

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nik SUSIČ

**VZPOSTAVITEV IN OPTIMIZACIJA PROTOKOLA  
ZA TRANSFORMACIJO ORANŽNEGA KRINKARJA  
(*Mimulus aurantiacus* Curtis) Z BAKTERIJO  
*Agrobacterium tumefaciens***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nik SUSIČ

**VZPOSTAVITEV IN OPTIMIZACIJA PROTOKOLA ZA TRANSFORMACIJO  
ORANŽNEGA KRINKARJA (*Mimulus aurantiacus* Curtis) Z BAKTERIJO  
*Agrobacterium tumefaciens***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF PROTOCOL FOR  
TRANSFORMATION OF BUSH MONKEYFLOWER (*Mimulus aurantiacus* Curtis)  
USING *Agrobacterium tumefaciens***

M.SC. THESIS  
Master study programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v prostorih Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin na Oddelku za agronomijo, Biotehniška fakulteta.

Mentor: prof. dr. Borut Bohanec

Somentorica: dr. Jana Murovec

Recenzentka: prof. dr. Jana Žel

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:                   prof. dr. Branka JAVORNIK  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica:                         dr. Jana MUROVEC  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica:                         prof. dr. Jana ŽEL  
                                       Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in  
                                       sistemska biologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Nik Susič

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 606:631.528:575.2(043.2)
KG	<i>Mimulus aurantiacus</i> / genska transformacija / <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / ZsGreen / adventivna regeneracija / GUS / EGFP
AV	SUSIČ, Nik, dipl. bioteh. (UN)
SA	BOHANEC, Borut (mentor)/MUROVEC, Jana (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2014
IN	VZPOSTAVITEV IN OPTIMIZACIJA PROTOKOLA ZA TRANSFORMACIJO ORANŽNEGA KRINKARJA ( <i>Mimulus aurantiacus</i> Curtis) Z BAKTERIJO <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIV, 67, [7] str., 6 pregl., 16 sl., 5 pril., 85 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Razvili smo učinkovit protokol za transformacijo oranžnega krinkarja, ki je modelna rastlina za študije genetike evolucije in ekologije ter hkrati ekonomsko zanimiva cvetoča trajnica. Genske transformacije smo izvajali s 4 dnevno kokultivacijo listnih izsečkov, petiol in hipokotilov z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , s katero smo v rastinske celice vnašali tri različne genske konstrukte. Vsak je vseboval selekcijski gen <i>hptII</i> ter enega od reporterskih genov: <i>gusA</i> , <i>EGFP</i> ali <i>ZsGreen</i> . Adventivno regeneracijo transgenih poganjkov smo dosegli z gojenjem izsečkov na trdnem Murashige in Skoog gojišču, kateremu smo dodali 0,5 mg l <sup>-1</sup> 1-naftalenocetne kislina (NAA), 1 mg l <sup>-1</sup> citokinina (6-benzilaminopurina (BAP) ali tidiazurona (TDZ) ali zeatina), 30 g l <sup>-1</sup> saharoze in ustrezno količino higromicina B. Izražanje vseh reporterskih genov je bilo jasno vidno že v kalusnem tkivu v obliki fluorescence ali modregaobarvanja. Izražanje reporterskih genov je opazno upadlo z nadaljnjam razvojem poganjkov na elongacijskem gojišču (MS gojišče z vitaminimi, 0,1 mg l <sup>-1</sup> BAP, 0,1 mg l <sup>-1</sup> indol-3-octetna kislina (IAA), 30 g l <sup>-1</sup> saharoze). Primerjava izražanja treh markerskih proteinov je pokazala, da je bil <i>ZsGreen</i> svetlejši kot <i>EGFP</i> , prav tako pa primernejši za uporabo kot β-glukuronidaza (GUS). Iz 2.395 kokultiviranih izsečkov različnih tipov, smo v poskusih pridobili 154 rastlin, ki so se regenerirale na selekcijskem gojišču ob prisotnosti antibiotika higromicina B. Kemiluminescenčna analiza po Southern-u je pokazala, da je 89 % regeneriranih (137 T <sub>0</sub> rastlin) rastlin imelo vgrajeno T-DNA v genomu. S PCR analizo smo odkrili vključitev plazmidnih zaporedij izven T-DNA v genom večine (79,87 %) transformiranih rastlin.

### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2  
 DC UDC 606:631.528:575.2(043.2)  
 CX *Mimulus aurantiacus* / genetic transformation / *Agrobacterium tumefaciens* / ZsGreen / adventitious regeneration / GUS / EGFP  
 AU SUSIČ, Nik  
 AA BOHANEC, Borut (supervisor)/MUROVEC, Jana (co-advisor)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology  
 PY 2014  
 TI DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF PROTOCOL FOR TRANSFORMATION OF BUSH MONKEYFLOWER (*Mimulus aurantiacus* Curtis) USING *Agrobacterium tumefaciens*  
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
 NO XIV, 67, [7] p., 6 tab., 16 fig., 5 ann., 85 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB We have developed an efficient protocol for genetic transformation of bush monkeyflower, an emerging model plant for ecological and evolutionary genetics, while an economically promising ornamental perennial. Transformation was performed by 4 day co-cultivation of leaf explants, petiole and hypocotyls with *Agrobacterium tumefaciens*, carrying 3 different binary plasmids. Each of them contained in its T-DNA region *hptII* selection gene and one of three different reporter genes: *gusA*, *EGFP* and *ZsGreen*. Adventitious regeneration of transformed shoots was possible by growing the explants on solid regeneration medium based on Murashige and Skoog. Medium was supplemented with 0.5 mg l<sup>-1</sup> 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), 1 mg l<sup>-1</sup> of cytokinin (6-Benzylaminopurine (BAP) or thidiazuron (TDZ) or zeatin), 30 g l<sup>-1</sup> sucrose and an appropriate concentration of hygromycin B. Expression of reporter genes was clearly visible in callus tissue in the form of green fluorescence or blue staining, but gradually diminished with subsequent development of shoots on elongation medium (MS medium with vitamins, 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP, 0.1 mg l<sup>-1</sup> indole-3-acetic acid (IAA), 30 g l<sup>-1</sup> sucrose). New marker protein ZsGreen proved to be brighter than EGFP, while also being more suitable for use than β-glucuronidase (GUS). Out of 2,395 co-cultivated explants, 154 shoots regenerated on selection medium containing hygromycin B. Chemiluminescent Southern blot analysis showed that T-DNA was integrated in 89 % (137 T<sub>0</sub> plants) of regenerated plants. We detected a presence of vector backbone sequences in most (79.87 %) of T<sub>0</sub> plants.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b>	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b>	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b>	V
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	VIII
<b>KAZALO SLIK</b>	IX
<b>KAZALO PRILOG</b>	X
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	XI
<b>SLOVARČEK</b>	XIII
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	4
2.1 GENSKE TRANSFORMACIJE RASTLIN	4
2.1.1 Genski inženiring pri okrasnih rastlinah	5
2.1.2 Seleksijski in reporterski geni	7
2.1.3 Binarni plazmidni vektorji	8
2.1.4 Vnos genov z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
2.2 ORANŽNI KRINKAR	9
2.2.1 Rastlina <i>Mimulus aurantiacus</i> kot modelni organizem	11
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	14
3.1 GOJIŠČA	15
3.1.1 Rastlinska gojišča	15
3.1.2 Bakterijska gojišča	17
3.2 RASTLINSKI MATERIAL	18
3.2.1 Sterilizacija in kalitev semen	18
3.2.2 Gojenje rastlin v rastni komori in priprava izsečkov	18
3.3 ADVENTIVNA REGENERACIJA RASTLIN	19
3.3.1 Regeneracijski potencial različnih tipov izsečkov	19
3.3.2 Občutljivost različnih tipov izsečkov na seleksijski antibiotik	19

3.4 PLAZMIDI.....	20
3.4.1 Plazmid pCAMBIA1301 .....	20
3.4.2 Plazmida pCAMBIA1302-EGFP in pCAMBIA1302-ZsGreen.....	21
3.5 BAKTERIJE.....	22
3.5.1 Priprava kompetentnih celic bakterij <i>A. tumefaciens</i> za elektroporacijo	23
3.5.2 Elektroporacija celic bakterij <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 in EHA105.....	23
3.5.3 Shranjevanje bakterij <i>A. tumefaciens</i> z zamrzovanjem .....	24
3.6 TRANSFORMACIJA RASTLIN <i>M. aurantiacus</i> .....	24
3.7 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA TRANSFORMACIJE .....	25
3.7.1 Vpliv različnih rastlinskih hormonov na adventivno regeneracijo hipokotilov.....	25
3.7.2 Poskusi optimizacije transformacije.....	26
3.8 TESTIRANJE IZRAŽANJA TRANSGENOV.....	26
3.8.1 Histokemični β-glukuronidazni (GUS) test.....	26
3.8.2 Pregled izražanja genov EGFP in ZsGreen.....	27
3.9 MOLEKULARNA ANALIZA TRANSGENOV .....	27
3.9.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva .....	27
3.9.2 Merjenje koncentracije DNA .....	28
3.9.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	29
3.9.4 Agarozna gelska elektroforeza po PCR .....	30
3.9.5 Analiza transgenov s prenosom po Southern-u .....	31
3.9.5.1 Restrikcija genomske DNA.....	31
3.9.5.2 Ločevanje fragmentov DNA .....	32
3.9.5.3 Southern prenos DNA na membrano .....	32
3.9.5.4 Priprava DNA sonde .....	34
3.9.5.5 Hibridizacija DNA sonde .....	34
3.9.5.6 Detekcija vgrajenih transgenov .....	35
3.9.5.7 Spiranje DNA sonde iz membrane .....	35
3.10 UKREPI ZA ZAGOTAVLJANJE BIOLOŠKE VARNOSTI .....	36
4 REZULTATI .....	37
4.1 ADVENTIVNA REGENERACIJA RASTLIN .....	37
4.1.1 Regeneracijski potencial različnih tipov izsečkov .....	37

<b>4.1.2 Občutljivost različnih tipov izsečkov na selekcijski antibiotik .....</b>	38
<b>4.2 POSKUSI TRANSFORMACIJE RASTLIN .....</b>	39
<b>4.3 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA TRANSFORMACIJE .....</b>	42
<b>    4.3.1 Vpliv različnih kombinacij rastlinskih hormonov na adventivno regeneracijo hipokotilov .....</b>	42
<b>    4.3.2 Poskusi optimizacije transformacije.....</b>	46
<b>4.4 IZRAŽANJE REPORTERSKIH GENOV.....</b>	47
<b>    4.4.1 Izražanje <math>\beta</math>-glukuronidaze (GUS).....</b>	47
<b>    4.4.2 Izražanje fluorescentnih proteinov EGFP in ZsGreen .....</b>	47
<b>4.5 MOLEKULSKA ANALIZA REGENERIRANIH RASTLIN .....</b>	48
<b>    4.5.1 Analiza PCR.....</b>	48
<b>    4.5.2 Analiza DNA s prenosom Southern .....</b>	50
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	52
<b>5.1 REGENERACIJSKI POTENCIJAL IZSEČKOV .....</b>	52
<b>5.2 VPLIV SELEKCIJSKEGA ANTIBIOTIKA NA <i>in vitro</i> REGENERACIJO IZSEČKOV .....</b>	52
<b>5.3 USPEŠNOST TRANSFORMACIJE .....</b>	53
<b>5.4 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA TRANSFORMACIJE .....</b>	55
<b>5.5 MOLEKULSKA ANALIZA TRANSGENOV.....</b>	56
<b>5.6 DELOVANJE MARKERSKIH SISTEMOV .....</b>	57
<b>6 SKLEPI .....</b>	59
<b>7 POVZETEK.....</b>	60
<b>8 VIRI .....</b>	61
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pari sekvenc začetnih oligonukleotidov za namnoževanje selekcijskega in reporterskih genov <i>vir</i> genov iz <i>Agrobacterium</i> , mejnih sekvenc plazmida in pričakovane dolžine pomnožkov. ....	29
Preglednica 2: Adventivna regeneracija različnih tipov izsečkov <i>M. aurantiacus</i> na RMBN.....	37
Preglednica 3: Primerjava učinkovitosti transformacije (TE) in selekcije (SE) med tremi tipi izsečkov: listni izsečki, petiole in hipokotili. ....	41
Preglednica 4: Primerjava učinkovitosti transformacije (TE) med tremi različnimi binarnimi plazmidi (pCAMBIA 1301, pCAMBIA 1302-ZsGreen ali pCAMBIA 1302-EGFP).....	41
Preglednica 5: Adventivna regeneracija hipokotilov <i>M. aurantiacus</i> na RMBN, RMZN in RMTN, pri različnih kombinacijah rastlinskih hormonov.....	44
Preglednica 6: Primerjava učinkovitosti transformacije (TE) med poskusoma optimizacije uspešnosti transformacije (TE) petiol in hipokotilov.....	46

## KAZALO SLIK

Slika 1: Oranžni krinkar ( <i>M. aurantiacus</i> ) .....	10
Slika 2: Poenostavljen prikaz dela v okviru vzpostavitve in optimizacije protokola za transformacijo rastlin <i>M. aurantiacus</i> .....	14
Slika 3: Binarni plazmid pCAMBIA1301 s prikazanimi sestavnimi elementi .....	21
Slika 4: Binarni plazmid pCAMBIA1302-EGFP s prikazanimi sestavnimi elementi .....	22
Slika 5: Binarni plazmid pCAMBIA1302-ZsGreen s prikazanimi sestavnimi elementi ....	22
Slika 6: Shema detekcije z digoksigeninom (DIG) označene DNA sonde .....	31
Slika 7: Shema priprave za Southern prenos DNA na membrano s kapilarnim vlekom....	33
Slika 8: Primeri adventivne regeneracije različnih tipov izsečkov rastlin <i>M. aurantiacus</i> po 5 tednih rasti na RM-BAP .....	38
Slika 9: Občutljivost netransformiranih poganjkov rastlin <i>M. aurantiacus</i> na $10 \text{ mg l}^{-1}$ higromicina B .....	39
Slika 10: Redosled adventivne regeneracije transformiranih izsečkov .....	40
Slika 11: Adventivna regeneracija hipokotilov rastlin <i>M. aurantiacus</i> na gojiščih z različnimi kombinacijami in koncentracijami rastlinskih hormonov .....	45
Slika 12: Primer izražanja GUS v mladem rastlinskem tkivu listov rastlin <i>M. aurantiacus</i> , starih 6 tednov.....	47
Slika 13: Primeri izražanja fluorescentnih markerjev v rastlinskem tkivu rastlin <i>M. aurantiacus</i> .....	48
Slika 14: PCR analiza domnevnih transgenih rastlin <i>M. aurantiacus</i> .....	49
Slika 15: (a) PCR analiza prisotnosti genov <i>hptII</i> , <i>gusA</i> , <i>EGFP</i> in <i>ZsGreen</i> v vzorcih 1 – 13 in (b) Southern analiza vključenosti gena <i>hptII</i> v istih vzorcih .....	50
Slika 16: Hibridizacija iste membrane z dvema različima DNA sondama .....	51

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Sestava gojišča MS (Duchefa) (Murashige in Skoog, 1962).
- Priloga B: Sestava pufrov in raztopin uporabljenih v raziskavi.
- Priloga C: Sestava založnih raztopin kemikalij uporabljenih v raziskavi ter njihovo shranjevanje.
- Priloga D: Sheme T-DNA iz plazmidov (a) pCAMBIA 1301, (b) pCAMBIA 1302-EGFP in (c) pCAMBIA 1302-ZsGreen z označenimi sestavnimi elementi zaporedja
- Priloga E: Razvrstitev vzorcev DNA regeneriranih rastlin iz poskusov transformacij v skupine glede na prisotnost mejnih regij T-DNA in število kopij genov.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotek
°C	stopinje Celzija
Ab	protitelo
ang.	angleško
ANOVA	analiza variance (ang. Analysis Of Variance)
AP	alkalna fosfataza
As	amper sekunda
ATP	adenozin trifosfat
BAP	6-benzilaminopurin
bar	enota za merjenje tlaka
bp/kbp	bazni par/kilobazni par
BPB	bromfenol modro (ang. Bromophenol Blue)
CaMV 35S	promotor mozaičnega virusa cvetače (ang. Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter)
CAT	kloramfenikol acetiltransferaza
CCD	ang. Charge-Coupled Device
CDP Star®	dinatrijev 2-kloro-5-(4-metoksispiro {1,2-dioksetan-3,2'-(5'-kloro)triciklo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]dekan}-4-il) fenil fosfat (po podatkih proizvajalca)
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
ddH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
DICA	dikloroizocianurna kislina
DIG	digoksiigenin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
dTTP	deoksimidin trifosfat
dUTP	deoksiuridin trifosfat
EGFP	izboljšan zeleni fluorescentni protein (ang. Enhanced Green Fluorescent Protein)
EtBr	etidijev bromid
EU	Evropska unija
F	spremenljivka F-porazdelitve
GFP	zeleni fluorescentni protein (ang. Green Fluorescent Protein)
GSO	gensko spremenjeni organizem
GUS	β-glukuronidaza
HPT	higromicin fosfotransferaza

HSD	ang. Honestly Significant Difference (v povezavi s Tukey-evim HSD testom mnogoterih primerjav)
IAA	indol-3-ocetna kislina
KV	koeficient variacije
lat.	latinsko
LUC	luciferaza
M	molska masa snovi [g mol <sup>-1</sup> ]
MCS	multiplo mesto za kloniranje (ang. Multiple Cloning Site)
mol	enota množine snovi (ki vsebuje toliko delcev, kot je atomov v 12 g ogljikovega izotopa <sup>12</sup> C)
MS	Murashige in Skoog-ovo gojišče
NAA	1-naftalenocetna kislina
NCBI	ang. National Center for Biotechnology Information
NPT	neomicin fosfotransferaza
obr./min	obrati na minuto
OD600	optična gostota pri 600 nm
p	dosežena stopnja značilnosti
PAT	fosfinotricin acetiltransferaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini (lat. Pondus hydrogenii)
QTL	kvantitativni lokus ali lokus za kvantitativno lastnost (ang. Quantitative Trait Locus)
RNA	ribonukleinska kislina
s/min/h	sekunda/minuta/ura
SE	učinkovitost selekcije (ang. Selection Efficiency)
S.E.	standardna napaka aritmetične sredine (ang. Standard Error of the Mean)
T	temperatura
T <sub>0</sub>	ničta generacija
T-DNA	prenesena DNA (ang. Transfer DNA)
TDZ	tidiazuron
TE	učinkovitost transformacije (ang. Transformation Efficiency)
T <sub>hyb</sub>	temperatura hibridizacije

## SLOVARČEK

Adventivna regeneracija – razvoj novih poganjkov iz nemeristemskega rastlinskega tkiva.

Agarozna gelska elektroforeza – metoda za ločevanje molekul (navadno DNA ali RNA) glede na njihovo velikost, s premikanjem negativno nabitih molekul skozi agarozni gel v električnem polju.

Aseptično delo – delo, opravljeno v sterilnih pogojih s sterilnimi pripomočki.

Avtoklaviranje – postopek sterilizacije, pri katerem steriliziramo s pomočjo povišane temperature in povišanega tlaka vodne pare.

Ciklični termostat – naprava, katero uporabljamo za doseganje in ohranjanje specifične temperature, po vnaprej določeni časovni shemi.

DNA polimeraza – encim, ki katalizira sintezo DNA z vezavo (polimerizacijo) deoksiribonukleotidnih enot.

Izseček – izrezan delček tkiva ali organa, ki ga lahko uporabimo za pripravo *in vitro* tkivne kulture.

Genska transformacija – proces spremembe genoma bakterijske ali neživalske evkariontske celice z vsavitvijo tuje (eksogene) DNA v genom.

Hiperhidriranost – fiziološka deformacija rastlinskih tkiv, ki je nezaželen pojav v rastlinskih tkivnih kulturah. Kaže se v obliki nizke vsebnosti klorofila, visoki vsebnosti vode, nizki lignifikaciji, okrnjenem delovanju listnih rež in zmanjšani mehanski trdnosti tkiva.

Hipokotil – spodnji del steba, ki je med korenino in kličnimi listi.

*in vitro* – procesi in poskusi, ki potekajo v nadzorovanem okolju, zunaj živega organizma (lat. »v steklu«).

*in vivo* – procesi, ki potekajo v živem organizmu (lat. »v živem«).

Kalus – skupek nediferenciranih rastlinskih celic.

Kemiluminescenčna reakcija – kemijska reakcija, pri kateri pride do izsevanja svetlobe (luminescence).

Petiola – listni pecelj.

Promotor – regulatorno zaporedje DNA, ki se nahaja na 5' koncu gena in uravnava njegovo izražanje.

Proteaza – encim, ki katalizira razgradnjo beljakovin (proteinov) s cepitvijo vezi med aminokislinami.

Rastni regulator – kemikalija, ki regulira rast rastline (tudi rastlinski hormon).

Restriktijski encim – encim (tudi restriktaza ali restriktijska endonukleaza), ki razreže dvojnovidno DNA na specifičnih mestih nukleotidnih sekvenc oz. restriktijskih mestih.

RNAza – endonukleaza, ki katalizira hidrolitično cepitev polinukleotidov RNA verige.

Termolabilnost – topotna občutljivost. Lastnost snovi, da razpade ali izgubi biološko aktivnost pri povišani temperaturi.

Plazmid – večinoma krožna (lahko tudi linearne) dvovidna molekula DNA, ki je sposobna samostojnega podvojevanja.

Začetni oligonukleotidi – kratka zaporedja nukleinskih kislin, ki služijo za začetek podvojevanja DNA pri polimerazni verižni reakciji.

## 1 UVOD

Tehnologija rekombinantne DNA predstavlja pomemben pristop v genetskih raziskavah rastlinskih vrst, usmerjenih bodisi v razvoj novih rastlinskih sort ekonomsko pomembnih rastlin, bodisi v temeljne raziskave rastlinske genetike, fiziologije ter molekulske in celične biologije. Uporaba postopkov genskih transformacij omogoča izkoriščanje novih možnosti in pristopov v tovrstnih raziskavah, ker omogoča skoraj brezmejne genomske modifikacije. Z genskim inženiringom je mogoče v rastlinski genom vnašati zaporedja DNA iz drugih rastlinskih vrst, živali, gliv in bakterij, kar predstavlja bistveno razliko od tradicionalnih metod, saj je v tem primeru bila genetska raznolikost dosežena zgolj s križanjem in izborom genotipov znotraj vrst (Griffiths in sod., 2008). Genski inženiring je prav tako bolj natančen način vnosa genov v rastline, saj v rastlinski genom navadno vključujemo majhne, določene skupke genov. Tak način spominjanja vrst je postal mogoč zaradi razvoja novih biotehnoloških metod (kot so: gojenje somatskih celic, peloda, protoplastov, adventivna regeneracija številnih rastlinskih vrst) in zaradi izboljšanja orodij za genetske manipulacije (kot na primer: restrikcijski encimi, različni vektorski sistemi DNA, večja izbira promotorjev ter novi selekcijski in reporterski geni). K temu je pripomoglo tudi večanje knjižnic DNA klonov, ki je posledično privedlo tudi do boljšega poznavanja rastlinskega genoma, njegove organizacije in ekspresije pri višjih rastlinah (Žel, 1996).

Vnos genov v rastline lahko poteka na različne načine, najpogosteje uporabljen pa je posreden vnos genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, ki je sicer znan rastlinski patogen (Tzfira in Citovsky, 2008). Prva znanstvena demonstracija uporabe bakterije *A. tumefaciens* v namen genskega inženiringa je bila opravljena na tobaku (Barton in sod., 1983). Zgodnji uspehi transformacije rastlin so vključevali rastlinske vrste, katere so naravni gostitelj za bakterijo *A. tumefaciens* in za katere je predhodno obstajal protokol adventivne regeneracije v *in vitro* kulturi (Banta in Montenegro, 2008). Prvotne raziskave so nakazovale, da bakterija prenese zaključen del svoje DNA (T-DNA) v jedrni genom gostiteljske rastline. Večina molekularnih komponent, ki omogočajo prenos T-DNA, se nahaja na tumor-inducirajočem (Ti) plazmidu (Hellens in sod., 2000). Ta značilnost bakterije *A. tumefaciens* je pomembna za kasnejši razvoj bakterije, kot uspešnega vektorja za rastlinske transformacije. Dve glavni komponenti, povezani s prenosom genov z bakterijami *Agrobacterium*; zaporedje T-DNA in *vir* regija (geni, ki določajo virulenčne proteine in regulatorje), lahko ležita na ločenih plazmidih. Spoznanje je omogočilo izdelavo modernih Ti plazmidov, ki jih imenujemo binarni vektorski sistemi (Lee in Gelvin, 2008). Funkcije, ki jih določajo *vir* geni se nahajajo na »razoroženem« Ti plazmidu (Ti-helper) v primernem sevu agrobakterije. Gen(i) na T-DNA, ki bi jih radi prenesli v gostiteljsko rastlino, pa se nahajajo na drugem manjšem plazmidu – t.i. binarnem plazmidu. V regijo T-DNA lahko po želji vključujemo različne tipe genov, najpogosteje pa specifične gene v kombinaciji z reporterskimi geni (ki nam pomagajo pri vizualizaciji uspešne transformacije) ter geni za odpornost na antibiotik (ki preprečijo rast

netransformiranih celic v kulturi). Ekspresijo vstavljenih genov omogočajo specifični promotorji, kot npr. konstitutivni promotor mozaičnega virusa cvetače (CaMV 35S), ki omogoča izražanje transgena v vseh rastlinskih tkivih (Žel, 1996).

Oranžni krinkar (*Mimulus aurantiacus* Curtis) je cvetoči polgrm iz družine Phrymaceae, ki raste v zahodnem delu Združenih držav Amerike. Ekonomski potencial vrste v hortikulturi se kaže v obliki vpadljivega cvetenja med poletno sezono in skromnih vodnih potreb. Hkrati postaja rod *Mimulus* pomemben v bazični znanosti, kot modelni sistem za študije evolucijske in ekološke funkcionalne genomike (Streisfeld in Raushner, 2009). Razvoj učinkovitega sistema za transformacijo rastline *M. aurantiacus* je predpogoj za celovitejše genetske raziskave, kot so študije genetskih sprememb, povezanih z evolucijo prilagoditev. Stabilen sistem transformacije je mogoče uporabiti za testiranje kandidatnih genov in / ali promotorjev, ki uravnavajo biosintezo flavonoidov *in vivo*, kar privede do specifične obarvanosti cvetov, le – ta pa je mogoča prilagoditvena lastnost rastline (Streisfeld in Raushner, 2009; Wu in sod., 2008).

### 1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj magistrskega dela je bil vzpostavitev zanesljivega delovnega protokola, ki bi omogočal stabilno transformacijo rastline *M. aurantiacus* z uporabo bakterije *A. tumefaciens*, kot vektorja za prenos različnih genskih konstruktov (z binarnimi plazmidji pCAMBIA1301 in 1302 z različnimi reporterskimi geni) ter regeneracijo in diferenciacijo transformiranega rastlinskega tkiva.

Za dosego teh ciljev smo najprej želeli določiti najprimernejši tip izsečkov za poskuse transformacije ter izbrati sestavo gojišča, ki bo omogočala najuspešnejšo adventivno regeneracijo.

Z uporabo metode posredne transformacije z bakterijo *A. tumefaciens*, smo želeli v celice rastline *M. aurantiacus* vnesti reporterske gene *gusA* (binarni plazmid pCAMBIA1301), *EGFP* (binarni plazmid pCAMBIA1302-EGFP) in *ZsGreen* (binarni plazmid pCAMBIA1302-ZsGreen) ter spremljati razlike v izražanju reporterskih genov in razlike v izražanju teh genov v različnih fazah razvoja poganjkov.

S histokemičnim testom (za detekcijo izražanja *gusA* gena) in uporabo epifluorescenčne stereolupe z ustreznim setom filtrov (za detekcijo zelene fluorescence zaradi izražanja *EGFP* in *ZsGreen* genov), smo hoteli potrditi transformacijo regenerantov ter opažanja podkrepliti z molekulskimi tehnikami, kot sta verižna reakcija s polimerazo (PCR) in analiza po Southernu.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bo z uporabo protokola za adventivno regeneracijo poganjkov iz različnih rastlinskih izsečkov (listni izsečki, petiole, hipokotili) *M. aurantiacus*, uveljavljenih binarnih plazmidov (pCAMBIA130x) in različnih sevov bakterije *A. tumefaciens*, mogoče pridobiti odrasle transgene rastline.

Rastlinski izsečki z najvišjim regeneracijskim potencialom bodo dosegli uspešnejšo adventivno regeneracijo in s tem višjo uspešnost transformacije.

Vnešeni reporterski gen se bo v transgenih rastlinah konstitutivno izražal tudi po večkratni subkultivaciji na gojišče brez selekcijskega antibiotika, kar bo mogoče preveriti v različnih fazah regeneracije.

Prisotnost T-DNA v rastlinah bo mogoče dokazati s testiranjem s PCR, vgraditev transgenov v rastlinski genom pa z analizo genomske DNA po Southernu.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GENSKE TRANSFORMACIJE RASTLIN

Pri tradicionalnih postopkih žlahtnjenja rastlin dosegamo genetsko raznolikost s križanjem in izborom genotipov znotraj in med vrstami (Griffiths in sod., 2008). Vzgoja novih kultivarjev tako lahko traja desetletje in več, kar je odvisno tudi od evolucijske razdalje med križanima vrstama. Pri klasičnem križanju se lastnosti dedujejo po Mendlovinih zakonih in pri križanju ene same lastnosti, ki jo lahko določa le en gen, se običajno v rastlino vnesejo tudi sosednji (nezaželeni) geni. Učinek teh genov velikokrat ni opazen, v nekaterih primerih pa so po vnosu željenih lastnosti s primarnim križanjem, potrebna povratna križanja, da izločimo vse nezaželene lastnosti. Kot že rečeno, lahko žlahtnitelji s tradicionalnim žlahtnjenjem prenašajo le gene, ki so v sorodnih, spolno kompatibilnih vrstah. Pri križanju genetsko oddaljenih ali nesorodnih vrst pride do razvoja sterilnih rastlin ali pa te sploh ne dajo potomstva (Žel, 1996).

Izkoriščanje genskega inženirstva ponuja številne možnosti reševanja težav, s katerimi se srečuje kmetijstvo v 21. stoletju. Kern (2002) predpostavlja, da lahko razvoj genskih tehnologij, bistveno pripomore k soočanju s kompleksnimi izzivi v kmetijstvu. Sem spadajo zmanjševanje razpoložljivih kmetijskih površin, klimatske spremembe, izraba razpoložljivih vodnih virov ipd., na drugi strani pa povišano povpraševanje po hrani, krmni, vlaknih, gorivih, industrijskih surovinah ter specializiranih produktih rastlin. Genski inženiring je v povezavi s klasičnim žlahtnjenjem tako lahko učinkovito orodje za doseganje globalnih ciljev kmetijstva – učinkovita izraba omejenih dobrin, trajnostni razvoj, povišana dodana vrednost in znanstveni pristop k reševanju ovir.

