

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andreja BROŽIČ

**REGENERACIJA IN TRANSFORMACIJA
KROMPIRJA (*Solanum tuberosum*) SORT IGOR IN
SANTE ZA NADALJNJO ANALIZO GENOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andreja BROŽIČ

**REGENERACIJA IN TRANSFORMACIJA KROMPIRJA
(*Solanum tuberosum*) SORT IGOR IN SANTE
ZA NADALJNJO ANALIZO GENOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**REGENERATION AND TRANSFORMATION OF POTATO
(*Solanum tuberosum*) cv. IGOR AND cv. SANTE
FOR FURTHER GENE ANALYSIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Po sklepu komisije za dodiplomski študij Oddelka za biologijo z dne 3.6.2011 je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Jana Žel.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:

prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica:

prof. dr. Jana ŽEL
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica:

doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 5.12.2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski verziji, identična tiskani verziji.

Andreja Brožič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 581.1 : 581.2 : 582.951 (043.2) = 163.6
KG krompir (*Solanum tuberosum*)/regeneracija/zeatin ribozid/transformacija
AV BROŽIČ, Andreja
SA ŽEL, Jana (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2011
IN REGENERACIJA IN TRANSFORMACIJA KROMPIRJA (*Solanum tuberosum*)
SORT IGOR IN SANTE ZA NADALJNJO ANALIZO GENOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 66 str., 6 pregl., 22 sl., 73 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V naši raziskavi smo proučevali učinkovitost *in vitro* regeneracije krompirja (*Solanum tuberosum*) sort Igor in Sante. Ugotavljali smo morfološki potencial izsečkov in vpliv sestave gojišča na regeneracijo rastlin. Uporabili smo štiri različne koncentracije zeatin ribozida (ZR) v kombinaciji z drugimi rastnimi regulatorji. Indukcija kalusa na regeneracijskem gojišču je bila učinkovitejša z uporabo kombinacije rastnih regulatorjev naftalenocetne kisline (NAA), gibberelinske kisline (GA₃) in ZR kot pa z uporabo NAA, 6-benzilaminopurina (BAP), 2,4 diklorofenolocetne kisline (2,4 D) in kinetina (KIN). Glede na delež nastalega kalusa so za sorto Sante najprimernejši izsečki internodijev pri uporabi 5,69 μM raztopine ZR, pri sorti Igor pa izsečki listov pri uporabi 8,54 μM ali 11,38 μM raztopine ZR. Uporabljeno razmerje citokininov in avksinov ni stimuliralo nastanka poganjkov. V nadaljevanju smo pri transformaciji sorte Igor uporabili drugačne koncentracije rastnih regulatorjev (8,54 μM ZR, 0,05 μM GA₃ in 1,07 μM NAA). S postopkom transformacije smo pridobili transgene rastline z dokazano prisotnostjo vstavljenih genov za krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor (PCPI). Pridobljene transgene rastline predstavljajo pomembno orodje za nadaljnje analize genov sorte Igor, ki je bila pred okužbo z virusom PVY^{NTN} ena izmed najpopularnejših in gospodarsko najpomembnejših sort v Sloveniji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 581.1 : 581.2 : 582.951 (043.2) = 163.6
CX potato (*Solanum tuberosum*)/regeneration/zeatin riboside/transformation
AU BROŽIČ, Andreja
AA ŽEL, Jana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2011
TI REGENERATION AND TRANSFORMATION OF POTATO (*Solanum tuberosum*) cv. IGOR AND cv. SANTE FOR FURTHER GENE ANALYSIS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 66 p., 6 tab., 22 fig., 73 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars, cv. Igor and cv. Sante, and different varieties of explants, and media were selected to study relationships between *in vitro* regeneration responses. Firstly, four different ZR concentrations combined with other growth regulators were used. In comparison to combination of naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzylaminopurine (BAP), and kinetin (KIN) used for callus induction, better callus development was observed with a combination of NAA, gibberelic acid (GA₃), and zeatin riboside (ZR). The highest percentage of callus was induced with 5.69 μM ZR and 8.54 μM or 11.38 μM in cv. Sante internodes and in leaf parts of cv. Igor, respectively. There was no shoot formation at ratio of auxins and cytokinins that were used. Different combination of growth regulators (8.54 μM, ZR, 0.05 μM GA₃, and 1.07 μM NAA) for transformation of cv. Igor was used. Stable integration of potato cysteine proteinase inhibitor (PCPI) genes in transgenic plants confirmed successful transfer. Before the infection with virus PVY^{NTN}, cv. Igor represented one of the most popular and economically important cultivar in Slovenia. Transgenic plants acquired during this study are very important tool for further gene analysis of this plant.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 REGENERACIJA RASTLIN	3
2.1.1 Plastičnost in totipotentnost	3
2.1.2 Somatska embriogeneza in organogeneza	4
2.2 ŽLAHTNENJE RASTLIN	4
2.3 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE	5
2.3.1 Uporabnost rastlinskih tkivnih kultur	5
2.3.2 Izseček	6
2.3.3 Sterilnost	7
2.4 GOJIŠČE ZA RASTLINSKE TKIVNE KULTURE	7
2.4.1 Trdna in tekoča gojišča	8
2.4.2 Sestava gojišč	8
2.4.2.1 Anorganska hranila	8
2.4.2.2 Organski dodatki	9
2.4.2.3 Ogljikovi hidrati	9
2.4.2.4 Rastlinski rastni regulatorji (RRR)	10
2.4.2.5 Antibiotiki	13
2.4.2.6 Sredstva za strjevanje	13
2.4.2.7 Zunanji dejavniki	14
2.5 VNOS GENOV V RASTLINE (TRANSFORMACIJA)	14
2.6 ANALIZA GENOV	17
2.7 PROTEINAZNI INHIBITORJI	18
2.8 KROMPIR	19
2.8.1 Bolezni in škodljivci	19
2.8.2 Sorta Igor	20
2.8.3 Sorta Sante	20

3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Kemikalije	21
3.1.2 Laboratorijska oprema	22
3.1.3 Droben laboratorijski material in ostale potrebščine	22
3.1.4 Bakterije in plazmidi	23
3.1.5 Gojišča	25
3.1.5.1 Regeneracijska gojišča za sorti Sante in Igor	26
3.1.5.2 Gojišča uporabljena pri transformaciji sorte Igor	27
3.1.6 Rastlinski material	28
3.2 METODE	28
3.2.1 Pogoji dela	28
3.2.2 Priprava gojišč	29
3.2.2.1 Priprava gojišča MS	29
3.2.2.2 Priprava gojišča R3B	30
3.2.2.3 Priprava gojišča PACM	30
3.2.2.4 Priprava poskusnih gojišč z različnimi koncentracijami ZR	30
3.2.2.5 Priprava gojišča YEB	30
3.2.2.6 Priprava regeneracijskega gojišča za transformacijo sorte Igor	31
3.2.2.7 Priprava selekcijskega gojišča za transformacijo sorte Igor	31
3.2.3 Priprava rastlinskih rastnih regulatorjev in antibiotikov	31
3.2.4 Priprava rastlinskega materiala	32
3.2.5 Optimizacija postopka regeneracije	33
3.2.6 Transformacija	35
3.2.6.1 Gojenje bakterijske kulture za transformacijo rastlin	35
3.2.6.2 Potek transformacije	35
3.2.6.3 Prenos poganjkov iz petrijevok v posodice in epruvete	37
3.2.7 Testiranje potencialno transformiranih rastlin	38
3.2.8 Statistična analiza podatkov	38
4 REZULTATI	39
4.1 REGENERACIJA KROMPIRJA SORT SANTE IN IGOR NA POSKUSNIH GOJIŠČIH	39
4.1.1 Tvorba kalusa	39
4.2 TRANSFORMACIJA	45
4.2.1 Potek transformacije	45
4.2.2 Kontrola transformacije	45
4.2.3 Tvorba kalusa in poganjkov	47
4.2.4 Uspešnost transformacije	49
5 RAZPRAVA	51

6	SKLEPI	58
7	POVZETEK.....	59
8	VIRI	61
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Priprava raztopin RRR in antibiotikov (količine in medij za raztapljanje).	32
Preglednica 2:	Število izsečkov določene stopnje razvoja kalusa pri sortah Sante in Igor.	42
Preglednica 3:	Potek transformacije sorte Igor	45
Preglednica 4:	Rezultati kontrole transformacije sorte Igor.....	46
Preglednica 5:	Regeneracija transformiranega krompirja sorte Igor.....	49
Preglednica 6:	Uspešnost transformacije sorte Igor s konstruktom z genom PCPI	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz glavnih področij in nekaterih aplikacij celičnih in tkivnih kultur (prirejeno po Neumann, 2009:2)	6
Slika 2: Relativne koncentracije avksina in citokinina, značilne za rast in morfogenezo (Van Staden in sod., 2008: 220)	12
Slika 3: Model transformacije rastlinske celice z agrobakterijo (Păcurar in sod., 2011: 4). 15	
Slika 4: Svetovna proizvodnja krompirja med letoma 1991 in 2007 (prirejeno po International year of the potato, 2008)	19
Slika 5: Vektor pMDC32, v katerem je bil kasneje med mesti attR1 in attR2 vnesen gen PCPI (prirejeno po Curtis in Grossniklaus, 2003).....	24
Slika 6: Genski konstrukt, ki se iz vektorja pMDC32 prenese v rastlino (povzeto po Curtis in Grossniklaus, 2003).....	24
Slika 7: Mesta razreza rastlin z namenom pridobivanja nodijev	32
Slika 8: Načini razreza rastlin z namenom pridobivanja izsečkov internodijev in baz listnih ploskev	33
Slika 9: Razporeditev izsečkov na posamezna gojišča v petrijevkah.....	34
Slika 10: Potek transformacije.....	38
Slika 11: Prvi kalusi po 2-eh tednih rasti: a) Sante listi; b) Sante internodiji; c) Igor listi; d) Igor internodiji.....	39
Slika 12: Razvijanje kalusa (izraženo v odstotkih) pri sortah Sante in Igor po 2-eh tednih (levo) in po 6-ih tednih (desno)	40
Slika 13: Razvijanje kalusa (izraženo v odstotkih) na izsečkih listov (L.) in internodijev (I.) na gojiščih z različnimi koncentracijami ZR po 2-eh tednih (zgoraj) in po 6-ih tednih (spodaj)	41
Slika 14: Delež okužb in rjavenja kalusa glede na tip izsečka in sorto krompirja po 6-ih tednih rasti	42
Slika 15: Stopnja razvoja kalusa (izražena v odstotkih) glede na tip izsečka in sorto krompirja	43
Slika 16: Spremembe na izsečkih po 6 tednih rasti	44
Slika 17: Kontrole transformacije sorte Igor	46
Slika 18: Kalusi transformirane sorte Igor.....	47
Slika 19: Zametki poganjkov in razviti poganjki transformirane sorte Igor.....	47

Slika 20: Rast poganjkov v posodicah.....	48
Slika 21: Regeneracija transformiranih poganjkov iz internodijskih izsečkov	49
Slika 22: a) Namnoževanje rastlin krompirja sorte Igor po transformaciji na gojišča brez selekcije b) Transformirane rastline krompirja sorte Igor	50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
2,4 D	2,4 diklorofenolocetna kislina
BAP	6-benzilaminopurin (citokinin)
CAMV	virus mozaika cvetače
Cf	cefotaksim
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GA ₃	giberelinska kislina
GSO	gensko spremenjeni organizmi
Hg	higromicin
IAA	indol-3-ocetna kislina
IBA	indol-3-maslena kislina
K1 / K2 / K3	plošče s kontrolnimi gojišči
KIN	kinetin
LB	Lauria-Bertani gojišče
M	molarnost, mol/l
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MS	Murashige in Skoog gojišče
NAA	naftalenocetna kislina (avksin)
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
OR	osnovna raztopina za pripravo gojišča MS
PACM	osnovno gojišče MS z dodanimi avksini in citokinini
PCPI	krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor
PMI	fosfomanozna izomeraza
pMDC	komercialni plazmid družbe Cambia
PVY	krompirjev virus
R3B	osnovno gojišče MS z dodanimi avksini in citokinini
Rf	rifampicin
RNA	ribonukleinska kislina
RRR	rastlinski rastni regulator
<i>S. t.</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
T-DNA	transferna DNA
Ti-plazmid	tumor inducirajoči plazmid
<i>Vir</i> geni	geni za virulenco
YEB	gojišče za rast bakterij (ang. yeast extract and beef)
Z1 / Z2 / Z3 / Z4	gojišča z 2,85 / 5,69 / 8,54 / 11,38 μM zeatin ribozidom
ZR	zeatin ribozid

1 UVOD

Tehnike genskega inženiringa zahtevajo visoko frekvenco regeneracije rastlin. Zato raziskave kot so testiranje sposobnosti regeneracije tkiv izsečkov iz različnih delov rastline, ugotavljanje glavnih dejavnikov, ki vplivajo na viabilnost izsečkov in na potek organogeneze in embriogeneze ter optimizacija protokolov regeneracije spadajo med pomembnejše aktivnosti na področju rastlinske biotehnologije (Popescu in sod., 2010).

Krompir (*Solanum tuberosum*) je zaradi produktivnosti in vsebnosti škroba, vitaminov in proteinov pomembna kmetijska rastlina, ki jo gojimo na različnih koncih sveta. Napredek v rastlinski biotehnologiji je omogočil izboljšanje številnih sort krompirja, kar je posebej pomembno pri sortah, katerih tradicionalne metode vzgoje niso učinkovite (Hussain in sod., 2005).

Izdelanih je bilo že nekaj protokolov za regeneracijo krompirja različnih sort. Uspešnost regeneracije pri teh protokolih se je razlikovala glede na krompirjev genotip, začetni izseček, specifične koncentracije in kombinacije rastnih regulatorjev v gojiščih, sezonske razmere, časovno obdobje izpostavitve določenim koncentracijam in kombinacijam rastnih regulatorjev v gojiščih,... Zaradi navedenih razlogov je potrebno pri vsaki sorti pred transformacijo najprej določiti značilnosti in pogoje regeneracije (Hussain in sod., 2005).

Napredek genskega inženiringa rastlin je v zadnjem času velik in raziskovalci razvijajo nove metode za prenos DNA. Kot orodje za vnos tujih genov v rastline se najpogosteje uporablja bakterija *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*), ki ima naravno sposobnost transformacije rastlin (Tavazza in sod., 1988). Metoda vnosa DNA v rastlinski genom s pomočjo *A. t.* je bila uspešno uporabljena pri transformaciji krompirja, čeprav avtorji navajajo razlike v učinkovitosti protokolov pri različnih sortah krompirja. Regeneracija brez transformacije ima tako kot transformacija brez regeneracije zelo omejeno uporabnost, zato je potrebno najti primerno metodo za učinkovit in uspešen rezultat obeh postopkov.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil:

- Proučiti učinkovitost *in vitro* regeneracije krompirja (*Solanum tuberosum*) sort Sante in Igor. Želeli smo ugotoviti morfološki potencial izsečkov in vpliv sestave gojišča na *in vitro* regeneracijo pri dveh različnih tipih izsečkov in dveh genotipih.
- Transformirati krompir in pridobiti čim več transgenih linij krompirja sorte Igor s konstruktom za povečano ekspresijo krompirjevega cisteinskega proteinaznega inhibitorja (PCPI).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bomo optimizirali postopek regeneracije krompirja sort Igor in Sante. Predvidevamo, da so plazmidi pMDC ustrezni za vnos v bakterije *Agrobacterium tumefaciens* in za izražanje gena v transformiranih rastlinah. Pričakujemo, da se bo z uporabljenimi metodami transformacije genski konstrukt vgradil v genom poganjkov in bomo pridobili rastline za nadaljnje analize.

2 PREGLED OBJAV

2.1 REGENERACIJA RASTLIN

Regeneracija rastlin in tkivne kulture sta pomembni komponenti biotehnologije in bistveni pri genski manipulaciji rastlin. Visoka frekvenca regeneriranih rastlin iz *in vitro* tkivnih kultur je predpogoj za uspešno aplikacijo tkivne kulture in za genske inženirske tehnologije z namenom izboljšave pridelkov. Narejenih je bilo že veliko poizkusov za doseganje čim večje uspešnosti rastlinske regeneracije iz kalusa (neorganiziranega skupka celic) krompirja pri različnih sortah (Jasmin in sod., 2003).

Rastline kažejo izredno zmožnost spreminjanja v smislu rasti in razvoja zaradi sposobnosti spreminjanja in prilagajanja (plastičnosti) ter totipotentnosti njihovih celic. Tkivne kulture in regeneracija dajejo najboljši dokaz za totipotentnost, saj pri diferenciaciji ne pride do izgube genskega potenciala. Pri regeneraciji rastlin izkoriščamo sposobnost takšnega razvoja (Tyagi in Yadav, 2006).

2.1.1 Plastičnost in totipotentnost

Rastline so zaradi pritrjenosti in dolgega življenja razvile številne sposobnosti, ki jim omogočajo preživetje. Številni procesi, vključeni v rast in razvoj rastlin, so prilagoditve na okoljske razmere. Plastičnost omogoča rastlinam prilagajanje metabolizma, rasti in razvoja, da kar najboljše ustrezajo razmeram v okolju. Posebej pomemben vidik te adaptacije, ki je pomemben za rastlinske tkivne kulture in regeneracijo, je sposobnost iniciacije delitve celic iz praktično kateregakoli tkiva rastline in regeneracija izgubljenega organa ali razvoj v različnih smereh glede na določen stimul (Slater in sod., 2008). Do regeneracije in indukcije celične delitve, ki vodi v nastanek kalusa lahko pride pri praktično vseh rastlinskih tkivih. Rastline ali rastlinska tkiva, ki jih gojimo *in vitro*, običajno kažejo visoko stopnjo plastičnosti, kar omogoča iniciacijo razvoja določenega tipa tkiva ali organa iz drugega tipa. Gre za fiziološko, morfološko in regenerativno plastičnost (Tyagi in Yadav, 2006).

Regeneracija celotne rastline je odvisna od koncepta, da lahko vse rastlinske celice pod primernimi pogoji izrazijo celoten genski potencial starševske rastline. Ohranitev genskega potenciala imenujemo totipotentnost (Slater in sod., 2008). Na podlagi svoje enovite genske informacije se lahko vsaka celica razvije v popolno rastlino (Ravnikar, 1996).

2.1.2 Somatska embriogeneza in organogeneza

V širšem smislu se pri rastlinskih transformacijah večinoma uporabljata dve metodi rastlinske regeneracije: somatska embriogeneza in organogeneza (Slater in sod., 2008).

Somatska embriogeneza je razvoj embriju podobnih struktur iz somatičnih celic, katere se lahko v primernih razmerah razvijejo naprej na podoben način kot to poteka pri zigotičnem embriju. Nastanek somatskega embrija lahko poteka neposredno ali posredno. Pri neposrednem načinu nastane somatski embrij iz posamezne celice ali skupine celic brez stopnje nastanka kalusa. Pogostejša posredna somatska embriogeneza vključuje tudi tvorbo kalusa. Embriji nastanejo pod vplivom indukcije kalusa ali iz celične suspenzije pridobljene iz kalusa. Na ta način lahko nastane veliko število somatskih embrijev, zato gre za perspektivno metodo regeneracije rastlin v prihodnosti (Tyagi in Yadav, 2006).

Organogeneza temelji na tvorbi organov bodisi neposredno iz izsečka ali iz kalusne kulture (Slater in sod., 2008). Gre za proces, pri katerem pride do sprememb celic in tkiv, ki vodijo v nastanek unipolarne strukture, imenovane zasnova poganjka ali korenine, ki je pogosto s prevodnimi elementi povezana z matičnim tkivom (Thorpe, 1994).

Poznamo tri metode organogeneze s katerimi lahko dosežemo rastlinsko regeneracijo:

- a) preko nadomestnih organov iz kalusa (neorganiziranega skupka celic) nastalega na izsečku
- b) s tvorbo nadomestnih organov neposredno iz izsečkov
- c) z nastankom rastlin preko tvorbe in rasti aksilarnih (zalistnih) brstov

Običajno je organogeneza v celičnih kulturah kontrolirana predvsem z ustreznimi koncentracijami različnih rastnih regulatorjev, ki so prisotni v gojišču (Tyagi in Yadav, 2006).

2.2 ŽLAHTNJENJE RASTLIN

Človek je že od nekdaj odvisen od rastlin. Izbiral je najboljše primerke uporabnih rastlin in jih poskušal spremeniti, da bi kar najbolj ustrezale njegovim potrebam. V zadnjem času je napredek genetike in zmožnost modificiranja genskega materiala rastlin omogočil spreminjanje na bistveno hitrejši način kot pri konvencionalnem žlahtnjenju rastlin. V svetu, katerega populacija naj bi se podvojila v naslednjih šestdesetih letih, so hitre spremembe, ki omogočajo prilagajanje rastlin izrednega pomena. Da bi bile te spremembe učinkovite, moramo delati z rastlinami na celičnem nivoju, zato je bistveno razumevanje namena in tehnik rastlinskih tkivnih kultur (Tyagi in Yadav, 2006).

2.3 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE

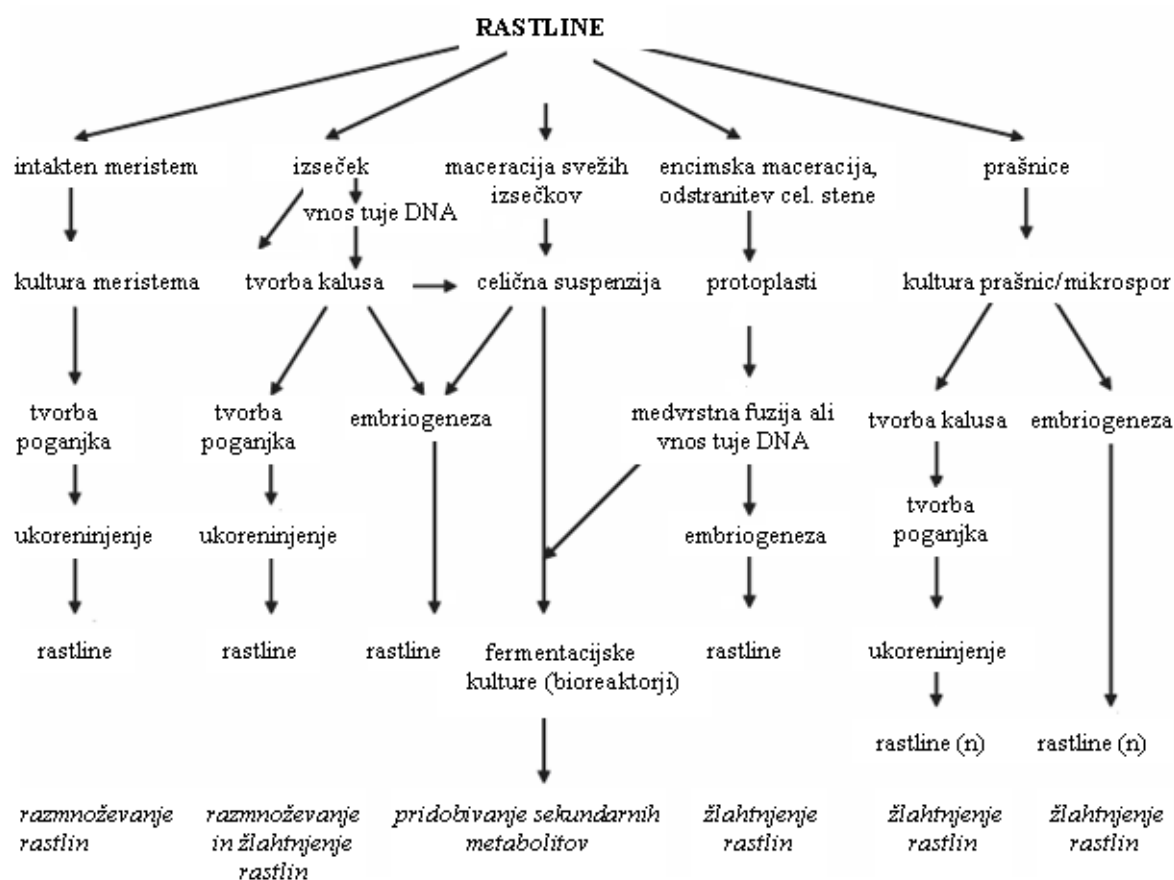
Rastlinske tkivne kulture se že več kot pol stoletja uporabljajo pri metodah fiziologije in biokemije, s katerimi si prizadevamo za razširitev znanja celične biologije (Constabel in Shyluk, 1994). Rastlinska tkivna kultura je izraz, s katerim opisujemo način gojenja rastlin, organov, tkiv ali posameznih celic na sterilnih gojiščih v posebnih laboratorijskih pogojih (Ravnikar, 1996). Metode rastlinskih tkivnih kultur so dopolnile konvencionalnim metodam žlahtnjenja in uporabne pri večini rastlinskih vrst (Nassar, 2009).

