthe B., Patthy A., Bánfalvi Z., Nádasy M., Gráf L., Asbóth B. 2005. Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. *Biotechnology Letters*, 27, 12: 829–834
- Koo Y.D., Ahn J.-E., Salzman R.A., Moon J., Chi Y.H., Yun D.-J., Lee S.Y., Koiwa H., Zhu-Salzman K. 2008. Functional expression of an insect cathepsin B-like counter-defence protein. *Insect Molecular Biology*, 17, 3: 235–245
- Korth K.L., Dixon R.A. 1997. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology*, 115, 4: 1299–1305
- Kramer K.J., Morgan T.D., Throne J.E., Dowell F.E., Bailey M., Howard J.A. 2000. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature Biotechnology*, 18, 6: 670–674
- Krishnan N., Kodrík D., Turanli F., Sehnal F. 2007. Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 53, 1: 67–74
- Kusnadi A. R., Nikolov Z. L., Howard J. A. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 5: 473–484

- Lacey L.A., Horton D.R., Chauvin R.L., Stocker J.M. 1999. Comparative efficacy of *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, and aldicarb for control of Colorado potato beetle in an irrigated desert agroecosystem and their effects on biodiversity, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 93: 189–200
- Lalitha S., Shade R.E., Murdock L.L., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Nielsen S.S. 2005. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 140, 2: 227–235
- Lam S.K., Ng T.B. 2011. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1: 45–55
- Lawrence P.K., Koundal K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 1: 1-17
- Lawrence S.D., Novak N.G., Ju C.J.-T., Cooke J.E.K. 2008. Potato, *Solanum tuberosum*, defense against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say): microarray gene expression profiling of potato by Colorado potato beetle regurgitant treatment of wounded leaves. *Journal of chemical ecology*, 34, 8: 1013–1025
- Lawson E.C., Weiss J.D., Thomas P.E., Kaniewski W.K. 2001. NewLeaf Plus Russet Burbank potatoes: replicase-mediated resistance to potato leafroll virus. *Molecular Breeding*, 7: 1–12
- Lecardonnell A., Chauvin L., Jouanin L., Beaujean A. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Science*, 140: 71–79
- Liu X.S., Dean D.H. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein engineering, design and selection*, 19, 3: 107–111
- Liu Y., Salzman R.A., Pankiw T., Zhu-Salzman K. 2004. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34, 10: 1069–1077
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25, 4: 402–408
- Long D., Drummond F., Groden E. 1998. Susceptibility of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) eggs to *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate pathology*, 71, 2: 182–183
- Maagd R.A., Bosch D., Stiekema W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*. 4, 1: 12–16
- Mazumdar-Leighton S., Broadway R.M. 2001. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 6-7: 645–657

- Miao J., Wu Y., Xu W., Hu L., Yu Z., Xu Q. 2011. The impact of transgenic wheat expressing GNA (snowdrop lectin) on the aphids *Sitobion avenae*, *Schizaphis graminum*, and *Rhopalosiphum padi*. *Environmental Entomology*, 40, 3: 743–748
- Michaud D., Bernier-Vadnais N., Overney S., Yelle S. 1995. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), 25, 9: 1041–1048
- Michaud D., Nguyen-Quoc B., Vrain T.C., Fong D., Yelle S. 1996. Response of digestive cysteine proteinases from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a recombinant form of human stefin A. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 31, 4: 451–464
- Michaud D., Nguyen-Quoc B., Yelle S. 1993. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *FEBS Letters*, 331: 173–176
- Michiels K., Van Damme E.J.M., Smagghe G. 2010. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Archives of insect biochemistry and physiology*, 73, 4: 193–212
- Mier N., Canete S., Kläbe A., Chavant L., Fournier D. 1996. Insecticidal properties of mushroom and toadstool carpophores. *Phytochemistry*, 41, 5: 1293–1299
- Mithöfer A., Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*, 63: 431–450
- Moon J., Salzman R.A., Ahn J.-E., Koiwa H., Zhu-Salzman K. 2004. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 13, 3: 283–291
- Mori N., Yoshinaga N. 2011. Function and evolutionary diversity of fatty acid amino acid conjugates in insects. *Journal of Plant Interactions*, 6, 2-3: 103–107
- Mullins E., Milbourne D., Petti C., Doyle-Prestwich B.M., Meade C. 2006. Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Science*, 11, 5: 254–260
- Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 3: 473–497
- Novillo C., Castañera P., Ortego F. 1997. Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36: 181–201
- Nowrousian M., Cebula P. 2005. The gene for a lectin-like protein is transcriptionally activated during sexual development, but is not essential for fruiting body formation in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *BMC Microbiology*, 5, 64: 1–10
- Odani S., Tominaga K., Kondou S., Hori H., Koide T., Hara S., Isemura M., Tsunasawa S. 1999. The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase

- inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete, *Lentinus edodes*. European journal of biochemistry, 262, 3: 915–923
- Oppert B., Elpidina E.N., Toutges M., Mazumdar-Leighton S. 2010. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics, 5, 4: 280–287
- Oppert B., Morgan T.D., Hartzler K., Kramer K.J. 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Comparative biochemistry and physiology - Part C: Toxicology and pharmacology, 140, 1: 53–58
- Outchkourov N.S., Rogelj B., Štrukelj B., Jongsma M.A. 2003. Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. Plant Physiology, 133, 1: 379–390
- Pace G. 1981. Vse o gobah. Ljubljana, Mladinska knjiga: 362 str.
- Pauchet Y., Wilkinson P., Chauhan R., Ffrench-Constant R.H. 2010. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. PLoS One, 5, 12: e15635
- Perlak F.J., Stone T.B., Muskopf Y.M., Petersen L.J., Parker G.B., Mcpherson S.A., Wyman J., Love S., Reed G., Biever D., Fischhoff D.A. 1993. Genetically improved potatoes - protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Molecular Biology, 22, 2: 313-321
- Petek M., Turnšek N., Buh Gašparič M., Pompe Novak M., Gruden K., Slapar N., Popovič T., Štrukelj B., Jongsma M.A. 2012. A complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 79, 3: 153–181
- Peumans W.J., Van Damme E.J. 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiology, 109, 2: 347–352
- Pfaffl M.V. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research, 29, 2002-2007
- Pohleven J., Brzin J., Vrabec L., Leonardi A., Čokl A., Štrukelj B., Kos J., Sabotič J. 2011. Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 4: 1141–1148
- Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčić K., Kos J., Kralj B., Štrukelj B., Brzin J. 2009. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. Biochimica et Biophysica acta, 1790, 3: 173–181
- Poler A. 1990. Gremo po gobe! Maribor, Obzorja: 474 str.

- Poulsen M., Kroghsbo S., Schröder M., Wilcks A., Jacobsen H., Miller A., Frenzel T., Danier J., Rychlik M., Shu Q., Emami K., Sudhakar D., Gatehouse A., Engel K.-H., Knudsen I. 2007. A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin *Galanthus nivalis* (GNA). *Food and chemical toxicology*, 45, 3: 350–363
- Purcell J. P., Greenplate J. T., Sammons R. D. 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 41-47
- Quilis J., López-García B., Meynard D., Guiderdoni E., San Segundo B. 2014. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 3: 367–377
- Rajamohan F., Alzate O., Cottrill J.A., Curtiss A., Dean D.H. 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 25: 14338–14343
- Rangarajan A., Miller A. R., Veilleux R.E. 2000. Leptine glycoalkaloids reduce feeding by Colorado potato beetle in diploid *Solanum* sp. hybrids, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 6: 689–693
- Rao K.V, Rathore K.S., Hodges T.K., Fu X., Stoger E., Sudhakar D., Williams S., Christou P., Bharathi M., Bown D.P., Powell K.S., Spence J., Gatehouse A.M.R., Gatehouse J.A. 1998. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal*, 15, 4: 469–477
- Rawlings N.D. 2010. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92, 11: 1463–1483
- Renko M., Sabotič J., Mihelič M., Brzin J., Kos J., Turk D. 2010. Versatile loops in mycocypins inhibit three protease families. *The Journal of biological chemistry*, 285, 1: 308–316
- Rivard D., Cloutier C., Michaud D. 2004. Colorado potato beetles show differential digestive compensatory responses to host plants expressing distinct sets of defense proteins. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 55, 3: 114–123
- Rohlf M., Albert M., Keller N. P., Kempken F. 2007. Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biology Letters*, 3, 5: 523–525
- Romeis J., Meissle M., Bigler F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, 24, 1: 63–71
- Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 485–510