Genski inženiring lahko prenosti nekatere težave, s katerimi se soočamo pri tradicionalnem žlančnjenju. Med nekatere prednosti genskega inženirstva sodijo:

- hitrejši in natančnejši način razvoja novih kultivarjev;
- povečevanje genetske variabilnosti, zaradi vnosu teoretično neomejenega izbora genov;
- omogočanje vnosu definiranih genskih konstruktov z dobro poznano funkcijo v obstoječe kultivarje, brez spremembe agronomsko oz. hortikulturno pomembnih lastnosti;
- pospešitev razvoja z uporabo molekulskih markerjev;
- pridobivanje novih kultivarjev v zelo kratkem času kljub kompleksnosti procesov in visoki ceni (v primerjavi s tradicionalnim križanjem).

Intenzivno delo, opravljeno na področju genskega inženiringa, kot je razvoj biotehnoloških metod in orodij genskih manipulacij, ne omogoča zgolj lažjega vnosu tujih genov v rastlinske celice, ampak tudi opravljanje kompleksnejših aktivnosti v smislu žlahtnjenja rastlin. Na eksperimentalni ravni, se gensko spremenjene (GS) rastline često uporabljajo za

pridobivanje boljšega vpogleda v biologijo in genetiko rastlin, vključenih v programe tradicionalnega žlahtnjenja (Ulukan, 2009).

V zadnjih 30 letih je bilo opravljenih že veliko študij, ki vključujejo gensko spremenjene rastline. Že preprosto iskanje po spletni podatkovni zbirkki PubMed, vključuje približno 26.680 zapisov v povezavi s transgenimi rastlinami, od tega je bilo v zbirko vnešenih kar 1.388 objav v obdobju med januarjem in oktobrom 2013 (PubMed, dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Za uspešno izvedbo genske transformacije določene rastline, je bistveno poznavanje uspešnega postopka *in vitro* adventivne regeneracije poganjkov za specifično vrsto. Med prvimi rastlinskimi vrstami, pri katerih je bila uspešno izvedena transformacija, so bile take, pri katerih je bil predhodno razvit protokol adventivne regeneracije. Primer je tobak (*Nicotiana tabacum* L.), ki je bil prva rastlina uspešno transformirana z bakterijo *A. tumefaciens* (Barton in sod., 1983) ter za katerega so razvili primerno gojišče za *in vitro* mikropropagacijo ter adventivno regeneracijo že leta 1962 (Murashige in Skoog, 1962).

Pregled nekaterih najvplivnejših znanstvenih objav na področju genskega inženirstva pri rastlinah, pokaže smer in pomembne mejnike v razvoju metodologije in tehnologij na tem področju (Vain, 2007). Za razvoj transformacijskih sistemov je bila pomembna demonstracija uporabe bakterij *A. tumefaciens* in *A. rhizogenes*, kot vektorjev za posreden vnos genov v rastlinski genom z razoroženimi plazmidi; razvoj različnih reporterskih sistemov, kot so GUS ( $\beta$ -glukuronidaza) (ki je daleč najbolj uporabljan), fluorescentni markerji na osnovi GFP (zeleni fluorescentni protein) in bioluminescentna LUC (luciferaza); razvoj koncepta binarnih plazmidov; razvoj promotorja CaMV 35S in uravnavanje izražanja ekspresije genov pri evkariontih z dodajanjem intronskih zaporedij v zaporedje markerskih genov; razvoj ostalih metod vnosa DNA, kot je uporaba virusov ter neposredne metode vnosa, kot npr. obstreljevanje z mikroprojektili (biolistika), elektroporacija protoplastov, prenos DNA z liposomi. Velik vpliv je imel tudi razvoj protokola za transformacijo modelne rastline *Arabidopsis thaliana* z namakanjem socvetij v suspenziji agrobakterij, s katerim je mogoče pridobiti transgeno seme. Metode neposrednega vnosa DNA so bile prvotno razvite za transformacije enokaličnic, med katerimi je veliko gospodarsko pomembnih vrst in katere niso naravni gostitelj bakterije *A. tumefaciens*. Različne študije so kasneje pokazale, da je mogoče obseg vrst, katere je mogoče transformirati s pomočjo agrobakterije, razširiti z uravnavanjem različnih faktorjev, med drugim tudi s povišano ekspresijo genov *virC* in *virF* (Banta in Montenegro, 2008).

### **2.1.1 Genski inženiring pri okrasnih rastlinah**

Svetovna industrija okrasnih rastlin in rezanega cvetja uspeva zaradi nenehnega razvoja novih sort okrasnih rastlin s širokim razponom fenotipskih značilnosti. Eden od načinov za

pridobivanje novosti (kar velja tudi pri gospodarsko pomembnih kmetijskih rastlinah) je domestifikacija divjih vrst v povezavi s klasičnim žlahtnjenjem. Genski inženiring ponuja koristne možnosti za širjenje nabora genov v florikulturi ter tako omogoča razvoj novih komercialnih sort rastlin (Tanaka in sod., 2005). Možnosti komercializacije gensko spremenjenih cvetlic je veliko, vendar je zaenkrat omejena na različne barvne kombinacije (Chandler in Sanchez, 2012).

Tanaka in sod. (2005) so lastnosti, katere lahko vnašamo v nove sorte, v grobem razdelili na dve skupini: novosti namenjene potrošniku in novosti namenjene proizvajalcu. Klasično žlahtnjenje je navadno usmerjeno v razvoj novosti tako za potrošnika, kot tudi za pridelovalce. Gensko inženirstvo okrasnih rastlin je osredotočeno na vpeljavo novosti namenjenih potrošniku, predvsem zaradi visokih stroškov, povezanih z razvojem novih sort cvetlic – kar je v nasprotju s smerjo razvoja pri GS poljščinah. Pri okrasnih rastlinah so tako komercialno pomembne lastnosti predvsem barva cvetov, oblika in vonj in so mišljene kot zanimive novitete, ki vplivajo na odločanje potrošnika.

Edini komercialno dostopni vrsti GS okrasnih rastlin sta vrtnica (*Rosa × hybrida*) in nagelj *Dianthus caryophyllus*. Obe rastlini izražata nove barvne kombinacije, slednji je komercialno na voljo v osmih različnih barvnih odtenkih. Sprememba barve je rezultat manipulacije antocianinske metabolne poti (Chandler in Sanchez, 2012). V okviru Evropske unije, imajo 4 sorte GS nagljev podjetja Florigene Ltd., dovoljenje za uvoz in trženje. Od teh je mogoče le eno GS sorto tudi pridelovati za rez. Glede na dostopne informacije, do decembra 2013 še ni odobrenih sort GS vrtnic za trženje v EU (GMO Compass, dostopno na: <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>).

Kljub trenutno omejenemu izboru tržnih aplikacij GS tehnologije okrasnih rastlin, je možnosti za razvoj še veliko. Chandler in Sanchez (2012) sta poleg razvoja barvnih odtenkov cvetov, oblike in vonja, izpostavila še možnosti za povečevanje odpornosti na abiotiski stres, odpornosti na različne bolezni in škodljivce, povečano obstojnost rezanega cvetja, uravnavanje vpliva dolžine dneva na razvoj rastlin, uravnavanje obdobja in trajanja cvetenja, inženiring odpornosti na herbicide in povečevanje lateralnega razvejanja.

Poleg omenjenih potencialnih področijh uporabe genskega inženiringa pri okrasnih rastlinah, sta Chandler in Lu (2005) identificirala še možnost proizvodnje nekaterih industrijsko pomembnih sekundarnih metabolitov s pomočjo GS okrasnih rastlin. Nekatere vrste cvetočih rastlin so dandanes pomemben vir industrijsko zanimivih in farmacevtskih učinkovin. Primeri so npr. pridobivanje opiatov, esencialnih olj in spojin za industrijo parfumov. Hkrati sta opozorila na ekonomske prepreke pri upeljevanju genskih tehnologij v hortikulturi. Mednje sodijo stroški raziskav in razvoja sort, stroški zaradi regulatornih procesov vpeljave GS okrasnih rastlin na tržišče ter stroški, ki nastanejo zaradi zaščite intelektualne lastnine.

### 2.1.2 Seleksijski in reporterski geni

V sklopu T-DNA, katero vnašamo v rastlinske celice, vnašamo v rastline tudi specifične seleksijske gene, ki omogočajo selekcijo med transformiranimi in netransformiranimi rastlinami. Med pogosto uporabljene seleksijske gene spadajo geni za odpornost na antibiotike, kot so *nptII* (bakterijski gen, ki kodira encim neomicin fosfotransferazo (NPT), ki s fosforilacijo inaktivira kanamicin), *hptII* (bakterijski gen, ki kodira encim higromicin fosfotransferazo (HPT), ki s fosforilacijo inaktivira higromicin B) in *cat* (gen, ki kodira encim kloramfenikol acetiltransferazo (CAT), ki inaktivira kloramfenikol). Za selekcijo je mogoče uporabiti tudi gene, ki kodirajo odpornost na herbicide. Primer je gen *pat*, ki kodira fosfinotricin acetiltransferazo (PAT), ki inaktivira herbicid fosfinotricin (glufosinat). Z nekaterimi novejšimi seleksijskimi geni je mogoče dosegati selekcijo transgenih rastlin z dodajanjem netoksičnih metabolnih analogov ali brez njih. Primeri so: gen *xylA* (ksiloza izomeraza iz bakterije *Streptomyces rubiginosus*), *manA* (fosfomanozna izomeraza iz bakterije *E. coli*), *ipt* (izopentil transferaza iz bakterije *A. tumefaciens* ali rastline *A. thaliana*) ipd. (Miki in McHugh, 2004).

Z reporterskimi geni preverjamo aktivnost nekega gena v rastlinskem tkivu. Kodirajo lahko določljive substance, ki v rastlini nativno niso prisotne. Reporterski proteini omogočajo preverjanje uspešnosti vnosa in izražanje transgenov bodisi pri prehodni, bodisi pri stabilni transformaciji. Seleksijski in reporterski gen sta nameščena v T-DNA zaporedju, tako da se v rastlinski genom praviloma vključita oba. Reporterski geni so hkrati pomembni tudi v molekulski biologiji, saj omogočajo preučevanje razvojno-prostorskih vzorcev ekspresije endogenih genov organizmov ter *in planta* študije aktivnosti promotorjev v realnem času (de Ruijter in sod., 2003; Halfhill in sod., 2003).

Obstaja veliko različnih reporterskih genov, mnogi med njimi so pogosto uporabljeni v rastlinski biotehnologiji. Najpogosteje uporabljene lahko razdelimo v dve skupini, glede na lastnosti reporterskih proteinov, katere določajo: reporterski proteini, ki potrebujejo dodatek substrata in fluorescentni reporterski proteini. V prvo skupino spadata npr. gen *gusA* (*uidA*), ki določa encim β-glukuronidazo (GUS). Aktivnost GUS določamo s histokemičnim testom, v katerem encim hidrolizira substrat (X-GlcA), kar privede do modro obarvanih produktov reakcije (Jefferson in sod., 1987); ter gen *luc* iz kresnice *Photinus pyralis*, ki kodira polipeptid ff-LUC. Polipeptid reagira s substratom (luciferin) v prisotnosti ATP in kisika, kar omogoči svetlobno reakcijo pri 562 nm (Ow in sod., 1986). V drugo skupino spadajo geni, ki kodirajo različne fluorescentne proteine iz morskih nevretenčarjev (kot je npr. GFP in njegovi številni derivati) ali pa nekoliko novejši fluorescentni proteini iz morskih koral in anemon (kot so npr. AmCyan, ZsGreen, ZsYellow, DsRed ipd.). Fluorescentnim reporterskim proteinom je skupno to, da za detekcijo ne potrebujejo substrata, prav tako tudi ni potrebno uničenje vzorcev za analizo. Fluorescentni proteini (kot je GFP) so nepogrešljivi pri raziskavah razvoja rastlin, kjer

reporterji morfološkega stanja tkiv, celičnih tipov ali diferenciacijskih stanj bodisi niso znani, bodisi niso lahko prepoznavni. Uporaba fluorescentnih reporterjev tako omogoča identifikacijo in spremeljanje sicer nevidnih celičnih stanj v razvoju rastlinskih tkiv (Ckurshumova in sod., 2011). Študije novejših družin fluorescentnih proteinov so pokazale, da so ti velikokrat svetlejši kot GFP in njegovi mutanti, omogočajo izbor v širšem razponu barv in so visoko topni. Zaradi teh lastnosti so primerni za nadaljnje raziskave (Wenck in sod., 2003; Wenck, 2006).

### **2.1.3 Binarni plazmidni vektorji**

Prvotno so se za namene transformacij z bakterijo *A. tumefaciens*, uporabljali derivati Ti-plazmidov, v katerih T-DNA je bilo mogoče klonirati željena zaporedja (Banta in Montenegro, 2008). Zaradi velikosti Ti-plazmidov divjega tipa (200 – 800 kbp), je manipulacija tako velikih vektorjev za namene genskih transformacij često zelo težavna (Gelvin, 2003). Problem so rešili z vpeljavo binarnih vektorskih sistemov. V primeru binarnih vektorskih sistemov je genetska informacija, ki je bila predhodno vključena v en večji plazmid (Ti-plazmid), razdeljena na dva manjša plazmida. Manjši plazmid (t.i. binarni plazmid) nosi zapis za levo in desno mejno regijo T-DNA, med kateri skloniramo gene, ki jih želimo vnesti v rastlinsko celico. Večji plazmid (t.i. razoroženi Ti plazmid, ang. Helper Ti plasmid) vsebuje zapis za *vir* gene, ki omogočajo prenos T-DNA. Sistem je omogočil veliko fleksibilnost, lahko manipulacijo (pomnoževanje) binarnih plazmidov v bakteriji *E. coli*, obenem pa je omogočal učinkovito transformacijo rastlinskih celic (Zambryski in sod., 1983). Prav razvoj binarnih plazmidov je omogočil velik porast v številu genskih modifikacij rastlin (Banta in Montenegro, 2008).

V letih raziskav, od začetka vpeljave binarnih plazmidnih vektorjev, je bilo opravljenih veliko dodatnih izboljšav. Sem sodijo izboljšave funkcij pomnoževanja binarnih plazmidov v bakteriji *E. coli* in nadaljne zmanjševanje velikosti vektorjev. Pomembna je tudi vključitev multiplih mest za kloniranje (MCS) v zaporedje plazmida, ki omogoča lahko rekombinacijo zaporedij DNA in s tem lažjo izdelavo novih plazmidnih vektorjev. Mogoč je tudi izbor primernih binarnih plazmidov glede na tip selekcijskega markerja (Hellens in sod., 2000). Za izražanje transgenov, veliko plazmidnih vektorjev vsebuje konstitutivni promotor CaMV 35S iz mozaičnega virusa cvetače, čeprav se za transformacije enokaličnic in tkivno specifično izražanje, uporablajo drugačni promotorji (Banta in Montenegro, 2008).

### **2.1.4 Vnos genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens***

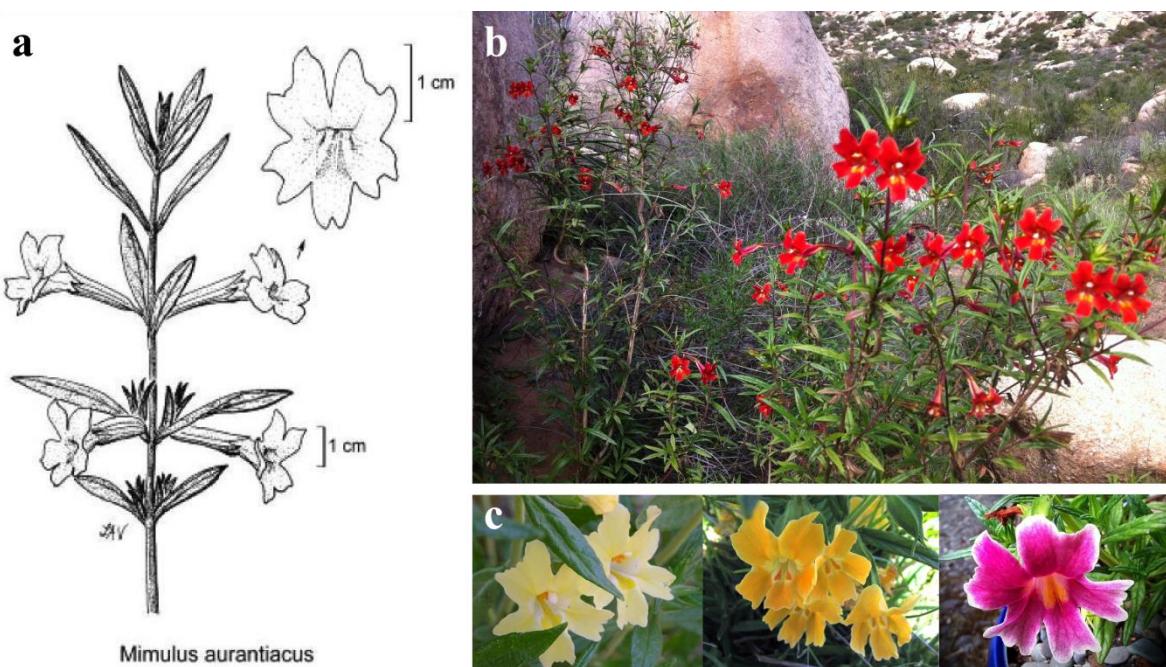
Bakterija *A. tumefaciens* divjega tipa je talna, po Gramu negativna fitopatogena bakterija, ki okužuje ranjeno tkivo pri dvokaličnicah in na poškodovanem mestu povzroči nastanek rakaste tvorbe oz. tumorja. Bakterija *A. tumefaciens* ima naravno sposobnost prenosa

genetskega materiala med bakterijo in rastlino, kar povzroči spremembe dela rastlinskega tkiva, ki nato opravlja sintezo spojin, ki jih uporablja bakterija. Prenos DNA v rastlinsko celico omogoča genska informacija, zapisana na Ti-plazmidu (200 – 800 kbp). Divji tip (*wt*) Ti-plazmida (ang. »Tumor-inducing«) nosi zapis za razne virulentne gene (*vir*), ki so pomembni za prenos genske informacije iz bakterije v rastlinski genom, gene za katabolizem opinov in posebno zaporedje DNA, ki se prenese v rastlinsko celico in integrira v genom gostitelja (T-DNA). To zaporedje vsebuje zapise za onkogene gene (*onc*), katerih ekspresija povzroči povečanje izražanja endogenih rastnih regulatorjev (rastlinskih hormonov avksinov in citokinov) in s tem nastanek tumorja na rastlini. *wt* T-DNA prav tako vsebuje gene, ki nosijo zapis za sintezo opinov. Ti sekundarni metaboliti se izražajo v tumorskem tkivu in predstavljajo specifičen vir ogljika, dušika in energije za celice bakterij *Agrobacterium*, saj jih rastlina ne more presnavljati (Žel, 1996).

Geni za virulenco (*vir*), ki se nahajajo v *vir* regiji na Ti-plazmidu ter kromosomalni virulentni geni (*chv*), uravnava prenos in vključitev T-DNA v rastlinsko celico. Približno 35 *vir* genov je organiziranih v 7 operonov – *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* in *virG*. Poleg tega na proces prenosa in vključitve T-DNA vplivajo še različni proteini gostitelja, saj bakterija *Agrobacterium* izrabi obstoječe celične procese gostitelja, kot so mehanizmi prenosa DNA in proteinov, tarčne proteolize in popravljanja poškodb DNA, da izvrši uspešno integracijo T-DNA v rastlinski genom (Hellens in sod., 2000; Gelvin, 2003; Tzfira in Citovsky, 2008; Zhou in sod., 2013).

## 2.2 ORANŽNI KRINKAR

Oranžni krinkar (*Mimulus aurantiacus* Curtis) in ostale predstavnike rodu *Mimulus* uvrščamo v družino primovk (Phrymaceae, predhodno Scrophulariaceae), red Lamiales. Rod vključuje okoli 100 različnih vrst iz severne Amerike, Čila, vzhodne Azije, severne Afrike, Nove Zelandije in Avstralije. Splošne značilnosti rastlin iz rodu: stebla gladka do dlakava in navadno pokončne rasti, listi večinoma nameščeni nasprotno na steblu, dva nasprotna lista iz istega kolanca (nodija) lahko zraščena skupaj, listi so celi, enostavne oblike, lahko nazobčani, barva listov zelena z različnimi odtenki rdeče. Socvetja so racemozna oz. grozdasta, navadno 2 cvetova na zalistje. Cvetovi se pojavijo kleistogamno, cvetno odevalo (periant) navadno zeleno in sestavljeni iz 5 čašnih listov, ki tvorijo podaljšano cev. Venčni listi sestavljajo nežen venec, razpon barv od bele do rdeče, kostanjeve, vijoličaste in zlatorumene, spodnja ustna pri vznožju nabrekla. Prašnice razprte, 2 plodnici, aksilarna ali parietalna placentacija, brazda pestiča navadno sploščena. Plod navadno ovalen do vretenast (fuziformen), če podolgovat, ukrivljen navzgor, bolj ali manj krhek, kapsula lokulicidna na konici (sicer trdna, nedehiscentna), 1 – 2 prekata. Seme: številčno, navadno < 1 mm, ovalno, večinoma rumeno do temno rjavo (Thompson, 2012).



Slika 1: Oranžni krinkar (*M. aurantiacus*); (a) splošen oris (Thompson, 2012), (b) rastlina v svojem naravnem habitatu (York Design Group, 2011) in (c) mnoge tudi komercialno dostopne barvne kombinacije cvetov (SGWA, 2013; Santa Monica Mountains, 2004; Mead, 2011)

Rastlina *Mimulus aurantiacus* Curtis (Slika 1) je pokončno razraščajoč polgrm do grm, ki naravno uspeva v jugozahodni severni Ameriki, natančneje v jugozahodnem Oregonu in večini Kalifornije. V svojem naravnem habitatu je rastlina trajnica, ki doseže višino do 150 cm. Narečno ime (ang. »bush monkey-flower«) je rastlina dobila po svojih značilnih »opičjih« cvetovih, medtem ko lahko latinsko rodovno poimenovanje »*Mimulus*«, dobesedno prevedemo kot »mali pantomimik«, kar se v slovenskem poimenovanju izrazi kot »krinkar«. Vrstno poimenovanje »aurantiacus« je specifični epitet, ki opisuje rumene do temno oranžne venčne liste, ki so pogosta lastnost vrste in se v slovenskem poimenovanju izrazi kot okrasni pridevek »oranžni«. Stebla so navadno gladka do dlakasta. Listi so navadno enostavni, nasprotno nameščeni na vsakem kolencu po dva, dolžina v razponu 10 – 88 mm, listi so suličaste ali ovalne oblike z robovi zavihanimi navzdol. Barva listov je unifomno zelena, spodnja ploskev svetlejša kot zgornja. Zgornja ploskev je gladka, spodnja ploskev pa navadno lepljiva. Na 3 – 30 mm dolgem cvetnem peclju se razvijejo dvospolni cvetovi cevaste oblike. Pet venčnih listov, dolgih 17 – 46 mm, je zraščenih skupaj. Venec je navadno različnih odtenkov rumene, oranžne do rdeče barve. Vrat cveta dosega dolžine 25 – 57 mm. Značilna je parietalna placentacija. Čas cvetenja je v naravnem habitatu od marca do junija. Plod dosega velikosti 13 – 25 mm, kapsula se cepi v zgornjem vrhu. Število kromosomov je  $2n = 20$ , naravne populacije se prosto križajo med sabo, značilen je pojav medsortnih hibridov (Thompson, 2012).

### 2.2.1 Rastlina *Mimulus aurantiacus* kot modelni organizem

Rod *Mimulus* postaja v zadnjih letih modelni sistem evolucijske in ekološke funkcionalne genomike, saj vključuje širok razpon fenotipske, genomske in ekološke raznolikosti (Wu in sod., 2008). Nedavno je bila objavljena prva celotna genomska sekvenca predstavnika rodu *Mimulus*, in sicer za rumeni krinkar ali *Mimulus guttatus* (Mimulus Genome Project, DoE Joint Genome Institute).

Dosedanje delo z rastlinami *M. aurantiacus* vključuje raziskave molekularnih sprememb, ki sodelujejo pri prilagoditvenem razhajanju v obarvanosti cvetov. Streisfeld in Kohn (2005) sta primerjala obseg morfološke in genetske diferenciacije med geografsko strukturiranimi rdeče in rumeno-cvetočimi rasami rastlin *M. aurantiacus* v okrožju San Diego (južna Kalifornija, ZDA). Barva cvetov je izkazovala tako močno genetsko osnovo, kot tudi oster geografski prehod. V relativno ozkem območju stika obeh geografskih populacij, sta zabeležila rastline čistih ter mešanih barvnih fenotipov. Jasna razločitev med populacijama je nakazovala na dovolj močno selekcijo, ki preprečuje introgresijo barve cvetov, genskemu toku pri nevtralnih lokusih navkljub. Barva cvetov je tako bolj gensko pogojena ter manj odvisna od okolice. V kasnejši raziskavi sta spremljala navade oprševalcev teh dveh barvnih ras rastlin *M. aurantiacus* in ugotovila, da rumeno cvetoče rastline preferenčno obiskujejo vešče *Hyles lineata* (črtasti mlečkar), rdeče cvetoče rastline pa večinoma opršujejo kolibriji (*Calypte anna*, *C. costae* in *Archilochus alexandri*), kar bi lahko pojasnilo oster kontrast med populacijama. Študija je pokazala na majhno vendar značilno razliko v preživetju, rasti in pogostosti obiskov oprševalcev med rasama, po recipročni presaditvi rastlin med območjema rasti obeh populacij. Rdeče cvetoče rastline so uspevale bolje od rumeno cvetočih na obeh območjih, prav tako pa so jih pogosteje obiskovali oprševalci. Opažanja namigujejo na morebitne dodatne dejavnike, ki podpirajo ohranjanje populacije rastlin z rumenimi cvetovi (Streisfeld in Kohn, 2007).

Streisfeld in Rausher (2009) sta na istih dveh populacijah potrdila, da razlike v barvah cvetov rastlin, nastanejo zaradi prisotnosti, oziroma odsotnosti pigmentov antocianinov. Do tkivno specifičnih razlik v proizvodnji pigmentov pride zaradi koordinirane regulacije treh genov antocianinske metabolne poti. Rezultati kažejo na prilagodljivo naravo spremembe v barvah cvetov ter na genetsko osnovo takšnih sprememb, saj mutacije vplivajo na izražanje antocianinskih strukturnih genov. Streisfeld in sod. (2013) so dalje dokazali, da *cis*-regulatorna mutacija pri transkripcijskem faktorju R2R3-MYB povzroči razlikovalno regulacijo encimov v antocianinski biosintetski poti in je glavni povzročitelj razlik v obarvanosti cvetov. Raznosmerna selekcija je tako vodila v fiksacijo alternativnih alelov tega gena med ekotipi, kljub genskemu pretoku pri nevtralnih lokusih.

Delo v sklopu vrste vključuje tudi raziskave rastlinskih smol na površini listov. Rastline *M. aurantiacus* lahko proizvedejo veliko smole, ki lahko doseže 30 % suhe mase listov

(Lincoln, 1980, cit. po Hare, 2008). Smola je sestavljena iz različnih komponent, ki lahko na različne načine pripomorejo k zaščiti rastline. Smola preprečuje razvoj in preživetje ličinke metulja *Euphydryas chalcedona*, ki je primarni škodljivec rastline, prav tako pa ščiti rastlino pred poškodbami zaradi UV svetlobe in pomaga pri uravnavanju izgube vode med sušnimi obdobji. Komponente, ki tvorijo smolo pri rastlinah *M. aurantiacus*, so si med sabo sorodni geranilflavanoni s terpenoidno stransko verigo. Na flavonsko jedro se glede na različice spojin, vežejo hidroksilne in metoksilne skupine (Lincoln in Walla 1986, cit. po Hare, 2002b). Hare in Borchardt (2002) sta dalje določila strukturo geranil- $\alpha$ -pirona, ki je ena od sestavin smole. Hare (2002a) je pokazal, da proizvodnja smole varira glede na spremembe letnih časov ter, da je genetsko pogojena lastnost (Hare, 2002b). Proizvodnja smole je dalje pogojena tudi z interakcijo okolja z genotipom rastlin (Han in Lincoln, 1997).

Rastlina *M. aurantiacus* je bila vključena tudi v razvoj metod proizvodnje haploidov. Pridobivanje haploidov je pomembno za namene žlahtnjenja rastlin, prav tako tudi za razne genetske študije. Murovec in sod. (2007) so za namene testiranja homozigotnosti, razvili kodominantni mikrosatelitni marker *Mim-top6B*, ki izkazuje visoko stopnjo polimorfnosti pri rastlinah *Mimulus* spp. Murovec in Bohanec (2013) sta kasneje razvila uspešno metodo indukcije haploidov pri rastlinah *M. aurantiacus* z obsevanjem peloda z gama žarki in za testiranje izvora regenerantov, razvila nov mikrosatelitni marker *Mim-A*.