2.3.1 Uporabnost rastlinskih tkivnih kultur

Tehnologija tkivnih kultur ima široko uporabnost (slika 1) in posledično veliko prihodnost, saj je vključena v veliko raziskav. Nekaj glavnih možnosti uporabe rastlinskih tkivnih kultur (Ravnikar, 1996; Tyagi in Yadav, 2006; Loyola-Vargas in sod., 2008):

- pridobivanje transgenih rastlin: lastnosti, kot so odpornost na insekticide, sušo, patogene,... ki se jih ne da pridobiti s konvencionalnimi metodami žlahtnjenja se lahko prenesejo iz ene rastlinske vrste na drugo preko ustreznega vektorja (npr. preko bakterije *Agrobacterium* spp.) ali z biolistično metodo obstreljevanja z na delce težkih kovin nanešeno DNA; celice, ki vsebujejo svojo in novo vneseno DNA, so transformirane in lahko omogočijo nastanek transformirane rastline
- temeljne biološke študije: študije fizioloških, biokemijskih in molekularnih procesov v celici, kot so študije celičnih delitev, študije vloge genov,...
- biokemijska vrednost: proizvodnja naravnih rastlinskih metabolitov, ki so uporabni v farmacevtski in kozmetični industriji; tkivne kulture so zanimive zaradi visokega donosa z nizkimi stroški in konstantne produkcije, neodvisno od sezone zaradi kontroliranih dejavnikov okolja
- hitro razmnoževanje z mikropropagacijo: področje največjega ekonomskega učinka, čeprav je večinoma dražje od standardnih metod, zato se uporablja, kadar je klasično razmnoževanje težavno ali kadar je pomembna večja hitrost razmnoževanja
- reševanje embrijev: embriji križancev pogosto zakrniijo zaradi nekompatibilnosti endosperma z embrijem; embrij lahko izrežemo in prestavimo na ustrezno umetno gojišče, kjer se embrij lahko razvije in regenerira rastlino
- haploidi: vzgoja haploidnih rastlin z vzgojo prašnic ali pa pelod izločimo v kulturo, možno je tudi pridobivanje iz semenskih zasnov, pestičev ali celih cvetov; glavni pomen indukcije haploidnih rastlin je v hitri pridobitvi homozigotnih linij
- pridobivanje rastlin z novimi lastnostmi (npr. različne barve cvetov); uporaba kemikalij ali sevanja lahko poveča število mutacij, ki povzročajo različne variante lastnosti rastlin
- fuzija protoplastov: nastanek somatskih križancev, takšne fuzije so rezultat združitve dveh ali več protoplastov iste ali različnih starševskih rastlin; tako lahko nastane rastlina,

- ki združuje želene lastnosti dveh ali več starševskih rastlin; ne glede na način nastanka je potrebno takšne celice razmnožiti in regenerirati s tehnikami celične kulture
- shranjevanje dednine: številni pomembni pridelki izhajajo iz delov sveta, kjer vladajo ostri okoljski pritiski, zato zaradi izgube habitata vsako leto izumre vse več rastlinskih vrst, številne rastline še vedno ostajajo neraziskane, zato je zaželen ohranitev čim večjega števila primerkov; ker pogosto to v njihovem naravnem okolju ni možno, so *in vitro* kulture alternativni način ohranitve (Ravnikar, 1996; Tyagi in Yadav, 2006; Loyola-Vargas in sod., 2008).



Slika 1: Shematski prikaz glavnih področij in nekaterih aplikacij celičnih in tkivnih kultur (prirejeno po Neumann, 2009:2)

2.3.2 Izseček

Tkivne kulture nastanejo iz delčka rastline. Majhne organe ali dele tkiv, ki se pri tem uporabljajo, imenujemo izsečki. Izbor matične rastline, iz katere pridobimo izsečke, je

odvisen od vrste in namena kulture in rastlinske vrste, ki jo uporabljamo. Izbira pravega tipa izsečka ima lahko pomemben vpliv na uspeh tkivne kulture (George, 2008).

2.3.3 Sterilnost

Rastline so v naravnem okolju nenehno okužene z mikroorganizmi in žuželkami. Te okužbe so večinoma omejene na zunanjo površino, čeprav lahko nekateri mikrobi in virusi prodrejo tudi v tkiva. Ker rastlinske tkivne kulture nastanejo iz majhnega izsečka in rastejo na gojišču, ki je hranilno ugoden tudi za rast mikroorganizmov, moramo ves čas zagotavljati sterilne pogoje. Posebno bakterije in glive v *in vitro* pogojih tekmujejo z rastjo rastlinskega materiala, zato je potrebno onemogočiti okužbo že od prvega vnosa na gojišče dalje. Običajno to pomeni rast matične rastline v pogojih, ki minimizirajo infekcijo, obdelavo rastlinskega materiala z dezinfekcijskimi sredstvi in sterilizacijo orodja, posode in gojišč (George, 2008). Prav tako je potrebno zagotoviti aseptične pogoje dela, kar najlažje dosežemo v brezprašni komori, laminariju (Ravnikar, 1996).

2.4 GOJIŠČE ZA RASTLINSKE TKIVNE KULTURE

Gojišče za rastlinske tkivne kulture je umetno hranilno dopolnilo iz organskih in anorganskih hranil, ki jih uporabimo za kultiviranje rastlinskih tkiv. Poznavanje hranilnih zahtev in presnovnih potreb rastlinskega materiala je ključnega pomena za uspešnost tkivne kulture. Za optimalno rast tkiv v *in vitro* pogojih obstaja širok spekter prehrabnih zahtev, ki vrstno variirajo, zato je pogosto potrebno prilagajati gojišča določenemu tkivu (Sathyanarayana in Varghese, 2007). Prilagoditev gojišča je odvisna predvsem od vrste in namena kulture ter od rastlinske vrste. Včasih je pomembnejša produkcija kulture, velikokrat pa visoka stopnja rasti (Stepan-Sarkissian, 1990).

Murashige in Skoog (MS) gojišče je klasično osnovno gojišče, katerega uporaba je razširjena po vsem svetu tako v univerzitetnih laboratorijih kot v komercialnih ustanovah. Gojišče je bilo prvotno zasnovano za tkivno kulturo tobaka, a se je izkazalo kot primerno pri večini rastlinskih vrst. Poleg MS-gojišča je pri rastlinski regeneraciji v uporabi tudi Linsmaier in Skoog (LS) gojišče. Običajno preprosto gojišče vsebuje zgolj anorganske soli in uporabne sladkorje, večinoma pa je potrebno gojišču dodati še vitamine, aminokislino in rastne regulatorje v različnih kvalitativnih in kvantitativnih kombinacijah (Sathyanarayana in Varghese, 2007).

Pri pripravi gojišča si pomagamo z literaturo in že objavljenimi navodili za določeno rastlinsko tkivno kulturo. Če ti podatki ne zadostijo našim potrebam, oziroma je dostopnost določenih virov omejena, poskušamo najprej uporabiti že preverjene tipe gojišč, poleg tega

pa je priporočljivo eksperimentirati z različnimi kombinacijami avksinov in citokininov (Stepan-Sarkissian, 1990).

2.4.1 Trdna in tekoča gojišča

Rastlinski material lahko gojimo v tekočem ali na trdnem gojišču, kar je predvsem odvisno od tipa kulture in njenega namena.

Trdno gojišče se uporablja pri delu z izsečki, pri kalusnih kulturah, kulturah rastlinskih organov in pri dolgotrajnem vzdrževanju kulture. Najpogosteje se kot sredstvo za strjevanje, zaradi številnih prednosti uporabljata agar ali agaroz. Tekoča gojišča se najpogosteje uporabljajo pri suspenzijskih kulturah. Prednost teh gojišč je mešanje, ki zagotavlja prezračevanje, enakomerno razporeditev hranil in redčenje toksičnih izločkov (Sathyanarayana in Varghese, 2007).

2.4.2 Sestava gojišč

Glavne sestavine večine gojišč rastlinskih tkivnih kultur so anorganska hranila (makro- in mikroelementi), organski dodatki, rastni regulatorji, vir ogljika in sredstvo za strjevanje pri pripravi trdnih gojišč.

2.4.2.1 Anorganska hranila

Makroelementi so minerali, prisotni v koncentracijah večjih od 0,5 mmol/l, mikroelementi pa v koncentracijah manjših od 0,05 mmol/l (Jha in Ghosh, 2005).

Šest glavnih makroelementov predstavljajo dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij in žveplo. Vsi ti elementi so nujni za celično in tkivno rast (Sathyanarayana in Varghese, 2007). Večinoma makroelementi oskrbijo rastlinsko celico tako z anioni kot kationi. Ti elementi imajo tako strukturno kot tudi funkcionalno vlogo v sintezi beljakovin (predvsem N in S). Bodisi nitrat bodisi amoniak uporabljamo kot glavno komponento vseh gojišč rastlinskih tkivnih kultur. Sodelujejo pri sintezi kompleksnih organskih molekul. Kalij je pomemben za vzdrževanje ionskega ravnovesja v celici. Kalcij deluje z različnimi encimi kot kofaktor in se pogosto veže na celično steno in membrano. Fosfor je zelo pomemben pri energijskem metabolizmu celice. Magnezijevi ioni so zelo mobilni in bistveni v številnih encimskih reakcijah ter nujni pri fotosintetskih reakcijah (Jha in Ghosh, 2005).

Glavni mikroelementi, ki so prisotni v gojišču v manjših količinah, a nujni za celično in tkivno rast so železo, mangan, cink, bor, baker in molibden. Železo sodeluje pri sintezi klorofila, pri fotosintezi in respiraciji, mangan je pomemben v zgradbi klorofila, cink je pomemben za nastanek klorofila, bor je ključen pri transportu sladkorjev, vode in rastlinskih rastnih regulatorjev (RRR), baker sodeluje v energijskih pretvorbah in sintezi

klorofila, molibden pa je na primer pomemben pri sintezi beljakovin (Sathyanarayana in Varghese, 2007).

2.4.2.2 Organski dodatki

Rast in morfogenezu rastlinskih tkivnih kultur lahko izboljšamo z dodajanjem manjših količin organskih dodatkov. Količina, potrebna za določeno kulturo, variira glede na vrsto in genotip in je najverjetneje posledica sintetične kapacitete izsečka (Thorpe in sod., 2008).

Vitamini

Rastline sintetizirajo vitamine, ki jih uporabijo pri kataliziranju različnih metabolnih procesov. V gojišču lahko pride do njihovega pomanjkanja, zato je potrebno dodati določeno količino vitaminov, ki izboljšajo rast in preživetje tkiv. Večini gojišč dodajajo tiamin (vitamin B₁), pogosta pa sta tudi niacin (vitamin B₃), piridoksin (vitamin B₆) in mio-inozitol (član vitaminskega kompleksa B) (Thorpe in sod., 2008). Tiamin je vključen v biosintezo aminokislin in je pomemben kofaktor v metabolizmu ogljikovih hidratov. V rastlinah naj bi inozitol kot inozitol fosfat deloval v vlogi sekundarnega obveščevalca primarnega delovanja avksinov. Najverjetneje mio-inozitol sodeluje pri skladiščenju indol-3-octne kisline (IAA), tvorbi pektina in hemiceluloz, ki so potrebne za sintezo celične stene ter pri privzemu in rabi ionov (Bhojwani in Razdan, 1996).

Aminokislina

Tkiva v kulturi so normalno sposobna sinteze aminokislin, potrebnih pri različnih metabolnih procesih. Dodane aminokislina lahko omogočijo stimulacijo celične rasti ali so vir dušika v primeru odsotnosti njegovega anorganskega vira (Bhojwani in Razdan, 1996).

Drugi organski dodatki

V kulturo lahko dodajamo tudi različne druge organske ekstrakte. To so številne hranilne mešanice nedefinirane sestave kot so kazein hidrolizat, kokosovo mleko, kvasni ekstrakt, in paradižnikov sok, ki jih uporabljamo za vzpodbujanje rasti kalusa in organov. Če je možno, se je tem sestavinam priporočljivo izogniti, saj lahko vplivajo na ponovljivost rezultatov zaradi kvalitete in kvantitete sestavin, ki se pogosto spreminjajo s starostjo tkiva in raznolikostjo donorskega organizma. (Bhojwani in Razdan, 1996).

2.4.2.3 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati so v tkivnih kulturah pomemben vir energije in ogljika ter regulatorji osmotskega pritiska. Izredno malo rastlinskih celičnih linij gojenih *in vitro* je avtotrofnih (Thorpe in sod., 2008). Prvotno zelena tkiva v kulturi postopoma izgubijo zelena barvila in so zato odvisna od zunanjega vira ogljika (Bhojwani in Razdan, 1996). Za normalno

kulturo celic, tkiv ali organov je nujna prisotnost vira ogljika v gojišču. Najpogosteje se uporablja saharoza (2-4 %), ker je fruktoza manj učinkovita, manoza in laktoza sta manj primerni, glukoza pa je večinoma enakovredna ali celo učinkovitejša od saharoze, a dražja in zato redkeje uporabljena (Thorpe in sod., 2008).

2.4.2.4 Rastlinski rastni regulatorji (RRR)

RRR imajo v gojišču, namenjenemu regeneraciji, pogosto odločilno vlogo. Učinek je odvisen od sposobnosti privzema, stabilnosti gojišča in občutljivosti določenega tkiva. Lahko so naravnega ali umetnega izvora, a so slednji v večini primerov učinkovitejši od naravnih (Jha in Ghosh, 2005; Sathyanarayana in Varghese, 2007). Veliko je sintetičnih substanc, ki regulirajo rast in se med seboj razlikujejo po delovanju in vrstni specifičnosti. Pri razvijanju ali izboljševanju protokolov tkivnih kultur preizkušamo različne tipe, koncentracije in kombinacije RRR (Bhojwani in Razdan, 1996).

Dodajanje avksinov, citokininov, giberelinov in abscizinske kisline pospeši rast celic in tkiv. Prav vrsta uporabljenega RRR določa odziv, ki ga želimo doseči z uporabo tkivne kulture. RRR igrajo ključno vlogo pri fenotipu rastline. Delujejo kot povezovalci med okoljem in genom. Določen odziv tkivne kulture je najverjetneje v večji meri odvisen od razmerja med RRR kot od prisotnosti oziroma odsotnosti enega izmed RRR. Tako indukcija kalusa kot regeneracija iz rastlinskih izsečkov zahtevata primerne kombinacije in koncentracije RRR v gojišču (Jha in Ghosh, 2005; Sathyanarayana in Varghese, 2007).

RRR delujejo vzajemno bodisi sinergistično ali antagonistično. Vsak RRR lahko endogeno vpliva na biosintezo ali metabolizem drugega regulatorja. Prav tako lahko okoljski dejavniki, kot so svetloba, vodni status ali patogeni, spremenijo vpliv posameznega RRR. RRR in okoljske dejavnike namreč povezujejo signalne transdukcijske poti, ki oblikujejo odziv (Van Staden in sod., 2008).

Poleg glavnih štirih omenjenih skupin RRR v okviru regulatorjev preučujejo tudi druge spojine kot so poliamini, jasmonati, brasinosteroidi in salicilna kislina (Jha in Ghosh, 2005; Sathyanarayana in Varghese, 2007).

Avksini

Avksini sodelujejo pri celični delitvi, celičnemu podaljševanju, celični diferenciaciji, organogenezi in embriogenezi. Kemijsko je avksin IAA, ki se sintetizira iz triptofana. Primarno mesto nastanka avksina je apikalni meristem poganjka, čeprav običajno sodeluje pri rasti in iniciaciji nastanka korenin. Avksini se pomikajo navzdol po rastlini z aktivnim polarnim transportom s pomočjo protonskih črpalk. Ker inicirajo celično delitev, so vključeni v oblikovanje meristemov, ki omogočajo nastanek bodisi kalusa bodisi

diferenciranih organov. V tkivnih kulturah so avksini najpogosteje vključeni v procese celične delitve in diferenciacije korenin. V naravi pa regulatorji te skupine sodelujejo v procesih tropizma, apikalne dominancje, abscizije, ukoreninjenja in podaljševanja stebela (Jha in Ghosh, 2005; Sathyanarayana in Varghese, 2007; Machakova in sod., 2008).

Fiziološko najpomembnejši in najbolj razširjen naravni avksin je IAA, vendar je njegova uporaba v rastlinskih tkivnih gojiščih precej omejena zaradi svetlobne in toplotne občutljivosti. Za pripravo gojišč so najbolj uporabni avksini indol-3-maslena kislina (IBA), naftalenocetna kislina (NAA) in 2,4-diklorofenoksiocetna kislina (2,4-D). Od teh se IBA in NAA najpogosteje uporabljata za ukoreninjenje in v interakciji z citokinini za proliferacijo poganjkov. 2,4-D in 2,4,5-triklorofenocetna kislina (2,4,5-T) sta precej učinkovita pri indukciji in rasti kalusa. 2,4-D je pomembna tudi pri indukciji somatske embriogeneze. Avksini so običajno topni v etanolu ali razredčeni raztopini NaOH. (Bhojwani in Razdan, 1996; Sathyanarayana in Varghese, 2007; Slater in sod., 2008).

Na to, kateri avksin in kakšno koncentracijo le-tega bomo izbrali, vplivajo: želen tip rasti in razvoja, sposobnost privzema in transporta do tarčnih tkiv, inaktivacija (oksidacija in/ali konjugacija) avksina v gojišču in izsečku, občutljivost rastlinskega tkiva na avksin in interakcija med dodanimi avksini in naravnimi endogenimi substancami (Machakova in sod., 2008).

Citokinini

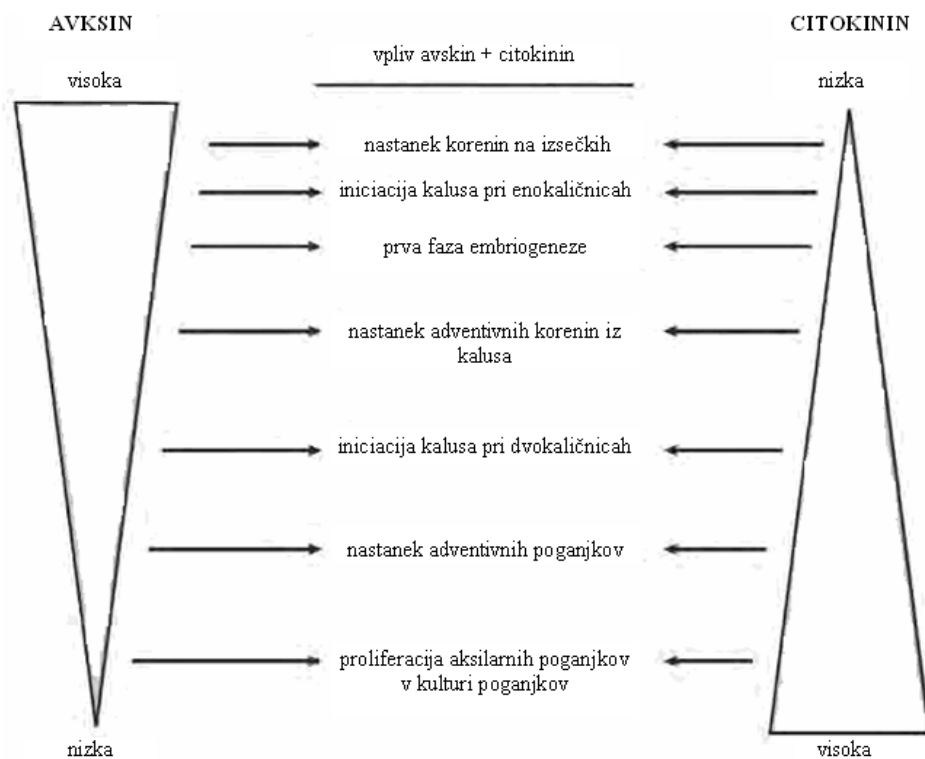
Citokinini so skupina toplotno stabilnih derivatov fenil-uree. Biosinteza citokininov poteka predvsem v koreninah, deloma pa tudi v drugih aktivno rastočih tkivih. Do drugih regij se običajno transportirajo preko ksilema. Gre za najbolj kompleksno skupino RRR. Mednje sodijo benzilaminopurin (BAP) ali 6-benziladenin (BA), 6- β - β -dimetilaminopurin (2-ip), N-(2-furfurilamino)-1-purin-6-amin (kinetin) in 6-(4-hidroksi-3-metil-trans-2butilaminopurin) (zeatin) (Sathyanarayana in Varghese, 2007; Van Staden in sod., 2008).

Citokinini spodbujajo celično delitev (pogosto skupaj z avksini), proliferacijo poganjkov in vplivajo na celični cikel. Prav tako spodbujajo tvorbo adventivnih poganjkov, embriogenezo, običajno zavirajo nastanek korenin, zavirajo senescenco in apikalno dominanco. V gojišče tkivne kulture jih večinoma dodajamo zaradi stimuliranja celične delitve in diferenciacije adventivnih poganjkov iz kalusov. Vsi so razmeroma učinkoviti, najbolj aktiven pa naj bi bil kemično stabilen sintetičen 2-ip. Citokinini so večinoma topni v raztopini HCl ali NaOH (Bhojwani in Razdan, 1996; Jha in Ghosh, 2005; Sathyanarayana in Varghese, 2007).

Z uporabo zeatina pri internodijskih izsečkih so dosegli večji delež regeneracije kot pri uporabi BAP. Zeatin ribozid (ZR) je pomemben in dobro poznan RRR, ki se uporablja za neposredno indukcijo poganjkov (Molla in sod., 2011). Zeatin ribozid v gojišču reducira fazo kalusa in pospešuje tvorbo transgenih popkov. Posledično se s tem zmanjša problem somaklonalne variacije (Beaujean in sod., 1998).

Avksin-citokinin

Skoog in Miller (1957) sta ugotovila, da lahko spodbudimo rast poganjkov iz kalusa tobaka z uporabo relativno nizkih količin avksina in visokih citokinina v gojišču. Od tega odkritja dalje je prišlo do številnih spoznanj, povezanih s pomenom razmerja teh dveh regulatorjev za celično rast, diferenciacijo in organogenezo. Proliferacija kalusa iz tkiv večine dvokaličnic je večinoma posledica prisotnosti tako avksina kot citokinina v gojišču. Učinkovita organogeneza pa je odvisna od primernega ravnovesja med njima (slika 2). Razmerja med avksinom in citokininom, ki so običajna pri iniciaciji rasti in diferenciacije v tkivnih kulturah, prikazuje slika 2, čeprav relativna razmerja obeh RRR niso vedno takšna. Za opisane učinke obeh RRR pa ni nujno, da avksin in citokinin uporabimo v gojišču istočasno. Pogosto lahko uporabimo najprej gojišče z enim in nato izvedemo prenos na gojišče z drugim RRR. Avksin namreč lahko zavira akumulacijo citokinina in citokinini lahko zavirajo določene učinke avksina (Van Staden in sod., 2008).



Slika 2: Relativne koncentracije avksina in citokinina, značilne za rast in morfogenezo (Van Staden in sod., 2008: 220)

Oba RRR sodelujeta pri celičnem ciklu, čeprav avksin vpliva na podvojevanje DNA, citokinin pa ima večji vpliv na dogodke, ki vodijo v mitozo. Avksinom lahko zato rečemo induktorji celičnega cikla, citokininom pa promotorji le-tega. Sinhronizacija dogodkov med fazo S in celično delitvijo kaže na to da mora biti razmerje obeh RRR natančno kontrolirano (Van Staden in sod., 2008).

Giberelini

Giberelini nastajajo v koreninah in mladih listih. Od več kot sto poznanih giberelinov je giberelinska kislina (GA_1) najbolj aktivna pri celičnem podaljševanju. Eden redkih komercialno dostopnih giberelinov in hkrati najpogosteje uporabljen giberelin v tkivnih kulturah je GA_3 , ki spodbuja podaljševanje pritlikavih in zakrnelih rastlin. Poleg rasti v višino zaradi raztezanja celic imajo giberelini vlogo tudi pri mobilizaciji endosperma, kalitvi semen, določanju spola, razvoju plodov in prehodu iz juvenilne v odraslo fazo (Moshkov in sod., 2008).

V tkivnih kulturah giberelini pospešujejo tudi tvorbo gomoljev in brstov ter zrelost embrijev. Na drugi strani pa lahko zavirajo rast kalusa in indukcijo korenin in poganjkov. GA_3 je topna v destilirani vodi in ni temperaturno stabilen (Jha in Ghosh, 2005).

Abscizinska kislina

Abscizinska kislina (ABA) ima vlogo pri regulaciji zapiranja listnih rež, kontroli koreninskega črpanja vode in ionov ter absciziji in senescenci listov. V tkivnih kulturah včasih pospešuje morfogenezo in rast, običajno pa zavira rast kalusa in poganjkov. Je temperaturno stabilna in svetlobno občutljiva (Moshkov in sod., 2008).

2.4.2.5 Antibiotiki

Antibiotike lahko uporabljamo pri omejevanju okužb izsečkov. Večkrat pa antibiotike kot so cefotaksim, neomicin, higromicin, kanamicin, vankomicin in druge dodajamo v selekcijska gojišča. Pod ustreznimi pogoji selekcije na takšnih gojiščih zrastejo in tvorijo kalus transformirane celice, ki so odporne na antibiotik (Bhojwani in Razdan, 1996).

Cefotaksim je cefalosporinski antibiotik s širokim spektrom delovanja, predvsem proti po Gramu negativnim bakterijam. Zavira sintezo bakterijske stene in je baktericiden za bakterije v rastni fazi. Higromicin je aminoglikozidni antibiotik, ki zavira sintezo proteinov. Pogosto ubije občutljive celice hitreje kot kanamicin (Bashir, 2004).

2.4.2.6 Sredstva za strjevanje

Agar pridobivajo z ekstrakcijo nekaterih rdečih morskih alg. Strukturno je agar polisaharid iz dveh komponent: agaroze in agaropektina, ki tvorita gel z visoko vsebnostjo vode. Agar se pogosto uporablja v tkivnih kulturah, ker tvori gel, ki se topi pri 100 °C in strdi pri

45 °C, rastlinski encimi ga ne razgrajujejo in njegove sestavine ne reagirajo z sestavinami gojišča. Agaroz je agar brez agaropektina in sulfatnih skupin. Prav zaradi postopka čiščenja je agaroz dražja, tvori močnejši gel in je posebej primerna, ko se želimo znebiti nečistoč (Sathyanarayana in Varghese, 2007).