- Ryan C.A. 1990. Protease inhibitors in plants—genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 425–449.
- Sabotič J. 2007. Karakterizacija mikocipinov izbranih vrst prostotrosnic z genskim in proteinskim inženirstvom. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 189 str.
- Sabotič J., Bleuler-Martinez S., Renko M., Avanzo Caglič P., Kallert S., Štrukelj B., Turk D., Aebi M., Kos J., Künzler M. 2012. Structural basis of trypsin inhibition and entomotoxicity of cospin, serine protease inhibitor involved in defense of *Coprinopsis cinerea* fruiting bodies. *The Journal of biological chemistry*, 287, 6: 3898–3907
- Sabotič J., Galeša K., Popovič T., Leonardi A., Brzin J. 2007a. Comparison of natural and recombinant cliticypins, the fungal cysteine protease inhibitors. *Protein expression and purification*, 53, 1: 104–111
- Sabotič J., Gaser D., Rogelj B., Gruden K., Štrukelj B., Brzin J. 2006. Heterogeneity in the cysteine protease inhibitor cliticypin gene family. *Biological Chemistry*, 387, 12: 1559–1566
- Sabotič J., Kos J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors--current and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 93, 4: 1351–1375
- Sabotič J., Popovič T., Puizdar V., Brzin J. 2009. Macrocypins, a family of cysteine protease inhibitors from the basidiomycete *Macrolepiota procera*. *The FEBS Journal*, 276, 16: 4334–4345
- Sabotič J., Trček T., Popovič T., Brzin J. 2007b. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of biotechnology*, 128, 2: 297–307
- Sasson A. 1998. *Plant Biotechnology - Derived Products: market-Value Estimates and Public Acceptance*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 160 str.
- Schuler T. H., Poppy G. M., Kerry B. R., Denholm I. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, 16: 685–692
- Shen Z., Denton M., Mutti N., Pappan K., Kanost M.R., Reese J.C., Reeck G.R. 2003. Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science*, 3, 24: 1–9
- Spiteller P. 2008. Chemical defence strategies of higher fungi. *Chemistry*, 14, 30: 9100–9110
- Šmid I., Gruden K., Buh Gašparič M., Koruza K., Petek M., Pohleven J., Brzin J., Kos J., Žel J., Sabotič J. 2013. Inhibition of the growth of colorado potato beetle larvae by macrocypins, protease inhibitors from the parasol mushroom. *Journal of agricultural and food chemistry*, 6, 51: 12499–12509

- Šmid I., Rotter A., Gruden K., Brzin J., Buh Gašparič M., Kos J., Žel J., Sabotič J. 2014. Clitocypin, a fungal cysteine protease inhibitor, exerts its insecticidal effect on Colorado potato beetle larvae by inhibiting their digestive cysteine proteases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, doi:10.1016/j.pestbp.2014.12.022: 8 str.
- Tabashnik B.E., Brévault T., Carrière Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature biotechnology*, 31, 6: 510–521
- Takakura Y., Oka N., Suzuki J., Tsukamoto H., Ishida Y. 2012. Intercellular production of tamavidin 1, a biotin-binding protein from Tamogitake mushroom, confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae* in transgenic rice. *Molecular biotechnology*, 1, 1: 9–17
- Takakura Y., Tsunashima M., Suzuki J., Usami S., Kakuta Y., Okino N., Ito M., Yamamoto T. 2009. Tamavidins--novel avidin-like biotin-binding proteins from the Tamogitake mushroom. *The FEBS Journal*, 276, 5: 1383–1397
- Terra W.R., Ferreira C. 1994. Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function. *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry in molecular biology*, 109, 1: 1-62
- Terra W.R., Ferreira C. 2005. Biochemistry of digestion. V: *Comprehensive Molecular Insect Science, Volume 3: Endocrinology*. Lawrence I.G., Kostas I., Sarjeet S.G. (eds.). Oxford, UK. Elsevier: 171-224
- Thie N. M. R., Houseman J. G. 1990. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry*, 20: 313-318
- Trigueros V., Lougarre A., Ali-Ahmed D., Rahbé Y., Guillot J., Chavant L., Fournier D., Paquereau L. 2003. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621, 3: 292–298
- Ullrich K. K., Hiss M., Rensing S. A. 2015. Means to optimize protein expression in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 32: 61–67
- Vance V., Vaucheret H. 2001. RNA Silencing in Plants — Defense and Counterdefense. *Science*, 292: 2277–2281
- Vandenborre G., Smaghe G., Van Damme E.J.M. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72, 13: 1538–1550
- Vasconcelos I.M., Oliveira J.T.A. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44, 4: 385–403