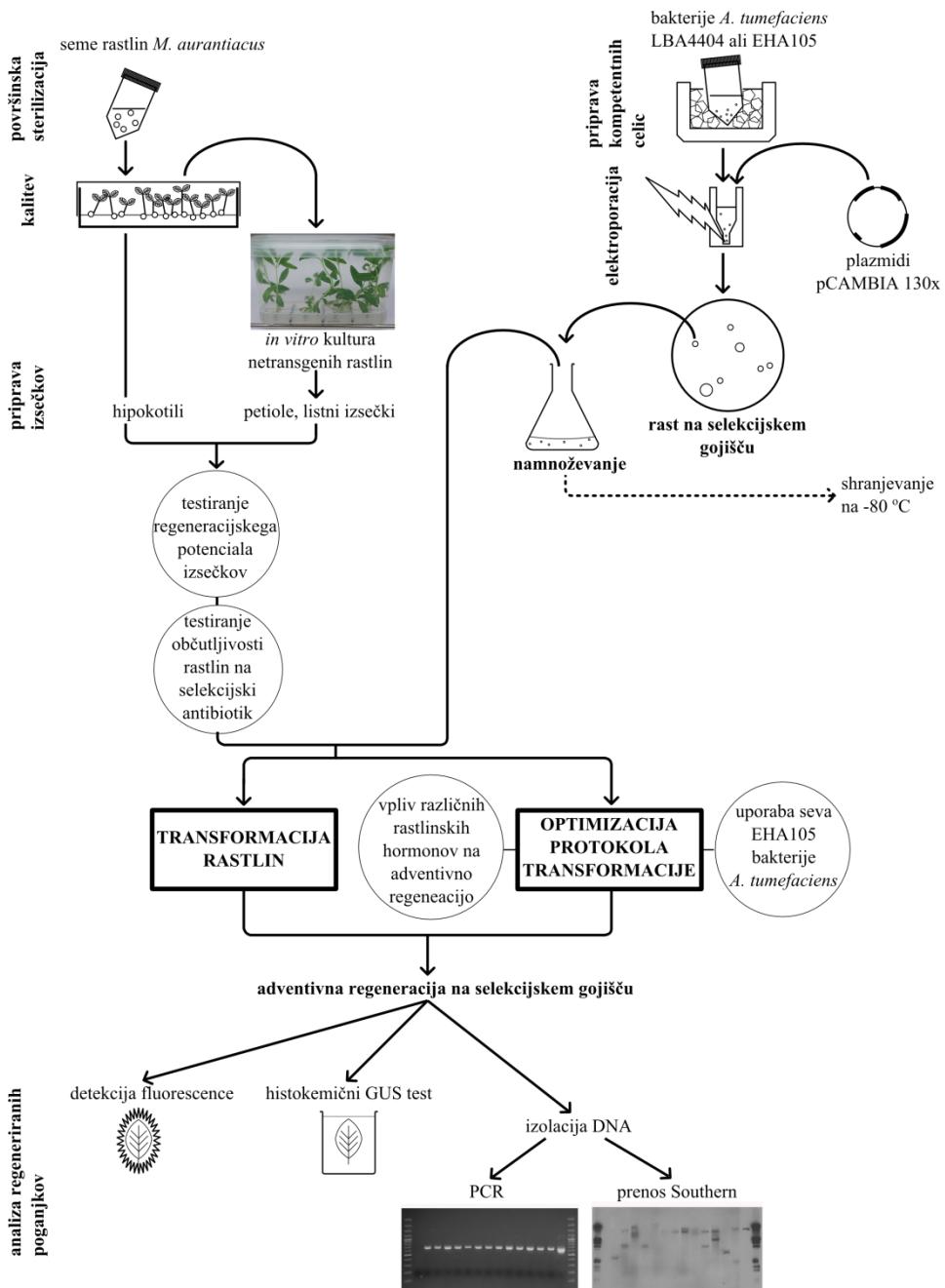
Adventivna regeneracija poganjkov iz izsečkov v *in vitro* okolju, je bistven predpogoj za osnovanje protokola genskih transformacij. Murovec in sod. (2010) so za rastline *M. aurantiacus* postavili sistem adventivne regeneracije poganjkov iz internodijev ter listnih izsečkov. V študiji so preizkušali vpliv različnih koncentracij 1-naftalenocetne kisline (NAA) (0.0, 0.1 in 0.5 mg l<sup>-1</sup>) ter tidiazurona (TDZ) (0.5, 1, 2.5 in 5 mg l<sup>-1</sup>) na uspeh adventivne regeneracije poganjkov na trdnem gojišču, osnovanem na MS. Optimalna koncentracija rastlinskih hormonov je bila 0.5 NAA in 2.5 TDZ (mg l<sup>-1</sup>) za listne izsečke ter 0.1 NAA in 1.0 TDZ (mg l<sup>-1</sup>) za internodije. Pri teh kombinacijah koncentracij hormonov so zabeležili do 100 % odzivnost izsečkov in pri uspešnosti tvorbe globularnih zasnov ter kasneje poganjkov.

Da bi bilo mogoče dalje izkoriščati rastlino *M. aurantiacus* kot modelni sistem za genetske študije ali v okviru žlahtniteljskih prizadovanj, je potrebno razviti zanesljiv sistem za genske transformacije. Uspešno *in planta* transformacijo dveh sestrskih vrstah iz rodu *Mimulus* (*M. lewisii* in *M. cardinalis*), so nedavno uporabili v študiji genetike reproduktivne izolacije, do katere pride zaradi delovanja oprševalca (Yuan in sod., 2013). Glede na naše informacije, do sedaj ni bilo objav o uspešni *in vitro* transformaciji katere od vrst iz rodu *Mimulus*.

Postavitev protokola za transformacijo rastlin *M. aurantiacus* je le ena od potencialnih analog za uveljavitev rodu *Mimulus* kot modelnega sistema evolucijske in ekološke funkcionalne genomike. Wu in sod. (2008) v tem oziru definirajo še mnoge druge cilje. V zadnjih letih je bilo mogoče opaziti napredek v identifikaciji QTL-ov, ki podpirajo ekološko pomembne lastnosti ter v razvoju genomskega vira, kar bo omogočilo razčlenitev genov, ki določajo variacijo preučevanih lastnosti. Da bi na koncu dosegli tako visoko raven razumevanja modelnega sistema – identifikacijo kandidatnih genov ter razumevanje njihovega molekularnega in ekološkega pomena – je potreben nadaljnji razvoj eksperimentalnih tehnologij in protokolov ter bioinformacijskih virov. Prioriteto predstavlja razvoj za eksperimentalno validacijo kandidatnih genov, ki vključuje metodologije transformacije in RNA interference. Učinkovit protokol transformacije bo dalje omogočal razvoj knjižnic T-DNA insercijskih mutant za študije genske funkcije. Mogoč je tudi razvoj mikromrež za rod *Mimulus*, ki bi izboljšale zmožnost razumevanja vzorcev genske ekspresije in vpliva le – te na adaptacijo in speciacijo, mikromreže bi prav tako služile kot orodje za gensko mapiranje pri višji resoluciji. Pomembno je tudi preučevanje vzorcev raznolikosti nukleotidnega zaporedja med in znotraj vrst rastlin *Mimulus*. Te informacije so uporabne pri preučevanju strukture populacij, evolucijske zgodovine vrst in za oceno vpliva selekcije ter demografije na ekološko pomembne kandidatne gene (identificirane s genskim kartiranjem in pozicijskim kloniranjem). Tovrstne študije bi lahko priskrbele informacije o vzorcih in pogostosti sorodstvenih neravnotežjih znotraj vrste (Wu in sod., 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE

Na sliki 2 je predstavljen poenostavljen redosled dela v sklopu vzpostavitve in optimizacije protokola za transformacijo rastlin *M. aurantiacus*. Natančne informacije o posameznih stopnjah so opisane v nadaljnjih podpoglajih.



Slika 2: Poenostavljen prikaz dela v okviru vzpostavitve in optimizacije protokola za transformacijo rastlin *M. aurantiacus*.

### 3.1 GOJIŠČA

#### 3.1.1 Rastlinska gojišča

Trdna gojišča za gojenje rastlin *M. aurantiacus* so bila osnovana na podlagi mešanice makro- in mikroelementov po Murashige in Skoog-u (MS) (1962) (Priloga A). Za pripravo gojišč, smo uporabljali komercialni mešanici MS z dodanimi vitaminimi ali brez njih (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Nizozemska), katerima smo dodali ogljikove hidrate ter primerne rastlinske hormone in vse skupaj raztopili v bidestilirani vodi (ddH<sub>2</sub>O) (Millipore, MA, ZDA) v čaši z mešanjem na magnetnem mešalu. Gojišču smo umerili volumen s pomočjo merilne bučke in pH vrednost na 5,8 pred dodatkom agarja (Daishin agar, Duchefa). Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem za 20 min pri 121 °C in pritisku 1,13 bar. Termolabilne sestavine (večinoma antibiotiki) smo v gojišče sterilno dodali po avtoklaviranju pred razlivajem v sterilne petrijevke (Sterilin®, Cambridge, VB). Pripravljena gojišča smo do uporabe shranjevali v hladilniku pri 4 °C v sterilni embalaži.

MSSE gojišče za kalitev semen:

MS osnovno gojišče z vitaminimi (M 0222.; Duchefa)	4,405 g l <sup>-1</sup>
kazeinhidrolizat (Sigma, St. Louis, ZDA)	0,5 g l <sup>-1</sup>
saharoza (Duchefa)	40 g l <sup>-1</sup>
agar (Duchefa)	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

RM-BAP gojišče za adventivno regeneracijo:

MS osnovno gojišče brez vitaminov (M 0221.; Duchefa)	4,302 g l <sup>-1</sup>
mio-inozitol (Sigma)	0,1 g l <sup>-1</sup>
tiamin (Sigma)	2 mg l <sup>-1</sup>
piridoksin (Sigma)	1 mg l <sup>-1</sup>
nikotinska kislina (Sigma)	1 mg l <sup>-1</sup>
6-benzilaminopurin (BAP) (Sigma)	1 mg l <sup>-1</sup>
1-naftalenocetna kislina (NAA) (Sigma)	0,5 mg l <sup>-1</sup>
saharoza	30 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

RM-ZEA gojišče za adventivno regeneracijo:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l <sup>-1</sup>
mio-inozitol	0,1 g l <sup>-1</sup>
tiamin	2 mg l <sup>-1</sup>
piridoksin	1 mg l <sup>-1</sup>
nikotinska kislina	1 mg l <sup>-1</sup>

zeatin (Duchefa)	1 mg l <sup>-1</sup>
NAA	0,5 mg l <sup>-1</sup>
saharoza	30 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

RM-TDZ gojišče za adventivno regeneracijo:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l <sup>-1</sup>
mio-inozitol	0,1 g l <sup>-1</sup>
tiamin	2 mg l <sup>-1</sup>
piridoksin	1 mg l <sup>-1</sup>
nikotinska kislina	1 mg l <sup>-1</sup>
tidiazuron (TDZ) (Duchefa)	1 mg l <sup>-1</sup>
NAA	0,5 mg l <sup>-1</sup>
saharoza	30 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

EM-BAP gojišče za elongacijo in mikropropagacijo:

MS osnovno gojišče z vitaminimi	4,405 g l <sup>-1</sup>
BAP	0,1 mg l <sup>-1</sup>
indol-3-ocetna kislina (IAA) (Duchefa)	0,1 mg l <sup>-1</sup>
saharoza	30 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

EM-ZEA gojišče za elongacijo in mikropropagacijo:

MS osnovno gojišče z vitaminimi	4,405 g l <sup>-1</sup>
zeatin	0,1 mg l <sup>-1</sup>
IAA	0,1 mg l <sup>-1</sup>
saharoza	30 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

EM-TDZ gojišče za elongacijo in mikropropagacijo:

MS osnovno gojišče z vitaminimi	4,405 g l <sup>-1</sup>
TDZ	0,1 mg l <sup>-1</sup>
IAA	0,1 mg l <sup>-1</sup>
saharoza	30 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	5,8

### 3.1.2 Bakterijska gojišča

Tudi za pripravo bakterijskih gojišč, smo najprej natehtali sestavine, raztopili v ddH<sub>2</sub>O in z merilno bučko umerili volumen gojišča. Pri trdnih gojiščih smo pH umerili pred dodatkom agarja. Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem za 20 min pri 121 °C in pritisku 1,13 bar. Antibiotike smo v gojišče sterilno dodali po avtoklavirjanju pred razlivanjem v sterilne petrijevke (v primeru trdnih gojišč) ali pred začetkom namnoževanja bakterij v erlenmajericah (v primeru tekočih gojišč).

YM gojišče za elektroporativne celice bakterij *A. tumefaciens*:

kvasni ekstrakt (Sigma)	0,4 g l <sup>-1</sup>
manitol (Duchefa)	10 g l <sup>-1</sup>
NaCl (Duchefa)	0,1 g l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Merck, Darmstadt, Nemčija)	0,2 g l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška)	0,38 g l <sup>-1</sup>
agar	8 g l <sup>-1</sup>
pH	7,0

YEB tekoče gojišče za namnoževanje bakterij *A. tumefaciens*:

saharoza	5 g l <sup>-1</sup>
Pepton (Sigma)	5 g l <sup>-1</sup>
goveji ekstrakt (Sigma)	5 g l <sup>-1</sup>
kvasni ekstrakt	1 g l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 g l <sup>-1</sup>
acetosiringon (AS) (Sigma) <sup>a</sup>	200 µM
pH	7,0

<sup>a</sup> dodatek po avtoklavirjanju, pred namnoževanjem bakterij *A. tumefaciens*

½ MS tekoče gojišče za transformacijo:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	2,151 g l <sup>-1</sup>
saharoza	10 g l <sup>-1</sup>
AS <sup>b</sup>	200 µM
pH	7,0

<sup>b</sup> dodatek po avtoklavirjanju, pred resuspendiranjem bakterij *A. tumefaciens*

## 3.2 RASTLINSKI MATERIAL

### 3.2.1 Sterilizacija in kalitev semen

Semena oranžnega krinkarja (*M. aurantiacus* Curtis) (Stover Seed Company, Los Angeles, ZDA) smo pred kalitvijo v *in vitro* kulti površinsko sterilizirali z namakanjem v 1,67 % raztopini dikloroizocianurne kisline natrijeve soli (DICA) (Sigma) z dodatkom 3 kapljic detergenta Tween® 20 (Sigma) za 15 min v sterilnih 50 ml plastičnih centrifugirkah (Sterilin®). Po sterilizaciji smo semena v razkužilu centrifugirali pri 5.000 obr.  $\text{min}^{-1}$  za 5 min (centrifuga Beckman J2-HS, rotor JA-20), da smo lažje odpipetirali razkužilo. Semenom smo dolili sterilno ddH<sub>2</sub>O ter jih ob občasnem mešanju spirali 3 minute, sledilo je ponovno centrifugiranje ter zamenjava vode. Spiranje z ddH<sub>2</sub>O smo ponovili še dvakrat. Po zadnjem spiranju smo iz centrifugirke odlili približno 2/3 ddH<sub>2</sub>O ter preostanek odlili v sterilne 90 mm petrijevke (Corning, New York, ZDA) v katere smo predhodno položili sterilne filtrske papirje. Petrijevke smo inkubirali v rastni komori za 3 dni in nato v brezprašni komori aseptično odbrali polna semena ter jih prenesli na trdno gojišče za kalitev semen (MSSE). Petrijevke s semenami smo ponovno postavili v rastno komoro.

### 3.2.2 Gojenje rastlin v rastni komori in priprava izsečkov

Rastlinski material smo gojili v rastni komori kapacitete 600 litrov pri naslednjih pogojih: T= 23 ± 1 °C, fotoperioda: 16 h svetloba / 8 h temna, osvetlitev 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (pretok fotonov). V poskusih transformacij smo uporabljali tri tipe rastlinskih izsečkov: hipokotile, listne izsečke in petiole. Te smo pridobivali iz različnih delov rastlin v različnih razvojnih stopnjah in z različnim regeneracijskim potencialom. Za pridobivanje hipokotilov, smo 14 dnevnim sejancem, ki so vzklili *in vitro*, izrezali 1 cm predel hipokotila med kličnimi listi in koreninskim vratom. Pri rezu hipokotilov smo pazili, da ne izrežemo delov apikalnega meristema, saj bi s tem povečali možnost razvoja regenerantov iz apikalnega meristema. Za vzpostavitev *in vitro* kulture netransformiranih rastlin *M. aurantiacus*, katere smo uporabljali v poskusih transformacije listnih izsečkov in petiol, pa smo počakali, da sejanci razvijejo prve prave liste. Takrat smo rastline v aseptičnih razmerah s sterilnim skalpelom odrezali na spodnjem delu hipokotila in dobljeni apikalni vršiček prestavili v večje plastične posodice Microbox OV80 (Combiness, Nazareth, Belgija) na trdno gojišče za mikropropagacijo in elongacijo (EM-BAP). Te rastline smo subkultivirali vsakih 8 tednov za namen ohranjanja *in vitro* kulture netransformiranih rastlin *M. aurantiacus*. Ko so rastline zrasle približno 7 cm in razvile stranske (aksilarne) poganjke, smo iz listov rastlin s sterilnim skalpelom v aseptičnih pogojih izrezali listne izsečke kvadratne oblike, površine ~ 0,5 cm<sup>2</sup> (stranice ~ 7 mm). Za pridobivanje petiol, smo aseptično zarezali listni pecelj ob steblu, vendar smo pri tem pazili, da ne zajamemo celic aksilarnega meristema zalistnega brsta. Listno ploskev smo zarezali pravokotno glede na rast peclja, približno 3 mm za listnim pecljem.

### 3.3 ADVENTIVNA REGENERACIJA RASTLIN

#### 3.3.1 Regeneracijski potencial različnih tipov izsečkov

Uspešnost adventivne regeneracije listnih izsečkov, petiol in hipokotilov smo testirali z namenom vrednotenja odzivnosti in regeneracijskega potenciala različnih tipov izsečkov na gojišču RM-BAP. Informacije smo uporabili za oceno primernosti gojišča za poskuse transformacije. Poskus smo opravili v šestih ponovitvah za vsak tip izsečka. Celokupno smo testirali 150 listnih izsečkov, 120 petiol in 135 hipokotilov. Uspešnost adventivne regeneracije smo spremajali s štetjem odzivnih izsečkov po 6 tednih regeneracije. Odzivnost posameznih tipov izsečkov smo predstavili tudi kot delež odzivnih izsečkov, katerega povprečje ponovitev za posamezen tip izsečka, smo opremili z izračunom standardne napake aritmetične sredine (S.E.). Z izračunom S.E. smo želeli ovrednotiti doslednost rezultatov odzivnosti posameznih tipov izsečkov med ponovitvami poskusa. S.E. smo izračunali po enačbi 1, pri čemer označuje pomenijo: ( $\sigma$ ) standardni odklon aritmetične sredine in ( $\bar{X}$ ) število ponovitev meritev.

$$S.E. = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad \dots(1)$$

Rezultatom povprečij odzivnosti izsečkov smo izračunali še koeficient variacije (KV) in ga izrazili v odstotkih. KV je relativna mera nestanovitnosti in kaže koliko odstotkov vrednosti aritmetične sredine spremenljivke predstavlja vrednost standardnega odklona. KV smo izračunali po enačbi 2, kjer označuje pomenijo: ( $\sigma$ ) standardni odklon aritmetične sredine in ( $\bar{X}$ ) vrednost aritmetične sredine odzivnosti izsečkov.

$$KV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 [\%] \quad \dots(2)$$

Rezultate smo dalje statistično obdelali z analizo variance (enosmerna ANOVA) in Tukeyevim testom mnogoterih primerjav (HSD; Honestly Significant Difference), z uporabo funkcij »aov« in »HSD.test« (Steel in sod., 1997), statističnega računalniškega programa R (R Core Team, 2013). Pred izvedbo omenjenih analiz, smo preverili domnevo o homogenosti variance z Levene-ovim testom (Levene, 1960; funkcija »levene.test«: Gastwirth in sod., 2009).

#### 3.3.2 Občutljivost različnih tipov izsečkov na seleksijski antibiotik

S poskusi občutljivosti različnih tipov netransformiranih izsečkov na naraščajoče koncentracije seleksijskega antibiotika higromicina B, smo iskali najnižje učinkovite koncentracije antibiotika za posamezen tip izsečkov, katere smo nato uporabili za rastlinsko selekcijo v poskusih transformacije. Delovne koncentracije antibiotika smo

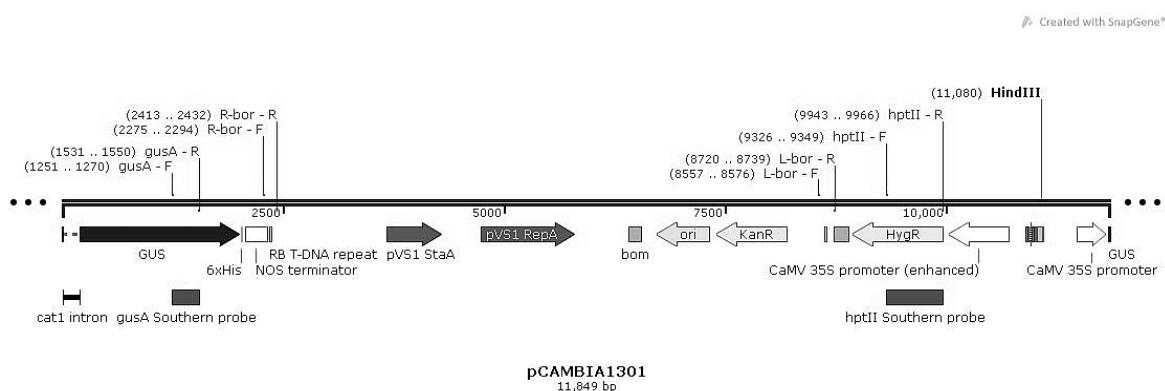
izbrali z ugotavljanjem minimalne učinkovite koncentracije antibiotika, pri kateri izsečki tudi po 5 tednih trajanja poskusa, niso razvili globularnega tkiva in / ali poganjkov. V ta namen smo testirali občutljivost listnih izsečkov, petiol in hipokotilov na 5, 10, 20 in 50 mg l<sup>-1</sup> higromicina B v gojiščih RM-BAP. Skupno smo spremljali po 50 izsečkov pri vsaki koncentraciji antibiotika. V poskusih smo beležili uspešnost delovanja antibiotika s štetjem odzivnih izsečkov in razvrščanjem le-teh glede na obseg regeneracije globularnega tkiva in poganjkov iz izsečkov. Regenerante smo razvrstili v tri različne razrede, kot v primeru Murovec in sod. (2010).

Testirali smo tudi občutljivost poganjkov, ki smo jih pridobili iz netransformiranih rastlin *M. aurantiacus* in jih subkultivirali na gojišča EM-BAP z 0, 10, 20 in 50 mg l<sup>-1</sup> higromicina B. Skupno smo spremljali po 24 poganjkov pri vsaki koncentraciji antibiotika. V poskusu smo beležili čas, ki je bil potreben za odmrtje vseh poganjkov, glede na različne koncentracije antibiotika.

### 3.4 PLAZMIDI

#### 3.4.1 Plazmid pCAMBIA1301

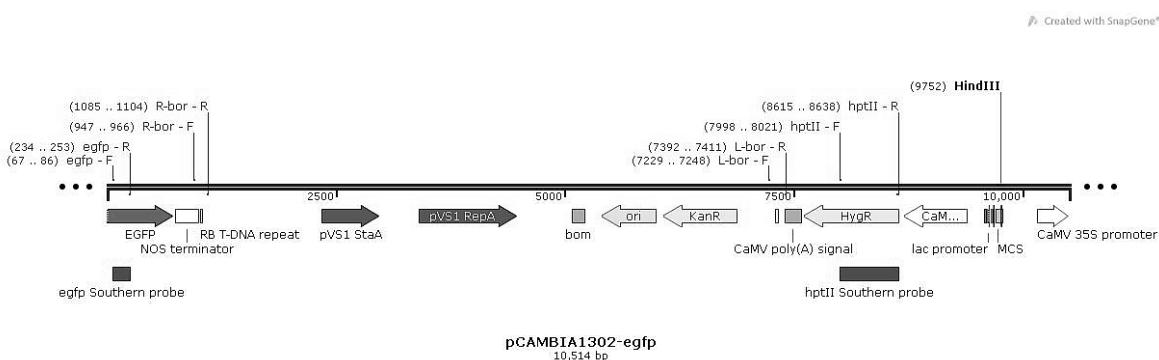
Binarni plazmid pCAMBIA1301 (Cambia, Camberra, Avstralija) je 11,8 kb velik plazmid, osnovan na ogrodju pPZP vektorjev (Hajdukiewicz in sod., 1994). Plazmid se namnožuje v visokem številu kopij med koloniranjem v bakteriji *E. coli*. Regiji *rep* in *sta*, ki izhajata iz plazmida pVS1, omogočata stabilno izražanje v bakterijah *Agrobacterium*, tudi pri gojenju pri neselektivnih pogojih. Plazmid vsebuje *lacZα* zaporedje s pUC18 polilinkerjem. Plazmid prav tako vsebuje gen za bakterijsko selekcijo *nptII*, ki določa odpornost na antibiotik kanamicin in omogoča selekcijo transformiranih bakterij med namnoževanjem. Plazmid v svoji T-DNA regiji vsebuje zaporedje za reporterski gen *gusA* (*uidA*), ki služi za prepoznavanje transformiranih rastlin, ter *hptII* gen, ki omogoča rastlinsko selekcijo na podlagi odpornosti na antibiotik higromicin B. Izražanje reporterskega in rezistenčnega gena uravnava konstitutivni promotor CaMV 35S iz mozaičnega virusa cvetače. Funkcionalni *gusA* gen vsebuje mutacijo N358Q, ki onemogoča N-vezano glikozilacijo, saj tovrstne posttranslacijske modifikacije lahko bistveno zmanjšajo aktivnost GUS (Iturriaga in sod., 1989). Zaporedje *gusA* gena prav tako vsebuje intron iz ricinusove katalaze, ki zagotavlja izražanje GUS v evkariontskih celicah in preprečuje izražanje v prokariontih kot je bakterija *A. tumefaciens*, ki bi povzročile lažno pozitivne rezultate (Ohta in sod., 1990; Tanaka in sod., 1990). Shema pCAMBIA1301 z označenimi elementi in restrikcijskimi mesti je prikazana na sliki 3.



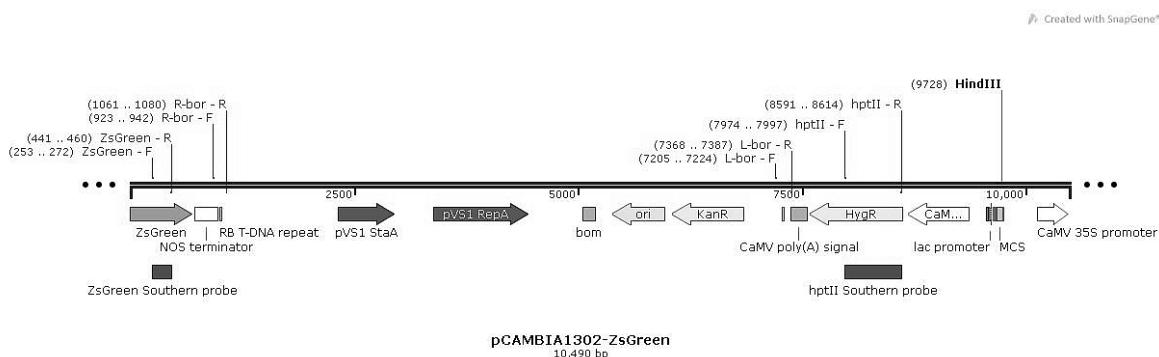
Slika 3: Binarni plazmid pCAMBIA1301 s prikazanimi sestavnimi elementi: (CaMV 35S) promotor iz mozaičnega virusa cvetače; (cat1) intron iz ricinusove katalaze; (GUS) zaporedje *gusA* gena za  $\beta$ -glukuronidazo; (6xHis) zaporedje polihistidinske afinitetne oznake; (NOS terminator) zaključevalno zaporedje nopalinske sintaze; (RB T-DNA repeat) zaporedje desne mejne sekvence T-DNA; (pVS1 StaA) zaporedje gena, ki kodira za protein StaA, ki stimulira stabilnost plazmida v bakterijah *Agrobacterium*; (pVS1 RepA) zaporedje gena, ki kodira za protein RepA, ki stimulira podvojevanje plazmida v bakterijah *Agrobacterium*; (bom) regija, ki omogoča mobilnost plazmida med konjugacijo (ang. basis of mobility); (ori) mesto začetka podvojevanja plazmida; (KanR) zaporedje *nptII* gena za aminoglikozidno transferazo; (LB T-DNA repeat) zaporedje leve mejne sekvence T-DNA; (CaMV poly(A) signal) poliadenilacijsko signalno zaporedje iz mozaičnega virusa cvetače; (HygR) zaporedje *hptII* gena za higromicin B fosfotransferazo; (MCS) multiplo mesto za kloniranje. Slika prikazuje še mesto delovanja restriktijskega encima *HindIII* in mesta naleganja parov začetnih oligonukleotidov (gusA-F, gusA-R, R-bor-F, R-bor-R, L-bor-F, L-bor-R, hptII-F, hptII-R). Slika je bila ustvarjena s programskim orodjem SnapGene® Viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, ZDA), DNA zaporedje pa pridobljeno iz NCBI.

### 3.4.2 Plazmida pCAMBIA1302-EGFP in pCAMBIA1302-ZsGreen

Binarni plazmid pCAMBIA1302 (Cambia) je različica plazmida pCAMBIA1301 in se od predhodnika razlikuje le v različnem reporterskem genu. Pri prvotnem pCAMBIA1302 je namesto gena *gusA* vgrajen gen *mgfp5*, ki kodira za svetlejšo in termostabilno različico zelenega fluorescentnega proteina (GFP) iz meduze *Aequoria victoria* (Siemerling in sod., 1996). Za študije transformacije rastlin *M. aurantiacus*, so v podjetju GenScript Inc. (New Jersey, ZDA) izdelali binarna plazmida pCAMBIA1302-EGFP (Slika 4) in pCAMBIA1302-ZsGreen (Slika 5), tako da so gen *mgfp5* zamenjali bodisi z *EGFP*, bodisi z *ZsGreen*. Gen *EGFP* kodira fluorescentni protein EGFP, ki je optimizirana različica divjega (wt) GFP, saj je približno 100- krat svetlejši in učinkovitejši pri zvijanju aminokislinskega zaporedja proteina (Cormack in sod., 1996). Gen *ZsGreen* (predhodno *zFP506*) kodira zeleni fluorescentni protein ZsGreen in izvira iz nebioluminescentne korale iz rodu *Zoanthus* (Matz in sod., 1999).



Slika 4: Binarni plazmid pCAMBIA1302-EGFP s prikazanimi sestavnimi elementi. Elementi: CaMV 35S promoter, NOS terminator, RB T-DNA repeat, pVS1 StaA, pVS1 RepA, bom, ori, KanR, RB T-DNA repeat, CaMV poly(A) signal, HygR in MCS so enaki, kot pri pCAMBIA1301. (EGFP) je zaporedje gena za EGFP. prikazuje še mesto delovanja restriktijskega encima HindIII in mesta naleganja parov začetnih oligonukleotidov (egfp-F, egfp-R, R-bor-F, R-bor-R, L-bor-F, L-bor-R, hptII-F, hptII-R). Slika je bila ustvarjena s programskim orodjem SnapGene® Viewer, DNA zaporedje pa pridobljeno iz NCBI.



Slika 5: Binarni plazmid pCAMBIA1302-ZsGreen s prikazanimi sestavnimi elementi. Elementi CaMV 35S promoter, NOS terminator, RB T-DNA repeat, pVS1 StaA, pVS1 RepA, bom, ori, KanR, RB T-DNA repeat, CaMV poly(A) signal, HygR in MCS so enaki, kot pri pCAMBIA1301. (ZsGreen) je zaporedje gena za ZsGreen. prikazuje še mesto delovanja restriktijskega encima HindIII in mesta naleganja parov začetnih oligonukleotidov (ZsGreen-F, ZsGreen-R, R-bor-F, R-bor-R, L-bor-F, L-bor-R, hptII-F, hptII-R). Slika je bila ustvarjena s programskim orodjem SnapGene® Viewer, DNA zaporedje pa pridobljeno iz NCBI.

### 3.5 BAKTERIJE

Glede na predhodne dolgoletne pozitivne izkušnje, smo za poskuse transformacije izbrali bakterije *Agrobacterium tumefaciens* seva LBA4404 (Invitrogen, Carlsbad, ZDA) in EHA105.