2.4.2.7 Zunanji dejavniki

V tkivni kulturi je potrebno natančno kontrolirati zunanje dejavnike, saj na rast in razvoj rastlin pomembno vplivajo tudi svetloba, njena intenziteta, sestava in dolžina dnevnega osvetljevanja, temperatura in vlaga. Te dejavnike kontroliramo z gojenjem rastlin v rastnih komorah (Ravnikar, 1996).

2.5 VNOS GENOV V RASTLINE (TRANSFORMACIJA)

Z genskim inženiringom želimo locirati in izolirati tarčni gen z zaželenimi lastnostmi. Nato ga moramo za delovanje v rastlinah ustrezno opremiti ter vnesti v tiste rastlinske celice, iz katerih se organizem regenerira (Bohanec, 2004).

Vnos genov v rastline lahko poteka na več načinov. Gene lahko prenesemo tako, da jih vključimo v vektor ali prenašalec. Kot prenašalec se najpogosteje uporablja bakterija *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*). Virusi pa delujejo kot naravni transformacijski prenašalci, ki vključijo, podvojijo in izrazijo svoj genom v gostiteljski celici. Poleg posrednega načina s prenašalci, lahko neposredno vnašamo v rastlinske celice tudi golo molekulo DNA. Tak vnos lahko poteka preko protoplastov s pomočjo kemičnih agensov, z elektroporacijo ali v praksi bolj uporabljeno obstreljevanje z delci težkih kovin – biolistika (Žel, 1996; Bohanec 2004).

Metode genske transformacije so pomemben del genskega spreminjanja rastlin, ki so rezultat uporabe novejšega molekularno biološkega znanja v žlahtnjenju rastlin (Javornik, 2004). Lastnosti gensko spremenjenih rastlin lahko pomenijo izboljšave v kmetijstvu in vrtnarstvu, izboljšave kakovosti rastlin (hranilne vrednosti, vsebnosti vitaminov in mineralov, zmanjšanje alergenov...) ali možnost proizvodnje npr. biofarmaceutikov (cepiva, protitelesa), biogoriv, biorazgradljivih materialov in številne druge možnosti (fitoremediacija, tobak brez nikotina,...). Na tržišču so danes najbolj uveljavljene transgene rastline odporne proti virusom, herbicidom, žuželkam ali kombinaciji obeh, v razvoju pa so rastline odporne na sušo ali slanost (Žel, 2007). Prednost teh transgenih rastlin pred klasično vzgojenimi je enak ali višji pridelek in predvsem manjši strošek za insekticide in herbicide ter posledično zmanjšanje poseganja v okolje (Javornik, 2004). Gensko spreminjanje rastlin omogoča tudi bazične raziskave, kot je določanje vloge posameznih genov v rastlinah. Prav transformacija rastlin nam omogoči funkcijsko analizo

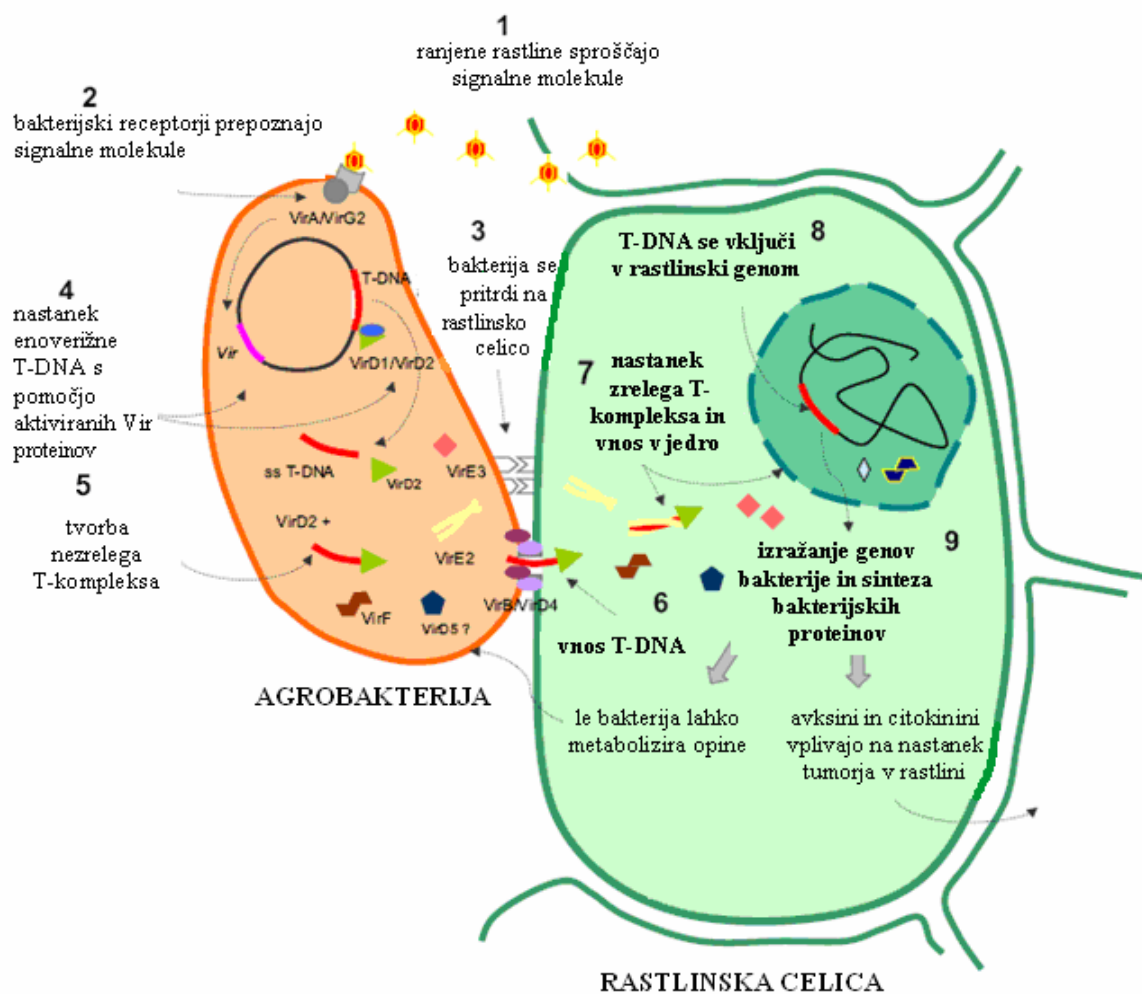
genov, s pomočjo katere odkrivamo kakšne lastnosti določajo in kakšna je njihova vloga v organizmu (Dobnik, 2009).

Agrobacterium tumefaciens

Pri prvih uspešnih poskusih produkcije transgenih rastlin so izkoristili naravni proces prenosa genov s talno bakterijo *A. t.*. Lastnost te bakterije je tvorba tumorjev pri rastlinah, posebej dvokaličnicah (Walden in Schell, 1990). *A. t.* ima najbolj širok spekter gostiteljev izmed vseh poznanih rastlinskih patogenih bakterij (Păcurar in sod., 2011). Bakterija nosi velik *Ti*-plazmid, ki je odgovoren za okužbo rastlin (Sharma in sod., 2005).

Prenos transferne DNA (T-DNA) v rastlinsko celico

Glavna razloga za patogenezo bakterije *A. t.* sta transformacija (prenos tumorogene T-DNA v genom rastline) in tumorogeneza (nastanek tumorja). Kompleksen in še do danes ne popolnoma pojasnjen proces transformacije lahko poenostavljeno razčlenimo na nekaj glavnih korakov (slika 3).



Slika 3: Model transformacije rastlinske celice z agrobakterijo (Păcurar in sod., 2011: 4)

Začetek okužbe povzročijo fenolne (acetosiringon) in sladkorne spojine, nastale ob poškodbi rastline. S pomočjo kemotaksije se bakterija približa rastlini, vstopi in kolonizira gostiteljske intercelularne prostore. Fenolne spojine so signal za kaskado dogodkov v bakteriji s posredovanjem virulentnih (*vir*) genov, ki se ne prenesejo v rastlino. *Vir*-regija vsebuje približno 35 virulentnih skupin genov na vsaj osmih operonih (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* in *virH*). Ta regija na *Ti*-plazmidu kodira proteine, ki zaznavajo in se odzivajo na induktorje, ki se sproščajo iz rastline, nadzirajo prenos T-DNA, sodelujejo pri metabolizmu opinov,... (Walden in Schell, 1990; Păcurar in sod., 2011).

Bakterija prepozna signalne molekule z dvokomponentnim transdukcijskim sistemom VirA/VirG. VirA se avtofosforilira in nato fosforilira VirG, kar vodi v aktivacijo ostalih *vir*-genov (Zupan in sod., 1995). S pomočjo aktivacije *vir*-genov nastanejo VirD1/VirD2 produkti, ki delujejo kot endonukleaze na robne sekvence T-DNA in specifično cepijo enojno verigo T-DNA. Po odcepitvi enojne T-DNA se znotraj mejnih sekvenc sintetizira nova veriga. Na 5'-konec odcepljene enojne T-DNA se kovalentno veže VirD2, da nastane tako imenovan nezrel T-kompleks. Kompleks VirD2/enovijačna T-DNA se nato prenese v rastlinsko citoplazmo preko sistema, ki ga tvorijo proteini VirB in VirD4. Zrel T-kompleks se najverjetneje tvori v rastlinski celici z združitvijo nezrelega kompleksa z VirE2. Tako VirD2 kot VirE2 proteina vodita zrel kompleks v jedro in domnevno ščitita enovijačno verigo pred razgradnjo. V jedru se spremljevalni proteini s proteolizo sprostijo, enovijačna T-DNA se prepíše v dvovijačno in integrira v rastlinski genom. Po uspešni integraciji se sintetizirajo bakterijski proteini (Păcurar in sod., 2011).

T-DNA je mobilni del *Ti*-plazmida. Tvorba tumorjev na mestih infekcije nastane zaradi sprostitve in integracije T-DNA v rastlinski genom. T-DNA vsebuje dva seta genov. Primarni geni (*iaaM*, *iaaH* in *ipt*) ter sekundarni onkogeni kodirajo encime, vključene v sintezo avksinov in citokininov ter modificirajo učinke RRR v celici. Njihova aktivnost vodi v nastanek tumorja. Drugi set genov sodeluje pri sintezi opinov, ki nastanejo s kondenzacijo aminokislin ali fosforilacijo sladkorjev. Opini sodelujejo pri spremembi rastlinskega metabolizma, kar povzroči nenormalno celično proliferacijo in sintezo hranil, ki jih *A. t.* uporablja kot vir ogljika in dušika. Noben od teh genov T-DNA pa ni vključen v njegov transport (Păcurar in sod., 2011).

Uporaba *A. t.* v biotehnoške namene temelji na funkciji in strukturi T-DNA (Păcurar in sod., 2011). Na osnovi opisanih dejstev so razvili uporabne vektorje za vnos v rastlinsko celico. V tem primeru odstranijo onkogene in jih zamenjajo z zelenimi geni. Takšni plazmidi so razoroženi in ne povzročajo tumorjev. Rastline, v katere jih vnašamo, se razvijejo v normalne rastline (Žel, 1996). Najlažje je poseči po že pripravljenih in komercialno dostopnih praznih plazmidnih vektorjih. Ti nosijo vse potrebne strukture, nam

ostane le, da svoj gen vstavimo v plazmid. Tako pripravljen vektor vnesemo v agrobakterijo (Dobnik, 2009).

Po končani transformaciji potrebujemo način, s katerim preverimo vključenost genov v genom. V ta namen poleg tarčnega gena vnašamo tudi selekcijski ali markerski gen. Selekcijski geni bakterijskih plazmidov so večinoma geni za odpornost na določen antibiotik (Bohanec, 2004). Rastline, ki so na ta antibiotik občutljive propadejo, če nimajo vnesenega tega gena (Žel, 1996). V novejšem času se kot selekcijski geni uporabljajo tudi fosfomanozno izomerazni geni (PMI), ki kodirajo fosfomanozne izomeraze. Z uporabo teh genov lahko selekcioniramo transgene rastline, ki normalno rastejo na gojišču, ki vsebuje manozo od netransformiranih, ki bodisi prenehajo rasti ali propadejo (Hansen in Wright, 1999, cit. po Hoa in Bong, 2002). Z markerskimi geni pa lahko preverimo tudi aktivnost gena v rastlini (Žel, 1996).

2.6 ANALIZA GENOV

Razvoj molekularne genetike omogoča analizo strukture, evolucije in funkcije tako celotnih rastlinskih genomov kot posameznih genov. Primerjalne analize dajejo nov vpogled v evolucijo genoma rastlin. Vzporedne analize mRNA, proteinov in drugih metabolitov, prisotnih v celici ali tkivih dajejo informacije, ki vodijo v boljše razumevanje funkcije genoma. Analize naravnega spreminjanja funkcije genov in njihov vpliv na fenotip pomagajo pri nastajanju novih diagnostičnih in terapevtskih molekularnih orodjih. Le-ta bi bila uporabna pri žlahtnjenju, adaptaciji in ekologiji rastlin (Gebhardt in sod., 2005).

S funkcionalno analizo genov poskušamo ugotoviti vlogo, ki jo imajo geni v rastlinah in njihov vpliv na celoten organizem. Pri poljščinah je posebej zanimivo spoznavanje nastanka modifikacije genov tekom evolucije in selekcij, ki so vodile v specifične lastnosti posameznih sort. Prav tako nam funkcionalna genomika omogoča hitro identifikacijo genov, ki so pomembni v kmetijstvu zaradi določenih prednostnih lastnosti in zagotavlja strategije, ki omogočajo njihovo spreminjanje (Leader, 2004).

Analize genov so pomembno področje systemske biologije. V okviru systemske biologije uporabljajo genske posege v sisteme (mutacije, utišanje genov,...) za določanje funkcije posameznega gena. Glavna orodja za študij systemske biologije so transkriptomika, proteomika in metabolomika. Transkriptomika preučuje izražanje genov, natančneje količino mRNA na nivoju celotnega genoma ali njegovega dela. Proteomika je pomembna za določanje koncentracije in posledično funkcionalne analize proteinov. S pomočjo metabolomike pa lahko ločujemo in identificiramo metabolite, kar omogoča ločevanje med genotipi, ugotavljanje vplivov iz okolja in končno funkcionalno karakterizacijo določenega gena (Baebler, 2007).

2.7 PROTEINAZNI INHIBITORJI

Proteinaze so encimi, ki hidrolizirajo peptidne vezi. Proteinaze lahko poimenujemo tudi proteaze, peptidaze ali proteolitični encimi. Rastlinske proteinaze so vključene v fiziologijo in razvoj rastline (van der Hoorn, 2008, cit. po González-Rábade in sod., 2011). Imajo pomembno vlogo pri razgradnji napačno zviti proteinov, senescenci, post-translacijskih modifikacijah proteinov, celičnih procesih kot sta fotoinhibicija v kloroplastih, obrambnih mehanizmih, programirani celični smrti, razvoju semena (Estelle, 2001, cit. po González-Rábade in sod., 2011) in številnih drugih procesih, ki vključujejo vse dele življenjskega cikla rastline (González-Rábade in sod., 2011).

Proteinazni inhibitorji so velika in kompleksna skupina rastlinskih proteinov. Vsem je skupna sposobnost tvorbe kompleksov s proteinazami zaradi česar encimi izgubijo svojo aktivnost. Inhibitorje lahko razdelimo glede na tip proteinaz, ki jih inhibirajo na cisteinske (fitocistatini), serininske, aspartat in metalo proteinazne inhibitorje (Laskowski in Kato, 1980; Bode in Huber, 1992; Valueva in Mosolov, 1990, cit. po Mosolov in Valueva, 2005).

Z razvojem biotehnologije so postali proteinazni inhibitorji zanimivi zaradi uporabe pri povečevanju odpornosti rastlin na škodljivce in bolezni. Obrambne strategije pred herbivornimi insekti, parazitskimi nematodi in mikrobnimi patogeni temeljijo na inhibiciji s selektivnimi inhibitorji (Visal in sod., 1998). Številni inhibitorji proteolitičnih encimov, ki jih vsebujejo rastline in so jih prvotno opisali kot inhibitorje živalskega tripsina in kimotripsina, delujejo na proteinaze v prebavnem traktu insektov. Inhibitorno delovanje teh encimov pa je opaženo tudi pri bakterijah, glivah in parazitih (Ryan, 1990, cit. po Mosolov in Valueva, 2008). Dokazano je tudi, da hrana, v kateri so serinski in cisteinski inhibitorji, povzroča pri insektih, ki se z njo hranijo, zmanjšano rast, razvoj in fertilitet. Zaradi tega je transformacija rastlinskih genomov z geni za proteinazne inhibitorje možna strategija kontrole rastlinskih škodljivcev in patogenov. Zaradi obširnega potenciala pa lahko proteinazni inhibitorji, ki se sintetizirajo v transgenih rastlinah, služijo tudi v nadaljnjih študijah s proteazami povezanih patogenih procesov (Michaud in Vrain, 1998).

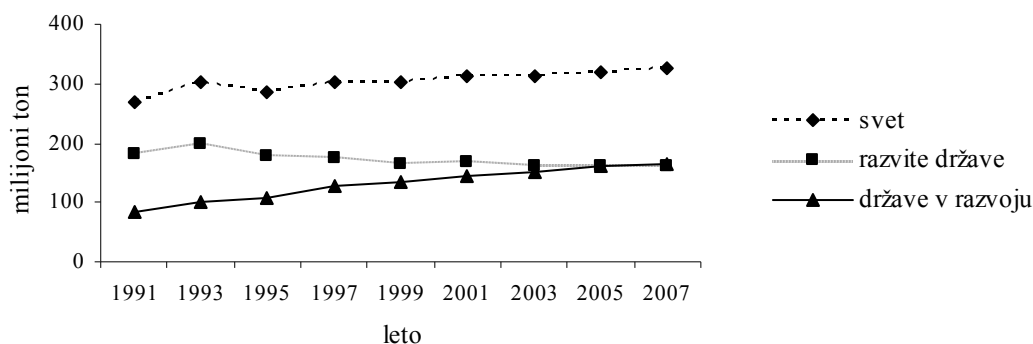
Tudi okužbe z virusi lahko povzročijo spremembe izražanja določenih proteinov. Pri krompirju pride po okužbi z virusom PVY^{NTN} do spremembe razmerja med cisteinskimi proteinazami in njihovimi endogenimi inhibitorji (Pompe Novak, 2002). Na področju interakcij med rastlino in virusom je bistveno manj raziskav kot pri interakcijah med rastlinami in bakterijami ali glivami. Do uspešnih strategij za zaščito rastlin lahko pridemo le z razumevanjem procesov razvoja bolezni in obrambnih mehanizmov rastline proti virusni okužbi (Pompe Novak, 2006).

2.8 KROMPIR

Krompir, *Solanum tuberosum* (*S. t.*) sodi poleg koruze, riža in pšenice med najbolj pomembne poljščine na svetu (FAOSTAT, 2009). Pomembnost krompirja narašča s povečevanjem svetovne populacije, zmožnosti uspevanja v različnih razmerah in njegove visoke hranilne vrednosti. Krompir je bogat z antioksidanti, ki so povezani s številnimi ugodnimi vplivi na zdravje (Grafius in Douches, 2008).

Žlahtnjenje krompirja je zaradi vegetativnega razmnoževanja in tetraploidnosti poseben izziv. Poznamo veliko število vrst iz rodu *Solanum*, ki predstavljajo vir kvalitetnih lastnosti, katere bi lahko vnesli v *S. t.* Žal, pa so številni divji sorodniki krompirja diploidni, kar oteži klasični postopek žlahtnjenja. Zato je vnos genov z genskim inženiringom pomembna metoda za razvoj novih sort (Grafius in Douches, 2008).

Pridelovanje krompirja pogosto ovirajo številni patogeni, ki napadajo vse dele rastline in povzročajo zmanjšanje količine in kvalitete pridelka. Nove sorte, ki bi bile odporne na različne virusne, bakterijske in glivne bolezni, na škodljivce ali na neugodne okoljske razmere, so zato zelo pomembne (Grafius in Douches, 2008). Še posebej to velja za države v razvoju, kjer že nekaj let prihaja do velikega povečanja gojenja in tudi potrebe po krompirju (slika 4) (International year of the potato, 2008).



Slika 4: Svetovna proizvodnja krompirja med letoma 1991 in 2007 (prirejeno po International year of the potato, 2008)

2.8.1 Bolezni in škodljivci

Od krompirjevih škodljivcev je najbolj znan koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*) (Rupnik, 1998). Nevarni škodljivci so tudi krompirjev molj (*Phthorimaea operculella*), ipsilon sivka (*Agrotis ipsilon*), krompirjeva plesen (*Phytophthora infestans*) in številni drugi organizmi, ki uničujejo gomolje, zelene dele rastline in prenašajo viruse (Grafius in Douches, 2008). Prav virusi povzročajo pridelovalcem veliko težav. Večina virusov povzroča izrojavanje krompirja, še posebno pri občutljivih sortah. Leta 1987 se je v

Sloveniji pojavila prva večja okužba krompirja s krompirjevim virusom PVY (Rupnik, 1998).

PVY so izolirali iz krompirja in razvrstili v več skupin glede na njegove biološke, serološke in/ali molekularne značilnosti (Balme-Sinibaldi in sod., 2006). Med vsemi različki je virus PVY^{NTN} najbolj agresiven in povzroča velik upad pridelka (Pompe Novak, 2006). Pri okuženih rastlinah se pojavijo močne morfološke in fiziološke spremembe. Pojavljajo se hude nekroze gomoljev in listov ter spremembe v strukturi in delovanju kloroplastov (Reinero in Beachy, 1989, cit. po Zhou, 2004). PVY^{NTN} povzroča bolezen imenovano obročkasta nekroza gomoljev. Med najbolj občutljive in dovzetne sorte sodi slovenska sorta krompirja Igor (Pompe Novak, 2006).

2.8.2 Sorta Igor

Sorta se je potem, ko so jo sredi sedemdesetih let vzgojili, uspešno širila in je v najboljših letih dosegla kar 60 % delež. Pridelki so bili visoki in kakovostni, zato so bili z njim zadovoljni tako pridelovalci kot porabniki, kar je izjemen primer. Prav obročkasta nekroza gomoljev je povzročila konec njenega pridelovanja. V nekaj letih po pojavu je sorta izginila z naših polj (Rupnik, 1998).

Bolezenska znamenja, ki se pojavljajo pri krompirju sorte Igor kot posledica okužbe z virusom PVY^{NTN} so nekrotični obročki na gomoljih in zelenih delih rastline. Nekaj dni po okužbi se nekrotične pike pojavijo na inokuliranih listih. Ko se virus razširi lahko na neinokuliranih listih opazimo gubanje listnih površin in mozaične kloroze (sistemska bolezenska znamenja). Listi začnejo odpadati tako pri primarni kot tudi pri sekundarni okužbi. Spremembe so tudi na celični ravni. V nekrotičnih pikah nabreknejo kloroplasti, tilakoide se zrahljajo in spremeni se optična gostota kloroplastov. Na območjih okrog nekroz pa prihaja do zmanjšanja velikosti kloroplastov (Pompe Novak, 2006). PVY^{NTN} povzroča tudi spremembe v strukturi in aktivnosti apikalnega meristema (Dolenc in sod., 2000) in povečanje endogenega nivoja citokininov (Dermastia in Ravnikar, 1996).