- Visal S., Taylor M.A., Michaud D. 1998. The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 434, 3: 401–405
- Vishwanathreddy H., Ganapati G.B., Shashikala R.I., Ravindra K.G., Swamy B.M. 2014. *Sclerotium rolfsii* lectin exerts insecticidal activity on *Spodoptera litura* larvae by binding to membrane proteins of midgut epithelial cells and triggering caspase-3-dependent apoptosis. *Toxicon*, 78: 47–57
- Visser R., Jacobsen E., Hesselting-Meinders A., Schans M., Witholt B., Feenstra W.J. 1989. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology*, 12: 329–337
- Vrabl S. 1992. Škodljivci poljščin. Kmečki glas, Ljubljana: 145 str.
- Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., MacKerron D.K.L., Taylor A.M., Ross H.A. 2007. *Potato Biology and Biotechnology, Advances and Perspectives*. Oxford, Elsevier: 856 str.
- Wang H., Ng T.B., Ooi V.E.C. 1998. Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 102, 8: 897–906
- Wang M., Trigueros V., Paquereau L., Chavant L., Fournier D. 2002. Proteins as active compounds involved in insecticidal activity of mushroom fruitbodies. *Journal of economic entomology*, 95, 3: 603–607
- Weber D.C., Ferro D.N. 1994. Colorado potato beetle: diverse life history poses challenge to management. V: *Advances in potato pest biology and management*. Zehnder G.W., Jansson R.K., Powelson M.L., Raman K.V. (eds). St. Paul, APS Press: 54–70
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 2853–2858
- Whalon, M.E., Mota-Sanchez D., Hollingworth R.M. 2014. Arthropod pesticide resistance database. Michigan, Michigan State University.
<http://www.pesticideresistance.com/display.php?page=species&arId=141> (18. nov. 2014): 1 str.
- Wohlschlager T., Butschi A., Zurfluh K., Vonesch S.C., Auf Dem Keller U., Gehrig P., Bleuler-Martinez S., Hengartner M.O., Aebi M., Künzler M. 2011. Nematotoxicity of *Marasmius oreades* agglutinin (MOA) depends on glycolipid binding and cysteine protease activity. *The Journal of biological chemistry*, 286, 35: 30337–30343
- Wolfson J.L., Murdock L.L. 1987. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 44, 3: 235–240

- Zhu-Salzman K., Koiwa H., Salzman R.A., Shade R.E., Ahn J.-E. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 12, 2: 135–145
- Zhu-Salzman K., Zeng R.S. 2008. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle. *Insect Science*, 15, 6: 477–481
- Zipfel C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*. 35, 7: 345–351
- Zuchowski J., Grzywnowicz K. 2006. Partial purification of proteinase K inhibitors from liquid-cultured mycelia of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Current Microbiology*, 53, 4: 259–264

ZAHVALA

Za mentorstvo pri doktorski nalogi se iskreno zahvaljujem Jani Žel. Hvala, da si mi omogočila vstop v raziskovalni svet, za tvoj čas, usmerjanje ter vse posredovano znanje. Najlepša hvala tudi somentorici Kristini Gruden za strokovno podporo, optimizem pri interpretaciji rezultatov in potrpežljivost.

Za temeljit in hiter pregled doktorske naloge ter za konstruktivne pripombe se zahvaljujem članom komisije, prof. dr. Jelki Šuštar Vozlič, prof. dr. Borutu Bohancu in prof. dr. Janku Kosu.

Za financiranje se zahvaljujem Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, ki je podprla delo v okviru financiranja mladih raziskovalcev (pogodba št. 1000-09-310204) in projekta Funkcionalna analiza proteinov za odpornost proti suši ali žuželkam (pogodba št. J4-2022).

Za sodelovanje se zahvaljujem zaposlenim na Odseku za biotehnologijo na IJS, s katerimi smo sodelovali v okviru projekta Funkcionalna analiza proteinov za odpornost proti suši ali žuželkam. Med njimi bi se še posebej zahvalila Jerici Sabotič za vse koristne napotke, pomoč pri laboratorijskem delu ter sodelovanje pri pisanju člankov.

Za pomoč v laboratoriju se zahvaljujem sodelavcem Meti, Marku, Davidu in Neži ter (takratnima) diplomantkama Urški in Hani. Živi se zahvaljujem za reševanje iz prenekaterih računalniških zagat. Hvala za dobro družbo vsem cimrom, ki ste se zvrstili v mojih letih na FITO. In hvala tudi vsem ostalim FITO-vcem za prijetno delovno vzdušje.

Hvala mami in ati, ker sta mi vedno pustila hoditi po svoji poti, a mi hkrati nudila varen pristan. Najlepša hvala mojima sončkoma, Drejcu in Binetu, ker sta mi v letih doktorskega študija pokazala, kaj šteje največ. In hvala Blaž, ker mi že toliko let dokazuješ, da so stvari vredne mnogo več, če jih počneš v dvoje.