V celice bakterij *A. tumefaciens* LBA4404 je mogoče vstavljati poljubne plazmidne konstrukte s postopkom elektroporacije, kateremu je sev tudi prilagojen. Sev LBA4404 izhaja iz kromosomskega ozadja Ach5. Izvor Ti-plazmida je pTiAch5, ki je v primeru seva LBA4404 razorožen, saj vsebuje le *vir* in *ori* regijo Ti-plazmida (Hoekema in sod., 1983). Glede na katabolizem opinov divjega tipa seva bakterije *A. tumefaciens*, uvrščamo sev LBA4404 med oktopinski tip. Seleksijski gen *rif* na kromosому določa odpornost seva na

antibiotik rifampicin, selekcijski gen *strep* na Ti-plazmidu pa odpornost na streptomicin (Lee in Gelvin, 2008; Hellens in sod., 2000).

Tudi v bakterijske celice *A. tumefaciens* EHA105 je mogoče vstavljati poljubne plazmidne konstrukte s postopkom elektroporacije. Sev EHA105 izhaja iz kromosomskega ozadja C58. Izvorni Ti-plazmid je pTiBo542, ki je v EHA105 razorožen in vsebuje le *vir* in *ori* regijo (Hood in sod., 1993). Glede na katabolizem opinov divjega tipa seva bakterije *A. tumefaciens*, uvrščamo sev EHA105 med sukcinamopinski tip. Selekcijski gen *rif* na kromosomu določa odpornost seva na antibiotik rifampicin, Ti-plazmid ne vsebuje selekcijskih markerjev odpornosti na antibiotike (Lee in Gelvin, 2008; Hellens in sod., 2000).

### **3.5.1 Priprava kompetentnih celic bakterij *A. tumefaciens* za elektroporacijo**

Pred elektroporacijo željenih plazmidnih konstruktov v bakterije *A. tumefaciens*, smo »prazne« bakterije, shranjene v zamrzovalniku na -80 °C, odtajali na ledu in odpipetirali 100 µl bakterijske suspenzije v 100 ml tekočega gojišča YEB, predhodno ogretega na 28 °C. Bakterije smo gojili čez noč v termostatiranem stresalniku WB30-STE (Kambič, Semič, Slovenija) pri 28 °C in 130 stresljajih min<sup>-1</sup>, dokler niso dosegle optične gostote merjene pri 600 nm v gojišču: OD<sub>600</sub> = 0,6 (kar ustreza  $5 \times 10^6$  celic ml<sup>-1</sup>). Gostoto bakterijskih celic v gojišču smo merili s spektrofotometrom (Eppendorf BioPhotometer RS232C). Kulturo smo nato takoj ohladili na ledu, jo polovico odlili v 50 ml centrifugirko (Sterilin®) in centrifugirali za 5 min pri 3.000 obr. min<sup>-1</sup> ter 4 °C. Odlili smo supernatant in centrifugiranje ponovili še z drugo polovico kulture, tako da smo bakterijski pelet združili v isti centrifugirki. Bakterije smo dalje resuspendirali v 25 ml hladne sterilne ddH<sub>2</sub>O in centrifugirali pri zgornjih pogojih. Spiranje smo ponovili še dvakrat in pelet končno resuspendirali v 400 µl hladne sterilne ddH<sub>2</sub>O. Glede na končni volumen bakterijske suspenzije smo dodali glicerola do končne koncentracije 10 %, razdelili suspenzijo v 40 µl alikvote v sterilne 1,5 ml mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija), ter shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

### **3.5.2 Elektroporacija celic bakterij *A. tumefaciens* LBA4404 in EHA105**

Binarne plazmide pCAMBIA 1301, pCAMBIA 1302-EGFP in pCAMBIA 1302-ZsGreen smo v kompetentne oz. elektroporativne bakterijske celice vnesli s postopkom elektroporacije z uporabo elektroporatorja Easyject Prima (Equibio Ltd., Cambridge, VB). Postopek je osnovan na navodilih proizvajalcev (Equibio Ltd. in Invitrogen).

Kompetentne bakterije shranjene v zamrzovalniku na -80 °C, smo odtajali na ledu in zmešali 1 µl želenega plazmida koncentracije do 100 ng µl<sup>-1</sup> z 20 µl suspenzije kompetentnih celic bakterij *A. tumefaciens*. Suspenzijo smo premešali s pipetiranjem in

pustili celice na ledu za 1 min. Mešanico smo nato odpipetirali v ohlajeno elektroporacijsko kiveto in preverili, da v tekočini ni mehurčkov zraka. Hladno kiveto smo vložili v elektroporator in suspenzijo elektroporirali pri 2.500 V za 5 ms. V kiveto smo takoj odpipetirali 1 ml tekočega gojišča YM, ogretega na sobno temperaturo. Suspenzijo smo v kiveti previdno premešali brez penjenja s pipetiranjem in jo prenesli v 15 ml centrifugirke (Sterilin®) ter inkubirali v termostatiranem stresalniku za 3 h, pri 30 °C in 225 stres. min<sup>-1</sup>. Po 3 h smo 100 µl suspenzije razmazali s sterilno stekleno ezo na trdno gojišče YM, kateremu so bili dodani ustrezni antibiotiki. Za bakterijsko selekcijo smo v gojišče dodali 50 mg l<sup>-1</sup> rifampicina in / ali 100 mg l<sup>-1</sup> streptomicina. Za selekcijo glede na binarne plazmide pCAMBIA1301, 1302-EGFP in pCAMBIA 1302-ZsGreen smo v gojišče dodali še 50 mg l<sup>-1</sup> kanamicina. Poleg neredčene bakterijske suspenzije, smo na selekcijska gojišča razmazali še 10- in 100- kratne redčitve, da bi pridobili posamezne kolonije bakterij. Petjevke smo inkubirali pri 30 °C za 2 – 3 dni.

### 3.5.3 Shranjevanje bakterij *A. tumefaciens* z zamrzovanjem

V izogib variabilnosti bakterijskega materiala med ponovitvami poskusov transformacije, smo pripravili biološko banko starterskih kultur bakterij *A. tumefaciens* LBA4404 za vsak posamezen plazmid. Bakterije smo namnožili iz posameznih kolonij, ki so zrasle na trdnih gojiščih YM s selekcijskimi antibiotiki. Postopek omogoča pripravo agrobakterij za neposredno namnoževanje za postopke transformacije ali večletno shranjevanje. Izbrane posamezne kolonije smo aseptično precepili v tekoče gojišče YEB, kateremu smo predhodno dodali selekcijske antibiotike iz založnih raztopin: 50 mg l<sup>-1</sup> rifampicina in / ali 100 mg l<sup>-1</sup> streptomicina ter 50 mg l<sup>-1</sup> kanamicina. Bakterije smo gojili čez noč v termostatiranem stresalniku pri 28 °C in 130 stres. min<sup>-1</sup>, do pozne eksponencialne faze rasti, kar smo izmerili spektrofotometrično pri OD600 = 0,6. Kulturo smo nato ohladili na ledu in v alikvotih po 500 µl v plastičnih 1,5 ml mikrocentrifugirkah zmešali 350 µl bakterijske suspenzije s 150 µl sterilnega 50 % glicerola. Na ta način pripravljene starterske kulture smo shranili v zamrzovalniku pri -80 °C.

## 3.6 TRANSFORMACIJA RASTLIN *M. aurantiacus*

En dan pred predvideno transformacijo, smo pripravili rastlinske izsečke, ki smo jih čez noč inokulirali na trdno gojišče RM-BAP brez antibiotikov, in nacepili bakterijsko kulturo *A. tumefaciens* s primernim plazmidom, tako da smo v 100 ml sterilnega gojišča YEB z antibiotiki in 200 µM AS, v steklenih erlenmajericah kapacitete 300 ml (Schott AG, Mainz, Nemčija), suspendirali 100 µl željene starterske kulture, ki smo jo odtajali na ledu. Bakterije smo gojili čez noč v termostatiranem stresalniku pri 28 °C in 130 stres. min<sup>-1</sup>, do pozne eksponencialne faze rasti pri OD600 = 0,6.

Ob doseženi primerni celični gostoti, smo kulturo iz erlenmajerice aseptično razdelili v dve 50 ml plastični centrifugirki in centrifugirali za 5 min pri 5.000 obr.  $\text{min}^{-1}$ . Gojišče YEB smo odlili in pelet bakterij prelili z enakim volumnom tekočega gojišča  $\frac{1}{2}$  MS, kateremu smo dodali 200  $\mu\text{M}$  AS iz založne raztopine. Bakterije smo resuspendirali, suspenzijo odlili v sterilne plastične 90 mm petrijevke in vanjo položili rastlinske izsečke. V 50 ml bakterijske suspenzije smo kokultivirali približno 50 izsečkov za 15 min z občasnim rahlim mešanjem. Po 15 min kokultivaciji v suspenziji bakterij *A. tumefaciens*, smo izsečke zračno osušili na sterilnem filterskem papirju in jih prenesli na trdno gojišče RM-BAP brez antibiotikov z dodanim 200  $\mu\text{M}$  acetosiringonom. Petrijevke smo oblepili s parafinskim filmom (Parafilm®M; Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, ZDA) in inkubirali v temi pri 28 °C za 4 dni.

Po 4 dneh kokultivacije izsečkov s celicami bakterij *A. tumefaciens* v temi, smo le-te spirali v raztopini timentina (tikarcilin + klavulanska kislina v razmerju 15:1), koncentracije 200 mg  $\text{ml}^{-1}$ , dvakrat po 5 minut. Po drugem spiranju smo izsečke prenesli na sterilen filterski papir in počakali da se zračno posušijo. Izsečke smo inokulirali na trdno gojišče RM-BAP z dodanima antibiotikoma timentin in higromicin B. Timentin (150 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) je služil za preprečevanje rasti agrobakterij, ki bi morebiti ostale po spiranju izsečkov. Higromicin B je omogočal rastlinsko selekcijo gensko spremenjenih celic. Delovne koncentracije antibiotika v selekcijskem gojišču smo predhodno določili s testom občutljivosti različnih netransformiranih izsečkov na higromicin B in izbrali delovno koncentracijo 20 mg  $\text{ml}^{-1}$  za petiole in listne izsečke ter 50 mg  $\text{ml}^{-1}$  za hipokotile. V posamezno 90 mm petrijevko smo položili 10 izsečkov. Petrijevke smo oblepili s parafinskim filmom in postavili v rastno komoro na svetlobo in predhodno opisanih splošnih pogojih za gojenje rastlin *M. aurantiacus*. Regenerirajoče rastlinsko tkivo smo subkultivirali na sveže gojišče po 4 tednih.

### 3.7 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA TRANSFORMACIJE

#### 3.7.1 Vpliv različnih rastlinskih hormonov na adventivno regeneracijo hipokotilov

Da bi preverili možnost optimizacije potokola transformacije, smo najprej preizkusili uspešnost adventivne regeneracije hipokotilov v odvisnosti od različnih koncentracij avksinov in treh različnih vrst citokinov (BAP, zeatin in TDZ). Uspešnejša regeneracija na drugačnem gojišču, bi lahko vodila v izboljšano adventivno regeneracijo v poskusih transformacije. V poskusu smo za vsako vrsto citokinina testirali 4 različne koncentracije (0,5; 1; 2,5 in 5 mg  $\text{l}^{-1}$ ) v kombinaciji z dvema koncentracijama avksina NAA (0,1 in 0,5 mg  $\text{l}^{-1}$ ). Vsaka kombinacija koncentracije avksina in citokinina je predstavljava različno gojišče. Serije so predstavljale ponovitve poskusa na posameznem gojišču. Vsa gojišča, kjer smo testirali različne kombinacije posameznega citokinina, pa smo lahko združili v skupine določenega citokinina.

Za spremljanje uspešnosti adventivne regeneracije, smo beležili število regeneriranih poganjkov iz posameznega izsečka, mase izsečkov z adventivnimi strukturami in število hiperhidriranih poganjkov. Meritve smo izvajali v šestih ponovitvah (serijah) za vsako gojišče. Rezultate smo predstavili kot povprečje meritev iz serij posameznega gojišča. Povprečno število regeneriranih poganjkov iz posameznega izsečka in povprečne mase izsečkov z adventivnimi strukturami smo predstavili s standardno napako aritmetične sredine (S.E.), katero smo izračunali po enačbi 1 ter z koeficientom variacije (KV), katerega smo izračunali po enačbi 2.

### 3.7.2 Poskusi optimizacije transformacije

V poskusih optimizacije protokola transformacije rastlin *M. aurantiacus*, smo preiskovali učinke 2 različnih faktorjev oz. sprememb v protokolu, na končno učinkovitost transformacije (TE). V poskusih optimizacije transformacije smo varirali en faktor naenkrat. Faktorja optimizacije sta bila uporaba drugačnega seva bakterij *A. tumefaciens* (EHA105), kot vektorja za prenos genskih konstruktov v rastlinske celice, in uporaba različnih citokininov (zeatin in TDZ) za stimulacijo adventivne regeneracije izsečkov v poganjke. V ta namen smo po ko-kultivaciji izsečkov uporabljali gojišča RM-ZEA in EM-ZEA ali RM-TDZ in EM-TDZ. Natančen opis gojišč je v poglavju 3.1.1. Z izjemo omenjenih faktorjev optimizacije, smo ostale postopke v poskusih transformacije opravili, kot je opisano v poglavju 3.6. V poskusih optimizacije z bakterijami *A. tumefaciens* EHA105 smo uporabili hipokotile, v poskusih optimizacije gojišč pa smo uporabljali hipokotile in petiole.

## 3.8 TESTIRANJE IZRAŽANJA TRANSGENOV

### 3.8.1 Histokemični $\beta$ -glukuronidazni (GUS) test

Za testiranje smo uporabili zelene, normalno razvite regenerirane poganjke rastlin *M. aurantiacus*, transformirane z bakterijo *A. tumefaciens*-pCAMBIA1301. Za negativno kontrolo smo uporabili netransformirane rastline iz tkivne kulture.

Histokemični GUS test smo izvajali po prirejenem protokolu Jefferson-a in sod. (1987). S testom določamo izražanje gena *gusA*, glede na aktivnost encima  $\beta$ -glukuronidaze (GUS), ki ga gen kodira. Encim  $\beta$ -glukuronidaza razgrajuje substrat X-GlcA (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronska kislina; Duchefa), poznan tudi pod imenom X-Gluc, v brezbarvno glukoronsko kislino in brezbarven vodotopen indoksilni derivat (5-bromo-4-kloro-3-indolil). Po oksidativni dimerizaciji primarnega produkta encimske reakcije, nastane modro obarvan produkt – barvilo indigo, ki ni topno v vodnih raztopinah in se zato obori na mestu delovanja GUS (Jefferson, 1987).

Tkivo domnevno transgenih rastlin, ki so se regenerirale na selekciskem gojišču, smo v aseptičnih pogojih s sterilnim skalpelom odrezali iz matične rastline / poganjka. Vzorce smo inkubirali v 50 mM fosfatnem pufru NaPO<sub>4</sub> (pH 6,8) (Priloga B) z 1 % Triton™ X-100 (Sigma) pri 37 °C za 1 h. Raztopino smo odstranili in dodali svež fosfatni pufer z dodanim substratom 1 mM X-Gluc (Duchefa) ter 20 % metanolom (Merck). Raztopino z vzorci smo vakuumirali (tlak ~ 100 mbar) za 5 minut in inkubirali čez noč pri 37 °C.

Naslednji dan smo testirane vzorce vizualno pregledali za pojav modre obarvanosti tkiva. Za natančnejši pregled ter fotografiranje rezultatov smo si pomagali s stereolupo (Nikon SMZ1000).

### 3.8.2 Pregled izražanja genov *EGFP* in *ZsGreen*

Regenerirane poganjke rastlin *M. aurantiacus*, ki so zrastli iz kokultiviranih izsečkov z bakterijama *A. tumefaciens*-pCAMBIA1302-EGFP in *A. tumefaciens*-pCAMBIA1302-ZsGreen, smo pregledali z epifluorescentnim stereomikroskopom (Nikon SMZ1000) z ustreznim filtrom za detekcijo zelene fluorescence proteinov EGFP in ZsGreen. EGFP ima ekscitacijski maksimum pri 488 nm ter emisijski maksimum pri 509 nm (Cormack in sod., 1996). ZsGreen ima ekscitacijski maksimum pri 496 nm ter emisijski maksimum pri 506 nm (Matz in sod., 1999; Wenck in sod., 2003). Zaradi podobnosti v emisijskem in ekscitacijskem maksimumu obeh proteinov, smo za detekcijo fluorescence obeh, uporabili enak set filtrov, ki vključuje: ekscitacijski filter (EX) 480/40 nm, dikroično zrcalo (DM) 505 nm in emisijski filter (BA) 535/50 nm.

Zaradi nedestruktivne narave detekcije fluorescenčnih proteinov, smo izražanje fluorescentnih reporterskih genov *EGFP* in *ZsGreen* lahko opazovali v različnih stopnjah regeneracije rastlinskega tkiva – od pojava kalusne gmote nediferenciranih celic, oblikovanja globularnega tkiva, do razvitih poganjkov.

## 3.9 MOLEKULARNA ANALIZA TRANSGENOV

### 3.9.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva

Celokupno genomsko DNA iz listov in stebel 12 tednov starih transformiranih regenerantov rastlin *M. aurantiacus*, smo izolirali s prilagojeno metodo s CTAB (heksadeciltrimetilamonijev bromid) (Kump in Javornik, 1996).

Pred izolacijo smo apikalne poganjke posameznih regenerantov subkultivirali na sveže gojišče v aseptičnih pogojih. Preostalo rastlinsko tkivo smo nato prenesli iz rastne posodice v keramične terilnice tako, da smo v posamezni terilnici procesirali tkivo posameznega

regeneranta. Nadaljnje postopke izolacije DNA smo izvajali v digestoriju. V izogib medsebojne kontaminacije vzorcev ter vdora plazmidne DNA iz okolja, smo terilnice pred načrtovano izolacijo DNA, preko noči spirali v 3N HCl in nato sprali ostanke HCl s spiranjem v vodi za 1 h ter v pomivalnem stroju pri standardnem programu pranja.

Rastlinskemu tkivu v terilnicah smo dodali 700 – 1.000 µl pufra CTAB (Priloga B), segretega na 68 °C in ga s trenjem z batom homogenizirali v gosto suspenzijo. Notranjosti terilnice se nismo dotikali s prsti, da nismo kontaminirali vzorcev. Suspenzijo smo nato prelili v mikrocentrifugirko in inkubirali v vodni kopeli pri 68 °C za 1,5 – 2 h. V primeru izolacije DNA za testiranje s Southern prenosom, smo pred inkubacijo v posamezen vzorec dodali še 100 µg ml<sup>-1</sup> RNAze A (Thermo Scientific, Waltham, ZDA) in po 1 h inkubacije še 20 µg ml<sup>-1</sup> proteinaze K (Thermo Scientific). Po inkubaciji smo suspenziji dodali 700 µl topila kloroform / izoamilalkohol v razmerju 24:1, dobro premešali in centrifugirali za 15 min pri 11.000 obr. min<sup>-1</sup> in 4 °C (centrifuga Beckman J2-HS, rotor JA-18). Po centrifugiranju, se je suspenzija ločila v več faz: spodnjo organsko fazo z nepolarnim topilom, mejno fazo z zbitim celičnim drobirjem ter v zgornjo vodno fazo. Vodno fazo smo prenesli v svežo 1,5 ml mikrocentrifugirko in pri tem pazili, da nismo zajeli ostankov tkiva ali organske faze ter dodali 70 µl 3 M natrijevega acetata (NaOAc) (pH 5,2) in 700 µl izopropanola, ohlajenega na -20 °C. Vsebino mikrocentrifugirke smo nato dobro premešali in postavili v zamrzovalnik na -20 °C za 1 – 24 h. Po ohlajanju smo vsebino ponovno centrifugirali za 15 min pri 11.000 obr. min<sup>-1</sup> in 4 °C. Po centrifugiranju je bila DNA vidna na dnu mikrocentrifugirke v obliki peleta. Supernatant smo zavrgli, oborjeno DNA sprali s 500 µl 70 % etanola in vsebino centrifugirali za 15 min pri 11.000 obr. min<sup>-1</sup> in 4 °C. Po centrifugiranju smo odstranili ves etanol, odprte mikrocentrifugirke prenesli v delujočo brezprašno komoro in zračno sušili ~ 10 min, dokler ni etanol izhlapel. Oborini DNA smo nato dodali 30 µl pufra TE (Priloga B) in postavili v hladilnik za 24 h, da se je DNA raztopila. Raztopino smo do končne uporabe (za daljše obdobje) shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

### 3.9.2 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo izolirane DNA iz rastlin *M. aurantiacus*, smo izmerili z DNA fluorometrom DyNA Quant™ 200 (Amersham Biosciences, Amersham, VB) po navodilih proizvajalca. Za merjenje koncentracije DNA smo pripravili standardiziran pufer. Pufer je vseboval 1× TNE pufer (pH 7,0) (Priloga B), fluorescentno barvilo Hoechst 33258 (1 µl ml<sup>-1</sup>) in ddH<sub>2</sub>O. DNA telečjega timusa (1 mg ml<sup>-1</sup> DNA v 1× TNE pufru) je bila standard za kalibracijo fluorometra. Koncentracije DNA smo merili v raztopini 2 ml standardiziranega pufra, v katerega smo odpipetirali 2 µl vzorca. Za merjenje smo uporabljali 2 ml kivete iz kvarčnega stekla. DNA izoliranih vzorcev smo redčili glede na zahteve nadaljnjih analitskih metod.

### 3.9.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo ugotavljali prisotnost specifičnih genov v vzorcih DNA, izoliranih iz regeneriranih rastlin *M. aurantiacus*. Ugotavljali smo prisotnost regij *hptII*, *gusA*, *EGFP*, *ZsGreen*, *virA*, *virD4*, *R-bor* in *L-bor*. Namnoževanje regij je potekalo v dupleks PCR z dodatkom dveh parov začetnih oligonukleotidov (Preglednica 1). Pare testiranih genov za dupleks PCR smo izbrali glede na pričakovano končno dolžino namnoženega fragmenta, po ključu: rezistenčni gen / reporterski gen, *virA* / *R-bor* in *virD4* / *L-bor*. Z detekcijo *vir* genov iz bakterij *A. tumefaciens* smo ugotavljali kontaminacijo vzorcev z rezidualnimi bakterijskimi celicami, ki bi lahko povzročile lažno pozitivne rezultate PCR testiranja. S testiranjem za zaporedja mejnih sekvenc T-DNA, smo želeli ugotoviti frekvenco vnosa DNA zaporedij, ki niso del T-DNA, ali prehodno transformacijo.

Preglednica 1: Pari sekvenc začetnih oligonukleotidov za namnoževanje selekcijskega in reporterskih genov, *vir* genov iz bakterij *Agrobacterium*, mejnih sekvenc plazmida in pričakovane dolžine pomnožkov (povzeto po Susič in sod., 2013).

Gen	Zaporedje oligonukleotidov 5'-3'	Dolžina namnoženega fragmenta (bp)
<i>hptII</i>	ATG ACC GCT GTT ATG CGG CCA TTG (forward) AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG ACG (reverse)	641
<i>gusA</i>	CTT GGT TAG GAC CCT TTT CTC (forward) GCC CGG CTT TCT TGT AAC (reverse)	301
<i>EGFP</i>	ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC (forward) AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG (reverse)	187
<i>ZsGreen</i>	AGA ACT CGT GTC CTG CTG GT (forward) ATG ATC TTC TCG CAG GAT GG (reverse)	208
<i>virA</i>	TAG CAC AAA ACT CGG TGT CT (forward) GCT GAT GAT GAT GTC GAT TT (reverse)	341
<i>virD4</i>	GAG GAA GAA GAC CTG CAT TT (forward) GAG ATG TAG GTT GGG GTC TC (reverse)	360
<i>R-bor</i>	ACT GAT GGG CTG CCT GTA TC (forward) AAT CCA GAT CCC CCG AAT TA (reverse)	183
<i>L-bor</i>	AGC GCG CAA ACT AGG ATA AA (forward) AAA CCT TTT CAC GCC CTT TT (reverse)	158

PCR reakcijske mešanice smo pripravljali v brezprašni komori na ledu. Sestava posamezne 25 µl PCR reakcije je bila: 20 ng genomske DNA, 0.5 U *Taq*-DNA polimeraze (Fermentas), 1 × PCR pufer (priložen polimerazi), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM vsakega deoksinukleotida dNTP in 4 × 0.5 µM ustreznih začetnih oligonukleotidov (IDT,

Coralville, ZDA) (Preglednica 1) Vzorcem smo pri vsaki seriji dodali še pozitivni in negativni kontroli. Pozitivni kontroli sta bili DNA ustreznega plazmida in 5 ng DNA izolirane iz bakterij *A. tumefaciens* z vključenim plazmidom. Kot negativni kontroli sta služili DNA, izolirana iz netransformiranih rastlin *M. aurantiacus* ter ddH<sub>2</sub>O (IDT). Za izvedbo PCR smo uporabili ciklični termostat GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, ZDA) s temperaturnim profilom: začetna denaturacija za 5 min pri 94 °C, 30 ponavlajočih se ciklov denaturacije 1 min pri 94 °C, prileganja začetnih oligonukleotidov 1 min pri 56 °C in sinteze fragmentov DNA 1,5 min pri 72 °C, končna 7 minutna inkubacija pri 72 °C in ohlajanje na 4 °C. Do nadaljnje analize smo vzorce za krajši čas (nekaj dni) hranili na 4 °C, za daljši čas pa zamrznili na -20 °C.

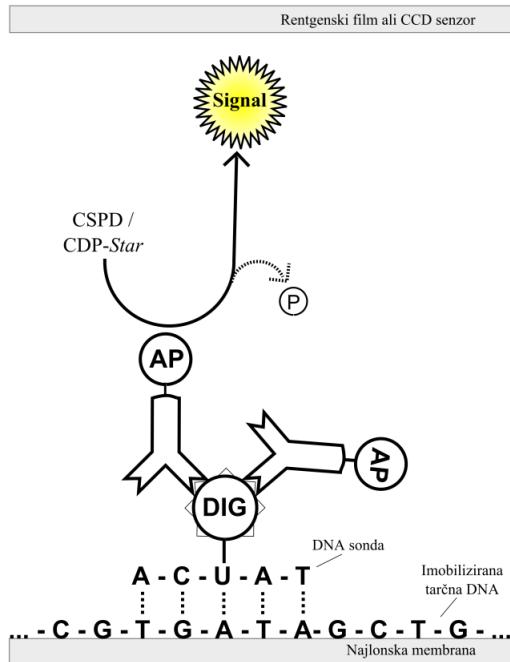
### 3.9.4 Agarozna gelska elektroforeza po PCR

Z agarozno gelsko elektroforezo smo ločevali fragmente DNA bodisi po restriktijski reakciji z restriktijskimi endonukleazami za nadaljnjo analizo s prenosom po Southern-u, bodisi za analizo prisotnosti transgenov v rastlinski DNA s PCR reakcijo.

Za analizo rezultatov PCR smo fragmente DNA po reakciji ločevali v 1,2 % agaroznem gelu (SeaKem® LE Agarose; Lonza, Basel, Švica) debeline 5 mm, kateri vsebuje še 1× TBE (Priloga B) pufer in 0,5 µg ml<sup>-1</sup> etidijevega bromida (EtBr) (Sigma). Ko smo zmešali vse sestavine razen EtBr, smo dopolnili z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumna in mešanico trikrat segreli do vretja v mikrovalovni pečici. EtBr smo dodali v raztopljeno agarozo, ko se je ta ohladila na približno 60 °C in jo nato razlili v izbran kalup z vstavljenim glavnikom. Elektroforezo smo izvajali v horizontalnem elektroforetskem sistemu Bio Rad Sub-Cell® Model 192 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA). Ko se je gel strdil, smo odstranili glavnik in gel potopili v elektroforetsko posodo z 1× TBE pufrom. Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali 1/4 volumna nanašalnega barvila BPB (Priloga B) in premešali. Poleg vzorcev smo na gel nanesli tudi negativni in pozitivni kontroli, kateri smo pripravili v seriji s posamezno PCR reakcijo. Vzorcem smo na vsaki strani gela nanesli še dolžinski DNA standard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas), s pomočjo katerega smo ocenjevali dolžine pomnoženih fragmentov. Uporabljeni dolžinski standard je vseboval DNA fragmente velikosti 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 in 1031 bp. Elektroforezo smo izvajali pri toku v anodni smeri in napetosti 130 V za ~ 90 minut. DNA fragmente smo po končani elektroforezi detektirali s pomočjo EtBr (ki tvori komplekse z dvojerično DNA in omogoča detekcijo v UV spektru) pod UV lučjo pri 302 nm na transiluminatorju (UVP, LLC, Upland, ZDA). Gel smo med osvetljevanjem z UV lučjo, fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 8400 ED (Nikon, Tokio, Japonska).

### 3.9.5 Analiza transgenov s prenosom po Southern-u

Z analizo vzorcev DNA predpostavljenih transgenov s prenosom po Southernu, smo preverjali uspešnost vgradnje T-DNA v rastlinski genom in določili število vgrajenih kopij.



Slika 6: Shema detekcije z digoksigeninom (DIG) označene DNA sonde, hibridizirane na tarčno genomske DNA imobilizirano na najljonski membrani. Na DIG se vežejo protitelesa, konjugirana z encimom alkalno fosfatazo (anti-DIG-AP Ab), katera katalizira razgradnjo substrata CDP-Star, kar privede do kemiluminescentne reakcije, ki jo lahko detektiramo z rentgenskim filmom ali CCD senzorjem (lastno delo, narejeno po navodilih Eisel in sod., 2008).

Za izvedbo analize smo sledili navodilom protokola v priročniku DIG Application Manual for Filter Hybridization (Eisel in sod., 2008).

#### 3.9.5.1 Restrikcija genomske DNA

Genomsko DNA, izolirano iz domnevno transgenih rastlin *M. aurantiacus*, ki so se regenerirale v *in vitro* kulturi na selekcijskem gojišču, smo izpostavili delovanju restrikcijske endonukleaze *HindIII*. Z restrikcijo genomske DNA na različno dolge fragmente, smo dosegli ločitev le-teh po velikosti s pomočjo gelske elektroforeze (Southern, 2006). Pred izborom primerenega restrikcijskega encima smo z informacijskimi orodji, kot je NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze in sod., 2003) preverili, da ta ne reže verige DNA znotraj zaporedja gena (Priloga D), katerega prisotnost smo detektirali z DNA sondno. Restrikcijski encim *HindIII* prepozna palindromsko zaporedje nukleotidov »AAGCTT« in prekline DNA verigo na mestu »A | AGCTT«.