2.8.3 Sorta Sante

Sante je ena redkih na PVY^{NTN} odpornih sort. Odpornost so dosegli s klasičnim žlahtnjenjem z vnosom gena Ry_{sto} iz vrste *Solanum stoloniferum* (Hinrichs in sod., 1998, cit. po Mehle in sod. 2004). Odporna je tudi proti več rasam rumene in bele krompirjeve cistotvorne ogorčice in srednje odporna proti plesni. Je zelo rodovitna, razširjena in uporabna sorta, čeprav ni primerna za lahka peščena tla, saj v stresnih razmerah močno izrašča in formira gomolje (Kmetijski inštitut, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

<i>kemikalija</i>	<i>proizvajalec</i>
2,4 D	Sigma
70% in 96% etanol	Pharmachem
Agar (Bacto)	BD
BAP	Sigma
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Merck
cefotaksim (Cf)	Sigma
CoCl ₂ · 6H ₂ O	Merck
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Merck
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma
GA ₃	Sigma
glicin	Merck
goveji ekstrakt	Difco
H ₃ BO ₃	Merck
HgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck
higromicin (Hg)	Invivo Gen
kazein hidrolizat	
KH ₂ PO ₄	Kemika
KI	Merck

kinetin	Sigma
KNO ₃	Merck
kvasni ekstrakt	Oxoid
metanol	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck
mioinozitol	Sigma
MnSO ₄ · 4H ₂ O	Sigma
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	Kemika
Na ₂ M ₁₀ O ₄ · 2H ₂ O	Sigma
NAA	Sigma
NaCl	Merck
NH ₄ NO ₃	Sigma
nikotinska kislina	Kemika
pepton	Bacto
pirodoksin - HCl	Sigma
rifampicin	Sigma
saharoza	Kemika
natrijev hipoklorit	
tiamin - HCl	Caldiochem
zeatin ribozid	Sigma

3.1.2 Laboratorijska oprema

<i>oprema (naprave, pripomočki, ...)</i>	<i>proizvajalec</i>
avtoklav	Kambič
avtomatske pipete	Eppendorf
baterijski pipetor	
brezprašna komora za delo z bakterijami in plazmidi	Biosan
brezprašna komora za delo z rastlinami v tkivnih kulturah	Ehret
dispenzor	Eppendorf
hladna soba	Angeltoni Scientifica
inkubator	Kambič
kuhalnik	Severin
magnetno mešalo	Tehtnica
mikrovalovna pečica	
pH meter	Mettler Toledo
rastna komora	Kambič
stresalniki	Kambič
špiritni gorilnik	
tehtnica	Lotrič
tehtnica	Sartorius
ultrazvočna kopel	Sonic-pro
vodna kopel	
vorteks mešalo	

3.1.3 Droben laboratorijski material in ostale potrebščine

- žličke • spatule • steklene palčke • sterilne plastične posodice • pincete • čaše
- aluminijasta folija • kontrolni avtoklavirni trak • merilni valji • petrijevke • steklenice
- erlenmajerice • plastične posode za mešanje • posodice za tehtanje • filter papir
- papir za rezanje • skalpeli • liji • merilne pipete • stojala za epruvete • parafilm
- teflonske magnetne palčke • sterilni filtri

3.1.4 Bakterije in plazmidi

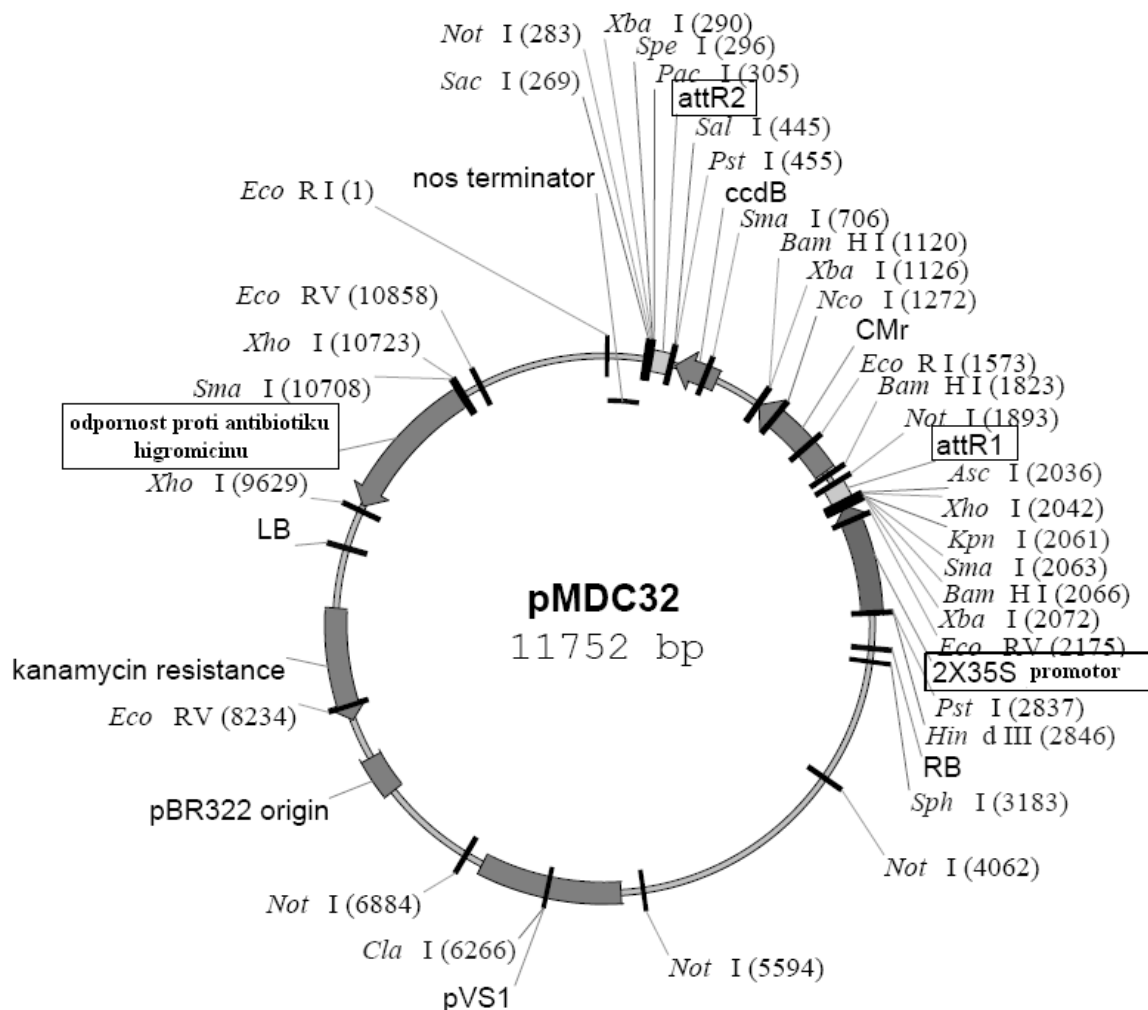
Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* - sev LBA4404 z vstavljenim plazmidom pMDC32_PCPI (slika 5).

Komercialni sev *A. t.* LBA4404 vsebuje kromosom TiAch5 in pAL4404 razoroženi Ti-plazmid, ki je odporen na antibiotik rifampicin.

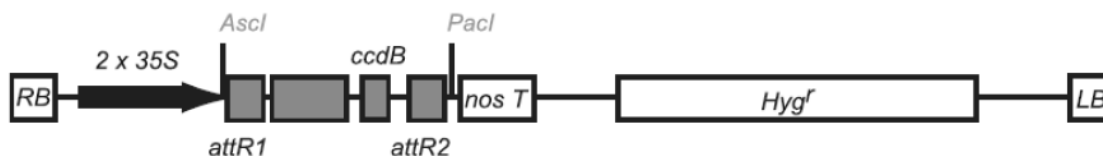
Vektor pMDC32 je eden izmed vektorjev, ki ga uporabljamo za kompatibilno rekombinacijo Gateway. Metoda temelji na sekvenčno specifični rekombinaciji, ki omogoča namestitev sekvenc med kompatibilni mesti v plazmidu. Najprej želeno sekvenco vstavimo v vstopni vektor. Nastane rekombinantni plazmid, ki ima tarčno sekvenco DNA med attL rekombinacijskima sekvencama. Z attL obdan želen gen se lahko rekombinira s sekvenco obdano z mestoma attR. Pri tem pride do prenosa gena v ciljni vektor (npr. pMDC32). Pred rekombinacijo se med mestoma attR nahaja gen (ccdB), ki selekcioniira vse vektorje, ki niso uspešno rekombinirani.

Vgrajeno regijo omejujeta desna mejna sekvenca (RB) in leva mejna sekvenca (LB), ki sta del naravne T-DNA (slika 6). Dvojni 35S promotor je regulator izražanja vstavljenega gena. Izvorno je promotor iz virusa cvetače CaMV-35S in omogoča močno ekspresijo gena v rastlini. Selekcijo transformant omogoča gen za odpornost proti higromicinu.

Vektor pMDC32 z vstavljenim genom PCPI so pripravili na Nacionalnem inštitutu za biologijo (slika 6).



Slika 5: Vektor pMDC32, v katerem je bil kasneje med mesti attR1 in attR2 vnesen gen PCPI (prirejeno po Curtis in Grossniklaus, 2003)



Slika 6: Genski konstrukt, ki se iz vektorja pMDC32 prenese v rastlino.

RB (angl. right border) - desna mejna sekvenca in LB (angl. left border) - leva mejna sekvenca, mesti attR1, attR2, ki omogočita rekombinacijsko kloniranje gena (Gateway), Hyg^r - gen za odpornost proti antibiotiku higromicinu, ccdB - ubijalski gen (povzeto po Curtis in Grossniklaus, 2003)

3.1.5 Gojišča

MS-GOJIŠČE; pH = 5,85 (prirejeno po Murashige in Skoog, 1962)

Sestavine	Končna koncentracija		Osnovna raztopina (OR)
	mg/l	mM	
NH ₄ NO ₃	1650	20,6	} OR1
KNO ₃	1900	18,8	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	3,0	
KH ₂ PO ₄	170	1,25	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	1,5	
mioinozitol	100	555	
	mg/l	μM	
H ₃ BO ₃	1,9	30,7	} OR2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	100	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,11	} OR3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,10	
KI	0,83	5,00	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	1,03	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	100	} OR4
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3	100	
glicin	2,0	26,6	
nikotinska kislina	0,5	4,06	} OR5
piridoksin - HCl	0,5	2,43	
tiamin - HCl	0,5	1,48	
saharoza	30 g/l	87,6 mM	za MS30-gojišče za trdno gojišče
agar	8 g/l		
destilirana voda			dodamo do 1 l

OR so vnaprej pripravljene kemikalije za gojišča, da nam jih ni potrebno vedno znova tehtati. S tem tudi zmanjšamo napako, ki nastane pri tehtanju zelo majhnih količin.

3.1.5.1 Regeneracijska gojišča za sorti Sante in Igor

GOJIŠČE R3B; pH = 5,8 (po protokolu, prejetem od prof. Visser, WUR, Nizozemska)

Sestavine	Končna koncentracija		
MS30			
saharoza	30	g/l	87,6 mM
agar	8	g/l	
NAA	2	mg/l	10,74 μ M
BAP	1	mg/l	4,44 μ M

GOJIŠČE PACM, pH = 6,5 (po protokolu, prejetem od prof. Visser, WUR, Nizozemska)

Sestavine	Končna koncentracija		
MS30			
saharoza	30	g/l	87,6 mM
kazein hidrolizat	2	g/l	
2,4 D	1	mg/l	4,52 μ M
kinetin	0,5	mg/l	2,32 μ M

POSKUSNA GOJIŠČA Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI ZR (prirejeno po Webster in sod., 1994)

Sestavine	Končna koncentracija		
MS30			
saharoza	30	g/l	87,6 mM
agar	8	g/l	
NAA	2	mg/l	10,74 μ M
GA ₃	0,34	mg/l	0,98 μ M
ZR (za gojišče Z1)	1	mg/l	2,85 μ M
ZR (za gojišče Z2)	2	mg/l	5,69 μ M
ZR (za gojišče Z3)	3	mg/l	8,54 μ M
ZR (za gojišče Z4)	4	mg/l	11,38 μ M

3.1.5.2 Gojišča, uporabljena pri transformaciji sorte Igor

Bakterijska gojišča:

GOJIŠČE LB; pH = 7,0 (Webster in sod., 1994)

Sestavine	Končna koncentracija	
tripton	10 g/l	
kvasni ekstrat	5 g/l	
NaCl	5 g/l	85,62 μ M
agar	8 g/l	
destilirana voda	dodamo do 1 l	

GOJIŠČE YEB, pH = 7,5 (Vervliet in sod., 1975)

Sestavine	Končna koncentracija	
kvasni ekstrat	1 g/l	
goveji ekstrat	5 g/l	
pepton	5 g/l	
saharozna	5 g/l	14,61 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g/l	2,03 μ M
destilirana voda	dodamo do 1 l	
rifampicin	15 mg/l	18,23 μ M
higromicin	50 mg/l	94,79 μ M

Rastlinska gojišča:

REGENERACIJSKO GOJIŠČE; pH = 5,85 (prirejeno po Webster in sod., 1994)

Sestavine	Končna koncentracija	
MS30		
saharozna	30 g/l	87,6 mM
agar	10 g/l	
NAA	0,2 mg/l	1,074 μ M
GA ₃	0,018 mg/l	0,052 μ M
ZR	3 mg/l	8,537 μ M

SELEKCIJSKO GOJIŠČE; pH = 5,85 (prirejeno po Webster in sod., 1994)

Sestavinam za regeneracijsko gojišče (glej zgoraj) dodamo antibiotika higromicin in cefotaksim.

Sestavine	Končna koncentracija	
regeneracijsko gojišče		
higromicin	4 mg/l	7,58 μ M
cefotaksim	250 mg/l	523,62 μ M

3.1.6 Rastlinski material

- krompir *Solanum tuberosum* L. sorta Sante
- krompir *Solanum tuberosum* L. sorta Igor

Uporabljali smo zdrave rastline, gojene v tkivni kulturi iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB). Rastline smo gojili v rastni komori pri naslednjih pogojih:

- fotoperioda: 16 ur svetloba; osvetlitev z žarnico Osram L58 W/77
8 ur tema
- temperatura: tema 19 ± 1 °C
svetloba 21 ± 1 °C
- relativna zračna vlažnost: 94 ± 2 %
- gostota pretoka fotonov: $70 - 90 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

3.2 METODE

3.2.1 Pogoji dela

- V laboratoriju: Gojišča in raztopine (razen pri uporabi RRR in antibiotikov) smo pripravljali na pultih v laboratorijih, kjer delo ni sterilno. Kljub temu smo poskrbeli, da smo pred in po končanem delu očistili in razkužili delovno površino s 70 % etanolom. Pri tetanju RRR in antibiotikov smo uporabljali zaščitno masko.

- V aseptični brezprašni komori (laminariju): Delo z rastlinskim materialom je sterilno, zato smo vedno delali v brezprašni sterilni komori. Pred začetkom dela v brezprašni komori smo prižgali UV luč. Delovno površino smo razkužili s 70 % etanolom, prav tako

smo si med delom večkrat sprali roke z razkužilom. Skalpele, pincete in vratove epruвет in erlenmajeric smo vsakokrat pred ponovno uporabo namočili v 96 % etanol in ožgali nad plamenom. Sterilno filtracijo antibiotikov in RRR ter njihovo dodajanje v gojišča smo prav tako izvajali v brezprašni komori. Posebej smo bili previdni pri delu s transformiranimi bakterijami. Uporabljeno gojišče z bakterijami in etanol za razkuževanje smo zlili v posodo z natrijevim hipokloritom (10 %). Ves uporabljen rastlinski material, gojišča, petrijevke in posodice smo po končanem delu zavrgli v posebne označene posode ali vreče za avtoklaviranje.

3.2.2 Priprava gojišč

3.2.2.1 Priprava gojišča MS

V večji steklen merilni valj smo položili teflonski magnet za mešanje in dodali del potrebne količine destilirane vode. Pripravili smo si osnovne raztopine (OR2 do OR5) shranjene v hladilniku, OR1 pa smo vzeli iz zamrzovalnika in jo odtalili v mikrovalovni pečici (na 60 % moči). V destilirani vodi smo ob mešanju na magnetnem mešalu dobro raztopili osnovne raztopine in saharozo. Nato smo dodali potrebno količino destilirane vode za zelen volumen gojišča. Raztopini smo umerili pH vrednost z dodajanjem HCl oziroma NaOH. V primeru priprave trdnega gojišča za gojenje tkivnih kultur v petrijevkah in posodicah smo v posode za avtoklaviranje zatehtali ustrezno količino agarja. Pri pripravi tekočega gojišča MS, ki je služil tudi kot osnovno gojišče za pripravo drugih, agarja nismo dodali. Steklenice z gojiščem smo narahlo zaprli z zamaškom, zaščitili z aluminijasto folijo, označili s kontrolnim avtoklavirnim trakom in avtoklavirali. V primeru, ko gojišča nismo takoj uporabili, smo ohlajene steklenice shranili na hladnem (4 °C).

- Uporaba gojišča MS v petrijevkah in posodicah

V primeru uporabe gojišča v petrijevkah in posodicah smo pripravljeno gojišče razdelili takoj po avtoklaviranju ali pa smo shranjeno gojišče najprej segreti v mikrovalovni pečici, da se je utekočinilo. Predhodno smo si v brezprašni komori za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami pripravili ustrezno označene sterilne petrijevke ali sterilne posodice. V vsako petrijevko smo v sterilnem okolju nalili približno 25 ml gojišča, v vsako posodico pa približno 70 ml. Petrijevke in posodice nismo povsem pokrili s pokrovčki dokler se ni gojišče popolnoma ohladilo in strdilo. S tem smo preprečili nastanek kondenza.

- Uporaba gojišča MS z antibiotiki ali RRR

Za pripravo gojišča MS z antibiotiki ali RRR smo gojišče po avtoklaviranju ohladili v vodni kopeli na 50 °C. V primeru shranjenega gojišča smo le to morali najprej segreti in utekočiniti v mikrovalovni pečici ter nato prilagoditi temperaturo. S pomočjo avtomatskih pipet, merilne epruветe in baterijskega pipetorja smo v brezprašni komori za delo z

bakterijami in plazmidi dodali ustrezne količine sterilno pripravljenih raztopin antibiotikov ali RRR. Nadaljevali smo po že opisanem postopku uporabe gojišča v petrijevkah ali posodicah.

- Uporaba gojišča MS v epruveh

V primeru uporabe gojišča v epruveh smo gojišče segreti na kuhalniku. Tik pred vretjem smo gojišče odstavili s kuhalnika in med mešanjem dodali najprej saharozo, nato agar. Segrevanje smo nadaljevali na mešalniku z gretjem in dodatno mešali, dokler se agar ni raztopil in se je raztopina zbistrila. V stojala smo si pripravili primerno število epruveh. S pomočjo dispenzorja smo nato še toplo gojišče razdelili v epruvete. V vsako epruveto smo nalili 8-9 ml gojišča. Epruvete z gojiščem smo pokrili s pokrovčki, stojala z epruvehami zavili v papir, pakete označili s kontrolnimi avtoklavirnimi trakovi in avtoklavirali.

V vseh primerih smo gojišča avtoklavirali 15 min pri 121 °C in tlaku 103,4 kPa.

3.2.2.2 Priprava gojišča R3B

Po predhodni pripravi gojišča smo sterilno dodali raztopino NAA do končne koncentracije 10,74 µM in raztopino BAP do končne koncentracije 4,44 µM. Sicer pa smo delali po že opisanih postopkih uporabe gojišča z antibiotiki in RRR ter uporabe gojišča v petrijevkah ali posodicah.

3.2.2.3 Priprava gojišča PACM

Za pripravo gojišča smo stehali ustrezne količine sestavin in jih raztopili v destilirani vodi ter sterilno dodali raztopino 2,4 D do končne koncentracije 4,52 µM in raztopino kinetina do končne koncentracije 2,32 µM. pH smo uravnali na 6,5. Ker gojišča nismo takoj uporabili, smo po avtoklaviranju ohlajene steklenice shranili na hladnem (4 °C).

3.2.2.4 Priprava poskusnih gojišč z različnimi koncentracijami ZR

V vsa štiri poskusna gojišča smo v predhodno pripravljeno avtoklavirano gojišče MS sterilno dodali raztopino NAA do končne koncentracije 10,74 µM in GA₃ do končne koncentracije 0,98 µM. V poskusna gojišča smo nato dodali ustrezne količine ZR do končnih koncentracij 2,85 µM, 5,69 µM, 8,54 µM in 11,38 µM. RRR smo dodajali po že opisanih postopkih uporabe gojišča z antibiotiki in RRR in nadaljevali po prav tako že opisanih postopkih uporabe gojišča v petrijevkah ali posodicah.

3.2.2.5 Priprava gojišča YEB

Sestavine za gojišče smo stehali in stresli v steklenico za avtoklaviranje. V steklenico smo dali teflonsko magnetno palčko ter prelili z destilirano vodo. Steklenico z raztopino smo

postavili na mešalnik, da so se sestavine dobro raztopile, nato pa smo umerili pH na 7,5. Steklenice z gojiščem smo narahlo zaprli z zamaškom, zaščitili z aluminijasto folijo, označili s kontrolnim avtoklavirnim trakom in avtoklavirali. Ker gojišča nismo takoj uporabili, smo po avtoklaviranju ohlajene steklenice shranili na hladnem (4 °C).

- Dodajanje antibiotikov v gojišče YEB

Avtoklavirano gojišče YEB smo razdelili v sterilne erlenmajerice po 10 ml. S pomočjo avtomatske pipete smo v brezprašni komori za delo z bakterijami in plazmidi v vsako erlenmajerico dodali sterilno pripravljeno raztopino rifampicina do končne koncentracije 18,23 μM in higromicina do končne koncentracije 94,79 μM . Rifampicin nam omogoči selekcijo agrobakterij (na razoroženem plazmidu bakterije LBA4404), higromicin pa selekcijo vektorja, da zrastejo le tiste, ki imajo plazmid pMDC32. Antibiotike smo v gojišče dodali tik pred uporabo.

3.2.2.6 Priprava regeneracijskega gojišča za transformacijo sorte Igor

V predhodno pripravljeno avtoklavirano gojišče MS smo sterilno dodali raztopino NAA do končne koncentracije 1,074 μM , raztopino GA₃ do končne koncentracije 0,052 μM in raztopino ZR do končne koncentracije 8,537 μM . RRR smo dodajali po že opisanih postopkih uporabe gojišča z antibiotiki in RRR in nadaljevali po prav tako že opisanih postopkih uporabe gojišča v petrijevkah ali posodicah.

3.2.2.7 Priprava selekcijskega gojišča za transformacijo sorte Igor

V predhodno pripravljeno avtoklavirano gojišče MS smo sterilno dodali raztopino NAA do končne koncentracije 1,074 μM , raztopino GA₃ do končne koncentracije 0,052 μM , raztopino ZR do končne koncentracije 8,537 μM , raztopino Cf do končne koncentracije 523,62 μM in raztopino Hg do končne koncentracije 7,58 μM . RRR in antibiotike smo dodajali po že opisanih postopkih uporabe gojišča z antibiotiki in RRR ter nadaljevali po prav tako že opisanih postopkih uporabe gojišča v petrijevkah ali posodicah.

3.2.3 Priprava rastlinskih rastnih regulatorjev in antibiotikov

RRR in antibiotiki se raztapljajo v različnih gojiščih. Raztopine so različno obstojne, zato so bile nekatere že predhodno pripravljene in ustrezno shranjene v hladilniku ali zamrzovalniku (Preglednica 1). Krajši čas obstojne in raztopine, ki smo jih uporabljali v večjih količinah (zeatin ribozid) smo morali pripraviti večkrat.

Preglednica 1: Priprava raztopin RRR in antibiotikov (količine in medij za raztapljanje)

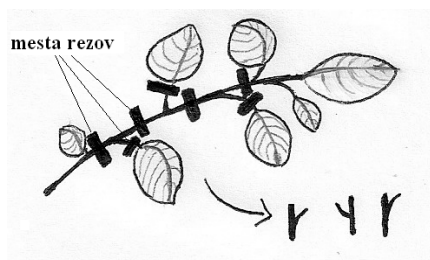
RRR	mg/50 ml	Raztapljamo v	antibiotik	mg/ml	Raztapljamo v
NAA	9	1 M NaOH	Cf	250	H ₂ O
GA ₃	17	H ₂ O	Hf	100	H ₂ O
ZR	11	1 M HCl	Rf	250	metanol
		BAP	11	1 M HCl	
		2,4 D	11	1 M NaOH	
		KIN	11	1 M HCl	

Za pripravo raztopine zeatin ribozida smo stehali potrebno količino RRR. Na podstavek za tehtanje s pripravljenim praškom smo kanili nekaj kapljic 1 M HCl. S predhodno pripravljeno potrebno količino vode v merilnem valju smo sprali raztopino v malo erlenmajerico. V primeru neraztopljenih delcev smo uporabili ultrazvočno kopel. Raztopino smo nato v brezprašni komori filtrirali v sterilno 50 ml centrifugirko. Raztopino smo shranili v zamrzovalniku. Postopek priprave je podoben tudi pri ostalih RRR in antibiotikih. Razlikuje se v uporabljenem topilnem mediju in načinu shranjevanja. Pri manjših količinah je potrebno raztopino razdeliti na manjše alikvote v mikrocentrifugirke.

3.2.4 Priprava rastlinskega materiala

Namnožitev rastlin

Za naš eksperiment smo potrebovali večje število zdravih rastlin krompirja sort Igor in Sante gojenih v tkivni kulturi. Prvotno smo uporabili rastline iz zbirke NIB, ki smo jih namnožili, da smo obnovili zbirko in dobili zadostno število za izvedbo eksperimenta. Prenos smo izvajali iz posodic, kjer so bile rastline stare približno 4 tedne in visoke približno 8 cm. V brezprašno komoro za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami smo prinesli posodice z rastlinami in predhodno pripravljene posodice z gojiščem MS. V sterilnih pogojih smo odrezali rastline tik nad gojiščem in jih s pinceto previdno vzeli iz posodice. Rastlino smo položili na sterilni papir, na katerem smo s skalpelom izrezali nodije iz močnejših delov stebra rastline (slika 7).

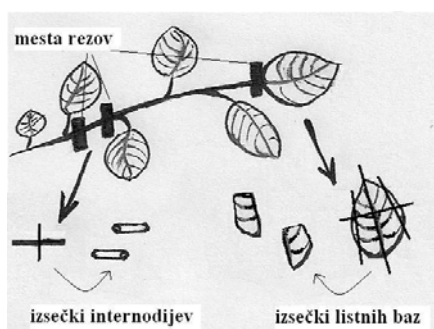


Slika 7: Mesta razreza rastlin z namenom pridobivanja nodijev

Po osem nodijev smo prenesli v eno posodico s svežim hranilnim gojiščem MS30. Izsečke smo dajali v posodice pravokotno na površino MS-gojišča, s fiziološkim bazalnim delom obrnjenim navzdol v gojišče. Po približno mesecu dni oziroma, ko so rastline dosegle želeno velikost, smo celoten postopek ponovili. Na ta način smo vsakokrat vsaj potrojili število rastlin.

Priprava izsečkov

V brezprašno komoro za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami smo prinesli petrijevke z gojiščem in posodice z rastlinami krompirja sort Igor in Sante, ki smo jih predhodno namnožili. V sterilnih pogojih smo rastline s pinceto previdno vzeli iz gojišča in položili na papir, na katerem smo s skalpelom izrezali internodije iz močnejših delov stebra rastline. Internodije smo narezali na izsečke velikosti 2-6 mm in pazili, da smo odstranili vse zalistne brste. V prvem delu eksperimenta smo potrebovali tudi izsečke baz listnih ploskev, zato smo odrezali večje liste in jih razrezali na koščke (slika 8). Najprej smo list zarezali pravokotno na glavno žilo, da smo odrezali konico lista. Drugi rez pa smo zarezali po glavni žili, da smo dobili dva izsečka. Izsečke smo s pinceto sterilno prenesli v petrijevke, horizontalno glede na površino gojišča. Pri prenosu listov smo pazili, da smo jih polagali z zgornjo stranjo navzdol, da listne reže niso bile v stiku s podlago.



Slika 8: Načini razreza rastlin z namenom pridobivanja izsečkov internodijev in baz listnih ploskev

3.2.5 Optimizacija postopka regeneracije

Raziskovali smo vpliv začetnega izsečka ter različnih gojišč na regeneracijo poganjkov.

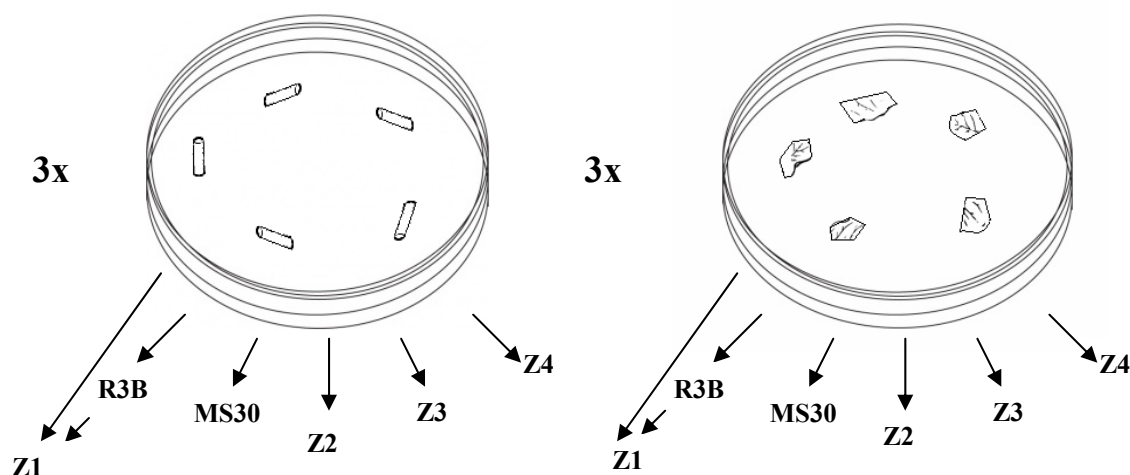
- 1. dan

Pripravili smo gojišča MS30, R3B, PACM in MS30 z NAA, GA₃ in različnimi koncentracijami ZR. Gojišča smo razlili v označene petrijevke.

- 2. dan

V vsako od šestih petrijevk z R3B gojiščem smo položili po dva okrogla sterilna filter

papirja. Filter papirja smo navlažili z 2 ml tekočega gojišča PACM. Na tako pripravljen filter papir smo v brezprašni komori za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami sterilno položili po 5 izsečkov internodijev v 3 petrijevke in po 5 izsečkov listnih delov v 3 petrijevke. Enako število izsečkov smo pripravili tudi za kontrolo in jih prenesli v 6 petrijevk z MS-gojiščem. Na gojišča s poskusnimi koncentracijami ZR smo prav tako prenesli po 5 izsečkov internodijev na tri petrijevke in po 5 izsečkov listov na tri petrijevke za poskusne koncentracije 2 mg/l, 3 mg/l in 4 mg/l (Z1, Z2, Z3) (slika 9). Na gojišče s koncentracijo 1 mg/l ZR (Z1) izsečkov še nismo polagali. Vse petrijevke z izsečki smo zaprli, zatesnili s parafilmom in prenesli v rastno komoro za tkivne kulture. Skupaj smo tako za poskus pripravili 300 izsečkov v 60 petrijevkah. Za vsako sorto smo pripravili po 15 internodijev in 15 listnih delov za kontrolo in po 15 internodijev in 15 listnih delov za posamezna poskusna gojišča (Z1, Z2, Z3 in Z4) (slika 9).



Slika 9: Razporeditev izsečkov na posamezna gojišča v petrijevkah.

Z1, Z2, Z3 in Z4: gojišča z 2,85 μ M, 5,69 μ M, 8,54 μ M in 11, 38 μ M ZR; MS: Murashige in Skoog gojišče; R3B: osnovno gojišče MS z dodanimi avksini in citokinini; MS30: gojišče MS s 30 g/l saharoze

- 5. dan

Izsečke, ki smo jih gojili na gojišču R3B, smo v brezprašni komori za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami sterilno prenesli na gojišče Z1. Tudi te petrijevke smo zatesnili s parafilmom in prenesli v rastno komoro za tkivne kulture.

- 29. dan

Pripravili smo petrijevke z gojišči MS30 in MS30 z NAA, GA₃ in različnimi koncentracijami ZR.

- 30. dan

Izsečke smo v brezprašni komori za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami sterilno prenesli na sveža gojišča.

Postopek prenašanja na sveža gojišča smo ponovili čez 3 tedne. Poskus je trajal 9 tednov v obdobju od septembra do novembra. Med poskusom smo spremljali spremembe na izsečkih. Pozorni smo bili na izvor izsečka, da bi lahko primerjali, katera vrsta izsečkov ima uspešnejšo regeneracijo. Opazovali in popisovali smo tudi izgled kalusov, spremembe gojišča, stanje izsečkov,... Izsečke, pri katerih je med poskusom prišlo do okužbe, smo zavrgli in zdrave izsečke z iste plošče prenesli na sveže gojišče. Spremembe smo dokumentirali tudi s fotografiranjem plošč.

3.2.6 Transformacija

Za transformacijo smo uporabili internodije iz tkivnih nodijskih kultur krompirja sorte Igor. Za izvedbo postopka transformacije krompirja z vektorjem z genom PCPI smo pripravili 480 izsečkov.

3.2.6.1 Gojenje bakterijske kulture za transformacijo rastlin

Bakterije, gojene na gojišču LB z dodanim rifampicinom, smo z ezo vcepili v erlenmajerice s po 10 ml gojišča YEB z dodanima selekcijskima antibiotikoma higromicin in rifampicin. Tako pripravljeno gojišče smo prenesli na stresalnik v inkubatorju pri 30 °C. Suspenzijo bi pri dobri rasti lahko uporabili po 24 urah.

3.2.6.2 Potek transformacije

- 1. dan

Pred začetkom transformacije smo si pripravili bakterijsko kulturo (3.2.6.1). Za transformacijo smo namreč potrebovali gojišče z bakterijo *A. t.* z vstavljenim konstruktom z genom PCPI v plazmid pMDC32.

- 2. dan

Pripravili smo petrijevke z regeneracijskim in s kontrolnim gojiščem MS30 ter tekoče gojišče MS30. V brezprašni komori za delo z bakterijami in plazmidi smo v erlenmajerice s po 500 ml MS-gojišča sterilno dodali NAA do končne koncentracije 1,074 μM , GA₃ do končne koncentracije 0,052 μM in ZR do končne koncentracije 8,537 μM . V 500 ml tekočega MS-gojišča RRR nismo dodajali. Gojišča smo razlili v označene petrijevke.

- 3. dan

V sterilnih pogojih brezprašne komore za tkivne kulture smo v 12 petrijevkih razlili po 20 ml tekočega gojišča MS30. Nato smo pripravili 480 izsečkov internodijev in jih v vsako petrijevko z gojiščem MS dali po 40. S tem smo preprečili njihovo izsuševanje. V brezprašni komori za delo z bakterijami in plazmidi smo izvedli prenos izsečkov na gojišča. Najprej smo prenesli po 5 izsečkov na 10 plošč s kontrolnim gojiščem MS30 brez dodanih

antibiotikov in RRR. Sledilo je izmenično ponavljanje postopka prenosa izsečkov na petrijevke z gojiščem. V prvo petrijevko s tekočim gojiščem MS in izsečki smo odpipetirali po 100 μ l bakterijske kulture. Petrijevko smo dali na stresalnik in po 20 minutah stresanja na sobni temperaturi, smo izsečke prenesli na gojišča. Postopek smo ponovili z vsemi pripravljenimi izsečki. Prenesli smo po 8 izsečkov v 50 petrijevok z regeneracijskim gojiščem. Petrijevke smo zaščitili s parafilmom in dali v tkivno komoro na debel stiropor. Vse plošče smo prekrili z belim papirjem in pustili 48 ur na reducirani svetlobi.

- 4. dan

Pripravili smo si petrijevke s selekcijskim gojiščem. V brezprašni komori za delo z bakterijami in plazmidi smo v erlenmajerice s po 500 ml gojišča MS sterilno dodali NAA do končne koncentracije 1,074 μ M, GA₃ do končne koncentracije 0,052 μ M in ZR do končne koncentracije 8,537 μ M, Cf do končne koncentracije 523,62 μ M in Hg do končne koncentracije 7,58 μ M. Pripravili smo tudi 250 ml gojišča MS, v katerega smo dodali vse prej navedene snovi razen higromicina. Gojišča smo razlili v označene petrijevke.

- 5. dan

Izsečke smo v sterilnih pogojih rastne komore za tkivne kulture prenesli iz regeneracijskega na selekcijsko ali kontrolno gojišče. Najprej smo predstavljali izsečke, ki so bili namenjeni kontroli brez transformacije. Tako smo preprečili, da bi ti izsečki prišli v stik s transformiranimi bakterijami. Na posamezno gojišče v petrijevki smo prenesli po 5 izsečkov.

a) iz kontrolnih plošč z gojiščem MS30 na 4 plošče z gojiščem brez higromicina: brez bakterije, brez selekcije - kontrola 1 (K1)

b) iz plošč z regeneracijskim gojiščem na 4 plošče z gojiščem brez higromicina: z bakterijo, brez selekcije - kontrola 2 (K2)

c) iz kontrolnih plošč z gojiščem MS30 na 4 plošče z gojiščem s higromicinom: brez bakterije, s selekcijo - kontrola 3 (K3)

d) iz plošč z regeneracijskim gojiščem na 82 plošč z gojiščem s higromicinom: z bakterijo, s selekcijo – transformacija (T)

Vse petrijevke z izsečki smo zaprli, zatesnili s parafilmom in prenesli v rastno komoro za tkivne kulture. Skupno smo tako za poskus pripravili 470 izsečkov v 94-ih petrijevkah.

- 17. dan

Pripravili smo petrijevke z gojiščem (glej 4.dan).

- 18. dan

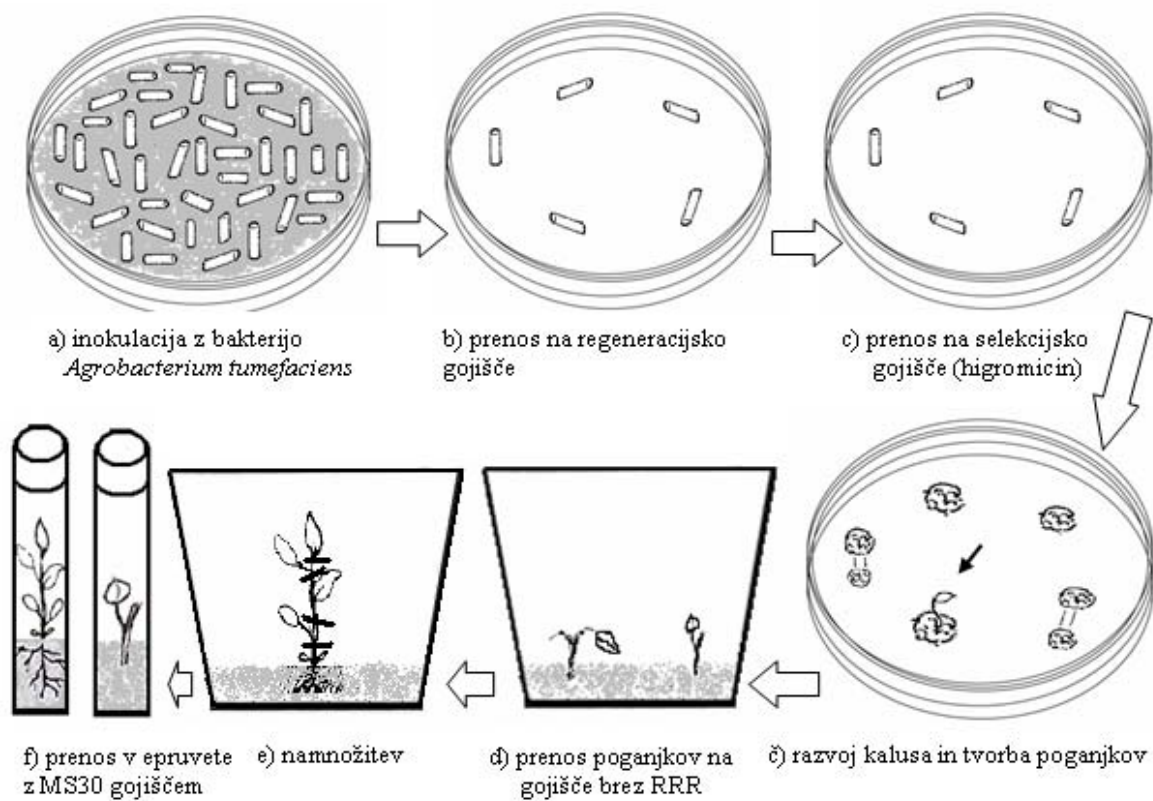
Izsečke, pri katerih smo uporabili metodo transformacije in kontrolne izsečke K3 smo prenesli na sveža gojišča s selekcijo (higromicin), kontrolne izsečke K1 in K2 pa na gojišče brez selekcije. Vse petrijevke z izsečki smo zaprli, zatesnili s parafilmom in prenesli v rastno komoro za tkivne kulture.

Postopek prenašanja na sveža gojišča smo ponavljali na 14 dni. Poskus je trajal 21 tednov v obdobju od novembra do aprila. Med poskusom smo spremljali in zapisovali spremembe na izsečkih. Pozorni smo bili na razvoj kalusov, tvorbo poganjkov, propadanje izsečkov, okužbe, videz kalusa,... Poganjke, ki so se pojavili na kalusih smo pustili, da so postali dovolj veliki za prenos v posodico. Izsečke, pri katerih je med poskusom prišlo do okužbe, smo zavrgli in zdrave izsečke z iste plošče prenesli na sveže gojišče. Spremembe smo dokumentirali tudi s fotografiranjem plošč.

3.2.6.3 Prenos poganjkov iz petrijevk v posodice in epruvete

Dan pred prenosom transformiranih poganjkov smo si pripravili posodice ali epruvete z gojiščem. V posodicah smo pripravili gojišče MS30, kateremu smo dodali antibiotike, RRR pa ne. Naslednji dan smo v brezprašno komoro za tkivne kulture prinesli posodice z gojiščem ter plošče, na katerih so se razvili poganjki. S sterilnim skalpelom smo dovolj velike poganjke odrezali od kalusa in jih prenesli v posodice. Poganjke, ki so se v posodicah lepo razvijali, smo po določenem času (5-8 tednov) namnožili tako, da smo s skalpelom izrezali posamezne nodije (slika 7). Vsak nodij smo v sterilnem okolju brezprašne komore za tkivne kulture s pinceto prenesli v svojo epruveto z MS30-gojiščem brez dodanih RRR ali antibiotikov. Epruvete smo prenesli v rastno komoro za tkivne kulture.

Celoten postopek transformacije je shematsko prikazan na sliki 10.



Slika 10: Potek transformacije.

RRR: rastlinskih rastnih regulatorjev; MS: Murashige in Skoog gojišče; MS30: gojišče MS s 30 g/l saharoze

3.2.7 Testiranje potencialno transformiranih rastlin

Z metodo za določanje prisotnosti promotorja 35S CaMV v genomu lahko preverimo ali je bil konstrukt uspešno vstavljen v genom in ali je rastlina uspešno transformirana. Analizo so izvedli na NIB.

3.2.8 Statistična analiza podatkov

Pri statistični analizi podatkov smo uporabili Studentov t-test. Stopnje tveganja smo označili z naslednjimi simboli:

$p \leq 0,05$ *

$p \leq 0,01$ **

$p \leq 0,001$ ***

4 REZULTATI

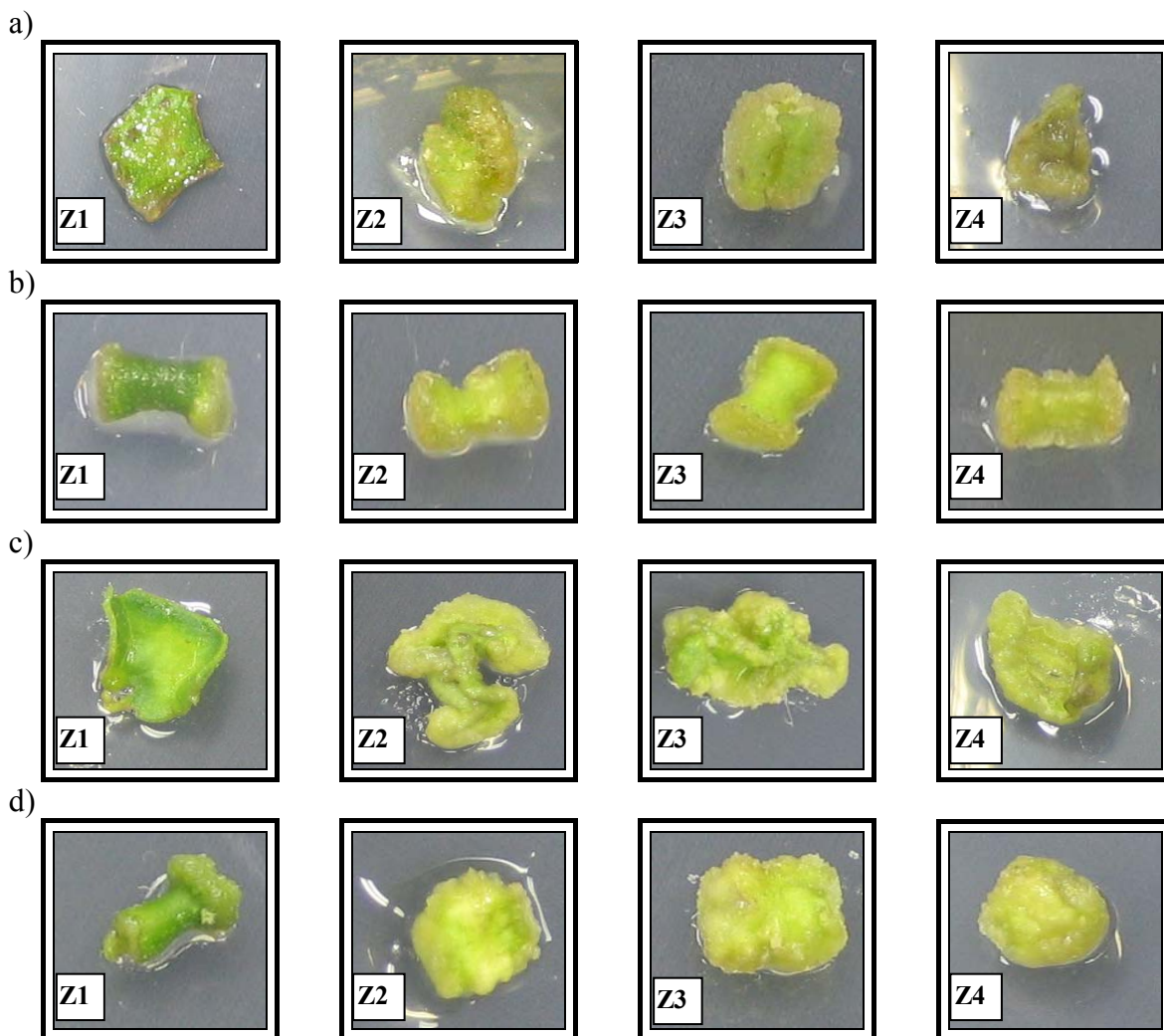
4.1 REGENERACIJA KROMPIRJA SORT SANTE IN IGOR NA POSKUSNIH GOJIŠČIH

Proučevali smo regeneracijo krompirja sort Igor in Sante na gojiščih z različnimi koncentracijami rastnih regulatorjev. Primerjali smo regeneracijo iz izsečkov internodijev in izsečkov listnih delov.

4.1.1 Tvorba kalusa

- 2 tedna

Pojavili so se prvi kalusi. Učinki posameznih gojišč na izsečke so prikazani na slikah. (slika 11).



Slika 11: Prvi kalusi po 2-eh tednih rasti. a) Sante listi; b) Sante internodiji; c) Igor listi; d) Igor internodiji
Z1, Z2, Z3 in Z4: gojišča z 2,85 μM , 5,69 μM , 8,54 μM in 11, 38 μM ZR

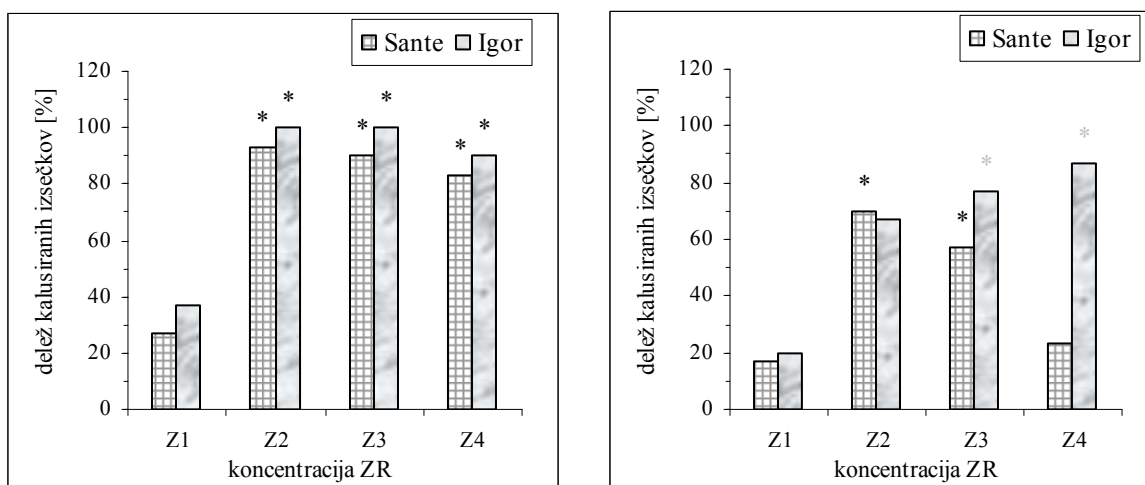
Pri obeh sortah se na gojišču Z1 kalusi na listih po dveh tednih še niso razvili in so bili primerljivi z izsečki na kontrolnih gojiščih, ki prav tako niso kalusirali. Podobno je bilo z internodiji na gojišču Z1, kjer je zgolj pri nekaterih prišlo do iniciacije kalusa. Pri sorti Sante smo na gojiščih z internodiji opazili slabši razvoj kalusa. Razvoj kalusa je bil na gojišču Z1 statistično značilno slabši kot na gojiščih Z2, Z3 in Z4 ($p = 0,01$). Kalusi na gojišču Z4 z listi so bili manjši in bolj rjavkasto obarvani kot na gojiščih Z2 in Z3. Pri sorti Igor so se kalusi v primerjavi s sorto Sante razvijali boljše. Manjšo razliko smo opazili pri izsečkih internodijev na gojišču Z4, kjer je bil kalus nekoliko manj razvit kot pri izsečkih na gojiščih Z2 in Z3, vendar še vedno bolj kot pri izsečkih sorte Sante na istih gojiščih.

- 3 tedni

Na gojišču Z1 nismo opazili večjih sprememb. Pri izsečkih, kjer se je pojavil kalus, se je ta rjavkasto obarval, do povečanja pa ni prišlo. Na kontrolnih gojiščih ni prišlo do iniciacije kalusa. Pri listih sorte Sante na gojiščih Z2 in Z3 je bila rast kalusa še vedno boljša kot na Z4. Internodiji sorte Sante, pa so nekoliko bolj kalusirali na gojišču Z3. Povečanje velikosti kalusa smo opazili pri listih sorte Igor na gojiščih Z2 in Z3. Do povečanja kalusa je prišlo tudi pri internodijih sorte Igor, v največji meri na gojišču Z3.

- 4 tedni

Večje spremembe smo opazili pri sorti Igor, pri kateri je prišlo do povečanja kalusov, predvsem pri listih gojišča Z3. Zaradi okužbe smo morali ločiti izsečke na eni izmed plošč Z2 z listi sorte Igor in odstraniti ploščo Z3 sorte Sante z listi. Pod nekaterimi izsečki smo opazili bele ali rumene meglice. Da bi preprečili morebitno okužbo smo te izsečke pri prenosu ločili od tistih, pri katerih sprememb na gojišču nismo opazili.