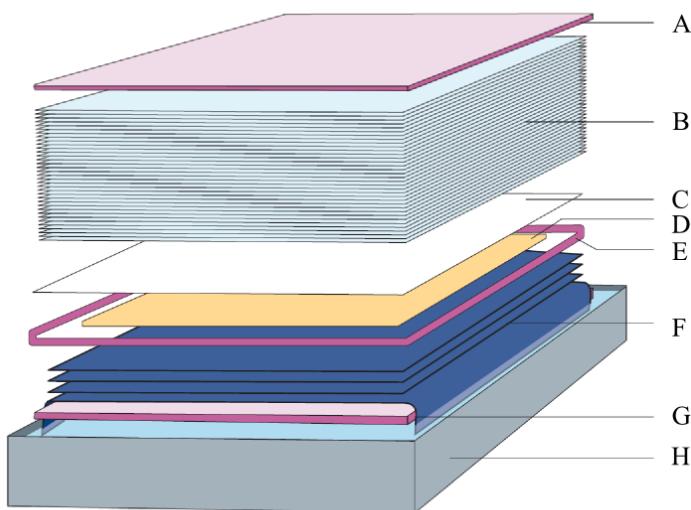
Restriktivno reakcijo smo izvajali čez noč v cikličnem termostatu pri 37 °C. Reakcijska mešanica v PCR mikrocentrifugirkah je vsebovala najmanj 5 µg genomske DNA, 50 enot encima *Hind*III (10 U *Hind*III / µg<sup>-1</sup> DNA) (Thermo Scientific), 1× pufer R (Thermo Scientific) in ddH<sub>2</sub>O (IDT) za uravnavanje volumna. Restriktivni encim smo mešanici dodali zadnjega in ga do uporabe hranili na ledu. Končni volumen restriktivske reakcije je znašal 20 – 70 µl. Za negativno kontrolo smo uporabili 5 µg genomske DNA iz netransformiranih rastlin *M. aurantiacus*, za pozitivno kontrolo smo namenili 5 pg ustreznega plazmida.

### 3.9.5.2 Ločevanje fragmentov DNA

Prekonočni restriktivni reakciji je sledilo ločevanje fragmentov DNA z agarozno gelsko elektroforezo. Zaradi priročnega formata najlonovih membran površine 150 cm<sup>2</sup>, smo na posamezen gel nanesli 13 vzorcev DNA, 2 kontroli ter 2 dolžinska standarda. Za ločevanje fragmentov genomske DNA, razrezane z restriktivskimi endonukleazami, smo pripravili 0,8 % agarozni gel debeline 7,5 – 10 mm, brez dodanega EtBr. Gel smo pripravili po že opisanem postopku (poglavlje 3.9.4), le da smo predhodno očistili elektroforetsko posodo in zamenjali 1× TBE pufer s svežim, da smo se izognili kontaminaciji z EtBr. Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali 1/6 volumna 6x DNA Loading Dye (Promega) ter dobro premešali. Poleg vzorcev smo na gel nanesli tudi negativno in pozitivno kontrolo, kateri smo pripravili v seriji s posamezno restriktivno reakcijo. Na vsaki strani gela smo nanesli še z digoksičenom označen dolžinski DNA standard DNA Molecular Weight Marker III, digoxigenin-labeled (Roche), s fragmenti velikosti 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 in 21226 bp. Na gel smo nanesli 20 ng dolžinskega DNA standarda. Elektroforezo smo izvajali pri toku v anodni smeri in napetosti 80 V za ~ 3 ure, oziroma dokler ni prva (modra) fronta nanašalnega barvila skoraj dosegla roba gela.

### 3.9.5.3 Southern prenos DNA na membrano

Po končani elektroforezi, smo gel vzeli iz kalupa in s pomočjo ravnila in skalpela odrezali odvečne dele. Gel smo previdno prenesli v podolgovato plastično posodo (volumen 500 ml) in dvakrat po 15 min spirali z 250 ml denaturacijske raztopine (Priloga B) ob nežnem stresanju na stresalniku GyroTwister™ 3-D Shaker (Labnet International, Edison, ZDA) pri sobni T. Previdno smo odlili denaturacijsko raztopino in 2 × sprali z 250 ml ddH<sub>2</sub>O. Sledila je nevtralizacija 2 × 15min v 250 ml nevtralizacijske raztopine (Priloga B) ob nežnem stresanju pri sobni T ter 2 × spiranje z ddH<sub>2</sub>O. Med nevtralizacijo gela smo sestavili pripravo za kapilarni prenos DNA po Southern-u (Slika 7). V čisto plastično posodo smo dali podstavek iz pleksi stekla in čezenj nastavili 3 plasti kromatografskega papirja iz celuloze 3MM Chr (Whatman®, Kent, VB), ki smo ga izrezali tako, da je na dveh nasprotnih koncih segala v spodnji rezervoar za pufer. Na sredino zgornje ploskve smo nalili 20× SSC pufer (Priloga B) ter hkrati valjali s čisto stekleno epruveto, dokler nismo zgladili celotne površine papirja.



Slika 7: Shema priprave za Southern prenos DNA na membrano s kapilarnim vlekom. (A) 500 g utež, (B) sklad papirnatih brisač, (C) najlonska membrana, (D) agarozni gel z DNA za prenos na membrano, (E) obloga iz parafinskega filma za omejevanje površine kapilarnega vleka, (F) 3 plasti celuloznega kromatografskega papirja srednje debeline, ki sega v pufer, (G) stekleno ali plastično stojalo, ki sega nad gladino pufera, (H) plastična ali steklena posoda s puferom 20× SSC (Southern, 2006: 520).

V spodnji rezervoar smo nalili preostanek od 2 litrov 20× SSC pufera. Gel smo pred nanosom uravnotežili v 250 ml 20× SSC puferu za 10 min ob stresanju na sobni T. Medtem smo pripravili pozitivno nabito najlonsko membrano Type66 (mere 10 x 15 cm) (Roche). Membrano smo primerno označili z grafitnim svinčnikom in za 5 min omočili v manjši količini 20× SSC pufera pri sobni T. Uravnotežen gel smo prestavili na namočeno ploskev priprave za prenos po Southern-u in z nežnim valjanjem s čisto stekleno epruveto odstranili mehurčke zraka. Na gel smo nato položili najlonsko membrano, poravnali in z valjanjem odstranili mehurčke zraka. Izpostavljeni mokri dele papirne ploskve okoli gela smo izolirali s parafinskim filmom in na membrano previdno postavili 3 plasti kromatografskega papirja, izrezanega glede na velikost membrane. Pripravo smo zaključili z dodatkom približno 400 papirnatih brisač, katere smo obtežili s 500 g utežjo. Kapilarni vlek smo pustili delovati čez noč in zgodaj zjutraj zamenjali namočene brisače s suhimi.

Naslednji dan smo po končanem prenosu pripravo razdrli in zavrgli mokre papirnate brisače in agarozni gel, pripravo pa zavili v plastično folijo, da smo preprečili izsušitev pred nadaljnjo uporabo. Membrani smo odrezali zgornji desni rob in jo spiralni (obrnjeno tako, da je bila DNA orientirana na zgornji strani) v 2× SSC za 5 min pri sobni T. Membrano smo prenesli na suh kromatografski papir in jo sušili v brezprašni komori eno uro. Sledilo je obsevanje membrane z UV lučjo na transiluminatorju pri višji jakosti za točno 3 min. Obsevanje z UV svetlobo je povzročilo kovalentno vezavo DNA na površino

membrane. Tako pripravljeno membrano smo bodisi shranili na suho pri -20 °C za daljši čas, bodisi nadeljevali s postopkom hibridizacije DNA sonde.

#### 3.9.5.4 Priprava DNA sonde

Za sintezo DNA sond s PCR, smo uporabili komplet PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche), s katerim smo sintetizirali alkalno labilne DNA sonde, označene z digoksigeninom. Za izpeljavo postopka smo sledili navodilom proizvajalca. 50 µl reakcijska mešanica je vsebovala 1 × pufer za PCR (z 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), mešanico nukleotidov (200 µM dATP, dCTP, dGTP, 130 µM dTTP, 70 µM DIG-dUTP), 2 × 1 µM začetnih oligonukleotidov, 2,6 U encimske mešanice in 10 pg plazmidne DNA. Uporabljeni začetni oligonukleotidi za sintezo sond, so bili enaki tistim pri analizi prisotnosti transgenov s PCR (Preglednica 1). Sinteza sonde je potekela v cikličnem termostatu po naslednji temperaturni shemi: začetna denaturacija za 2 min pri 95 °C, 30 ponavlajočih se ciklov denaturacije 30 s pri 95 °C, prileganja začetnih oligonukleotidov 30 s pri 60 °C in sinteze fragmentov DNA 40 s pri 72 °C, končna 7 minutna inkubacija pri 72 °C in ohlajanje na 4 °C. Za preverjanje uspešnosti reakcije, smo 5 µl mešanice iz posamezne reakcije nanesli na 1,2 % agarozni gel in izvedli ločevanje z elektroforezo pri že prej opisanih pogojih. Na novo sintetizirane sonde smo pred vnosom v hibridizacijski pufer DIG Easy Hyb (Roche), ogret na T hibridizacije, v cikličnem termostatu segreli na 95 °C za 5 min. Nato smo 45 µl reakcijske mešanice, med inkubacijo na ledu, hitro odpipetirali v 20 ml ogretega hibridizacijskega pufra z membrano. Predhodno uporabljeni DNA sonde, raztopljljene v DIG Easy Hyb pufru, smo pred hibridizacijo denaturirali pri 68 °C za 10 min in nadeljevali s hibridizacijo.

#### 3.9.5.5 Hibridizacija DNA sonde

Membrano smo pred postopkom hibridizacije zavili med dve hibridizacijski mrežici in vstavili v steklen hibridizacijski valj, tako da je bila vezana DNA orientirana v notranjost valja. V valj smo najprej vlili 20 ml pufra DIG Easy Hyb, predhodno segretega na temperaturo hibridizacije ( $T_{hyb}$ ). Po 30 minutah pred-hibridizacije, smo pufer odlili in prilili svež DIG Easy Hyb pufer z denaturirano sondno. Hibridizacija je potekala čez noč pri  $T_{hyb}$ , ki smo jo izračunali po enačbi 3, pri čemer oznake pomenijo: (%G + C): odstotek gvaninskih in citozinskih ostankov v sekvenci sonde; (L): dolžino hibrida sonda-tarča v bp. Uporabljeni  $T_{hyb}$  za DNA sonde so tako znašale:  $T_{hyb}$  (sonda hptII) = 50 °C,  $T_{hyb}$  (sonda gusA) = 39,23 – 44,23 °C,  $T_{hyb}$  (sonda EGFP) = 47,85 – 52,85 °C in  $T_{hyb}$  (sonda ZsGreen) = 43,74 – 48,75 °C.

$$T_{hyb} = (49,82 + 0,41 (\%G + C) - 600 / L) - (20 \text{ do } 25 \text{ }^{\circ}\text{C}) \quad \dots (3)$$

### 3.9.5.6 Detekcija vgrajenih transgenov

Po hibridizaciji smo odlili DIG Easy Hyb z DNA sondo in raztopino shranili v zamrzovalniku pri -20 °C, saj smo isti hibridizacijski pufer uporabili do petkrat. Membrano smo dvakrat spirali v 50 ml raztopine LSS (Priloga B) za 5 min pri sobni T, nato pa še v 50 ml raztopine HSS (Priloga B), predhodno ogrete na 68 °C za 2 × 15 min v hibridizacijski pečici pri 68 °C. Membrano smo nato prenesli v čisto plastično posodico prostornine 300 ml in spirali v pufru Washing buffer (Priloga B) na stresalniku za 2 min pri sobni T, kateremu je sledilo spiranje v 1× Blocking solution (Priloga B) za 30 min pri sobni T. Membrani smo nato dolili svežo 1× Blocking solution, v katero smo predhodno dodali protitelesa proti digoksigeninu, označena z alkalno fosfatazo (Anti-DIG-AP Fab; Roche). Protitelesa smo pred dodatkom v raztopino centrifugirali za 5 min pri 11.000 obr. min<sup>-1</sup> in nato odpipetirali iz gladine suspenzije protiteles, do končne koncentracije 150 mU / ml. Membrano smo ponovno inkubirali na stresalniku za 30 min pri sobni T. Po inkubaciji s protitelesi, smo membrano dvakrat spirali v Washing buffer za 15 min ter končno še s pufrom za detekcijo (Detection buffer, Priloga B) za 3 min pri sobni T. Membrano smo iz posodice s pinceto prenesli na razprto plastično mapo (Esselte, Stamford, ZDA), tako da je bila DNA obrnjena navzgor. Po membrani smo enakomerno nakapljali 0,25 mM raztopino kemiluminescentnega substrata za alkalno fosfatazo CDP-Star® (ready-to-use) (Roche), zaprli mapo in jo inkubirali za 5 min v temi pri sobni T. Po inkubaciji smo iz mape odstranili mehurčke zraka z glajenjem in membrano zavarili v plastično mapo s topotnim varilcem in jo do detekcije kemiluminescence hranili v temi pri sobni T.

Pojav kemiluminescence (Slika 6) smo detektirali z ekspozicijo membrane na rentgenski film BioMax XAR (Kodak, Rochester, ZDA). Detekcijo smo opravili v nekaj urah od dodatka substrata CDP-Star®. Ekspozicijo in razvijanje filma smo opravljali v temnici ob uporabi rdeče fotografiske luči. Čas ekspozicije smo varirali glede na jakost kemiluminescenčnega signala od 1 do 5 minut. Po ekspoziciji smo film namakali v razvijalcu (Kodak GBX Developer) za 2 min, sledilo je spiranje filma pod tekočo vodo za 30 s in fiksacija v fiksirni raztopini (Kodak GBX Fixer) za 2 min. Razvit film smo posušili, označili in odčitali rezultate. Raztopine razvijalca in fiksirja smo pripravili po navodilih proizvajalca.

### 3.9.5.7 Spiranje DNA sonde iz membrane

Membrano smo po detekciji odstranili iz zavarjene mape in jo spirali z ddH<sub>2</sub>O za 1 min. Sledilo je dvakratno spiranje s Stripping buffer (Priloga B) za 15 min pri 37 °C in končno spiranje z 2× SSC za 5 min. Membrano smo nato posušili v brezprašni komori ter jo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. S spiranjem alkalno labilne DNA sonde, smo pripravili membrano za morebitno ponovno hibridizacijo z različnimi DNA sondami.

### 3.10 UKREPI ZA ZAGOTAVLJANJE BIOLOŠKE VARNOSTI

Delo z gensko spremenjenimi organizmi (GSO) je potekalo v skladu z določili Uredbe o merilih za uvrstitev dela z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu v varnostni razred in o zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih za posamezen varnostni razred (Ur.l. RS, št. 71/2011), ki se nanaša na Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/05 – uradno prečiščeno besedilo in 21/10).

## 4 REZULTATI

### 4.1 ADVENTIVNA REGENERACIJA RASTLIN

#### 4.1.1 Regeneracijski potencial različnih tipov izsečkov

Poskusi, s katerimi smo vrednotili regeneracijski potencial izsečkov na RM-BAP, za uporabo v nadalnjih poskusih transformacije, so pokazali na očitne razlike v regeneraciji treh izbranih tipov izsečkov: listnih izsečkov, petiol in hipokotilov (Preglednica 2). Med temi so pri 6 ponovitvah poskusa pokazali največji regenerativni potencial hipokotili, saj se je bilo v povprečju odzivnih 89,3 % hipokotilov, inokuliranih na RM-BAP. Ob enakih pogojih so listni izsečki pokazali najnižjo regeneracijsko sposobnost, saj je bilo v povprečju odzivnih zgolj 28 %. Analiza variance je pokazala na statistično značilne razlike med skupinam različnih tipov izsečkov pri  $p < 0,01$ . Z uporabo Tukey-evega testa (HSD) smo opazili statistično značilne razlike med hipokotili in skupinama petiol in listnih izsečkov, med katerima pa ni bilo statistično značilnih razlik. Med testiranimi tipi izsečkov smo dalje opazili časovne razlike v poteku adventivne regeneracije, saj so se hipokotili regenerirali najhitreje, listni izsečki pa najpočasneje. Pri hipokotilih smo zabeležili razlike v uspešnosti adventivne regeneracije, kar smo razvrstili v tri razrede (Slika 8a) in tako razvstitev uporabili tudi pri opisovanju regeneracije listnih izsečkov in petiol. Razredi se razlikujejo v pojavu in obsegu adventivnih struktur (kalusa, globul, poganjkov). Prvi razred predstavlja izsečki pri katerih se je pojavil kalus, vendar razvoj le-tega v odraslo tkivo ni potekel dalje. V drugi razred smo uvrstili izsečke, pri katerih se je iz omejenega globularnega tkiva razvilo nekaj poganjkov. Tretji razred predstavlja izsečki na katerih se je razvil bistveno večji obseg globularnega tkiva z mnogimi poganjki.

Preglednica 2: Adventivna regeneracija različnih tipov izsečkov rastlin *M. aurantiacus* na RM-BAP.

Tip izsečka	Št. izsečkov <sup>a</sup>	Št. odzivnih izsečkov <sup>b</sup>	Povp. delež odzivnih izsečkov (% ± S.E. HSD) <sup>c</sup>	KV za povp. delež odziv. izs. (%) <sup>d</sup>
Listni izsečki	150	42	28,0 ± 16,5 b	144,0
Petiole	120	61	50,7 ± 9,9 b	47,8
Hipokotili	135	122	89,3 ± 3,7 a	10,1

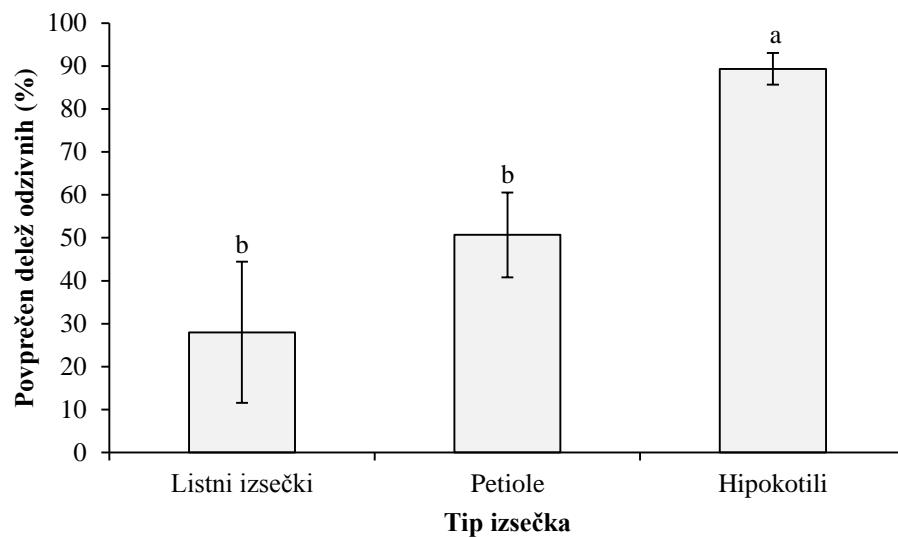
<sup>a</sup> Celokupno št. izsečkov iz 6 ponovitev

<sup>b</sup> Celokupno št. odzivnih izsečkov iz 6 ponovitev

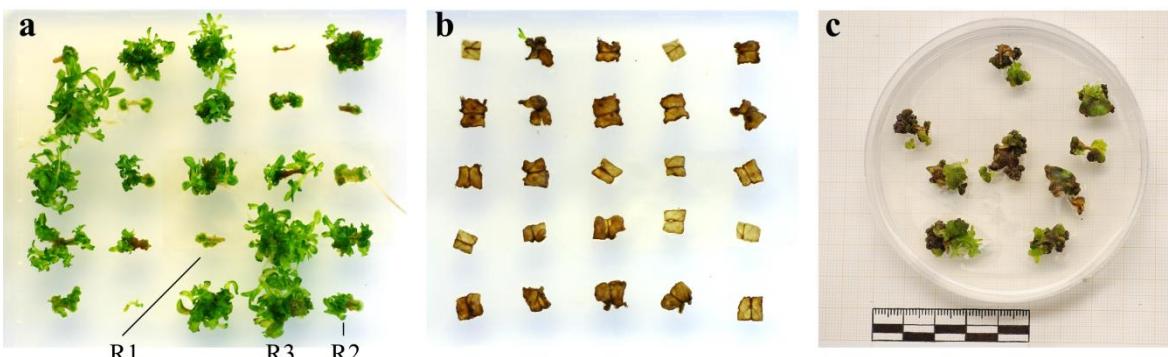
<sup>c</sup> Povprečen delež odzivnih izsečkov iz 6 ponovitev, prikazan s standardno napako (S.E.) in rezultatom Tukey-evega statističnega testa mnogoterih primerjav (HSD) za povprečni delež odzivnih izsečkov med različnimi tipi izsečkov. Povprečne vrednosti, ki so označene z enakimi črkami, niso statistično značilno različne pri 1 % stopnji značilnosti ( $\alpha = 0,01$ )

<sup>d</sup> Koeficient variacije (KV), izračunan za povprečni delež odzivnih izsečkov in izražen v odstotkih (%)

Poskusi adventivne regeneracije različnih tipov izsečkov so pokazali visoko variabilnost v rezultatih med posameznimi ponovitvami poskusov pri listnih izsečkih in petiolah (vrednosti KV), ter nizke razlike med poskusi regeneracije pri hipokotilih (Graf 1).



Graf 1: Povprečen delež odzivnih izsečkov v odsotkih, glede na tip izsečka, ki so se regenerirali na RM-BAP. Rezultati so prikazani s standardno napako (S.E.) serij za posamezen tip izsečka in rezultatom testa HSD. Stolpci, ki so označeni z enakimi črkami, prikazujejo vrednosti, ki niso statistično značilno različne pri  $\alpha = 0,01$ .



Slika 8: Primeri adventivne regeneracije različnih tipov izsečkov rastlin *M. aurantiacus* po 5 tednih rasti na RM-BAP. (a) Pri hipokotilih so opazne različne intenzitete regeneracije, kar je bilo opisano s tremi razredi R1 – R3, (b) listni izsečki kažejo v danem časovnem intervalu opazno slabšo regeneracijo, (c) primer adventivne regeneracije petiol. Merilo predstavlja 5 cm.

#### 4.1.2 Občutljivost različnih tipov izsečkov na selekcijski antibiotik

V poskusih občutljivosti treh tipov izsečkov na naraščajoče koncentracije selekcijskega antibiotika higromicina B, smo iskali najnižje učinkovite koncentracije antibiotika za posamezen tip izsečkov, katere smo nato uporabili za rastlinsko selekcijo v poskusih transformacije. Pri minimalni učinkoviti koncentraciji antibiotika, izsečki tudi po daljšem času trajanja poskusa (5 tednov), niso razvili globularnega tkiva in / ali poganjkov. Različni tipi izsečkov so bili različno občutljivi na prisotnost higromicina B v gojišču. Listni izsečki so bili najbolj občutljivi in hipokotili najmanj. Listni izsečki tudi ob

prisotnosti najnižje koncentracije antibiotika v gojišču ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) niso razvili poganjkov in / ali organogenih struktur. Pri  $20 \text{ mg l}^{-1}$  higromicina B je bil prisoten le nekrotičen kalus, zato smo to koncentracijo izbrali za delovno koncentracijo za poskuse transformacije listnih izsečkov. Petiole so prav tako pokazale občutljivost na prisotnost higromicina B v gojišču, vendar je pri koncentraciji  $5 \text{ mg l}^{-1}$  prišlo do razvoja poganjkov pri 4 % petiol, katere je bilo mogoče glede na uspešnost adventivne regeneracije, uvrstiti v drugi razred regeneracije. Sposobnost regeneracije se je bistveno zmanjšala šele s povišano koncentracijo antibiotika, tako smo za delovno koncentracijo za petiole prav tako izbrali  $20 \text{ mg l}^{-1}$  higromicina B. Pri hipokotilih je prišlo do regeneracije poganjkov pri relativno visoki koncentraciji antibiotika (do  $20 \text{ mg l}^{-1}$ ). Pri slednji so se poganjki razvili pri 28 % hipokotilov, katere je bilo prav tako mogoče uvrstiti v drugi razred regeneracije. Za selekcijo transformiranih poganjkov iz hipokotilov tako ni bilo mogoče uporabiti istih koncentracij, kot pri listnih izsečkih in petiolah. Izbrana delovna koncentracija higromicina B za selekcijo hipokotilov je bila  $50 \text{ mg l}^{-1}$ .

Testiranje občutljivosti netransformiranih poganjkov rastlin *M. aurantiacus* na različne koncentracije higromicina B, je pokazalo na učinkovito delovanje antibiotka že pri najnižji testirani koncentraciji ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Slika 9). Koncentracija  $10 \text{ mg l}^{-1}$  je 2 – 5 krat nižja, kot izbrane delovne koncentracije higromicina B za rastlinsko selekcijo v poskusih transformacije. Pri vseh testiranih koncentracijah antibiotika so odmrli vsi subkultivirani poganjki, razlike so nastale le v hitrosti odmiranja poganjkov. Pri  $10 \text{ mg l}^{-1}$  higomicina B, so vsi poganjki odmrli po 10 tednih, pri  $20 \text{ mg l}^{-1}$  higomicina B, po 8 tednih ter pri  $50 \text{ mg l}^{-1}$  higomicina B, po 4 – 5 tednih.

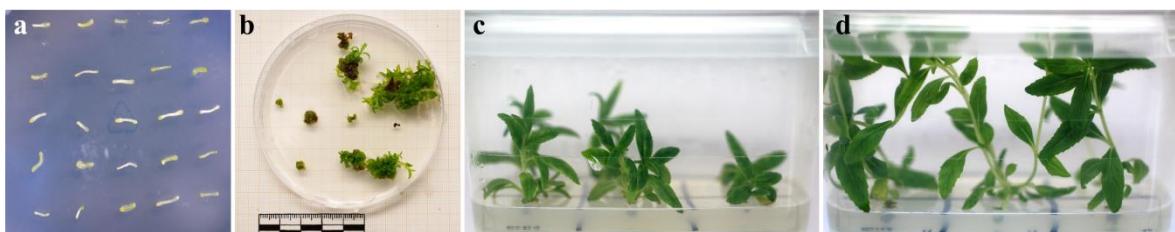


Slika 9: Občutljivost netransformiranih poganjkov rastlin *M. aurantiacus* na  $10 \text{ mg l}^{-1}$  higromicina B. Poganjki so bili subkultivirani na EM-BAP. (a) Na nekaterih poganjkih po 1 tednu rasti že prihaja do nastanka nekroz tkiva internodijev, (b) po 5 tednih so pri vseh poganjkih vidne nekroze, nekateri so odmrli, (c) poganjki so po 10 tednih v celoti odmrli.

#### 4.2 POSKUSI TRANSFORMACIJE RASTLIN

Poskuse transformacije različnih izsečkov rastlin *M. aurantiacus* smo izvedli z uporabo gojišč RM-BAP (MS +  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA in  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP) in EM-BAP (MS +  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA in  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP). Rastlinsko selekcijo (koncentracije higromicina B) smo za posamezne izsečke prilagodili glede na rezultate iz poskusov občutljivosti. Osnovni

poskusi transformacije so pokazali različno učinkovitost transformacije (TE) in učinkovitost selekcije (SE) na različnih tipih izsečkov (listni izsečki, petiole in hipokotili) (Preglednica 3). Poskusi transformacije listnih izsečkov, petiol in hipokotilov, so pokazali uspešno delovanje različnih markerskih genov (pCAMBIA 1301, pCAMBIA 1302-ZsGreen ali pCAMBIA 1302-EGFP) (Preglednica 4).



Slika 10: Redosled adventivne regeneracije transformiranih izsečkov. (a) Hipokotili 5 dni po kokultivaciji z agrobakterijo, (b) regeneracija transformiranih poganjkov na seleksijskem gojišču RM-BAP z antibiotiki in inhibicijo regeneracije netransformiranega tkiva, merilo znaša 5 cm, (c) 12 tednov stari transgeni poganjki, ki rastejo na elongacijskem gojišču EM-BAP in (d) transgeni poganjki rastlin *M. aurantiacus* na EM-BAP, stari 4 mesece .

Izsečki so po kokultivaciji z bakterijami *A. tumefaciens* začeli tvoriti kalus oz. globularne strukture po 1 – 2 tednih (hipokotili), 2 tednih (petiole) in 2 – 3 tednih (listni izsečki) na RM-BAP, ki je vseboval higromicin B. Izsečke smo subkultivirali na sveže gojišče vsake 4 tedne, regenerirane poganjke pa smo prestavili na gojišče EM-BAP brez dodanih seleksijskih antibiotikov po najmanj 8 tednih rasti na RM-BAP s seleksijskim antibiotikom. Izražanje reporterskih genov smo spremljali na različnih stopnjah regeneracije izsečkov (izsečki po kokultivaciji z bakterijami *A. tumefaciens*, kalusno tkivo, regenerirani poganjki) (Slika 10), medtem ko smo po približno 5 mesecih regeneracije, iz poganjkov izolirali DNA in izvedli molekulsko analizo. S poskusi transformacije rastlin *M. aurantiacus* so se iz različnih tipov izsečkov v *in vitro* kulturi regenerirale normalno razvite rastline (Slika 10). Iz skupno 2.395 različnih izsečkov, smo v različnih poskusih pridobili 154 rastlin, ki so se regenerirale na seleksijskem gojišču ob prisotnosti antibiotika higromicina B. Delež odzivnih izsečkov je v različnih poskusih znašal od 0 do 14,12 % in v povprečju 2,80 %, medtem ko je bila uspešnost transformacije 5,72 odstotna (%).

Osnovni poskusi transformacije kažejo na opazne razlike v deležu odzivnih izsečkov in TE med listnimi izsečki, petiolami in hipokotili. Pri izbranih pogojih transformacije, so hipokotili dosegali najnižji odstotek odzivnih izsečkov (1,03 %) in TE (1,37 %) (Preglednica 3), kar je presenetljivo, saj so hipokotili kazali najvišji regeneracijski potencial v poskusih regeneracije (89,3 %) (Preglednica 2). Petiole so v poskusih transformacije kazale najboljšo odzivnost (6,98 %), kot tudi najvišjo TE (23,26 %). Listni izsečki so bili podobni hipokotilom v odstotku odzivnih izsečkov (1,48 %) in TE (1,48 %). Manjše razlike smo opazili tudi v učinkovitosti selekcije med različnimi tipi izsečkov, saj je bila selekcija bolj učinkovita pri hipokotilih in listnih izsečkih (100 %), medtem ko je bila pri petiolah nekoliko nižja (88,89 %) (Susič in sod., 2013).

Preglednica 3: Primerjava učinkovitosti transformacije (TE) in selekcije (SE) med tremi tipi izsečkov: listni izsečki, petiole in hipokotili. Vsi so bili transformirani z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, ki je vsebovala pCAMBIA 1301, pCAMBIA 1302-ZsGreen ali pCAMBIA 1302-EGFP ter dalje regenerirani na regeneracijskem gojišču (RM-BAP) s higromicinom B (povzeto po Susič in sod., 2013).