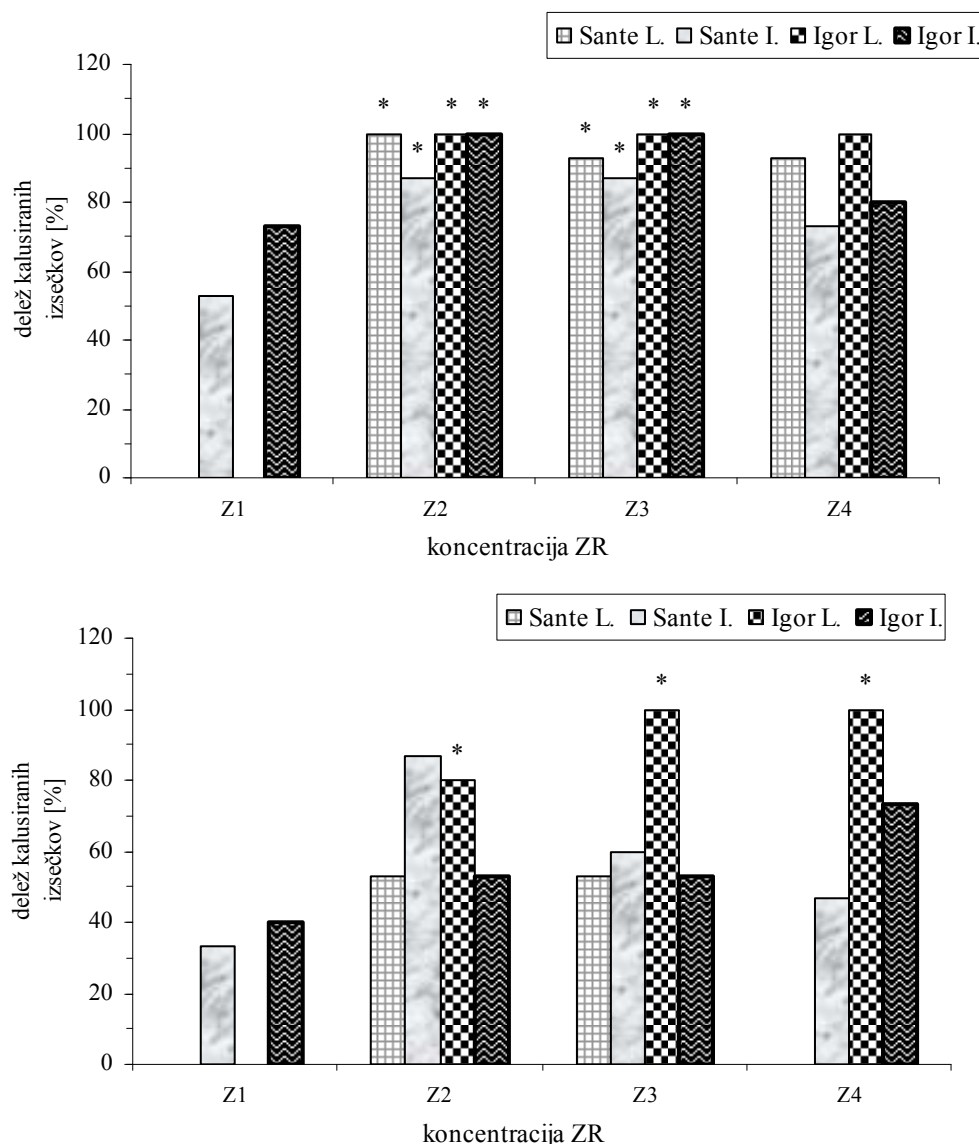
Slika 12: Razvijanje kalusa (v odstotkih) pri sorti Sante in Igor po 2-eh tednih (levo) in po 6-ih tednih (desno).

Z1, Z2, Z3 in Z4: gojišča z 2,85 μM ; 5,69 μM ; 8,54 μM in 11,38 μM ZR; $N_{\text{Sante Z1-Z4}} = 30$; $N_{\text{Igor Z1-Z4}} = 30$,

* Studentov t test ($p \leq 0,05$)

• 6 tednov

Na ploščah z gojiščem Z1 ni bilo sprememb, razen dodatne porjavelosti izsečkov, ki pa se je pojavila tudi na kontrolnih ploščah. Pri sorti Sante je bil kalus še vedno najbolj razvit na internodijih gojišč Z3. Opazili smo še močnejše povečanje velikosti kalusa, predvsem na ploščah Z2 in Z3 internodijev sorte Igor. Pri listih sorte Igor na ploščah Z4 se kalusi niso povečali, opazili smo, da so temnejši od tistih na ploščah Z2 in Z3. Primerjave med razvojem kalusa po 2 tednih in 6 tednih so prikazane v grafikonih (slika 12,13). Pri analizi kalusiranja po 6 tednih smo od celotnega deleža kalusiranih izsečkov odšteli delež izsečkov, katerih kalus je v celoti porjavel in se ni povečeval ter delež okuženih izsečkov.

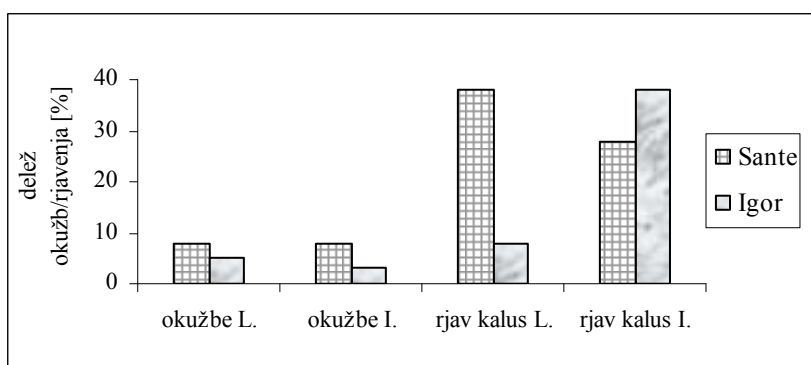


Slika 13: Razvijanje kalusa (izraženo v odstotkih) na izsečkih listov (L.) in internodijev (I.) na gojiščih z različnimi koncentracijami ZR po 2-eh tednih (zgoraj) in po 6-ih tednih (spodaj).

Z1, Z2, Z3 in Z4: gojišča z 2,85 μM , 5,69 μM , 8,54 μM in 11, 38 μM ZR; $N_{\text{Sante L./I., Z1-Z4}} = 15$; $N_{\text{Igor L./I., Z1-Z4}} = 15$; * Studentov t test ($p \leq 0,05$)

Pri koncentracijah Z2 in Z3 je kalusiralo statistično značilno več izsečkov ($p = 0,02$) kot pri koncentraciji Z1 (slika 13). Rast kalusa je bila na ploščah Z2 in Z3 sorte Sante statistično značilno boljše od rasti na ploščah Z1 in Z4 ($p = 0,02$) (slika 12). Izsečki listov na ploščah Z1 niso razvili kalusa, pri ostalih koncentracijah pa smo pri sorti Igor opazili tvorbo kalusov pri statistično značilno več izsečkih kot pri sorti Sante ($p = 0,04$) (slika 13). Pri višjih koncentracijah (Z3 in Z4) je kalusiralo statistično značilno več izsečkov sorte Igor ($p = 0,05$) (slika 12).

Občasno so se na posameznih izsečkih pojavljale okužbe. Rjavenje kalusa se je po 6-ih tednih pojavljalo pri vseh tipih izsečkov. Rjavenje kalusa listov se je v večji meri pojavljalo pri sorti Sante. Pri rjavenju internodijev in deležu okužb statistično značilnih razlik med sortama ni bilo (slika 14).

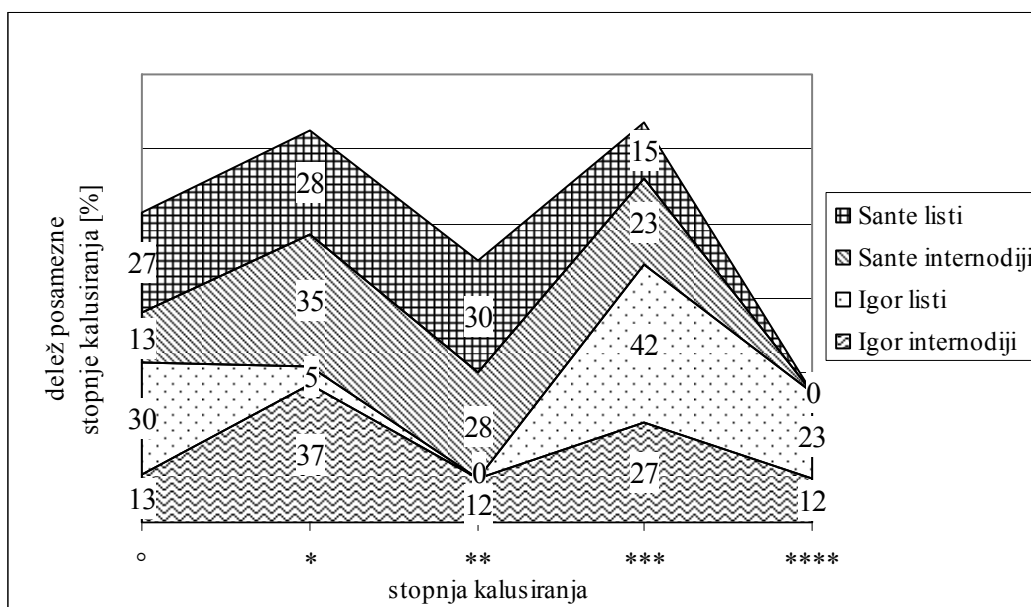


Slika 14: Delež okužb in rjavenja kalusa glede na tip izsečka in sorto krompirja po 6-ih tednih rasti.
L: listi, I: internodiji; $N_{Sante\ L./I.}$ in $N_{Igor\ L./I.} = 60$

Na ploščah se niso razvili kalusi enakih velikosti, pač pa so bile med njimi precejšnje razlike. Stopnja razvoja kalusa po 6 tednih je predstavljena v preglednici in grafikonu (preglednica 2, slika 15).

Preglednica 2: Število izsečkov določene stopnje razvoja kalusa pri sortah Sante in Igor
Število začetnih izsečkov je bilo pri vseh tipih 60.

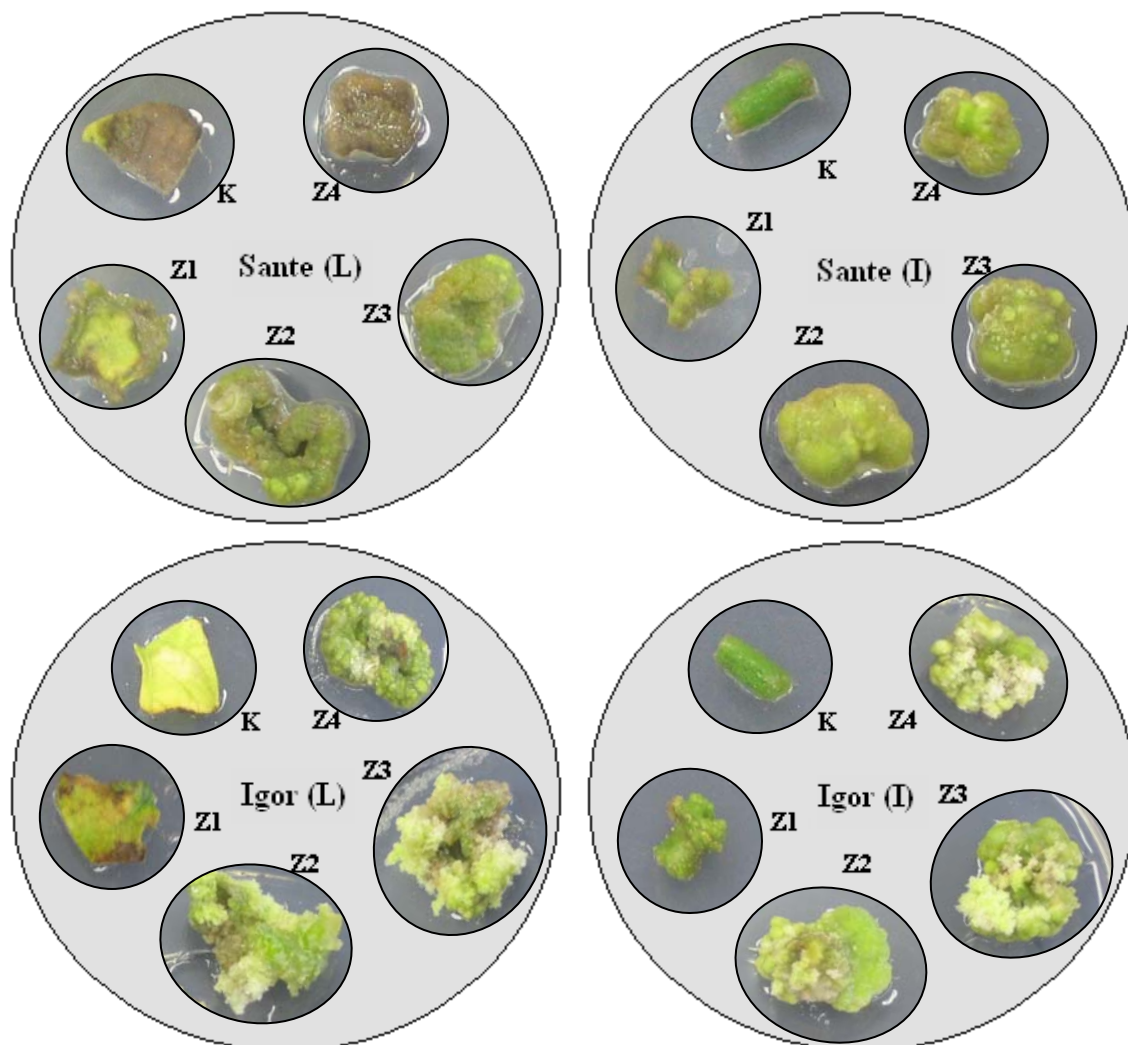
razvoj kalusa	nič	začetek	šibek	srednji	močan
tip izsečka	[°]	[*]	[**]	[***]	[****]
Sante listi	16	17	18	9	0
Sante internodiji	8	21	17	14	0
Igor listi	18	3	0	25	14
Igor internodiji	8	22	7	16	7



Slika 15: Stopnja razvoja kalusa (izražena v odstotkih) glede na tip izsečka in sorto krompirja
 °: nič; *: začetna; **: šibka; ***: srednja; ****: močna

Izsečki sorte Igor so kalusirali močnejše kot izsečki sorte Sante. Pri sorti Sante je bilo statistično značilno ($p = 0,01$) več izsečkov z nizko stopnjo kalusiranja kot tistih z intenzivnejšim kalusiranjem. Kalusa ni tvorilo statistično značilno več izsečkov listov kot internodijev ($p = 0,01$).

Kalusi so se poleg velikosti razlikovali tudi po barvi in kompaktnosti (slika 16). Pri sorti Sante so bili kalusi večinoma temnejši kot pri sorti Igor, kjer so bili najtemnejši kalusi listov na gojiščih Z4. Kalusi listov sorte Igor na gojiščih Z2 in Z3 so bili najbolj rahli in so ob prenašanju razpadali na več delov. Nasprotno so bili vsi kalusi sorte Sante kompaktni in trdnejši. Tudi pri listih se kljub nepravilnim oblikam izsečkov niso razraščali v različne smeri kot pri sorti Igor, ampak so bili bolj enotni.



Slika 16: Spremembe na izsečkih po 6 tednih rasti.

L: listi; I: internodiji; K: kontrolno gojišče; Z1, Z2, Z3 in Z4: gojišča z 2,85 μ M, 5,69 μ M, 8,54 μ M in 11,38 μ M ZR

Pri kontrolnih izsečkih ni prišlo do kalusiranja, večina listov, pa tudi kar nekaj internodijev je porjavelo v celoti ali vsaj na mestih razreza.

- 7 tednov

Izsečki, ki niso razvili kalusa, so propadli. Nekateri kalusi so že v prejšnjih tednih porjaveli in se niso spreminjali. Tisti, ki so se še naprej povečevali, so dosegli pokrovčke petrijevk in začeli rjaveti. Poganjki se še vedno niso razvili.

4.2 TRANSFORMACIJA

Transformirali smo rastline krompirja sorte Igor z namenom pridobiti čim več transformant s konstruktom za povečano ekspresijo krompirjevega cisteinskega proteinaznega inhibitorja (PCPI).

4.2.1 Potek transformacije

Rast bakterij v tekočem gojišču YEB je bila uspešna. Transformirane bakterije *A. t.* so se namnožile v 48 urah. Nekoliko dlje kot običajno so verjetno potrebovale, ker so bile pred prenosom v tekoče gojišče že daljši čas shranjene na ploščah pri nizki temperaturi. Uspešni transformaciji bakterij je sledila transformacija rastlin. Potek in rezultati regeneracije in transformacije izsečkov v tkivnih kulturah krompirja so prikazani v slikah in preglednicah (preglednica 3, 4, 5, 6; slike 18, 19, 20, 21, 22).

Preglednica 3: Potek transformacije sorte Igor

Dan	Postopek	Rezultat
1	Priprava bakterijske kulture <i>A. t.</i> z genom PCPI v pMDC32	<u>Rast bakterije</u> v gojišču YEB je bila uspešna.
3	Transformacija internodijskih izsečkov krompirja; priprava kontrolnih plošč	<u>Transformirali</u> smo 410 izsečkov; pripravili smo 60 kontrolnih izsečkov
3-16	Gojenje rastlinskih tkivnih kultur na regeneracijskem ali kontrolnem gojišču	70 % transformiranih izsečkov je <u>kalusiralo</u>
16	Prenos izsečkov na selekcijsko ali kontrolno gojišče	
30	Prenos izsečkov na sveže selekcijsko ali kontrolno gojišče	99 % transformiranih izsečkov je kalusiralo; pojav <u>zametkov poganjkov</u>
42		
55		
69		
84		<u>Razvoj poganjkov</u> (slika 21)
98		
112		
126		
141		

4.2.2 Kontrola transformacije

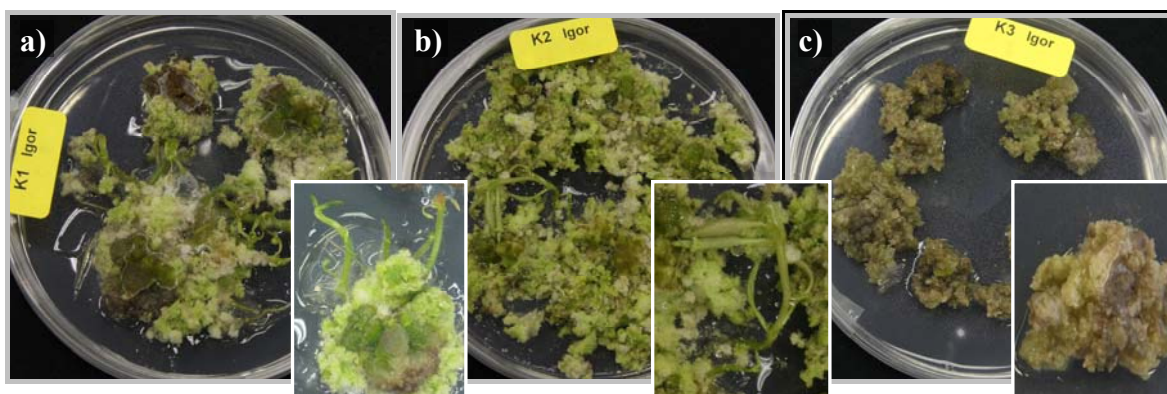
Pri kontroli regeneracije (K1) in pozitivni kontroli (K2) so bili rezultati pričakovani. Izsečki so kalusirali in tvorili poganjke (slika 17). Na ploščah K1 je bila rast kalusa

nekoliko slabša kot na K2. Na ploščah K2 ni propadel noben izseček, medtem ko jih je na ploščah K1 propadlo 5. Izsečki na ploščah negativne kontrole (K3) so tvorili kaluse, ki so se po 4-ih tednih povečali in porjaveli, nato pa po 6-ih tednih propadli. Kalusi, ki so se tvorili na kontrolnih ploščah K1 in K2 so bili rahli in so po 8-ih tednih razpadli ter prekrili celotno površino gojišča. Poganjki so se na K1 razvili po 8-ih tednih, na K2 pa šele po 10-ih tednih.

Rezultati kontrolnih plošč so prikazani v preglednici 4. Slika 17 prikazuje kontrolo regeneracije, pozitivno kontrolo za konstrukt in negativno kontrolo.

Preglednica 4: Rezultati kontrole transformacije sorte Igor

Kontrola	Št. izsečkov	Transformacija	Selekcija (higromicin)	Pričakovani rezultati	Dejanski rezultati
K1: kontrola regeneracije	20	✗	✗	Tvorba kalusov in poganjkov	Tvorba kalusov in poganjkov
K2: pozitivna kontrola	20	✓	✗	Tvorba kalusov in poganjkov	Tvorba kalusov in poganjkov
K3: negativna kontrola	20	✗	✓	Brez kalusiranja, brez poganjkov.	Izsečki začnejo kalusirati, le ti kmalu propadejo

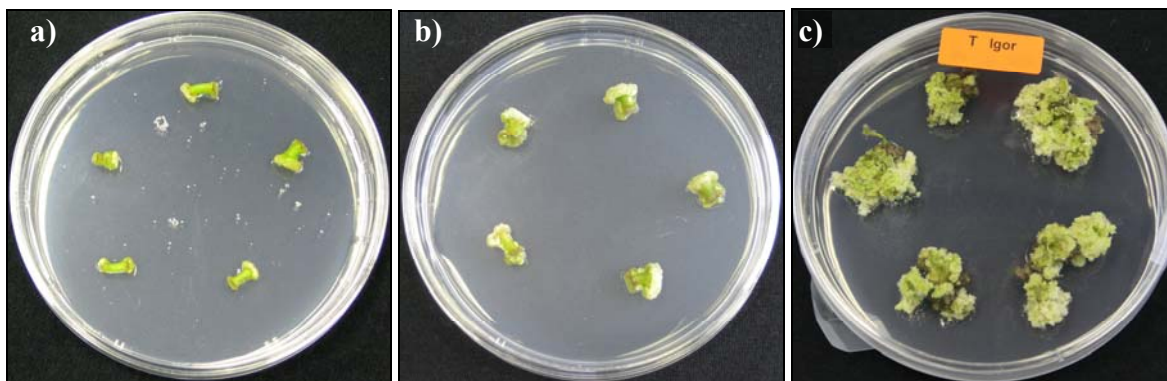


Slika 17: Kontrole transformacije sorte Igor.

a) K1 (netransformirani izsečki na gojišču brez higromicina); b) K2 (transformirani izsečki z genom PCPI na gojišču brez higromicina); c) K3 (netransformirani izsečki na gojišču s higromicinom)

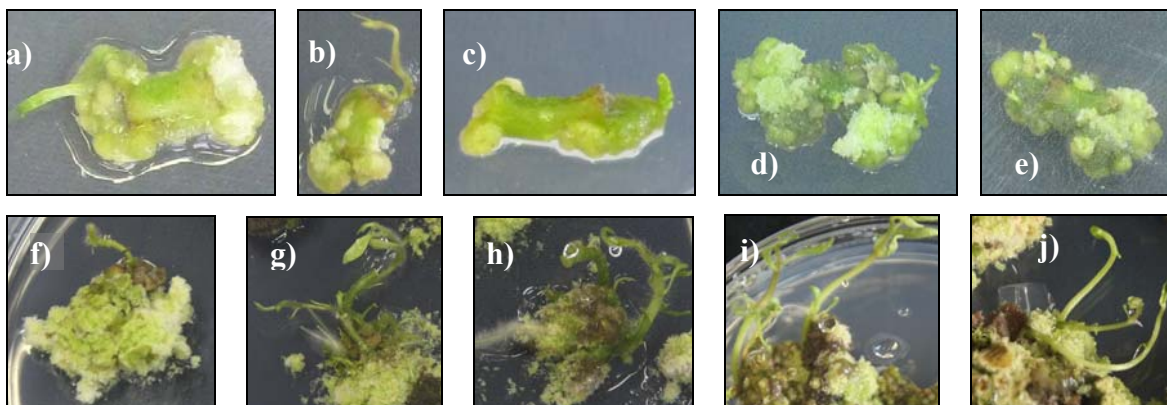
4.2.3 Tvorba kalusa in poganjkov

Izsečki krompirja sorte Igor, ki smo ga transformirali s konstruktom z genom PCPI, so začeli kalusirati po 2-eh tednih (slika 18). Kalusi so se začeli razvijati na več kot polovici vseh izsečkov.



Slika 18: Kalusi transformirane sorte Igor.
po: a) 2-eh tednih, b) 3-eh tednih rasti ter c) kalusi s poganjkom po 10-ih tednih rasti.

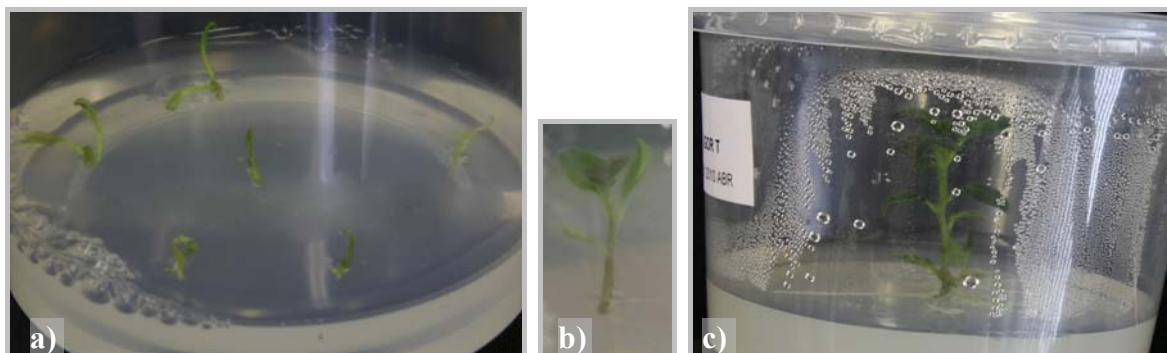
Po 4-ih tednih so kalusirali vsi poganjki razen enega, tri pa smo zaradi okužbe ločili na drugo ploščo. Na treh izsečkih so se pojavili zametki prvih poganjkov (slika 19 a, b in c), ki pa so bili še premajhni za prenos v posodice.



Slika 19: Zametki poganjkov in razviti poganjki transformirane sorte Igor.
a), b), c) po 2 tednih, d), e) po 4 tednih, f) po 6 tednih, g), h) po 10 tednih, i), j) po 12 tednih

Po 6-ih tednih so se kalusi še nekoliko povečali. Enega izmed poganjkov, katerega tvorbo smo opazili že po 4-ih tednih, smo prenesli v posodico. Štirje izsečki so razvili tvorbe, ki bi lahko bile zametki poganjkov. Propadli so izsečki, pri katerih smo že pred prenosom opazili okužbo, medtem ko so neokuženi iz iste plošče ostali intaktni. Po 8-ih tednih smo

opazili zametke poganjkov na 11-ih izsečkih. V posodico smo prenesli še en dovolj razvit poganjek.

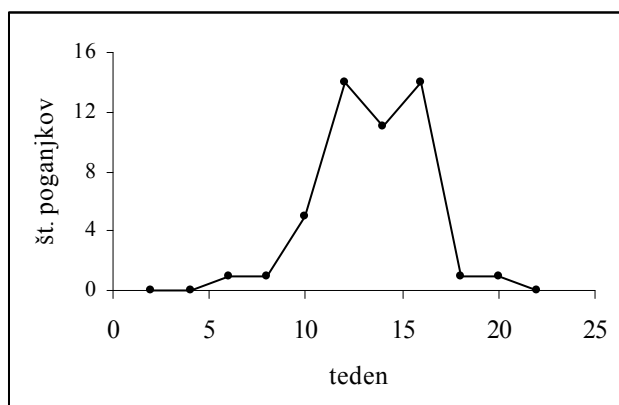


Slika 20: Rast poganjkov v posodicah.

a) Poganki na dan prenosa, b) prenesen poganjek po enem tednu rasti, c) transformirana rastlina z genom PCPI na selekcijskem gojišču za zakoreninjenje. Na slikah je vidna rast korenin.

Kalusi so se še povečali in po 10-ih tednih začeli rjaveti. Kljub temu so se razvili novi zametki poganjkov, čeprav nekateri niso imeli značilnih oblik in so bili bolj vilasto razrasli. V posodico smo prenesli 5 poganjkov, na 12 izsečkih pa so se razvijali novi poganjki. Eno ploščo smo morali zaradi okužbe odstraniti. Po 12-ih tednih smo v posodice prenesli še 14 poganjkov. Nekateri poganjki, ki smo jih opazili že v preteklih tednih, so se podaljšali in razrasli. Tako po 14-ih kot po 16-ih tednih smo opazili povečanje poganjkov, čeprav v manjši meri kot v preteklih tednih (slika 21). Pri vseh večjih kalusih je prihajalo do rjavenja. Nastajali so tudi novi poganjki. V posodicah so se poganjki ukoreninili in lepo razvijali, zato smo izvedli prenos v epruvete. Pri 18-ih tednih rasti smo opazili, da se je pod rjavo obarvanimi kalusi rjavo obarvala tudi podlaga pod njimi. Po 20-ih tednih smo v posodico prenesli še en šibek in majhen poganjek.

Po 20-ih tednih se je pri uporabi konstrukta z genom PCPI regeneriralo 48 poganjkov (slika 21). Večina poganjkov je nastala med 10-im in 16-im tednom rasti (slika 21).



Slika 21: Regeneracija transformiranih poganjkov iz internodijskih izsečkov
 Skupno število poganjkov je 48.

4.2.4 Uspešnost transformacije

Izmed 48 prestavljenih poganjkov, jih je 30 uspešno zraslo na gojišču za zakoreninjenje. Analiza regeneracije pri transformaciji je predstavljena v preglednici 5.

Preglednica 5: Regeneracija transformiranega krompirja sorte Igor

Število začetnih izsečkov	Regeneracija kalusov		Kalusi s poganjki		Odrezani deli poganjkov	Zakoreninjeni poganjki	
	št.	%	št.	%	št.	št.	%
410	409	100	37	9	48	30	62

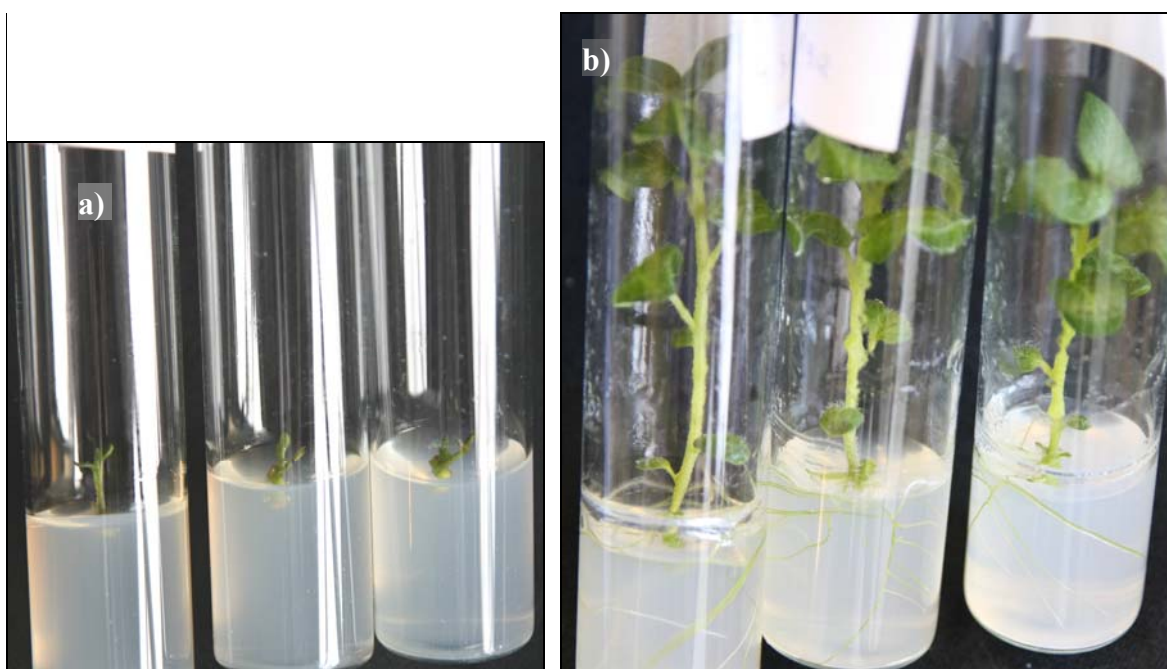
Izbrali smo najmočnejše in najlepše razvite poganjke, jih namnožili in prenesli v epruvete z gojiščem brez selekcije (slika 22). Tako smo pridobili 22 linij, ki so na tem gojišču uspešno zrasle. Pri vseh teh linijah smo preverili prisotnost promoterja 35S. Analizo so opravili na NIB-u. Z analizo smo potrdili prisotnost promoterja 35S pri 20 linijah z vnesenim konstruktom z genom PCPI. Po končanem poskusu smo izračunali uspešnost transformacije (1).

$$\text{Uspešnost transformacije} = \frac{\text{število pridobljenih transformant}}{\text{število testiranih izsečkov}} \times 100 \quad \dots (1)$$

Delež uspešno transformiranih rastlin s konstruktom z genom PCPI je prikazan v preglednici 6.

Preglednica 6: Uspešnost transformacije sorte Igor s konstruktom z genom PCPI

	Število vseh izsečkov	Število uspešno transformiranih rastlin	Transformacija [%]
Gen PCPI v pMDC32	410	20	5



Slika 22: a) Namnoževanje rastlin krompirja sorte Igor po transformaciji na gojišča brez selekcije
b) Transformirane rastline krompirja sorte Igor

Transformirane rastline so na NIB-u uporabili v nadaljnjih analizah funkcionalne genomike PCPI.

5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo želeli vzpostaviti najprimernejšo in najučinkovitejšo metodo regeneracije za krompir sort Igor in Sante, da bi kasneje lahko izvedli uspešno transformacijo. Transformirane rastline sorte Igor, ki smo jih pridobili se lahko uporabljajo za funkcionalno analizo gena za krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor (PCPI).

Krompir ima visoko hranilno vrednost in ni problematičen za pridelovanje, zato je ena izmed poljščin, ki se pogosto uporablja tako pri metodah konvencionalnega žlahtnjenja, kot pri biotehnoloških tehnikah izboljševanja rastlin (Banerjee in sod., 2006). Zaradi pomembnosti krompirja je prav, da poznamo podatke o primernosti sort za pridelovanje v določenih razmerah. Pri znanih sortah lahko ugotavljamo njihovo prilagodljivost na sušne razmere, bolezni in škodljivce, ki vsako leto povzročijo ogromno ekonomsko škodo. Z zbiranjem sort in prvimi križanji so tako že v začetku šestdesetih let nastale nove sorte, med njimi tudi Igor. Sorta Igor je izredno občutljiva na virus PVY^{NTN}. Kljub veliki priljubljenosti sorte, je virus povzročil njen umik iz pridelave (Kus M., 1992, cit. po Dolenc in sod., 2000). Sorta Sante pa je zelo razširjena in ena redkih proti virusu odpornih sort, vendar njeni gomolji niso tako široko uporabni in cenjeni kot so bili gomolji pri sorti Igor.

Regeneracijsko sposobnost začetnih izsečkov različnih sort krompirja so ugotavljali že v številnih študijah. Od sort, ki so pomembne v slovenskem prostoru, so bili postopki regeneracije in transformacije že večkrat opisani pri sorti Desirée, ki je zelo odziven v *in vitro* sistemih in daje pozitivne rezultate. Za sorti Igor in Sante imamo manj podatkov glede regeneracije in transformacije. V prvem delu našega eksperimenta smo v poskusu regeneracije rastlin krompirja sort Igor in Sante preizkusili vpliv izsečkov in sestave gojišč na regeneracijo poganjkov. Do tvorbe poganjkov ni prišlo, kljub temu pa smo na različnih gojiščih dobili statistično značilne razlike v tvorbi kalusa glede na sorto in tip uporabljenega izsečka (slika 11, 13).

Različni avtorji so uporabljali pri regeneraciji različne izsečke in dobivali tudi različne rezultate. V našem poskusu smo uporabili stebelne internodije in izsečke listov. Tudi pri objavljenih postopkih so bili ti izsečki pogosto uporabljeni (Demšar, 1998; Štrucl, 2000; Mlakar Medved, 2002; Mohorič, 2011). Pri naših izsečkih se je tvoril kalus tako pri izsečkih listov kot pri izsečkih internodijev. Izsečki sorte Igor so kalusirali močnejše kot izsečki sorte Sante (slika 11, 16). Pri sorti Sante je bilo več izsečkov z nizko stopnjo jakosti kalusiranja kot tistih z intenzivnejšim kalusiranjem (slika 15). Velikost kalusov je bila pri sorti Sante glede na tip izsečka podobna (slika 15), vendar je bil delež kalusiranih izsečkov večji pri izsečkih internodijev (slika 13). Kalusa pri obeh sortah ni tvorilo statistično značilno več izsečkov listov kot internodijev (slika 15). Po šestih tednih je bil delež

izsečkov, ki so tvorili kalus, če ne upoštevamo različnih gojišč, tako pri sorti Sante kot pri sorti Igor nekoliko večji pri izsečkih internodijev. Kalus pa je bil pri izsečkih sorte Igor večji pri listih kot pri internodijih (slika 15). Izsečki listov so pri sorti Igor tvorili kalus pri statistično značilno več izsečkih kot pri sorti Sante (slika 13).

Za tvorbo velikih kalusov pri listnih izsečkih sorte Igor je lahko več razlogov. Eden izmed njih bi lahko bila večja izpostavljenost površine in zmožnost infiltracije RRR. Prav večja površina bi lahko bila hkrati tudi razlog za največji delež listov, ki sploh niso kalusirali. Izvedba protokola je lažja z izsečki internodijev kot z občutljivejšimi in nežnejšimi izsečki listov. Le ti so namreč bolj izpostavljeni in bolj podvrženi poškodbam (Beaujean in sod., 1998). Prav tako smo opazili, da prihaja, najverjetneje zaradi večje in nežnejše površine, pri listih do nagubanja listne površine. Pri tem določeni deli lista izgubijo stik z gojiščem, kar bi lahko prav tako zmanjšalo kalusiranje. S povečanjem izpostavljene površine so poskusili tudi Beaujean in sod. (1998), ki so internodije vzdolžno prerezali in v povprečju dosegli 90 % uspešnost transformacije.

Pri poskusu regeneracije in transformacije sorte Igor je Mlakar Medved (2002) dobila večjo učinkovitost listnih izsečkov, pri drugih sortah pa je bila večja učinkovitost internodijev (Demšar, 1998; Štrucl, 2000). V omenjenih postopkih so uporabili različna gojišča, kar lahko vpliva na nastalo razliko. Pri poskusu, kjer je prišlo do večje učinkovitosti z izsečki listov, razlike v primerjavi z učinkovitostjo internodijev niso bile velike, medtem ko je bila v obratni situaciji razlika med deležem zakoreninjenih poganjkov, dobljenih iz listov, v primerjavi s tistimi iz internodijev večja. Demšar (1998) navaja 20 % zakoreninjenih poganjkov iz listnih delov in 57 % tistih iz internodijev, Štrucl (2000) pa 14 % in 31 % zakoreninjenih poganjkov iz listnih delov ter 62 % in 55 % tistih iz internodijev, odvisno od uporabljenega seva bakterije.

Tudi če izseček uspešno tvori poganjke, pa so ti lahko netransformirani. Visser in sod. (1989) so ugotovili, da izsečki listov in internodijev tvorijo primerljivo število poganjkov, ki so pri listih nastali hitreje, a večinoma niso bili transformirani. Možen razlog so pripisali hitrejšemu nastajanju, saj je polovica od vseh regeneriranih poganjkov nastala že po tretjini časa gojenja, pri internodijih pa šele po dveh tretjinah. V našem primeru smo manjši zamik pri hitrosti nastajanja kalusa opazili pri sorti Sante, kjer so bili kalusi po dveh tednih na izsečkih internodijev nekoliko slabše razviti kot pri listih (slika 11, 13). Po šestih tednih je bila razvitost kalusa boljša na internodijskih izsečkih (slika 13, 16). Pri listih sorte Sante je namreč prišlo do rjavenja kalusa in postopnega propadanja (slika 14). V primeru hitrejše tvorbe poganjkov bi tako lahko pri teh izsečkih dobili enako učinkovitost kot pri internodijih.

Velikost in delež kalusiranja se ni spreminjala zgolj glede na tip izsečka, ampak smo največje razlike opazili med posameznimi sestavami gojišč. Gojišča so vsebovala različne koncentracije ZR: 2,85 μM (Z1), 5,69 μM (Z2), 8,54 μM (Z3) in 11, 38 μM (Z4) ZR. Pogoji gojenja so bili pri uporabljenih koncentracijah Z2, Z3 in Z4 enaki, pri Z1 pa smo kot osnovo za transformacijo uporabili postopke iz članka Visser in sod. (1989).

Pri uporabljeni koncentraciji Z1 smo narezane izsečke predstavili na gojišče R3B, na katera smo predhodno položili dva filter papirja, navlažena s PACM gojiščem, ki vsebuje 2,4 D in kinetin. Po dveh dneh smo izsečke predstavili na poskusna regeneracijska gojišča na katera smo ostale izsečke predstavili že prvi dan. Visser in sod. (1989) so namreč ugotovili, da se učinkovitost transformacije precej poveča (iz 0,3 % na 2,3 % pri listih in iz 0,9 % na 8,1 % pri steblih), če so izsečke nekaj dni gojili na gojiščih brez selekcije. Tudi mi smo uporabili enak način predhodnega tretiranja izsečkov, nato pa smo jih predstavili na poskusno regeneracijsko gojišče, ki je vsebovalo 2,85 μM ZR; 10,74 μM NAA in 0,98 μM GA₃. Pri izsečkih na teh gojiščih smo dobili najslabše rezultate (slika 12, 13, 16). Pri koncentracijah Z2 in Z3 je kalusiralo statistično značilno več izsečkov kot pri koncentraciji Z1 (slika 13). Pri omenjenem protokolu (Visser in sod., 1989) so bile v članku uporabljene višje koncentracije RRR (npr. GA₃: 5 mg/l). Omenjen protokol so uporabili pri sorti Igor in izsečke z gojišča R3B prenašali na MS-gojišče z dodano enako koncentracijo ZR, a brez GA₃, vendar transformacija ni uspela. Protokol je bil uspešnejši pri sortah Desirée, Pentland in Sante, kjer so dobili transformirane rastline, vendar je tudi tu prišlo do največjega učinka pri sorti Desirée in najmanjšega pri sorti Sante (Mohorič, 2011).

Na gojiščih s koncentracijami Z2 in Z3 je kalusiralo statistično značilno več izsečkov kot pri gojiščih s koncentracijo Z1 (slika 13). Predvidevamo, da sta ti dve koncentraciji najbolj optimalni pri regeneraciji sorte Sante. Pri sorti Igor so bili na gojiščih Z2 in Z3 kalusi rahli, medtem ko so bili pri vseh izsečkih sorte Sante kompaktnjši in temnejši. Pri višjih koncentracijah (Z3 in Z4) je kalusiralo statistično značilno več izsečkov sorte Igor (slika 13). Glede na dobljene rezultate sklepamo, da ima ZR na kalusiranje sorte Sante manjši vpliv kot na sorto Igor, kjer smo pri najvišji koncentraciji Z4 dobili največji delež kalusiranih izsečkov, čeprav ni bilo statistično značilnih razlik z rezultati, dobljenimi pri koncentracijah Z2 in Z3.

Rezultati nekaj opravljenih študij so pokazali, da je bila uporaba protokola Webster in sod. (1994) zelo uspešna. Vendar je bila v nekaterih primerih uspešna zgolj regeneracija, ne pa tudi transformacija. V primeru testiranja različnih gojišč so ugotovili razlike v deležu regeneriranih poganjkov. Ker je stopnja učinkovitosti transformacije pri sorti Igor večinoma nizka, smo želeli poiskati protokol, ki bi poleg učinkovite regeneracije omogočil tudi učinkovito transformacijo. S tem namenom je bilo narejenih že več poskusov, pri

katerih so spreminjali koncentracijo uporabljenih RRR in antibiotikov ter kombinacije gojišč. Koncentracije, ki smo jih izbrali mi, očitno niso primerne, saj v našem primeru ni prišlo do tvorbe poganjkov. Vidimo pa, da je nastanek kalusa bistveno slabši pri izsečkih, kjer smo kot osnovo uporabili ugotovitve iz članka Visser in sod. (1989), kot pri tistih, kjer smo uporabili izsledke iz protokola Webster in sod. (1994). Iz dobljenih rezultatov in predhodnih izsledkov sklepamo, da je za regeneracijo izsečkov sorte Igor primernejša kombinacija RRR: NAA, GA₃ in ZR kot NAA, BAP, 2,4 D in kinetin na regeneracijskem gojišču in kombinacija RRR: NAA, GA₃ in ZR v primerjavi z ZR kot edinim RRR na selekcijskem gojišču. Ugotovitve se ujemajo tudi z rezultati drugih študij na sorti Igor (Demšar, 1998 Štrucl, 2000, Mohorič, 2011).

Pri transformaciji sorte Igor je Demšar (1998) izsečke iz regeneracijskega gojišča MS30 (1,074 μM NAA, 0,052 μM GA₃ in 8,537 μM ZR) po 2-eh dneh prenesla na selekcijsko gojišče MS30 (1,074 μM NAA, 0,052 μM GA₃, 8,537 μM ZR s Km in Cf). Pri izsečkih drugih gojišč niso uporabili, poganjke pa so prenesli v MS30-gojišče s selekcijo. Učinkovitost te transformacije je bila za gen A pri listnih izsečkih 2 %, pri internodijih 10 %, za gen B pa pri listnih izsečkih 24 % in pri internodijih 42 %. Učinkovitost transformacije je bila podobna še v enem izmed poskusov, kjer so bili pogoji gojenja obeh poskusov primerljivi (uporabljena nekoliko nižja koncentracija ZR), enaki pa so bili tudi geni, s katerimi so transformirali rastline. V tem primeru je bila učinkovitost transformacije za gen A pri listnih izsečkih 2,5 %, pri internodijih 30 %, za gen B pa pri listnih izsečkih 14 % in pri internodijih 30 % (Štrucl, 2000).

Da bi povečali učinkovitost transformacije so poskušali še z drugimi načini (Mlakar Medved, 2002). V enem izmed poskusov se izsečki listov, ki so bili ves čas na gojišču MS30 z ZR (brez NAA in GA₃) sploh niso regenerirali. Največji delež regeneracije poganjkov so dobili iz listnih izsečkov, ki so bili 2 tedna na trdem gojišču MS30 z 8,54 μM ZR ali z 7,11 μM ZR, 1,07 μM NAA in 0,06 μM GA₃, ter nato preneseni na trdno gojišče MS30 z 8,54 μM ali 8,54 μM ZR. Delež regeneracije je bil vsaj 85 % iz listov ter vsaj 80 % iz internodijev. Uporaba protokola pri transformaciji sort Desirée in Igor ni dala tako dobrih rezultatov. V treh od štirih serij je prišlo zgolj do kalusiranja ne pa do tvorbe poganjkov. Pozitivne rezultate so dobili samo v enem primeru pri katerem so čas regeneracije na selektivnih gojiščih za indukcijo kalusa (z 7,11 μM ZR, 1,07 μM NAA, 0,06 μM GA₃, Km in Cf) skrajšali iz 4-ih na 2 tedna in gojenje nadaljevali na selektivnem gojišču brez NAA in GA₃. Pa tudi v tem primeru je transformacija sorte Igor uspela samo pri izsečkih iz listnih delov, ne pa iz internodijev.

Protokol Webster in sod. (1994) so uporabili tudi v študiji, kjer so pri sortah Desirée in Igor proučevali učinkovitost regeneracije pri različnih izsečkih krompirja (deli listov,

internodijev, petiol) (Berljak in sod., 1995). Že regeneracija je bila bistveno slabša pri sorti Igor. Uporabili so trdno MS30-gojišče z dodanimi različnimi koncentracijami ZR in najboljše rezultate dobili z 7 μM ZR, 1 μM NAA in 0,1 μM GA₃. Pri teh pogojih je bila regeneracija pri internodijih 100 %, pri listih pa 9 %. Pri istih pogojih je bila regeneracija sorte Desirée bistveno učinkovitejša na vseh testnih gojiščih. Transformacija je bila uspešna pri internodijih sorte Desirée, pri sorti Igor pa so iz 450 izsečkov pridobili en sam transformiran poganjek (0,2 %).

Glede na naše rezultate poskusne regeneracije bi glede izsečkov lahko rekli, da je pri sorti Sante za regeneracijo primernejša uporaba internodijev in koncentracija ZR 5,69 μM ali 8,54 μM , pri sorti Igor pa bi zaradi boljšega kalusiranja raje izbrali izsečke listov, čeprav se je pri listih pojavila tudi najvišja stopnja tistih, ki sploh niso kalusirali in koncentracijo ZR 8,54 μM ali 11,38 μM . Z upoštevanjem rezultatov zgoraj omenjenih študij se moramo zavedati, da tudi pri visokem deležu tvorbe kalusa (do katere je prihajalo v teh primerih) transformacija ni nujno uspešna. Zaradi tega smo v nadaljevanju pri transformaciji uporabili protokol, ki se je do sedaj izkazal kot najbolj učinkovit pri transformaciji sorte Igor.

Za doseganje večje učinkovitosti transformacije sorte Igor bo potrebno nadaljnje preverjanje modifikacij gojišča z namenom hitrejše in učinkovitejše regeneracije. Očitno je uporaba ZR kot citokina v regeneracijskem gojišču ugodna, kar se je izkazalo tudi v zgoraj omenjenih študijah. Koncentracije ZR, ki ugodno vplivajo na nastanek poganjkov so različne, vendar primerljive s tistimi, ki smo jih uporabili v našem poskusu (Yadav, 1995; Beaujean, 1998). Zeatin v gojišču je v študijah povzročil skrajšanje faze kalusiranja in pospešil nastajanje poganjkov, vendar se vpliv na zvišanje stopnje organogeneze kalusa pri posameznih sortah razlikuje (Kumra, 2006; Van Staden in sod., 2008). Iz teh razlogov pričakujemo, da uporabljena koncentracija ZR ni vplivala na to, da v našem poskusu ni prišlo do tvorbe poganjkov. To potrjuje tudi rezultat, ki smo ga dobili s transformacijo, kjer smo uporabili enako koncentracijo ZR kot v enem od poskusnih gojišč. Tudi s koncentracijami GA₃, primerljivimi s tisto, ki smo jo uporabili v našem poskusu, je pri drugih študijah prišlo do razvoja poganjkov. Pri nekaterih je bila celo določena kot optimalna koncentracija za tvorbo in rast poganjkov (Jarret in sod., 1980; Haque in sod., 2009). Tudi pri uporabi 3-krat večje koncentracije GA₃ je prišlo do povečanja rasti poganjkov pri nekaj sortah krompirja. V kombinaciji z nizko koncentracijo NAA (0,1 mg/l) pa se je precej povečalo število poganjkov. Ker giberelinom pripisujejo vlogo podaljševanja stebel, avksini pa v intaktnih rastlinah običajno ne vzpodbujajo nastanka poganjkov, so v študiji navedli, da so avksini potrebni v nizkih koncentracijah za povečanje vpliva GA₃ (Miller in sod., 1985). Tako je pomembnejši vpliv na rezultat našega poskusa verjetno imela uporabljena koncentracija NAA. Predvsem je za nastanek

poganjkov iz kalusa pomemben večji delež citokininov kot avksinov (Kumra, 2006; Van Staden in sod., 2008). S spremenjenimi koncentracijami smo v poskusnem gojišču uporabili razmerje citokinini:avksini 0,8:1 kar je občutno manj kot razmerje 8:1, ki smo ga uporabili pri transformaciji (3.1.5.1, 3.1.5.2). Tako lahko upravičeno sklepamo, da je na zaviranje tvorbe poganjkov vplivala previsoka koncentracija NAA, ki ne omogoča nastanka poganjkov pri sorti Igor. Regeneracija bi bila verjetno uspešnejša, če bi uporabili manjšo koncentracijo avksina oziroma povečali razmerje citokinini/avksini.