Tip izsečka	Reporterski gen	Št. izsečkov	Odstotek odzivnih izsečkov <sup>a</sup>	Število regeneriranih poganjkov	Število transformiranih poganjkov <sup>b</sup>	Učinkovitost transformacije (TE) (%) <sup>c</sup>	Učinkovitost selekcije (SE) (%) <sup>d</sup>
Listni izsečki	<i>gusA</i>	539	1,48	8	8	1,48	100,00
Petiole	<i>gusA, ZsGreen, EGFP</i>	344	6,98	90	80	23,26	88,89
Hipokotili	<i>gusA, ZsGreen, EGFP</i>	877	1,03	12	12	1,37	100,00

<sup>a</sup> odstotek izsečkov, ki so razvili poganjke na selecijskem gojišču

<sup>b</sup> osnovano na analizi s PCR in Southern blot

<sup>c</sup> izračunana kot odstotek transformiranih rastlin, regeneriranih iz celokupnega števila ko-kultiviranih izsečkov

<sup>d</sup> izračunana kot odstotek transformiranih rastlin, regeneriranih iz celokupnega števila regeneriranih poganjkov

Preglednica 4 prikazuje podrobnejšo predstavitev rezultatov transformacij iz preglednice 3 za hipokotile in petiole.

Preglednica 4: Primerjava učinkovitosti transformacije (TE) med tremi različnimi binarnimi plazmidi (pCAMBIA 1301, pCAMBIA 1302-ZsGreen ali pCAMBIA 1302-EGFP), ki smo jih uporabili za transformacijo petiol in hipokotilov.

Tip izsečka	Reporterski gen	Št. izsečkov	Odstotek odzivnih izsečkov <sup>a</sup>	Število regeneriranih poganjkov	Število transformiranih poganjkov <sup>b</sup>	Učinkovitost transformacije (TE) (%) <sup>c</sup>
Petiole	<i>gusA</i>	101	4,95	17	16	15,84
	<i>ZsGreen</i>	143	4,20	14	11	7,69
	<i>EGFP</i>	100	13,00	59	53	53,00
Hipokotili	<i>gusA</i>	311	0,96	4	4	1,29
	<i>ZsGreen</i>	361	1,11	4	4	1,11
	<i>EGFP</i>	205	0,98	4	4	1,95

<sup>a</sup> odstotek izsečkov, ki so razvili poganjke na selecijskem gojišču

<sup>b</sup> osnovano na analizi s PCR in Southern blot

<sup>c</sup> izračunana kot odstotek transformiranih rastlin, regeneriranih iz celokupnega števila ko-kultiviranih izsečkov

Iz preglednice 4 je razvidno, da pri hipokotilih ni bilo razlik v učinkovitosti transformacije (TE) po transformaciji z različnimi reporterskimi geni. Pri petolah pa so bile vidne razlike, saj je bila najnižja TE po transformaciji z genom *ZsGreen* (7,69 %), najvišja pa po transformaciji z genom *EGFP* (53 %).

#### 4.3 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA TRANSFORMACIJE

##### 4.3.1 Vpliv različnih kombinacij rastlinskih hormonov na adventivno regeneracijo hipokotilov

Zaradi visoke regeneracijske sposobnosti hipokotilov na gojišču RM-BAP, ki vsebuje 0,5 mg l<sup>-1</sup> NAA in 1 mg l<sup>-1</sup> BAP, vendar obenem slab odzivnosti v osnovnih poskusih transformacij, smo tovrstni tip izsečkov vključili v poskuse regeneracije na različnih gojiščih. V gojiščih (1 – 24) smo varirali koncentracije hormonov in tri različne citokinine – poleg v osnovi uporabljenega BAP, še zeatin in tidiazuron (TDZ). Poskus je omogočil vpogled v primernost različnih koncentracij rastlinskih hormonov za adventivno regeneracijo rastlin *M. aurantiacus* in služil za oceno učinkovitosti zeatina in TDZ v primerjavi z BAP, na intenziteto in kvaliteto adventivne regeneracije.

Rezultati poskusa, kjer smo za vsako vrsto citokinina testirali 4 različne koncentracije (0,5; 1; 2,5 in 5 mg l<sup>-1</sup>) v kombinaciji z dvema koncentracijama avksina NAA (0,1 in 0,5 mg l<sup>-1</sup>), so predstavljeni v Preglednici 5. Rezultati izhajajo iz 6 ponovitev (t.i. serij) pri vsakem razmerju koncentracij avksinov in citokinov (gojišča: 1 – 24) in so predstavljeni kot povprečna vrednost pridobljena iz vseh ponovitev. Razlike v rezultatih za povprečno število regeneriranih poganjkov in povprečno maso izsečkov, so na splošno vidne predvsem med različnimi gojišči in ne med različnimi skupinami gojišč (vsa gojišča posameznega citokinina). Razlike med tremi skupinami, pa lahko opazimo v primeru števila hiperhidriranih izsečkov, saj smo povprečno najnižje število hiperhidriranih izsečkov opazili ob uporabi BAP (2,9), najvišje pa v primeru TDZ (5,4). V povprečju so najvišjo maso izsečkov z adventivnimi strukturami, razvili izsečki na gojišču 12, z 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA in 5 mg l<sup>-1</sup> zeatina (2,892 g). Povprečno največ poganjkov so razvili izsečki na gojišču 22; 11,0 poganjkov (0,5 mg l<sup>-1</sup> NAA in 1 mg l<sup>-1</sup> TDZ), najmanj pa izsečki na gojišču 5; 0,5 poganjkov (0,5 mg l<sup>-1</sup> NAA in 0,5 mg l<sup>-1</sup> BAP), pri katerih smo natehtali tudi povprečno najnižjo maso (0,340 g).

Poskusi regeneracije hipokotilov na različnih gojiščih so nasprošno kazali veliko variabilnost med serijami v številu regeneriranih poganjkov in masi izsečkov. Pojav je razviden z izračunom KV med serijami za posamezno gojišče (Preglednica 5). Najvišjo variabilnost med serijami smo opazili v skupini gojišč s citokininom BAP, ki je bila višja pri gojiščih 1 – 4 z nižjo koncentracijo NAA. Med skupinami smo pogosto opazili najvišjo variabilnost med serijami pri gojiščih z nižjimi koncentracijami avksina in citokinina

(gojišča 1, 5, 13 in 17). V poskusih smo dalje opazili možno odvisnost števila regeneriranih poganjkov in mase izsečkov z adventivnimi strukturami od stopnje hiperhidriranosti. Zaradi tega opažanja statistična analiza variance (ANOVA) ni upravičena, zaradi kršitve predpostavke o neodvisnosti meritev.

Primerno koncentracijo avksinov in citokininov v gojiščih RM-ZEA in RM-TDZ, smo tako izbrali z ozirom na ugodno razmerje med čim višjim povprečnim številom poganjkov, povprečno maso izsečkov z adventivnimi strukturami ter čim nižjim doseženim številom hiperhidriranih izsečkov v poskusih. Pri izboru smo upoštevali tudi možnost poenostavitev dela, tako smo za uporabo v poskusih optimizacije transformacije, v gojiščih RM-ZEA in RM-TDZ uporabili enake koncentracije citokininov, kot v RM-BAP:  $1 \text{ mg l}^{-1}$  zeatin (gojišče RM-ZEA) ali TDZ (gojišče RM-TDZ). Enakemu načelu smo sledili tudi pri pripravi gojišč za elongacijo poganjkov: EM-BAP ( $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP), EM-ZEA ( $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  zeatin) in EM-TDZ ( $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ). Podrobna sestava teh gojišč je opisana v poglavju 3.1.1.

Preglednica 5: Adventivna regeneracija hipokotilov rastlin *M. aurantiacus* pri različnih kombinacijah rastlinskih hormonov.

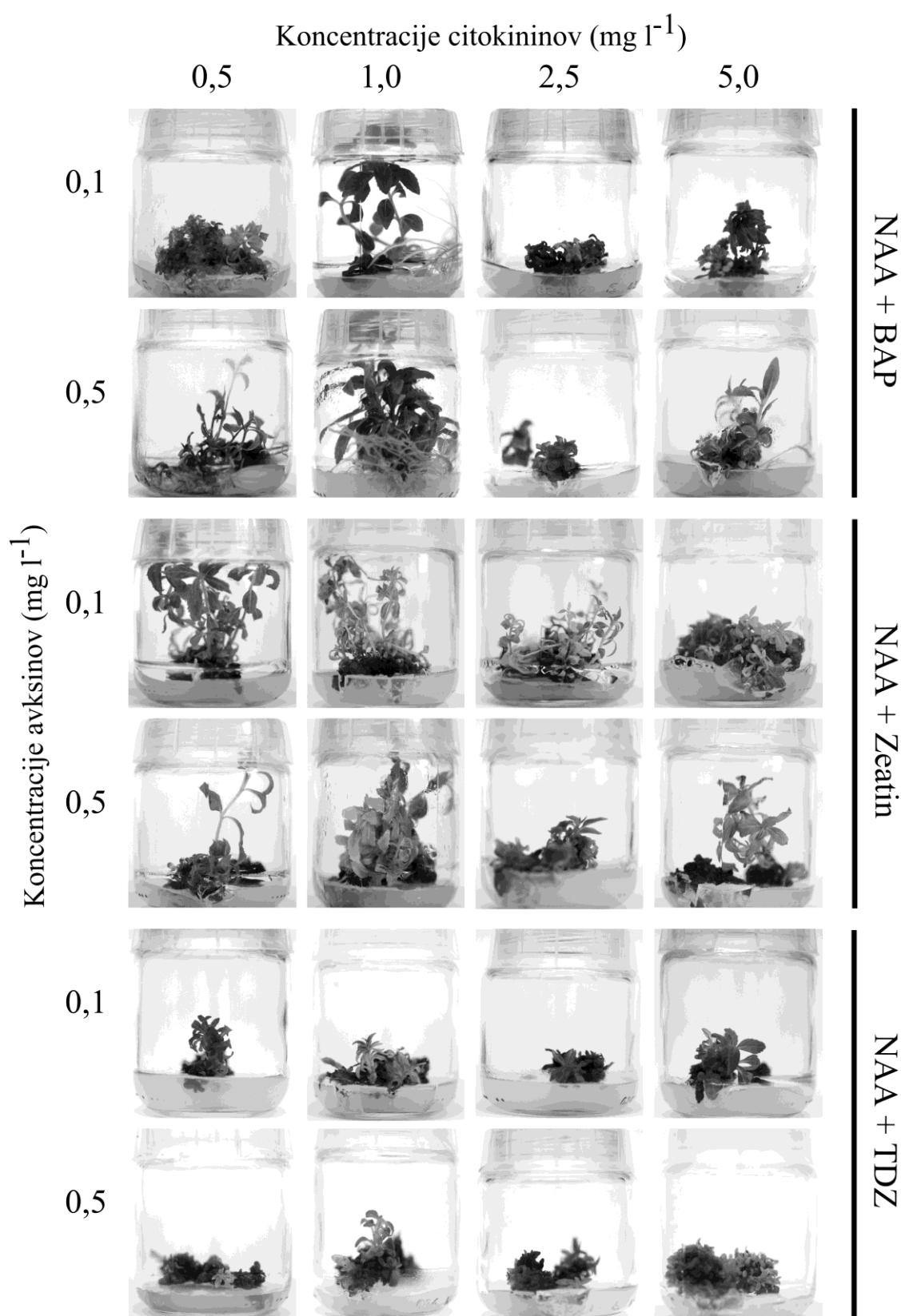
Zaporedna št. gojišča	Konc. homonov (mg l <sup>-1</sup> )	Povp. število reg. poganjkov (n ± S.E.) <sup>a</sup>	KV za povp. št. reg. poganjkov (%) <sup>b</sup>	Povp. masa izsečkov (g ± S.E.) <sup>c</sup>	KV za povp. maso izsečkov (%)	Število hiperhidriranih izsečkov <sup>d</sup>
NAA BAP						
1	0,1	0,5	6,2 ± 5,0	198,2	1,935 ± 1,161	146,965
2	0,1	1	8,5 ± 4,4	127,5	1,463 ± 0,447	74,834
3	0,1	2,5	1,5 ± 0,9	150,6	0,450 ± 0,115	62,791
4	0,1	5	3,8 ± 1,7	111,2	0,937 ± 0,348	91,061
5	0,5	0,5	0,5 ± 0,2	109,5	0,340 ± 0,045	32,273
6	0,5	1	5,2 ± 1,2	59,2	2,780 ± 0,638	56,239
7	0,5	2,5	3,3 ± 1,0	75,1	1,048 ± 0,138	32,260
8	0,5	5	5,0 ± 1,7	82,9	2,075 ± 0,678	80,090
NAA Zeatin						
9	0,1	0,5	5,2 ± 1,1	53,9	1,017 ± 0,220	52,924
10	0,1	1	4,3 ± 0,7	37,7	1,687 ± 0,311	45,124
11	0,1	2,5	8,0 ± 1,7	51,2	2,157 ± 0,588	66,775
12	0,1	5	5,2 ± 1,2	56,6	2,892 ± 0,357	30,269
13	0,5	0,5	0,7 ± 0,3	122,5	0,727 ± 0,190	63,956
14	0,5	1	6,8 ± 1,8	63,7	1,980 ± 0,351	43,428
15	0,5	2,5	5,5 ± 1,9	83,5	1,235 ± 0,291	57,745
16	0,5	5	4,2 ± 1,1	66,9	1,203 ± 0,158	32,094
NAA TDZ						
17	0,1	0,5	5,0 ± 2,7	133,9	1,885 ± 0,426	55,298
18	0,1	1	6,5 ± 2,4	90,1	2,173 ± 0,367	41,320
19	0,1	2,5	4,0 ± 1,1	65,2	1,338 ± 0,295	54,070
20	0,1	5	6,2 ± 1,7	68,4	1,632 ± 0,358	53,732
21	0,5	0,5	5,3 ± 1,0	46,9	1,993 ± 0,279	34,299
22	0,5	1	11,0 ± 3,5	78,2	2,297 ± 0,218	23,231
23	0,5	2,5	7,7 ± 2,0	63,2	2,057 ± 0,221	26,374
24	0,5	5	7,2 ± 1,5	51,0	2,067 ± 0,342	40,522

<sup>a</sup> Povprečno št. regeneriranih poganjkov, ki so se razvili na posameznih izsečkih. Vrednosti izračunane na podlagi 6 ponovitev in prikazane s S.E.

<sup>b</sup> Koeficient variacije (KV), izračunan za povprečno število reg. poganjkov in izražen v odstotkih (%)

<sup>c</sup> Povprečna masa izsečkov z adventivnimi strukturami izračunana na podlagi 6 ponovitev (izsečkov). Vrednosti izračunane na podlagi 6 ponovitev in prikazane s S.E.

<sup>d</sup> Število hiperhidriranih izsečkov izmed vseh 6 ponovitev (izsečkov).



Slika 11: Adventivna regeneracija hipokotilov rastlin *M. aurantiacus* na gojiščih z različnimi kombinacijami in koncentracijami rastlinskih hormonov.

#### 4.3.2 Poskusi optimizacije transformacije

V poskusih optimizacije protokola transformacije rastlin *M. aurantiacus*, smo preiskovali učinke dveh različnih faktorjev oz. sprememb v protokolu transformacije, na končno TE. Faktorja optimizacije sta bila: uporaba drugačnega seva bakterije *A. tumefaciens* (EHA105) in uporaba različnih citokinov (TDZ in zeatin) za stimulacijo adventivne regeneracije izsečkov v poganjke.

Rezultati poskusov optimizacije TE petiol in hipokotilov so v prvi meri pokazali na že opažene razlike med skupinama iz prejšnjih poskusov (Preglednica 6). Uporaba zeatina ni povzročila bistvenih sprememb v TE pri petiolah, ki so se regenerirale na RM-ZEA, hkrati pa je bil dosežen slabši rezultat pri hipokotilih (Preglednica 6). Bistvene razlike smo v poskusih optimizacije protokola transformacije rastlin *M. aurantiacus*, dosegli z uporabo TDZ v gojiščih RM-TDZ in EM-TDZ. Ob uporabi TDZ se je bistveno zvišal odstotek odzivnih izsečkov, ki je tako pri petiolah (14,1 %) kot hipokotilih (6,9 %) dosegel najvišje vrednosti izmed vseh opravljenih poskusov. Razlike v TE niso bile tako očitne pri petiolah, kot pri hipokotilih, kjer je bila TE najvišja (8,8 %) izmed vseh poskusov transformacije hipokotilov. Poganjki rastlin *M. aurantiacus*, ki so se regenerirali na gojišču s TDZ so bili bolj hiperhidrirani, kot v primeru regeneracije na gojišču z BAP. Hiperhidriranost je bila opazna tudi po večkratni subkultivaciji na sveže gojišče.

Preglednica 6: Primerjava učinkovitosti transformacije (TE) med poskusom optimizacije uspešnosti transformacije (TE) petiol in hipokotilov. V poskusih transformacije smo uporabili bakterijo *A. tumefaciens* LBA 4404 in binarni plazmid pCAMBIA 1302-ZsGreen. Faktorja optimizacije sta bila regeneracija izsečkov na gojišču RM-ZEA ali regeneracija izsečkov na gojišču RM-TDZ.

Tip izsečka	Faktor optimizacije	Št. izsečkov	Odstotek odzivnih izsečkov <sup>a</sup>	Število regeneriranih poganjkov	Št. transf. poganjkov <sup>b</sup>	Učinkovitost transf. (TE) (%) <sup>c</sup>
Petiole	TDZ	85	14,12	24	18	21,18
	Zeatin	38	7,89	7	7	18,42
Hipokotili	TDZ	102	6,86	9	9	8,82
	Zeatin	102	0,00	0	0	0,00

<sup>a</sup> odstotek izsečkov, ki so razvili poganjke na selekcijskem gojišču

<sup>b</sup> osnovano na analizi s PCR in Southern blot

<sup>c</sup> izračunana kot odstotek transformiranih rastlin, regeneriranih iz celokupnega števila ko-kultiviranih izsečkov

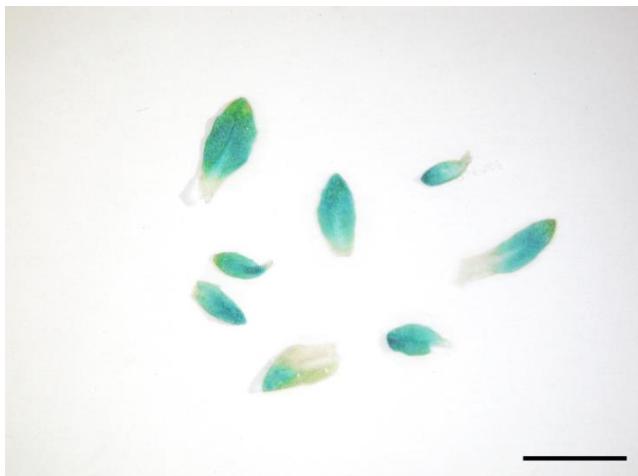
Tudi vnos T-DNA binarnega plazmida pCAMBIA1301 v rastlinske celice z bakterijami *A. tumefaciens* EHA105, ni pomenil bistvenih sprememb v TE pri hipokotilih (0,97 %). Od 308 inokuliranih izsečkov, je bilo odzivnih le 1,30 %. Iz poskusov z bakterijami *A. tumefaciens* EHA105 smo pridobili 4 regenerirane poganjke, od katerih so bili 3 pozitivni

pri testiranju s PCR in Southern. Rezultati ne predstavljajo bistvene razlike v primerjavi z osnovnimi poskusi transformacije hipokotilov (Preglednica 3).

#### 4.4 IZRAŽANJE REPORTERSKIH GENOV

##### 4.4.1 Izražanje $\beta$ -glukuronidaze (GUS)

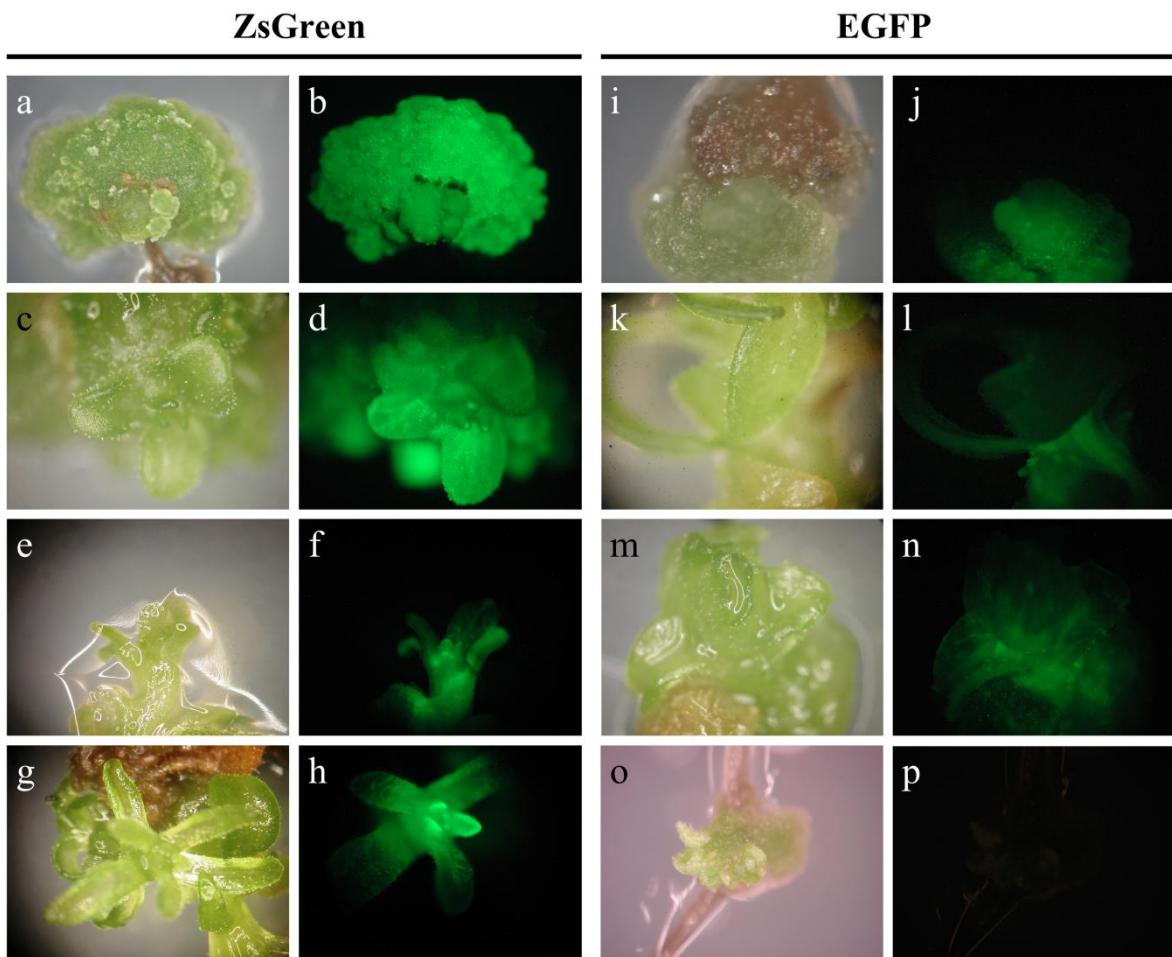
Tkivo regeneriranih poganjkov, ki so bili transformirani s pCAMBIA 1301, je pri testiranju s histokemičnim GUS testom pokazalo na aktivnost GUS in izražanje gena *gusA* (Slika 12). Testirali smo kalusno tkivo po 4 tednih regeneracije ali novo nastale poganjke, stare 6 – 7 tednov. Pri starejših poganjkih smo opazili zmanjšanje v intenzivnosti aktivnosti GUS. Aktivnost GUS je bila pri starejših poganjkih rastlin *M. aurantiacus* vidno izražena le še v apikalnih in aksilarnih brstih.



Slika 12: Primer izražanja GUS v mladem rastlinskem tkivu listov rastlin *M. aurantiacus*, starih 6 tednov. Tkivo smo transformirali z bakterijo *A. tumefaciens*-pCAMBIA1301. Merilo znaša 10 mm (Susič in sod., 2013).

##### 4.4.2 Izražanje fluorescentnih proteinov EGFP in ZsGreen

Z opazovanjem izražanja fluorescentnih proteinov EGFP in ZsGreen, smo zabeležili večjo intenziteto fluorescence ZsGreen v primerjavi z EGFP (Slika 13). Ta je bila tako pri EGFP kot pri ZsGreen najbolj intenzivna v času razvoja kalusa (Slika 13a, b in i, j), vendar je ZsGreen dosegel boljše rezultate. Podobne rezultate smo opazili tudi pri kasnejšem razvoju poganjkov (Slika 13c–h in k–n), vendar pa smo zabeležili bistveno zmanjšanje fluorescence pri obeh reporterskih proteinih, pri poganjkih starejših od 3 mesecev.



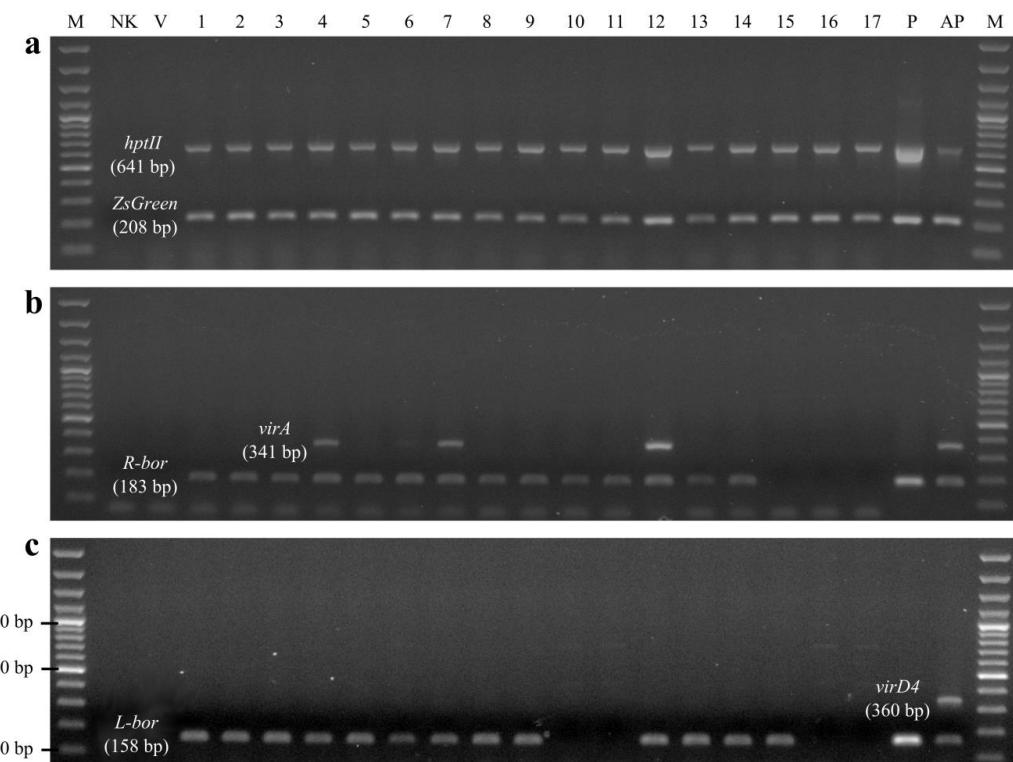
Slika 13: Primeri izražanja fluorescentnih markerjev v rastlinskem tkivu rastlin *M. aurantiacus*, transformiranim z pCAMBIA1302-ZsGreen (a–h) ali pCAMBIA1302-EGFP (i–n). (a, b) Rast transformiranega kalusa na hipokotilih pri vidni svetlobi (a) in fluorescenco proteina ZsGreen (b); (c–f) 6 tednov stari poganjki, ki so nastali iz transformiranih izsečkov pri vidni svetlobi (c, e) in fluorescenco proteina ZsGreen v tkivih (d, f); (g, h) 7 tednov stari poganjki, ki so nastali iz transformiranih petiol pri vidni svetlobi (g) in fluorescenco proteina ZsGreen v tkivu (h); (i, j) Rast kalusa na hipokotilih pri vidni svetlobi (i) in fluorescenco proteina EGFP (j); (k, l) 6 tednov stari poganjki, ki so nastali iz transformiranih izsečkov pri vidni svetlobi (k) in fluorescenco proteina EGFP v tkivih (l); (m, n) 7 tednov stari poganjki, ki so nastali iz kalusnega tkiva iz petiol pri vidni svetlobi (m) in fluorescenco proteina EGFP v tkivu (n); (o, p) negativna kontrola fluorescence netransgenega rastlinskega tkiva (nekatere slike povzete po Susič in sod., 2013).

## 4.5 MOLEKULSKA ANALIZA REGENERIRANIH RASTLIN

### 4.5.1 Analiza PCR

S PCR analizo smo želeli preverjati prisotnost določenih DNA regij v vzorcih regeneriranih rastlin. Z uporabo dupleks PCR smo v vzorcih preverjali prisotnost selekcijskega gena (*hptII*) ter reporterskih genov (*gusA*, *EGFP*, *ZsGreen*), DNA zaporedij ob levem in desnem mejnem zaporedju T-DNA (*L-* in *R-bor*) in agrobakterijskih virulenčnih genov (*virA*, *virD4*) (Slika 12). PCR analiza je pokazala prisotnost

seleksijskega ter reporterskih genov pri večini regeneriranih poganjkov (98,70 %) in obenem zelo nizek odstotek regenerantov, kontaminiranih z bakterijo *A. tumefaciens* (0,17 %). S PCR testiranjem za DNA zaporedja ob levem in desnem mejnem zaporedju T-DNA, smo ugotovili, da relativno visok odstotek regeneriranih poganjkov, ki smo jih pridobili v osnovnih poskusih transformacij (Preglednica 3), vsebuje dele plazmidne DNA izven T-DNA (75,26 %). Celokupen odstotek rastlin, zbranih iz vseh opravljenih poskusov, ki so kazale prisotnost plazmidne DNA je znašal 79,87 %. Večina izmed teh je vsebovala dele zaporedij plazmida izven obeh mejnih sekvenc (70,93 %), dele plazmidne DNA samo izven desne mejne sekvence T-DNA je vsebovalo 4,88 % rastlin, medtem ko je dele plazmidne DNA samo izven leve mejne sekvence, vsebovalo 4,07 % rastlin.