Štiri vrste rodu *Agrobacterium* povzročajo neoplastične tvorbe pri nekaj sto različnih rastlinskih vrstah. Med njimi je najbolj pomembna in preučevana prav bakterija *A. tumefaciens*, katero smo uporabili tudi v našem postopku transformacije. Z odkritjem sposobnosti transformacije gostitelja s pomočjo tvorbe tumorjev je ta bakterija postala modelni sistem za horizontalne prenose genov in najpomembnejše orodje za transformacijo rastlin. Desetletja raziskav so omogočila možnost vnosa in stabilne integracije praktično kateregakoli gena (Păcurar in sod.).

Za razvoj učinkovitih metod transformacije je pogosto potrebnih več let raziskovanja. Postopek razvoja transgenih rastlin namreč obsega več pomembnih korakov: razvoj zanesljivega regeneracijskega sistema tkivnih kultur, priprava genskega konstrukta in transformacija s primernim vektorjem, učinkovita metoda transformacije za vnos genov v rastline, namnožitev transgenih rastlin, molekularna in genetska karakterizacija transgenih rastlin, prenos genov v pomembne sorte s pomočjo konvencionalnega žlahtnjenja in ocena vpliva transgenih rastlin na zmanjšanje biotskega ali abiotskega stresa brez škodljivega vpliva na okolje in ostale organizme (Sharma in sod., 2005).

V izvedenem postopku transformacije, smo uporabili vektor pMDC32, ki se uporablja za Gateway kompatibilno rekombinacijo, kjer ni potrebna uporaba restriksijskih encimov in ligaz. Ker omenjeni vektor nosi na delu, ki se je prenesel v rastlino zapis za odpornost na higromicin, smo za selekcijo transformant uporabljali ta antibiotik. Transformirana bakterija je prav tako nosila odpornost proti higromicinu, kar ji je omogočalo rast na selekcijskem gojišču. Ker nismo želeli, da bi prišlo do okužb s transformiranimi bakterijami smo transformirane izsečke prenašali na gojišče z antibiotikom cefotaksim, ki preprečuje njeno rast.

Prvi kalusi so se tvorili že 14 dni po prestavitvi na selekcijsko gojišče, po 4-ih tednih pa so kalusirali vsi izsečki. Rezultati na kontrolnih ploščah so bili pri kontroli regeneracije in pozitivni kontroli pričakovani. Kljub temu se je na plošči kontrole regeneracije (netransformirane rastline) razvilo precej več poganjkov kot na plošči s transformiranimi rastlinami brez selekcije. Iz tega sklepamo, da je vnesen konstrukt vplival na zmanjšano

sposobnost tvorbe poganjkov. Rezultati na negativni kontroli niso bili popolnoma v skladu s pričakovanji. Na tej plošči namreč nismo pričakovali niti tvorbe kalusa niti poganjkov. Do razvoja kalusov pa je prišlo, čeprav so le ti kmalu propadli. Nastanek kalusov na izsečkih negativne kontrole na selekcijskem gojišču s higromicinom bi si lahko razlagali s premajhnim selekcijskim pritiskom zaradi prenizke koncentracije higromicina (4 mg/l; 7,58 μ M). Do tega je prišlo pri transformaciji sorte Desirée (Petti in sod., 2009), kjer so uporabljali precej nizko koncentracijo kanamicina (0,05 mg/l). Prav tako je prišlo do povečanja lažno pozitivnih transformant oziroma tako imenovanih pobeglih poganjkov. Franklin in sod. (2007) so izmed 6-ih uporabljenih koncentracij kot najbolj optimalno koncentracijo higromicina določili 20 mg/l. Ker smo tudi pri našem poskusu dobili dva poganjka, kjer ni bila potrjena prisotnost promotorja 35S, bi torej glede na petkrat nižjo koncentracijo od določene optimalne lahko sklepali, da je bila za to odgovorna nizka koncentracija higromicina. Zanimivo pa je, da Lenarčič (2010) prav tako navaja kalusiranje na negativni kontroli in številne pobegle poganjke, čeprav je delala s sorto Desirée, vendar je vnašala konstrukt z istim genom, uporabila pa je petkrat večjo koncentracijo higromicina kot mi. Glede na rezultate lahko sklepamo, da na uspešnost transformacije vpliva tudi genski konstrukt, ki ga vnašamo. Poganjka, ki nista vsebovala promotorja 35S sta rasla na gojišču s selekcijo, zato je odsotnost promotorja nepričakovana. Pobegle poganjke sicer navajajo tudi v številnih drugih študijah, tudi pri sorti Igor in tudi pri visokih koncentracijah uporabljenih antibiotikov. Pojav razlagajo z neuspešnim izražanjem tujega gena, neučinkovito selekcijo, kjer transformirane celice obdajo netransformirane in jih zaščitijo, manjšim izražanjem gena za odpornost,... (Visser, 1988; Berljak, 1995; Lenarčič, 2010).

Uspešnost transformacije v naši raziskavi je bila 5 %. Pri vseh linijah, ki so zrasle na gojiščih s selekcijo smo preverili prisotnost promotorja 35S. Če je bil promotor prisoten, to pomeni, da je bil konstrukt uspešno vstavljen v genom in je bila rastlina uspešno transformirana. Konstrukt z genom PCPI smo dokazali v 20 od 22 rastlin. Glede na število začetnih izsečkov (410) uspešnost naše transformacije ni bila visoka, vendar je bila v študijah s sorto Igor tudi že nižja (0,2 % (Berljak in sod., 1995), 2 % (Demšar, 1998), 2,5 % (Štrucl, 2000)) ali pa tudi povsem neuspešna (Mohorič, 2011). So pa bile tudi s sorto Igor dosežene učinkovitejše transformacije (50 % (Mlakar Medved, 2002), 42 % (Demšar, 1998), 30 % (Štrucl, 2000)), vendar z uporabo drugega konstrukta.

S transformacijo krompirja sorte Igor smo pridobili 20 zakoreninjenih transgenih rastlin z dokazano prisotnostjo vstavljenih genov, ki so primerne za nadaljnje študije.

6 SKLEPI

- Pri dvo-stopenjski metodi regeneracije krompirja sort Igor in Sante je indukcija kalusa na regeneracijskem gojišču učinkovitejša z uporabo kombinacije rastnih regulatorjev NAA, GA₃ in ZR kot pa z uporabo NAA, BAP, 2,4 D in Kn.
- Regeneracija poganjkov iz kalusov krompirja sort Igor in Sante s kombinacijo koncentracij rastnih regulatorjev: NAA (10,74 μM), GA₃ (0,98 μM) in ZR (2,85 μM – 11,38 μM) ni uspela.
- Za uspešno regeneracijo poganjkov iz kalusa krompirja sorte Igor je zelo pomembno povečano razmerje med citokinini in avksini.
- Glede na delež in velikost nastalega kalusa so pri sorti Sante najprimernejši izsečki internodiji, pri sorti Igor pa listni deli.
- Glede na delež in velikost nastalega kalusa je za regeneracijo sorte Sante najučinkovitejša koncentracija ZR med 5,69 μM in 8,54 μM, za sorto Igor pa med 8,54 μM in 11,38 μM.
- Plazmidi pMDC32 so primerni za uporabo pri transformaciji in za izražanje gena PCPI v transformiranih rastlinah krompirja sorte Igor
- Izbran postopek transformacije se je izkazal kot primeren za transformacijo krompirja sorte Igor in omogoča genski prenos, selekcijo in regeneracijo, vendar z relativno nizko učinkovitostjo.
- S postopkom transformacije smo pridobili 20 transformiranih rastlin krompirja z vstavljenim genom PCPI.

7 POVZETEK

Krompir je komercialno in gospodarsko pomembna poljščina, ki je razširjena po vsem svetu. Na pridelek vplivajo številni abiotski in biotski dejavniki, zaradi česar je vključen v številne *in vitro* genetske študije. Predpogoj za študije transformiranih rastlin je pridobitev učinkovitega protokola za regeneracijo rastlin.

Regeneracija rastlin s pomočjo tkivnih kultur predstavlja pomemben del biotehnologije. Postopek namreč omogoča izboljšanje obstoječih in nastanek novih sort. V tkivnih kulturah lahko manipuliramo z rastlinskimi rastnimi regulatorji, predvsem so pri regeneraciji pomembni citokinini in avksini. Z uporabo rastnih regulatorjev v tkivnih kulturah ugotavljamo njihove učinke in odkrivamo spremembe pri uporabi različnih kombinacij le-teh.

V našem delu smo želeli preučiti vpliv začetnega izsečka in gojišč z različnimi koncentracijami rastlinskih rastnih regulatorjev na regeneracijo krompirja sort Igor in Sante, ter nato s transformacijo pridobiti transgene linije krompirja z vnesenim konstruktom za povečano ekspresijo gena PCPI.

Ugotovili smo, da je pri dvo-stopenjski metodi regeneracije krompirja sort Igor in Sante indukcija kalusa na regeneracijskem gojišču učinkovitejša z uporabo kombinacije rastnih regulatorjev NAA, GA₃ in ZR kot pa z uporabo NAA, BAP, 2,4 D in KIN. Tvorbe poganjkov pri krompirju sort Igor in Sante s kombinacijo koncentracij rastnih regulatorjev: NAA (10,74 μM), GA₃ (0,98 μM) in ZR (2,85 μM – 11,38 μM) ni bilo. Kot najprimernejše izsečke za razvoj kalusa smo določili internodije pri sorti Sante in listne dele pri sorti Igor, kot najučinkovitejšo koncentracijo ZR pa pri sorti Sante 5,69 μM ter pri sorti Igor 8,54 μM in 11,38 μM ZR. Glede na rezultate našega in predhodno opravljenih poskusov smo ugotovili, da je bilo razmerje med uporabljenimi citokinini in avksini neprimerno, zato je prišlo do intenzivnega razvoja kalusa, ne pa tudi do razvoja poganjkov. Zato smo v nadaljevanju pri transformaciji uporabili drugačna razmerja rastnih regulatorjev.

Za transformacijo krompirja sorte Igor smo uporabili gojišče s kombinacijo rastnih regulatorjev: 8,54 μM ZR, 0,05 μM GA₃ in 1,07 μM NAA. Pridobili smo transformirane rastline z dokazano prisotnostjo vstavljenih genov za krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor (PCPI), ki so primerne za nadaljnje analize genov.

Študije funkcije genov in proteinov, ki jih kodirajo so nujne za razumevanje lastnosti posamezne rastline. Analize genov nam omogočajo boljše poznavanje biosinteznih, metabolnih in obrambnih mehanizmov krompirja. Tako odkrivamo potencialne tarče za

genske manipulacije z namenom spreminjanja in izboljšanja lastnosti rastlin. S transgenimi rastlinami smo prispevali orodje za preučevanje krompirja sorte Igor, ki je bila pred okužbo z obročkasto nekrozo gomoljev ena izmed ekonomsko in gospodarsko najpomembnejših sort v Sloveniji.

8 VIRI

- Baebler Š. 2007. Sistemska biologija. V: GENIalna prihodnost – genetika, determinizem in svoboda, Ljubljana, 4.-5. oktober 2007., Strugulc Krajšek S., Popit T., Vičar M. (ur.), Ljubljana, Zavod RS za šolstvo in Ministrstvo za šolstvo in šport, Založba Zavoda RS za šolstvo (zbornik prispevkov): 249 str.
<http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/baebler-clanek.pdf> (10.05.2011)
- Balme-Sinibaldi V., Tribodet M., Croizat F., Lefeuvre P., Kerlan C., Jacquot E. 2006. Improvement of *Potato virus Y* (PVY) detection and quantitation using PVY^N- and PVY^O- specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 134: 261-266
- Banerjee A. K., Prat S., Hannapel D.J. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science*, 170: 732–738
- Bashir K., Rafiq M., Fatima T., Husnain T., Riazuddin S. 2004. Hygromycin based selection transformation in a local inbred line of *Zea mays* (L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7,3: 318-323
- Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnell, Sangwan-Norreel B.S. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. 49, 326: 1589-1595
- Berljak J., Štrukelj B., Žel J. 1995. The regeneration capability of different explants for the transformation of potato *Solanum tuberosum* L. cv. *Desirée* and cv. *Igor*. *Acta Chimica Slovenica*. 42: 391-397
- Bhojwani S.S., Razdan M.K. 1996. *Plant tissue culture: theory and practise*, a revised edition. Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 767 str.
- Bohanec B. 2004 *Osnove rastlinske biotehnologije*. V: *Gensko spremenjena hrana*. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Constabel. F., Shyluk J.P. 1994. Initiation, nutrition, and maintenance of plant cell and tissue cultures. V: *Plant cell and tissue culture*. Vasil I.K., Thorpe T.A. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 3-16
- Curtis M.D., Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, 103: 462-469
- Dermastia M., Ravnihar M. 1996. Altered cytokinin pattern and enhanced tolerance to potato virus Y^{NTN} in the susceptible potato cultivar (*Solanum tuberosum* cv. *Igor*) grown *in vitro*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48,1: 65-71

- Demšar, T. 1998. Testiranje odpornosti transgenih rastlin tobaka in krompirja na virus PVY^{NTN}. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Dobnik D. 2009. Kako nastane gensko spremenjena rastlina. *Življenje in tehnika*, 40, 9: 46-50
<http://www.nib.si/images/stories/osebnestrani/daviddobnik/david1.pdf> (28.08.2011)
- Dolenc J., Vilhar B., Dermastia M. 2000. Systemic infection with potato virus Y^{NTN} alters the structure and activity of the shoot apical meristem in a susceptible potato cultivar. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56: 33-38
- FAOSTAT-Crops. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations (17.05.2011).
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (16.08.2011)
- Franklin G., Oliveira M., Dias A. C. P. 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science*, 172, 6: 1193-1203.
- Gebhardt C., Schmidt R., Schneider K. 2005. Plant genome analysis: The state of the art. *International Review of cytology*, 247: 223-284
- George E.F. 2008. Plant tissue culture procedure-background. V: Plant propagation by tissue culture. The background. 3rd edition. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. (eds.). Dordrecht, Springer: 1-28
- González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Oliver-Salvador M. del C. 2011. Production of plants proteases *in vivo* and *in vitro* – A review. *Biotechnology Advances*, 29: 983-996
- 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., Kennedy G.G. (eds.). New York. Springer: 195-221
- Haque A.U., Sammad M.A., Shapla T.L. 2009. In vitro callus initiation and regeneration of potato. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 34, 3: 449-456
- Hinrichs J, Berger S, Shaw J.G. 1998. A hypersensitive response-like mechanism is involved in resistance of potato plants bearing the Ry_{sto} gene to the potyviruses potato virus Y and tobacco etch virus. *Journal of General Virology*, 79: 167-176
- Hoa T.T.C., Bong B.B. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice embryogenic suspension cells using phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as a selectable marker. *Omonrice*, 10: 1-5

- Hussain I., Muhammad A., Chaudhry Z., Asghar R., Saqlan Naqvi S.M., Rashid H. 2005. Morphogenic potential of three potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from diverse explants, a prerequisite in genetic manipulation. *Pakistan Journal of Botany*, 37, 4: 889-898
- International year of the potato. 2008. FAO (2008)
<http://www.potato2008.org/en/world/index.html> (16.08.2011)
- Jaret R.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1981. Gibberellic acid regulation of adventitious shoot formation from tuber disc of potato. *In Vitro*, 17, 9: 825-830
- Jasmin S., Nasiruddin K.M., Begum R., Talukder S.K. 2003. Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2,12: 936-940
- Javornik B. 2004. Tržna pridelava spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Jha T.B., Ghosh B. 2005. Plant tissue culture. Basic and applied. Himayatnagar, India, Universities press: 216 str.
- Kmetijski inštitut Slovenije. 2011. Svetovanje kmetom in strokovni javnosti, strokovna predavanja. Sortni izbor krompirja v letu 2011 (2011).
http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/POL/Sel-center-krompir/sortni_izbor_2011.pdf
(12.10.2011)
- Kumra K. 2006. Studies on phytohormone requirements for regeneration from potato explants. A thesis report.
<http://www.google.si/url?q=http://dspace.thapar.edu:8080/dspace/bitstream/123456789/96/1/3040011.pdf&ei=F1q9TuKTM8ylsAa2peivBw&sa=X&oi=unauthorizedredirect&ct=targetlink&ust=1321034015842947&usg=AFQjCNGWpVw-gwOy-E1iiDogJgh9Hd0nuA> (19.10.2011)
- Leader D.J. 2004. Transcriptional analysis and functional genomics in wheat. *Journal of Cereal Science*, 41, 2: 149-163
- Lenarčič A. 2010 Primerjava različnih metod za spreminjanje izražanja genov v krompirju (*Solanum tuberosum*) sorte Désirée. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biotehnologijo
- Loyola-Vargas V.M., De-la-Peña C., Galaz-Ávalos R.M., Quiroz-Figueroa F.R. 2008. Plant tissue culture. V: Molecular biotechnology handbook. Walker J.M., Rapley R. (eds.). 2nd edition. Totowa, NJ, Humana Press: 875-904
- Machakova I., Zazimalova E., George E.F. 2008. Plant growth regulators I: Auxins, their analogues and inhibitors. V: Plant propagation by tissue culture. The background. 3rd edition. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. (eds.). Dordrecht, Springer: 175-204

- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Ravnikar M., 2004. Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 293-300
- Michaud D., Vrain T.C. 1998. Expression of recombinant proteinase inhibitors in plants. V: *Methods in Biotechnology. Vol.3. Recombinant proteins from plants. Production and isolation of clinically useful compounds.* Cunningham C., Porter J.R. (eds.). Totowa, NY, Humana Press Inc: 49-64
- Miller P.R., Amirouche L., Stuchbury T., Matthews S. 1985. The use of plant growth regulators in micropropagation of slow-growing potato cultivars. *Potato Research*, 28: 479-486
- Mlakar Medved M. 2002. Regeneracija in transformacija krompirja *Solanum tuberosum* L. *in vitro* Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Mohorič B. 2011. Postopki regeneracije rastlin pri genski transformaciji. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Molla M.M.H., Nasiruddin K.M., Al-Amin M., Khanam D., Salam M.A. 2011 Effect of growth regulators on direct regeneration of potato. *IPCBE*, 12: 205-210
- Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., George E.F. 2008. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors. *Miscellaneous compounds. V: Plant propagation by tissue culture. The background.* 3rd edition. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. (eds.). Dordrecht, Springer: 227-282
- Mosolov V.V., Valueva T.A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 3: 227-246
- Mosolov V.V., Valueva T.A. 2008. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, 3: 261-269
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15,3: 473-497.
- Nassar A.M.K. 2009. Use of somatic embryogenesis in potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Russet Burbank improvement. Doctoral dissertation. Montreal, McGill University. Department of plant science: 193 str.
- Neumann K.-H., Kumar A., Jafargholi I. 2009. Plant cell tissue culture-A tool in biotechnology. Basic and application. Berlin, Heidelberg, Springer: 333 str.
- Păcurar D.I., Thordal-Christensen H., Păcurar M.L., Pamfil D., Botez C., Bellini C. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, (v tisku) doi: 10.1016/j.pmpp.2011.06.004

- Petti C., Wendt T., Meade C., Mullins E. 2009. Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 3: 301–306.
- Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2005-2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 3-5: 237-247
- Pompe-Novak M., Poljšak-Prijatelj M., Popovič T., Štrukelj B., Ravnikar M. 2002. The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 2: 71-78
- Popescu C.F., Vişoiu E., Buciumeanu E., Teodorescu A., Gheorghe R.N., Tanasescu C., Ciocirlan C.N. 2010 From plant tissue culture to modern biotechnology at the national research and development institute for biotechnology in horticulture Stefanesti: achievements and prospect. *Romanian Biotechnological Letters*, 15, 2: 78-87
- Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 149-164
- Rupnik S. 1998. Nekaj zanimivosti iz pridelovanja krompirja. *Loški razgledi*, 45: 307-316
- Sathyanarayana B.N., Varghese D.B. 2007. *Plant tissue culture. Practices and new experimental protocols*. New Delhi, I.K.International Pvt. Ltd.: 316 str.
- Sharma K.K., Bhatnagar-Mathur P., Thorpe T. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. In *Vitro Cellular & developmental Biology – Plant*, 41: 102-112
- Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. 2008. *The genetic manipulation of plants*. 2nd edition. New York, Oxford University Press: 372 str.
<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199282616/ch02.pdf> (10.08.2011)
- Stepan-Sarkissian G. 1990. Selection of media for tissue and cell culture. V: *Methods in molecular biology*. Vol.6. *Plant cell and tissue culture*. Pollard J.W., Walker J.M. Griffin L.D.(eds.). Totowa, NJ, Humana Press: 1-12
- Štrucl R. 2000. Transformacija Tobaka (*Nicotiana tabacum*) cv. Samsun in krompirja (*Solanum tuberosum* L.) cv Igor. *Diplomsko delo*. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Tavazza R., Tavazza M., Ordas R.J., Ancora G., Benvenuto E. 1988. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): An efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Science*, 59: 157-181
- Thorpe T.A. 1994. Morphogenesis and Regeneration. V: *Plant cell and tissue culture*. Vasil I.K., Thorpe T.A. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 17-37

- Thorpe T., Stasolla C., Yaung E.C., de Klerk G.-J., Roberts A., George E.F. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. V: Plant propagation by tissue culture. The background. 3rd edition. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. (eds.). Dordrecht, Springer: 115-174
- Tyagi R., Yadav P.R. 2006. Biotechnology of plant tissue. New delhi, Discovery publishing house: 256 str.
- Van Staden J., Zazimalova E., George E.F. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. V: Plant propagation by tissue culture. The background. 3rd edition. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. (eds.). Dordrecht, Springer: 205-226
- Vervliet G., Holsters M., Teuchy H., Van Montagn M., Schell J. 1975. Characterization of different plaque forming and defective temperature phages in *Agrobacterium* strains. Journal of general Virology, 26: 33-48
- Visal S., Taylor M.A.J., Michaud D. 1998. The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. FEBS Letters, 434, 3: 401-405
- Visser R.G.F., Jacobsen E., Hesselings-Meinders A., Schans M.J., 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
- Walden R., Schell J. 1990. Techniques in plant molecular biology - progress and problems. European Journal of Biochemistry, 192: 563-567
- Webster, K.D., Reavy B., Barker H. 1994. An introduction to *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation techniques (A handbook methods used in the virology department). SCRI, 44 str.
- Zhou Y.H., Peng Y.H., Lei J.L., Zou L.Y., Zheng J.H., Yu J.Q. 2004. Effect of popato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. Photosynthetica, 42, 3: 417-423
- Zupan. R., Zambryski P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiology, 107: 1041-1047
- Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah-vnos genov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 299-308
- Žel J. 2007. Gensko spremenjene rastline. V: GENIalna prihodnost – genetika, determinizem in svoboda, Ljubljana, 4.-5. oktober 2007., Strugulc Krajšek S., Popit T., Vičar M. (ur.), Ljubljana, Zavod RS za šolstvo in Ministrstvo za šolstvo in šport, Založba Zavoda RS za šolstvo (zbornik prispevkov): 249 str.
www.zrss.si/bzid/geni/pdf/zel-clanek.pdf (10.05.2011)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Jani Žel, da mi je omogočila opravljanje diplomske naloge na Nacionalnem inštitutu za biologijo, za vse strokovne nasvete, posebej pa za razumevanje in prijazne besede. Prav tako bi se rada zahvalila prof. dr. Marjani Regvar za zaupanje in doc. dr. Jasni Dolenc Koce za oblikovne nasvete in koristne napotke. Obema gre zahvala za pregled diplomske naloge. Zahvala gre tudi Davidu Dobniku za uvajanje v delo, pomoč pri delu v laboratoriju in vse koristne nasvete.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

Hvaležna sem sošolkam zaradi katerih je bil študij biologije lažji, zabavnejši in bo ostal nepozaben zaradi prijateljstev, ki so postala del mojega življenja.

Posebna zahvala gre Alešu za potrpežljivost in vlivanje moči v trenutkih, ko nisem verjela vase. Nič manjša zahvala ne gre sestri Petri, ki mi je bila vzor in motiv za poskušanje doseganja zahtevnejših ciljev.

Iz srca se zahvaljujem mami in atu za vso podporo in razumevanje, predvsem pa zato, da sta mi omogočila doživeti študijska leta. V vseh mojih vzponih in padcih sta verjela vame, me optimistično spodbujala ter mi nesebično pomagala, da sem dosegla to, kar sem si želela.

Hvala vsem, ki ste mi stali ob strani.