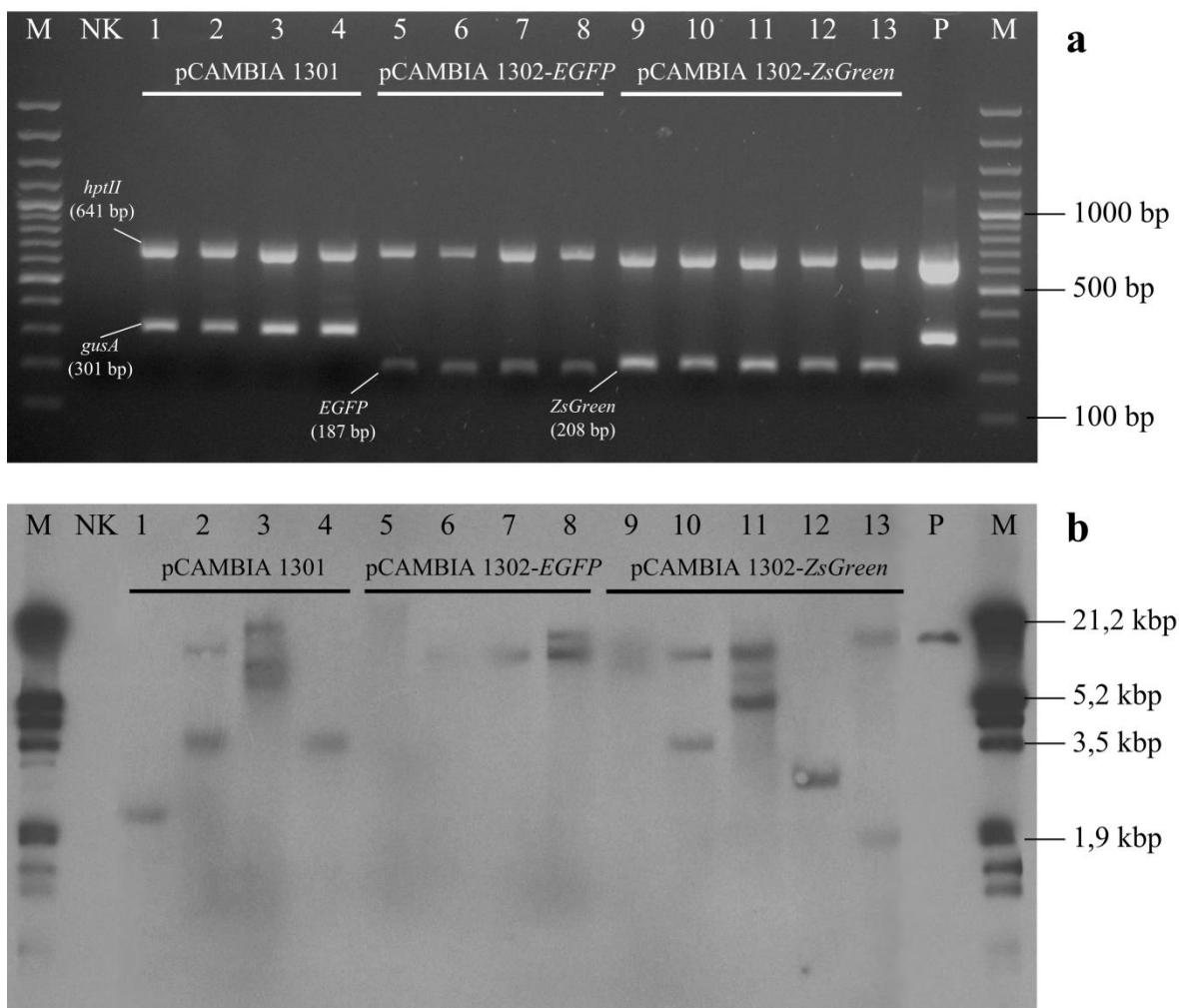


Slika 14: PCR analiza domnevnih transgenih rastlin *M. aurantiacus*. (a) Analiza prisotnosti seleksijskega gena *hptII* in reporterskega gena *ZsGreen* na 17 vzorcih (1 – 17), (b) analiza prisotnosti *virA* in *R-bor* regij in (c) *virD4* in *L-bor* regij. Pozitiven rezultat za *vir* gene namiguje na kontaminacijo z agrobakterijo. Pozitiven rezultat za *bor* gene pa kaže na prisotnost plazmidnih DNA zaporedij izven dela T-DNA. DNA vzorci so enaki v vseh treh analizah: (NK) negativna kontrola - DNA netransformirane rastline *M. aurantiacus*; (V) negativna kontrola - ddH<sub>2</sub>O; (P) pozitivna kontrola - plazmid pCAMBIA1302-ZsGreen (5 ng); (AP) pozitivna kontrola – DNA izolirana iz bakterije *A. tumefaciens*, ki je vsebovala binarni plazmid pCAMBIA1302-ZsGreen; (M) DNA dolžinski marker .

V analizi vključevanja vektorskih zaporedij v genom transgenih T<sub>0</sub> poganjkov, smo upoštevali rezultate tistih rastlin, ki s PCR analizo niso pokazale okužbe z bakterijo *A. tumefaciens*. (začetni oligonukleotidi za PCR so navedeni v Preglednici 1).

#### 4.5.2 Analiza DNA s prenosom Southern

Z analizo DNA s prenosom po Southernu, smo preučevali vnos T-DNA v rastlinsko celico in vgradnjo le-te v rastlinski genom. Vgrajenost T-DNA smo testirali s hibridizacijo DNA sond na tarčna zaporedja gena *hptII* in markerskih genov *gusA*, *EGFP* in *ZsGreen* (Slika 15b).

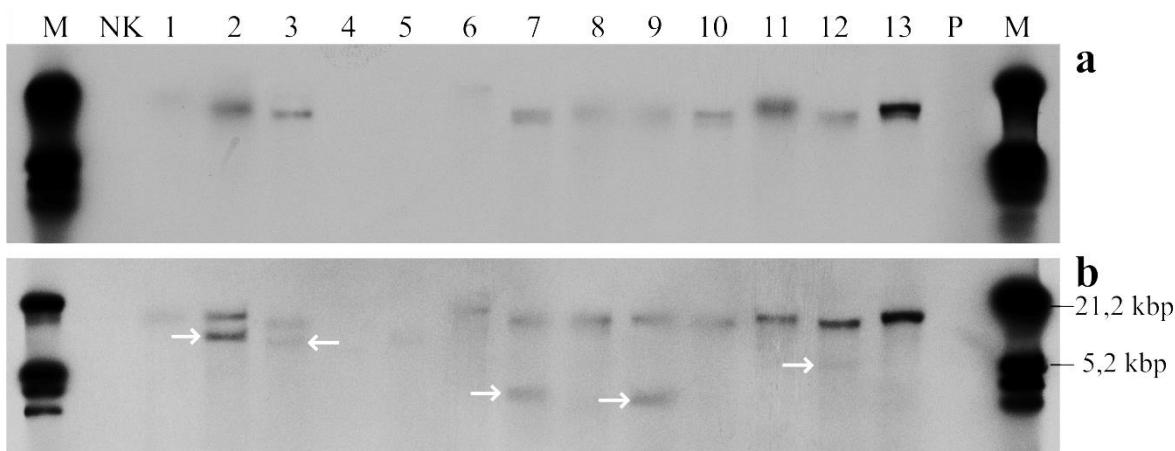


Slika 15: (a) PCR analiza prisotnosti genov *hptII*, *gusA*, *EGFP* in *ZsGreen* v vzorcih 1 – 13 in (b) Southern analiza vključenosti gena *hptII* v istih vzorcih; (NK) negativna kontrola - DNA netransformirane rastline *M. aurantiacus*; (P) pozitivna kontrola - razrezan plazmid pCAMBIA1301 in (M) dolžinski DNA marker (Susič in sod., 2013).

Analiza po Southernu je pokazala, da so regenerirane rastline, ki smo jih pridobili v osnovnih poskusih transformacije, vsebovale 1 – 3 kopije transgenov. Večina transformiranih rastlin (73,0 %) je vsebovala eno kopijo T-DNA (Slika 15, vzorci 1, 4, 5, 6, 7, 12), 23,0 % transformiranih rastlin (Slika 15, vzorci 2, 8, 9, 10, 13) je vsebovalo dve kopiji transgenov in le 4,0 % transformiranih rastlin je vsebovalo tri kopije (Slika 15,

vzorca 3 in 11) (Susič in sod., 2013). Razmerje je podobno, tudi če združimo rezultate iz vseh poskusov (1 kopija gena: 70,8 %, 2 kopiji gena: 25,6 % in 3 kopije gena: 3,7 %).

V nekaterih primerih je ob testiranju istih membran z dvema različnima DNA sondama, prišlo do opaznih razlik v profili hibridizacije sond (Slika 16). Isti vzorci so lahko po hibridizaciji z različnima sondama, kazali več ali manj kopij zaporedij genov. V tem oziru so posebej zanimivi vzorci, ki so po drugi hibridizaciji kazali večje število kopij gena, saj se v tem primeru izognemo napaki zaradi morebitne izgube DNA iz membrane med procesom spiranja sonde.



Slika 16: Hibridizacija iste membrane z dvema različnima DNA sondama: (a) *EGFP*, (b) *hptII*. Pri vzorcih 2, 3, 7, 9 in 12 so opazne razlike v hibridizacijskih profilih, kar prikazujejo puščice. V primeru detekcije s *hptII* DNA sondo imajo vzorci 2, 3, 7, 9 in 12 več kopij gena. Southern analizo smo izvedli v redosledu a, b. Elementi analize so: (M) DNA dolžinski marker, (NK) negativna kontrola - DNA netransformirane rastline *M. aurantiacus*, (1 – 13) DNA vzorci domnevno transformiranih rastlin *M. aurantiacus*; (P) PCR-*egfp* pozitivna kontrola - PCR pomnožek gena *EGFP*.

S primerjavo podatkov iz PCR in Southern analiz, smo ugotavljali razmerje med prisotnostjo T-DNA mejnih sekvenč in številom kopij gena pri posameznih vzorcih. Primerjava je pokazala razlike v razmerjih med vzorci z ali brez (*L-* in *R-bor*) mejnih zaporedij in pogostostjo večjega števila kopij T-DNA (Priloga E). Med vzorci, pri katerih nismo zaznali *L-* in *R-bor*, je 12,16 % vsebovalo 1 kopijo gena in 4,73 % vsebovalo več kopij gena, v razmerju 1:0,39. Med vzorci, pri katerih smo zaznali tako *L-* kot *R-bor*, je 41,89 % vsebovalo 1 kopijo gena in 22,97 % vsebovalo več kopij gena, v razmerju 1:0,63. Primerjava je pokazala, da so vzorci rastlin, pri katerih smo zaznali obe mejni zaporedji T-DNA, imele 1,6 –krat pogosteje vgrajenih več kopij gena, v primerjavi z vzorci rastlin brez prisotnih *L-* in *R-bor*. Deleži (%) izhajajo iz matrike, v katero smo analizirane vzorce razvrstili glede na število kopij gena (0, 1, 2 in 3) in prisotnost mejnih zaporedij *L-* in *R-bor* (0, 1 in 2) (Priloga E).

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 REGENERACIJSKI POTENCIAL IZSEČKOV

Med tremi tipi izsečkov rastlin *M. aurantiacus*, so se najuspešneje regenerirali hipokotili (Preglednica 2) in izkazovali tudi najnižjo variabilnost med rezultati poskusov. Opažena nihanja v variabilnosti regeneracijskega potenciala med listnimi izsečki, petiolami in hipokotili, bi lahko pojasnili z variabilnostjo genetskega ozadja rastlin, katere smo uporabili za pripravo izsečkov. Ta je bila veliko nižja v primeru listnih izsečkov ter petiol, čeprav smo skrbeli za čim bolj naključno razdelitev pripravljenih izsečkov v posamezne ponovitve poskusa. V primeru listnih izsečkov in petiol, je bilo mogoče pripraviti zadostno število izsečkov za posamezen poskus iz le nekaj posameznih rastlin. To je lahko privedlo do večjih odstopanj v rezultatih med ponovitvami v primeru uporabe rastlin s slabim regeneracijskim potencialom, kljub naključni razdelitvi. V primeru hipokotilov, je vsak izseček predstavljal eno ponovitev, saj smo iz posameznega semena pridobili le en hipokotil. Vpliv slabšega genetskega ozadja je bil tako omejen zgolj na posamezen izseček. Uporaba izsečkov (npr. hipokotili) z zelo heterogenim genetskim ozadjem privzeto omogoča uravnovešenje variabilnosti, ki nastane zaradi slabše genetske osnove posameznih primerkov in s tem boljšo ponovljivost (robustnost) poskusov. Vendar pa je v študijah izražanja specifičnih genov, često potrebno zagotoviti izenačeno genetsko osnovo rastlinskega materiala, kar bi v našem primeru lahko dosegli z uporabo petiol in listnih izsečkov iz predhodno okarakteriziranih *in vitro* namnoženih klonov rastlin.

### 5.2 VPLIV SELEKCIJSKEGA ANTIBIOTIKA NA *in vitro* REGENERACIJO IZSEČKOV

Netransformirani listni izsečki, petiole in hipokotili, ki smo jih gojili na RM-BAP, so izkazovali visok regeneracijski potencial, saj so vsi razvili poganjke. Zato smo opravili test občutljivosti na seleksijski antibiotik, ki bi omogočal določitev najnižje učinkovite koncentracije higromicina B. Po 8 tednih trajanja poskusa, so se pojavile nekroze tkiva pri vseh izsečkih, hipokotili so bili na delovanje higromicina B najmanj občutljivi. Glede na rezultate teh poskusov (poglavje 4.1.2) smo izbrali delovne koncentracije higromicina B. Ta je bila za selekcijo hipokotilov 2,5 –krat višja kot v primeru listnih izsečkov in petiol, kar je občutno zmanjšalo odzivnost hipokotilov v poskusih transformacije. Pozitiven vpliv ostrejše selekcije je bila višja učinkovitost selekcije (Preglednica 3), (izračunana kot odstotek transformiranih regeneriranih poganjkov), ki je bila v primeru uporabe bakterije *A. tumefaciens* LBA4404 pri hipokotilih, vselej 100 %. Cilj poskusov transformacije je doseganje čim višje učinkovitosti – tako transformacije, kot tudi selekcije, zato bi bilo potrebno v prihodnje ovrednotiti spremembe teh parametrov pri nižjih koncentracijah higromicina B. Rezultati testiranja občutljivosti poganjkov rastlin *M. aurantiacus* na različne koncentracije higromicina B so pokazali učinkovito selekcijo že pri koncentraciji

10 mg l<sup>-1</sup>, ki je 2 – 5 krat nižja od uporabljenih delovnih koncentracij antibiotika. Rezultati nakazujejo, da higromicin B omogoča robustno selekcijo tudi v primeru regeneracije lažno pozitivnih poganjkov. Do tega lahko pride v primeru nepopolne odstranitve meristemskega tkiva pri pripravi izsečkov, pri katerem imajo meristemske celice višji regeneracijski potencial od ostalih celic izsečka. Razvoj lažno pozitivnih poganjkov lahko poteče ob detoksifikacijskem delovanju okoliških transformiranih celic (Jordan in McHughen, 1988).

### 5.3 USPEŠNOST TRANSFORMACIJE

Regenerirane transgene rastline so bile fenotipsko normalne (Slika 10) in so fluorescirale pri osvetlitvi z modro svetlobo (Slika 13) ali kazale modro obarvanje pri testiranju aktivnosti GUS (Slika 12). Opazili smo povprečno višjo intenziteto fluorescence ZsGreen v primerjavi z EGFP, čeprav je bilo mogoče opaziti razlike v intenziteti fluorescence istega reporterskega proteina tudi med posameznimi tkivi in v različnih stopnjah regeneracije. Najbolj intenzivno fluorescenco smo opazili pri celicah kalusa, ki so izražale ZsGreen (Slika 13a,b), fluorescenza je bila konstantna tudi v zgodnjih stopnjah celične diferenciacije in organogeneze v liste in poganjke (Slika 13c,d). Z nadaljnjam razvojem poganjkov, smo zabeležili upad v jakosti fluorescence sorazmerno z velikostjo in starostjo rastline, kar je v kasnejših fazah onemogočalo uporabo reporterja za detekcijo transgenov. Opazen upad fluorescence je bil posebej opazen pri EGFP. Southern-ova analiza DNA poganjkov rastlin, transformiranih z *EGFP* in *ZsGreen*, je pokazala stabilno integracijo T-DNA v rastlinski genom. Zaradi tega, dobljenih rezultatov ne moremo pojasniti s prehodno transformacijo. Utišanje genov zaradi pozicijskega učinka je eden od mogočih razlogov, s katerimi lahko pojasnjujemo slabše izražanje gena, vendar so v tem primeru razlike vidne že na začetku regeneracije tkiva. Podobne rezultate postopnega nižanja jakosti fluorescence, kot v našem primeru, so zabeležili Zhou in sod. (2005) po transformaciji trnate meteljke (*Medicago truncatula* Gaertn.), riža (*Oryza sativa* L.) in repnjakovca (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) z genom *gfp*. V študiji so pokazali, da je za zmanjšanje fluorescence odgovorna interferenca pigmentov klorofila s fluorescenco GFP ter zmanjšanje deleža GFP v skupni vsebnosti poteinov celice. Oba faktorja sta korelirala s starostjo rastlinskega tkiva. Podoben upad fluorescence GFP s staranjem listov so opazili tudi pri oljni ogrščici (*Brassica napus* L.) (Halfhill in sod., 2003). Pri tej študiji so najvišji nivo fluorescence zabeležili med pojavom listov, le-ta pa je bistveno upadel z nadalnjim razvojem poganjkov. Pojav je bil koreliran z zmanjšanjem koncentracije topnih proteinov in hkratnem sorazmerinem zmanjšanju vsebnosti GFP v celici (Halfhill in sod., 2003). Takšen vzorec zmanjševanja zaznavne fluorescence s staranjem tkiv ni nenavaden, kot lahko zasledimo v pregledu Hraška in sod. (2006) in verjetno nastane zaradi zgoraj omenjenih razlogov. Nepravilno delovanje konstitutivnega promotorja CaMV 35S je manj verjetno, saj poskusi z istim promotorjem pri tobaku (*N. tabacum*), kažejo na dosledno izražanje *gfp* gena v tkivih po celotni rastlini – ne samo pri regeneriranih rastlinah T<sub>0</sub> generacije, ampak tudi pri T<sub>1</sub> in T<sub>2</sub> generacijah (Hraška in sod., 2008).

Rezultati, ki prikazujejo celokupno število regeneriranih poganjkov in število transformiranih poganjkov iz osnovnih poskusov transformacij (Preglednica 3), kažejo na visoko variabilnost v uspešnosti transformacije med različnimi tipi izsečkov. Najvišja uspešnost transformacije je bila dosegrena pri petiolah (23,26 %), najnižja pa v primeru hipokotilov (1,37 %) (Susič in sod., 2013). Nizka uspešnost transformacije hipokotilov je posebej presenetljiva, saj so hipokotili v poskusih regeneracije na RM-BAP brez selekcijskih antibiotikov, dosledno izkazovali najvišji regeneracijski potencial (Graf 1). Opažena variacija v TE pri petiolah med različnimi reporterji (Preglednica 4: *gusA*, 15,8 %; *EGFP*, 53,0 %; *ZsGreen*, 7,7 %) je navidez dokaj izdatna in namiguje na bistvene razlike med reporterskimi sistemi. Razlike v TE, so lahko v določenih primerih posledica kopiranja reporterskega proteina in toksičnega učinka le-tega v celicah. Tak primer so opazili npr. pri GFP, ki je pri visokem izražanju deloval toksično, zaradi tvorbe prostih radikalov med fluorescenco proteina (Haseloff, 1999). Razlike so v našem primeru verjetno posledica visoke variabilnosti v regeneracijski sposobnosti petiol (poglavlje 5.1) in ne posledica izražanja različnih reporterskih genov. To tezo podpira podobno visoka variabilnost pri rezultatih odzivnosti petiol na RM-BAP, ki smo jo predhodno zabeležili v poskusih regeneracije različnih izsečkov (Preglednica 2). Dalje, pri hipokotilih, ki so v poskusih regeneracije (brez predhodne transformacije) kazali manjšo variabilnost v odzivnosti med ponovitvami, v poskusih transformacije ni bilo opaznih razlik v TE med različnimi reporterji.

Slabe rezultate hipokotilov iz poskusov transformacije, bi lahko pripisali potencialno previsoki koncentraciji higromicina B v RM-BAP za potrebe rastlinske selekcije. Regeneracija hipokotilov pri višji koncentraciji higromicina B ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) je posledično pripomogla k 100 % uspešnosti selekcije, vendar tudi k nizkemu odstotku odzivnih izsečkov, nizkem številu regeneriranih poganjkov in končno k nizkem številu dobljenih transformiranih rastlin. Visoko uspešnost transformacije petiol bi potem takem lahko pojasnili z regeneracijo poganjkov pri nižji koncentraciji antibiotika, kar se kaže tudi v višjem številu (11 %) lažno pozitivnih oz. »pobeglih« netransformiranih poganjkov. Obe težavi (nizek odstotek regeneriranih poganjkov oz. visok delež lažno pozitivnih) bi lahko reševali z uporabo postopne selekcije med regeneracijo poganjkov, kot v primeru študij transformacije arašidov (*Arachis hypogaea* L.) (Livingstone in Birch, 1999), navadne nokote (*Lotus corniculatus* L.) (Nikolic in sod., 2007), gorskega glavinca (*Centaurea montana* L.) (Abou-Alaiwi in sod., 2012), *Crambe abyssinica* (Li in sod., 2013) ipd. Tak pristop omogoča uporabo nizkih koncentracij selekcijskega antibiotika v začetnih fazah regeneracije (kar omogoča lažje okrevanje transformiranih celic), s postopnim zviševanjem koncentracije antibiotika z vsakim nadaljnjjim subkultiviranjem regenerantov na sveže gojišče. Kanamicin in higromycin B sta med najpogosteje uporabljenima antibiotika za rastlinsko selekcijo, vendar pa je slednji bolj toksičen z naraščajočo koncentracijo. Aoshima (2005) je zabeležil bistveno višjo toksičnost higromicina B v primerjavi s

kanamicinom. Ta je bila opaznejša le pri višjih koncentracijah antibiotika, kar je imelo drastičen vpliv na somatsko embriogenezo iz kalusnega tkiva čajevca (*Camellia sinensis* L.). Težave pri uporabi higromicina B kot selekcijskega antibiotika, lahko nastanejo tudi zaradi nečistoč v formulacijah raztopin nekaterih proizvajalcev. Transformirane celice lahko inaktivirajo antibiotik z izražanjem higromicin fosfotransferaze (HPT), vendar pa lahko odmiranje celic povzročijo primesi (nečistote), prisotne v končni formulaciji antibiotika. Te ostanejo po nezadostnem čiščenju antibiotika iz bioprocесne brozge. Učinek je bolj izrazit pri višjih koncentracijah učinkovin (Pan, 2012).

#### 5.4 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA TRANSFORMACIJE

Optimizacijo protokola transformacije smo preiskušali s spreminjanjem dveh parametrov – uporabo drugačnega seva bakterije *A. tumefaciens* ali regeneracijo tkiva na gojiščih RM-ZEA in RM-TDZ. Pred tem smo izvedli poskus testiranja različnih koncentracij rastlinskih hormonov v regeneracijskih gojiščih, katerega namen je bil pridobiti okvirne informacije o vplivu različnih vrst citokinov na adventivno regeneracijo hipokotilov ter določiti razmerja koncentracij hormonov v gojiščih RM-BAP, RM-ZEA in RM-TDZ, ki so omogočala najuspešnejšo regeneracijo izsečkov. V ta namen smo rezultate regeneracije izsečkov na gojiščih iz vseh skupin primerjali med sabo glede na povprečno število regeneriranih poganjkov, povprečno maso izsečkov in število hiperhidriranih izsečkov med serijami. V poskusu smo opazili verjetno povezavo med višjo stopnjo hiperhidriranosti in večjim številom poganjkov ter večjo maso izsečkov, zaradi česar ni bilo mogoče upravičiti analize variance (ANOVA), zaradi kršenja predpostavke o neodvisnosti meritev. Delovno razmerje koncentracij hormonov v gojiščih RM-ZEA in RM-TDZ, smo tako določili z iskanjem ugodnega razmerja med številom poganjkov, povprečno maso regeneriranih izsečkov in deležem hiperhidriranih izsečkov. Za gojišči RM-ZEA in RM-TDZ smo izbrali delovno razmerje koncentracij hormonov enako tistemu v RM-BAP in nato testirali vpliv zeatina in TDZ na odzivnost hipokotilov in petiol in na TE v poskusih transformacije. Uporaba zeatina ni povzročila bistvenih sprememb v TE pri petiolah, ki so se regenerirale na RM-ZEA, hkrati pa je bil dosežen slabši rezultat pri hipokotilih. Uporaba bakterije *A. tumefaciens* EHA105 tudi ni privedla do bistvenih izboljšav TE. V poskusih optimizacije transformacije je največji vpliv na ta dva parametra imel TDZ, tako pri hipokotilih, kot v primeru petiol. Rezultat je mogoče z višjo gotovostjo tolmačiti pri hipokotilih, saj je bila v tem poskusu dosežena skoraj 7 –krat višja odzivnost hipokotilov v primerjavi z osnovnimi poskusi transformacije, kljub visoki koncentraciji higromicina B. Nenazadnje pa je bila v primeru hipokotilov zabeležena zelo nizka variabilnost v rezultatih med poskusi, ki nakazuje, da tovrstna odstopanja niso rezultat variabilnosti genetske osnove hipokotilov. Ob regeneraciji izsečkov na RM-TDZ smo opazili tudi povišano tvorbo poganjkov, vendar pa so bili ti v večini primerov hiperhidrirani. Hiperhidriranost tkiva in večje število poganjkov bi lahko bili povezani, saj nepravilnosti v razvoju tkiv zaradi hormonalnega neravnovesja, lahko vodijo v izgubo apikalne dominance, kar bi lahko povzročilo tvorbo

večjega števila poganjkov (Cassels in Curry, 2001). TDZ je velikokrat uporabljen za uravnavanje rastlinske morfogeneze v *in vitro* kulturah (Murthy in sod., 1998), uspešno uporabo TDZ v namen adventivne regeneracije listnih izsečkov in petiol, pa so predhodno zabeležili tudi pri rastlinah *M. aurantiacus* (Murovec in sod., 2010). Uporabo TDZ pri regeneraciji hipokotilov in internodijev v poskusih transformacije, so predhodno opisali pri topolu (*Populus tremuloides*) (Tzfira in sod., 1997; Cseke in sod., 2007) in slivah (*Prunus domestica* L.) (Petri in sod., 2008). Učinek TDZ na povišanje deleža odzivnih izsečkov v poskusih transformacije rastlin *M. aurantiacus*, bi bilo potrebno natančneje preučiti. Izziv predstavlja predvsem zmanjševanje pojavljanja hiperhidriranih poganjkov, saj hiperhidriranost onemogoča učinkovito aklimatizacijo rastlin iz *in vitro* kulture.

### 5.5 MOLEKULSKA ANALIZA TRANSGENOV

Regenerirane transgene rastline, ki smo jih pridobili v osnovnih poskusih transformacije, so vsebovale 1 – 3 kopije transgenov. Večina transformiranih rastlin (73,0 %) je vsebovala eno kopijo T-DNA, 23,0 % transformiranih rastlin je vsebovalo dve kopiji transgenov in le 4,0 % transformiranih rastlin je vsebovalo tri kopije (Susič in sod., 2013). Razmerje je podobno, tudi ob združitvi rezultatov iz vseh poskusov (1 kopija gena: 70,8 %, 2 kopiji gena: 25,6 % in 3 kopije gena: 3,7 %). Rezultati potrjujejo dosedanja spoznanja, da posreden vnos genov z bakterijo *A. tumefaciens*, vodi v integracijo nižjega števila kopij transgenov (Gelvin, 2003).

Analiza prisotnosti plazmidnih zaporedij izven mej T-DNA je pokazala, da relativno velik delež transformiranih rastlin, ki smo jih pridobili v osnovnih poskusih transformacij (75,26 %), vsebuje tovrstne dele plazmidne DNA. Celokupen odstotek rastlin, zbranih iz vseh opravljenih poskusov, ki so kazale prisotnost plazmidne DNA, je znašal 79,87 %. Rezultati nasprotujejo teoriji o natančnem izrezu T-DNA zaporedja iz plazmidne DNA in vgradnjo le-tega v rastlinski genom, vendar pa so do podobnih rezultatov že prišli pri tobaku, kjer so prisotnost delov plazmidne DNA zaznali pri 75 % vzorcev (Kononov in sod., 1997), v drugi študiji pa pri 65 % testiranih regeneriranih rastlin (Lee in sod., 2004). Izven– T-DNA zaporedja ogrodja plazmida, so odkrili tudi v regeneriranih rastlinah enokaličnic, kot npr. pri pšenici, ki so jih transformirali s pomočjo bakterij *A. tumefaciens*. V študiji je 62 % regenerantov vsebovalo omenjeno DNA (Wu in sod., 2006). V naši študiji je večina transformiranih  $T_0$  rastlin (79,87 %) vsebovala dele zaporedij plazmida izven obeh mejnih sekvenc (70,93 %), dele plazmidne DNA samo izven desne mejne sekvence T-DNA je vsebovalo 4,88 % rastlin, medtem ko je dele plazmidne DNA samo izven leve mejne sekvence, vsebovalo 4,07 % rastlin. Rezultati torej potrjujejo pojav vgradnje zaporedij vektorske DNA v genom rastline skupaj z zaželenim T-DNA zaporedjem. Po splošno sprejetem modelu procesiranja T-DNA med postopkom transformacije, se izrez T-DNA iz ogrodja binarnega plazmida začne na desni mejni sekvenci (*R-bor*) z vezavo proteina VirD2. Protein VirD2 prav tako izreže T-DNA na levi mejni sekvenci (*L-bor*), kar je

mogoče zaradi visoke homologije med sekvencama (Tzfira in sod., 2004). Znano je, da VirD2 lahko »preskoči« *L-bor*, saj prepozna tudi zaporedja, ki niso del mejnih zaporedij. Na ta način se lahko v rastlinko celico prenesejo deli zaporedja plazmida onstran *L-bor* T-DNA (Gelvin, 2003). Po tem sklepanju, bi med testiranimi prevladovali vzorci s prisotnimi regijami onstran *L-bor*. V našem primeru nismo opazili takih razlik, kar drži tudi pri opažanjih drugih avtorjev (Kononov in sod., 1997). Pri večini testiranih pogankov sta bili prisotni obe mejni sekvenci (*L-* in *R-bor*). Take rastline so imele 1.6 –krat pogosteje vgrajeno več kot eno kopijo transgena kot rastline, ki niso imele prisotnih *L-* in *R-bor*. Opaženo povezavo je težko pojasniti z danimi podatki. Nekatere študije kažejo, da prisotnost delov plazmidnega ogrodja izven T-DNA, lahko izzove rekombinacije med plazmidi (Fu in sod., 2000) ali drugačne preuređitve transgenov pred ali med vgraditvijo v rastlinski genom, kot so nelegitimne rekombinacije zaradi nastanka stabilnih sekundarnih struktur. Določena zaporedja DNA so lahko mesta delovanja nukleaz in topoizomeraz (npr. *ori* mesto) ter tako omogočajo rekombinacije s podvojevanjem. Določeni deli plazmidov lahko vsebujejo z AT bogata zaporedja, ki omogočajo rekombinacije in lahko vodijo v kompleksno multimerizacijo plazmida (Muller in sod., 1999). Tako delovanje lahko pomeni pojav večih kopij transgenov, kot tudi preuređitev zaporedja T-DNA ali izgubo določenih delov.

V dosedanjih študijah so opazili različne načine integracije T-DNA v rastlinski genom. V primeru pravilnega izreza T-DNA, se lahko ta vgradi v obliki ene kopije na posamezen lokus, ene kopije na večih lokusih, ter večih kopij na večih lokusih. Pri slednjem primeru se lahko T-DNA organizirajo v obliki tandemskih ponovitev, tandemskih ponovitev na levem koncu zaporedja T-DNA in tandemskih ponovitev na desnem koncu zaporedja. Mogoče so tudi kompleksnejše oblike vzorcev integracije, sestavljeni iz mešanice zgoraj opisanih možnosti. Med vgraditvijo T-DNA lahko nastanejo različne nepravilnosti, kot so vstavitev vključkov DNA (t.i. »filler DNA«), zaradi delecije tarčnega mesta v zaporedju genomske DNA; prenos vektorskih zaporedij skupaj s T-DNA; ter večje delecije in / ali razenotenje (fragmentacija) T-DNA in vgraditev v rastlinski genom (Windels in sod., 2008; Lee in sod., 2004; Wu in sod., 2006; Muller in sod., 1999). Nekatere od navedenih nepravilnosti v procesiranju in vgraditvi T-DNA, bi lahko pojasnile posamezne rezultate analize po Southernu, kjer smo po hibridizaciji iste membrane z dvema različnima DNA sondama, dobili različne rezultate glede števila vključenih transgenov (Slika 16). Pri vzorcih 2, 3, 7, 9 in 12, bi lahko prišlo do delecije celega ali dela zaporedja gena *EGFP* pred vgraditvijo T-DNA v rastlinski genom.

## 5.6 DELOVANJE MARKERSKIH SISTEMOV

Wenck in sod. (2003) so po testiranju transformacije različnih rastlinskih vrst s fluorescentnimi reporterimi geni iz koral *Zoanthus* spp., napovedali tem reporterjem široko področje uporabe v rastlinski biotehnologiji. Vendar pa ZsGreen po naših

informacijah še ni bil uporabljen za postavitev, ovrednotenje in izboljšave protokola transformacije rastlinske vrste. V poskusih transformacije rastlin *M. aurantiacus* je bil ZsGreen boljši v primerjavi z EGFP in GUS, predvsem zaradi opazno višje svetlosti kot EGFP in splošno lažje detekcije v primerjavi z GUS. Uporaba *gusA* reporterskega gena pri transformaciji rastlin *M. aurantiacus* je bila dokaj težavna. Ker detekcija izražanja *gusA* zahteva dodatek eksogenega substrata, kofaktorjev in izvedbo histokemične fiksacije tkiva, je za izvedbo beleženja aktivnosti GUS potrebno žrtvovati pravkar regenerirano transgeno tkivo. Zaradi dolgega časa regeneracije rastlin *M. aurantiacus* po kokultivaciji z bakterijami *A. tumefaciens*, je takšen pristop neprimeren. Izražanje ZsGreen smo (kakor je sicer značilno za fluorescentne reporterske gene) lahko spremljali v realnem času, *in vivo*, brez posebnih priprav vzorcev in žrtvovanja tkiva rastlin. Opaženo bledenje fluorescence z razvojem rastlinskih tkiv predstavlja težavo za spremeljanje izražanja transgenov pri starejših rastlinah, vendar pa je iz opravljenih študij na GFP (Hraška in sod., 2006), mogoče zaključiti, da je to splošno značilno za fluorescentne reporterske sisteme in ne zoglj negativna lastnost ZsGreen.

## 6 SKLEPI

Za cilj magistrske naloge smo si zadali postavitev zanesljivega delovnega protokola, ki bi omogočal stabilno transformacijo rastlin *M. aurantiacus* z uporabo bakterije *A. tumefaciens*, kot vektorja za prenos različnih genskih konstruktov ter regeneracijo in diferenciacijo transformiranega rastlinskega tkiva v *in vitro* kulturi. Da bi dosegli namen naloge, smo:

- s poskusi adventivne regeneracije najprej določili najprimernejši tip izsečkov za poskuse transformacije ter izbrali sestavo gojišča, ki je omogočala uspešno adventivno regeneracijo,
- s poskusi smo deloma ovrgli začetno hipotezo, da bodo rastlinski izsečki z najvišjim regeneracijskim potencialom, dosegli višjo uspešnost transformacije, saj so hipokotili dosegli nasprotne rezultate od pričakovanih. Hkrati smo pokazali na opažanja, da je na dobljeni rezultat v dobri meri vplivala povišana koncentracija selekcijskega antibiotika higromicina B,
- z uporabo metode posredne transformacije z bakterijo *A. tumefaciens*, smo v celice rastline *M. aurantiacus* vnesli reporterske gene *gusA* (binarni plazmid pCAMBIA1301), *EGFP* (binarni plazmid pCAMBIA1302-EGFP) in *ZsGreen* (binarni plazmid pCAMBIA1302-ZsGreen) ter spremljali njihovo izražanje. To je tudi potrdilo predvidevanja, da bo z uporabo protokola za adventivno regeneracijo poganjkov iz različnih rastlinskih izsečkov (listni izsečki, petiole, hipokotili) *M. aurantiacus*, uveljavljenih binarnih plazmidov ali njihovih derivatov in različnih sevov bakterij *A. tumefaciens*, mogoče pridobiti odrasle transgene rastline,
- s histokemičnim GUS testom in uporabo epifluorescenčne stereolupe z ustreznim setom filtrov, smo potrdili transformacijo regenerantov, opažanja pa smo dodatno preučevali z molekulskimi tehnikami (polimerazno verižno reakcijo (PCR) in analizo po Southernu), s čimer smo potrdili konstitutivno izražanje reporterskih genov, pokazali na prednosti uporabe *ZsGreen*, kot reporterja za detekcijo izražanja transgenov, hkrati pa tudi ugotovili nekatere pomanjkljivosti izbranih reporterskih sistemov (kot je bledenje fluorescence s staranjem rastlinskega tkiva in nepraktičnost GUS).

Skupaj z zadanimi cilji naloge, smo z molekulskimi tehnikami analize transgenov, opazili tudi različne variacije v uspešnosti prenosa in vključitve T-DNA v rastlinski genom (vnos različnega števila kopij T-DNA, možni prelomi, delekcije, prenos delov sekvenč binarnih plazmidov ipd.), kar nakazuje na kompleksno naravo procesov transogeneze z uporabo bakterije *A. tumefaciens*.

## 7 POVZETEK

Genski inženiring je pomemben pristop v raziskavah rastlin. Pripomore lahko k razvoju novih rastlinskih sort ekonomsko pomembnih rastlin, široko področje uporabe pa ima tudi pri temeljnih raziskavah rastlin. Uporaba postopkov genskih transformacij omogoča skoraj brezmejne možnosti genomske modifikacije, kar je med drugim dobrodošlo tudi pri hortikulturalno pomembnih rastlinah. Čeprav je znanih več različnih metod rastlinske transformacije, je uporaba bakterije *A. tumefaciens* kot vektorja za posreden vnos transgenov, najbolj razširjena. K uspešnemu razvoju genskega inženiringa pri rastlinah je pomembno vplival tudi razvoj binarnih plazmidov, uporaba učinkovitih selekcijskih in reporterskih sistemov ter nenazadnje tudi razvoj učinkovitih postopkov *in vitro* adventivne regeneracije rastlin.

Oranžni krinkar (*M. aurantiacus*) je bil razmeroma nedavno prepoznan kot primeren modelni organizem za študije evolucijske in ekološke funkcionalne genomike. Rastline *M. aurantiacus* so primerne za študij molekularnih osnov speciacije zaradi naravno prisotnih geografsko strukturiranih različno obarvanih populacij. Zanesljiv sistem za genske transformacije je bistven za celovito izkoriščanje rastline kot modelnega sistema za genetske študije, hkrati pa je tak sistem potencialno uporaben tudi za žlahtnitelske namene in gospodarsko izkoriščanje.

V ta namen smo razvili učinkovit in zanesljiv protokol za gensko transformacijo rastlin *M. aurantiacus*, katerega je mogoče uporabiti v prihodnjih študijah kandidatnih genov in / ali funkcijah promotorjev. Z uporabo sevov bakterij *A. tumefaciens* LBA4404 in EHA105 ter pCAMBIA binarnih plazmidov, smo pridobili 137 T<sub>0</sub> regeneriranih transgenih rastlin *M. aurantiacus* s stabilno vgrajenim zaporedjem T-DNA. Večina T<sub>0</sub> linij regenerantov je vsebovala enojno kopijo T-DNA z nekaj vgrajenimi plazmidnimi deli. V poskusih transformacije smo uporabljali gojišča za adventivno regeneracijo (RM-BAP) ter elongacijo rastlin (EM-BAP), osnovana na mešanici mikro in makroelementov po Murashige in Skoog-u, katerim so bili dodani ustrezni rastni regulatorji: 0,5 mg l<sup>-1</sup> NAA in 1 mg l<sup>-1</sup> BAP (RM-BAP) ter 0,1 mg l<sup>-1</sup> IAA in 0,1 mg l<sup>-1</sup> BAP (EM-BAP). Poleg BAP smo v poskusih optimizacije protokola transformacije uporabili še TDZ in zeatin v enakih koncentracijah. V poskusih transformacije smo največ regeneriranih poganjkov (121) pridobili iz petiol, ki so dosegle v povprečju najvišjo učinkovitost transformacije (~ 23 %). Pri transformiranih rastlinah smo opazili uspešno izražanje reporterskih genov, med katerimi je bil najbolj uspešen gen za fluorescentni protein ZsGreen iz koral *Zoanthus* spp., ki je dosegal višjo svetlost kot EGFP. Spremljanje fluorescence ZsGreen in EGFP, pa je bilo hitrejše in lažje izvedljivo, kot detekcija β-glukuronidazne aktivnosti (GUS) v rastlinskih tkivih.

## 8 VIRI

- Abou-Alaiwi A. W., Potlakayala S. D., Goldman S. L., Josekutty P. C., Karelia D. N., Rudrabhatla S. V. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of the medicinal plant *Centaurea montana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109: 1-8
- Aoshima Y. 2005. Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. *Plant Biotechnology*, 22: 277-280
- Banta L. M., Montenegro M. 2008. *Agrobacterium* and plant biotechnology. V: *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Tzfira T., Citovsky V. (eds.). New York, Springer Science+Business Media, LLC: 73-148
- Barton K. A., Binns A. N., Matzke A. J., Chilton M. D. 1983. Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell*, 32, 4: 1033-43
- Cassels A. C., Curry R. F. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 2-3: 145-157
- Chandler S. F., Lu S.-Y. 2005. Biotechnology in ornamental horticulture. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41: 591-601
- Chandler S. F., Sanchez C. 2012. Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 891-903
- Ckurshumova W., Caragea A. E., Goldstein R. S., Berleth T. 2011. Glow in the dark: fluorescent proteins as cell and tissue-specific markers in plants. *Molecular Plant*, 4, 5: 794-804
- Cormack B. P., Valdivia R. H., Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 1: 33-38
- Cseke L. J., Cseke S. B., Podila G. K. 2007. High efficiency poplar transformation. *Plant Cell Reports*, 26: 1529-1538
- de Ruijter N. C. A., Verhees J., van Leeuwen W., van der Krol A. R. 2003. Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biology*, 5: 103-115
- Eisel D., Seth O., Grünwald-Janho S., Kruchen B., Rüger B. 2008. DIG application manual for filter hybridization. Mannheim, Roche Diagnostics GmbH: 204 str.

- Fu X., Duc L. T., Fontana S., Bong B. B., Tinjuangjun P., Sudhakar D., Twyman R. M., Christou P., Kohli A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research*, 9: 11-19
- Gastwirth J. L., Gel Y. R., Miao W. 2009. The impact of levene's test of equality of variances on statistical theory and practice. *Statistical Science*, 24, 3: 343-360
- Gelvin S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 16-37
- Griffiths A. J. F., Wessler S., Lewontin R., Carroll S. 2008. *Intoduction to genetic analysis*. 9<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman and Company: 838 str.
- Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 25, 6: 989-994
- Halfhill M. D., Millwood R. J., Rufty T. W., Weissinger A. K., Stewart C. N. Jr. 2003. Spatial and temporal patterns of green fluorescent protein (GFP) fluorescence during leaf canopy development in transgenic oilseed rape, *Brassica napus* L. *Plant Cell Reports*, 22: 338-343
- Hare J. D. 2002a. Geographic and genetic variation in the leaf surface resin components of *Mimulus aurantiacus* from southern California. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 281-296
- Hare J. D. 2002b. Seasonal variation in the leaf resin components of *Mimulus aurantiacus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 709-720
- Hare J. D. 2008. Inheritance of leaf geranylflavanone production and seed production within and among chemically distinct populations of *Mimulus aurantiacus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 84-91
- Hare J. D., Borchardt D. B. 2002. Structure of a geranyl-alpha-pyrone from *Mimulus aurantiacus* leaf resin. *Phytochemistry*, 59: 375-378
- Haseloff J. 1999. GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods in Cell Biology*, 58: 139-151
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti-vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 10: 446-451
- Hoekema A., Hirsch P., Hooykaas P., Schilperoort R. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature*, 303: 179-180

- Hood E. E., Gelvin S. B., Melchers L. S., Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2, 4: 208-218
- Hraška M., Rakouský S., Čurn V. 2006. Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 303-318
- Hraška M., Rakouský S., Čurn V. 2008. Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94: 239-251
- Iturriaga G., Jefferson R. A., Bevan M. W. 1989. Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 1: 381-390
- Jefferson R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 4: 387-405.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. 1987. GUS fusion: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907
- Jordan M. C., McHughen A. 1988. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Reports*, 7, 4: 285-287
- Kern M. 2002. Food, feed, fibre, fuel and industrial products of the future: challenges and opportunities. Understanding the strategic potential of plant genetic engineering. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188, 291-305
- Kononov M. E., Bassuner B., Gelvin S. B. 1997. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant Journal*, 11: 945-957
- Kump B., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149-158
- Lee L.-Y., Gelvin S. B. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146: 325-332
- Lee M.-K., Kim H.-S., Kim S.-H., Park Y.-D. 2004. T-DNA Integration Patterns in Transgenic Tobacco Plants. *Journal of Plant Biology*, 47, 3: 179-186
- Levene H. 1960. Robust tests for equality of variances. V: Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling. Olkin I. (ed.). Palo Alto, Stanford University Press: 278-292

- Li X., Fan J., Gruber J., Guan R., Frentzen M., Zhu L.-H. 2013. Efficient selection and evaluation of transgenic lines of *Crambe abyssinica*. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-9
- Lincoln D. E., Han K. 1997. The impact of plasticity and maternal efect on the evolution of leaf resin production in *Diplacus aurantiacus*. *Evolutionary Ecology*, 11: 471-484
- Livingstone D. M., Birch R. G. 1999. Efficient transformation and regeneration of diverse cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by particle bombardment into embryogenic callus produced from mature seeds. *Molecular Breeding*, 5, 1: 43-51
- Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., Lukyanov S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 17: 969-973
- Mead L. R. 2011. *Mimulus aurantiacus* »Jellybean Purple/pink«. Lois Reynolds Mead's Blog.  
<http://loisreynoldsmead.files.wordpress.com/2011/05/monkey6.jpg> (14. okt. 2013)
- Miki B., McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107: 193–232
- Muller A. E., Kamisugi Y., Gruneberg R., Niedenhof I., Horold R. J., Meyer P. 1999. Palindromic sequences and AT-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Molecular Biology*, 291: 29-46
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Murovec J., Bohanec B. 2013. Haploid induction in *Mimulus aurantiacus* Curtis obtained by pollination with gamma irradiated pollen. *Scientia Horticulturae*, 162: 218-225
- Murovec J., Eler K., Bohanec B. 2010. Adventitious shoot regeneration from leaf and internodal explants of *Mimulus aurantiacus* Curtis. *Propagation of Ornamental Plants*, 10, 1: 18-23
- Murovec J., Stajner N., Jakse J., Javornik B. 2007. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of *Mimulus* species derived by a cross-genera approach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132, 5: 659-663
- Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 34: 267-275
- Nikolić R., Mitić N., Ninković S., Nešković M. 2007. Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. using a direct shoot regeneration protocol, stepwise hygromycin B

- selection, and a super-binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Archives of Biological Sciences 59: 311-317
- Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. 1990. Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant and Cell Physiology, 31, 6: 805-813
- Ow D. W., De Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H., Wood K. V., Deluca M. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science, 234: 856-859
- Pan Q. (2012). Low cell toxicity antibiotic Hygromycin B. United States Patent US 20120231448A1: 14 str.
- Petri C., Webb K., Hily J.-M., Dardick C., Scorza R. 2008. High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. Molecular Breeding, 22: 58-591
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.  
<http://www.R-project.org/> (okt. 2013)
- Santa Monica Mountains. 2004. Wildflowers of the Santa Monica Mountains National Recreation Area. National Park Service, U.S. Department of Interior.  
[http://www.smmflowers.org/bloom/species/Mimulus\\_aurantiacus.htm](http://www.smmflowers.org/bloom/species/Mimulus_aurantiacus.htm) (14. okt. 2013)
- SGWA. 2013. The San Gorgonio wilderness – shrubs and others. Mentone, San Gorgonio Wilderness Association.  
[http://www.sgwa.org/images/flora\\_fauna/shrubs/Mimulus\\_aurantiacus\\_C.jpg](http://www.sgwa.org/images/flora_fauna/shrubs/Mimulus_aurantiacus_C.jpg) (14. okt. 2013)
- Siemering K. R., Golbik R., Sever R., Haseloff J. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. Current Biology, 6: 1653-1663
- Southern E. 2006. Southern blotting. Nature Protocols, 1, 2: 518-525
- Steel R. G. D., Torrie J. H., Dickey D. A. 1997. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3<sup>rd</sup> ed. New York, McGraw-Hill: 666 str.
- Streisfeld M. A., Kohn J. R. 2005. Contrasting patterns of floral and molecular variation across a cline in *Mimulus aurantiacus*. Evolution, 59: 2548-2559
- Streisfeld M. A., Kohn J. R. 2007. Environment and pollinator-mediated selection on parapatric floral races of *Mimulus aurantiacus*. Journal of Evolutionary Biology, 20: 122-132

- Streisfeld M. A., Rausher M. D. 2009. Altered transregulatory control of gene expression in multiple anthocyanin genes contributes to adaptive flower color evolution in *Mimulus aurantiacus*. Molecular Biology and Evolution, 26: 433-444
- Streisfeld M. A., Young W. N., Sobel J. M. 2013. Divergent selection drives genetic differentiation in an R2R3-MYB transcription factor that contributes to incipient speciation in *Mimulus aurantiacus*. PLoS Genetics, 9, 3 (v tisku)  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003385> (15. okt. 2013)
- Susič N., Bohanec B., Murovec J. 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of bush monkey-flower (*Mimulus aurantiacus* Curtis) with a new reporter gene *ZsGreen*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 115, 2 (v tisku)  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0402-3> (15. okt. 2013)
- Tanaka A., Mita S., Ohta S., Kyozuka J., Shimamoto K., Nakamura K. 1990. Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. Nucleic Acids Research, 18, 23: 6767-6770
- Tanaka Y., Katsumoto Y., Brugliera F., John M. 2005. Genetic engineering in floriculture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80: 1-24
- Thompson, D. M. 2012. Phrymaceae. V: Baldwin B. G., Goldman D. H., Keil D. J., Patterson R., Rosatti T. J. (eds.). The digital Jepson manual: higher plants of California 2<sup>nd</sup> ed. University of California Press, Ltd., Los Angeles, CA: 988-997
- Tzfira T., Citovsky V. 2008. Agrobacterium: from biology to biotechnology. New York, Springer Science+Business Media, LLC: 750 str.
- Tzfira T., Jensen C. S., Wang W., Zuker A., Vinocur B., Arie Altman A., Vainstein A. 1997. Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Molecular Biology Reporter, 15: 219-235
- Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. 2004. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. Trends in Genetics, 20, 8: 375-383
- Ulukan H. 2009. The evolution of cultivated plant species: classical plant breeding versus genetic engineering. Plant Systematics and Evolution, 280: 133-142
- Vincze T., Posfai J., Roberts R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Research, 31: 3688-3691
- Wenck A. R. 2006. Application of reef coral fluorescent proteins to plant biotechnology. Clonetechniques, 10: 26-28

- Wenck A., Pugieux C., Turner M., Dunn M., Stacy C., Tiozzo A., Dunder E., van Grinsven E., Khan R., Sigareva M., Wang W. C., Reed J., Drayton P., Oliver D., Trafford H., Legris G., Rushton H., Tayab S., Launis K., Chang Y.-F., Chen D.-F., Melchers L. 2003. Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Reports*, 22: 244-251
- Windels P., De Buck S., Depicker A. 2008. Patterns of T-DNA integration into the host genome. V: *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Tzfira T., Citovsky V. (eds.). New York, Springer Science+Business Media, LLC: 73-148
- Wu C. A., Lowry D. B., Cooley A. M., Wright K. M., Lee Y. W., Willis J. H. 2008. *Mimulus* is an emerging model system for the integration of ecological and genomic studies. *Heredity*, 100: 220-230
- Wu H., Sparks C. A., Jones H. D. 2006. Characterisation of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*, 18: 195-208
- York Design Group. 2011. Native Plants – Ceanothus and Mimulus. San Diego, York Design Group.  
[http://www.yorklandscape.com/wp-content/uploads/2011/02/IMG\\_0572.jpg](http://www.yorklandscape.com/wp-content/uploads/2011/02/IMG_0572.jpg) (14. okt. 2013)
- Yuan Y.-W., Sagawa J. M., Young R. C., Christensen B. J., Bradshaw, Jr. H. D. 2013. Genetic dissection of a major anthocyanin QTL contributing to pollinator-mediated reproductive isolation between sister species of *Mimulus*. *Genetics*, 194, 1: 255-263
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Montagu M. V., Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*, 2, 12: 2143-2150
- Zhou X., Carranco R., Vitha S., Hall T. C. 2005. The dark side of green fluorescent protein. *New Phytologist*, 168: 313-322
- Zhou X., Wang K., Lv D., Wu C., Li J., Zhao P., Lin Z., Du L., Yan Y., Ye X. 2013. Global analysis of differentially expressed genes and proteins in the wheat callus infected by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS ONE*, 8, 11 (v tisku)  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079390> (13. dec 2013)
- Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah – vnos genov. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ed.). Ljubljana, BIA d.o.o.: 299-308

## ZAHVALA

H končni obliki pričajoče magistrske naloge so s svojim znanjem, vpogledom, nasveti in idejami, prispevali različni ljudje.

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Borutu Bohancu, za hiter pregled naloge, splošno usmerjanje pri delu in pomoč pri popravi končne oblike naloge.

Posebej se zahvaljujem svoji somentorici dr. Jani Murovec, saj mi je bila v veliko pomoč tako pri delu v laboratoriju, kot tudi pri prenosu spoznanj in rezultatov laboratorijskega dela v pisno obliko. Prav Jani bi se rad zahvalil tudi zaradi podobne pomoči pri pripravi znanstvenega članka, ki je nastal skupaj z magistrskim delom.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Jani Žel, za hiter in temeljit pregled naloge ter za konstruktivne predloge.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi svojim sodelavcem iz Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, ki so mi v času nastajanja magistrskega dela kakorkoli pomagali in / ali me nasmejali.

Končna zahvala gre mojim prijateljem in družini, oziroma vsem ki so me v tem času kakorkoli podpirali.

## Priloga A

Sestava gojišča MS (Duchefa) (Murashige in Skoog, 1962).

Mikroelementi	Masna koncentracija (mg l <sup>-1</sup> )	Množinska koncentracija (µM)
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10
Fe-Na-EDTA	36,70	100,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100,27
KI	0,83	5,00
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	16,90	100,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91
Makroelementi	mg l <sup>-1</sup>	mM
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25
KNO <sub>3</sub>	1900,00	18,79
MgSO <sub>4</sub>	189,54	1,50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	20,61
Organske sestavine	mg l <sup>-1</sup>	µM
glicin	2,00	26,64
mio-inozitol	100,00	554,94
nikotinska kislina	0,50	4,06
piridoksin-HCl	0,50	2,43
tiamin-HCl	0,10	0,30

## Priloga B

Sestava pufrov in raztopin uporabljenih v raziskavi.

### Histokemični GUS test

Raztopina / pufer	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija
50 mM fosfatni pufer NaPO <sub>4</sub> (pH 6,8)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kemika	6,2 % (w/v)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kemika	3,7 % (w/v)

### Izolacija DNA

Raztopina / pufer	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija
pufer CTAB	cetiltrimetil amonijev bromid (CTAB)	Duchefa	2 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 8,0)	Duchefa	0,1 M
	EDTA (pH 8,0)	Sigma	20 mM
	NaCl	Duchefa	1,4 M
	β-merkaptoetanol	Sigma	0,2 % (v/v)
pufer TE	Tris-HCl (pH 8,0)	Duchefa	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	Sigma	1 mM

### Merjenje koncentracije DNA

raztopina / pufer	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija
10× TNE pufer (pH 7,0)	Tris-HCl	Duchefa	0,1 M
	EDTA	Sigma	0,01 M
	NaCl	Duchefa	2 M

### Agarozna gelska elektroforeza

raztopina / pufer	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija
1× TBE pufer (pH 8,3)	Tris-HCl	Duchefa	1,1 M
	borna kislina	Duchefa	0,9 M
	EDTA	Sigma	25 mM
nanašalno barvilo BPB	Ficoll® 400	-	12,5 % (w/v)
	bromfenol modro	-	6,7 % (v/v)
	10× TBE pufer	-	Uravnavanje volumna
nanašalno barvilo 6x Loading Dye	Orange G	Promega	0,4 % (v/v)
	bromfenol modro	Promega	0,03 % (v/v)
	ksilen cianol FF	Promega	0,03 % (v/v)
	Ficoll® 400	Promega	15 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 7,5)	Promega	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	Promega	50 mM

### Southern blot

Raztopina / pufer	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija
10× Blocking raztopina	blocking reagent pufer maleinske kislina (pH 7,5)	Sigma -	100 mg ml <sup>-1</sup> Uravnavanje volumna
10 % SDS (pH 7,2)	Na-dodecil sulfat (SDS)	Duchefa	100 g l <sup>-1</sup>
20× SSC pufer (pH 7,0)	NaCl Na-citrat (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> × 2H <sub>2</sub> O)	Duchefa Honeywell Riedel-de Haen	3 M 0,3 M
CDP Star reagent	CDP Star substrat Pufer CDP Star	Roche	50 mM 1x
denaturacijska raztopina	NaOH NaCl	Merck Duchefa	0,5 M 1,5 M
detekcijski pufer (pH 9,5)	Tris-HCl NaCl	Duchefa	0,1 M 0,1 M
raztopina visoke strogosti (High Stringency solution; HSS)	20× SSC (pH 7,0) 10% SDS (pH 7,2)	-	0,1x 0,1 %
raztopina nizke strogosti (Low Stringency solution; LSS)	20× SSC (pH 7,0) 10% SDS (pH 7,2)	-	2x 0,1 %
pufer maleinske kisline (Maleic acid buffer) (pH 7,5)	maleinska kislina (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ) NaCl	Sigma Duchefa	0,1 M 0,15 M
nevtralizacijska raztopina (pH 7,5)	Tris-HCl NaCl	Duchefa Duchefa	0,5 M 1,5 M
pufer za prekinitev hibridizacije DNA sonde (Stripping buffer)	NaOH SDS	Merck Duchefa	0,2 M 0,1 %
pufer za spiranje 1 (Washing buffer I ) (pH 7,5)	maleinska kislina (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ) NaCl Tween 20	Sigma Duchefa Sigma	0,1 M 0,15 M 0,1 %

### Priloga C

Sestava založnih raztopin kemikalij uporabljenih v raziskavi ter njihovo shranjevanje.

#### Antibiotiki

Založna raztopina	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija	Shranjevanje
timentin	Timentin (tikarcilin in klavulanska kislina) ddH <sub>2</sub> O	Duchefa IDT	150 mg ml <sup>-1</sup> -	Zamrzovalnik (- 20 °C)
higromicin B	higromicin B ddH <sub>2</sub> O	Duchefa IDT	50 mg ml <sup>-1</sup> -	Zamrzovalnik (- 20 °C)
kanamicin	kanamicin ddH <sub>2</sub> O	Duchefa IDT	50 mg ml <sup>-1</sup> -	Zamrzovalnik (- 20 °C)
rifampicin	rifampicin 1 M HCl 96 % etanol ddH <sub>2</sub> O	Duchefa Merck Carlo Erba Reagents IDT	50 mg ml <sup>-1</sup> 20 % (v/v) 40 % (v/v) 40 % (v/v)	Pripravimo sveže
streptomycin	streptomycin ddH <sub>2</sub> O	Duchefa IDT	50 mg ml <sup>-1</sup> -	Zamrzovalnik (- 20 °C)

#### Rastlinski hormoni

Založna raztopina	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija	Shranjevanje
BAP	6-benzilaminopurin ddH <sub>2</sub> O	Sigma IDT	1 mg ml <sup>-1</sup> -	Hladilnik (4 °C)
IAA	indol-3-ocetna kislina ddH <sub>2</sub> O	Duchefa IDT	100 µg ml <sup>-1</sup> -	Hladilnik (4 °C)
NAA	1-naftalenocetna kislina ddH <sub>2</sub> O	Sigma IDT	200 µg ml <sup>-1</sup> -	Hladilnik (4 °C)
zeatin	zeatin ddH <sub>2</sub> O	Duchefa IDT	1 mg ml <sup>-1</sup> -	Zamrzovalnik (- 20 °C)
TDZ	tidiazuron dimetyl sulfoksid (DMSO)	Duchefa Sigma	1 mg ml <sup>-1</sup> -	Zamrzovalnik (- 20 °C)

#### Vitamini in ostalo

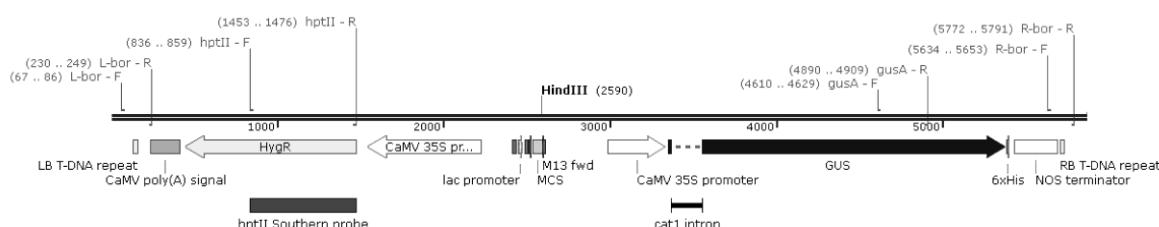
Založna raztopina	Sestavine	Proizvajalec	Koncentracija	Shranjevanje
TPN	tiamin piridoksin nikotinska kislina ddH <sub>2</sub> O	Sigma Sigma Sigma IDT	2 mg ml <sup>-1</sup> 1 mg ml <sup>-1</sup> 1 mg ml <sup>-1</sup> -	Hladilnik (4 °C)
acetosiringon	4-hidroksi-3,5-dimetoksiacetofenon DMSO	Sigma Sigma	200 mM -	Zamrzovalnik (- 20 °C)

## Priloga D

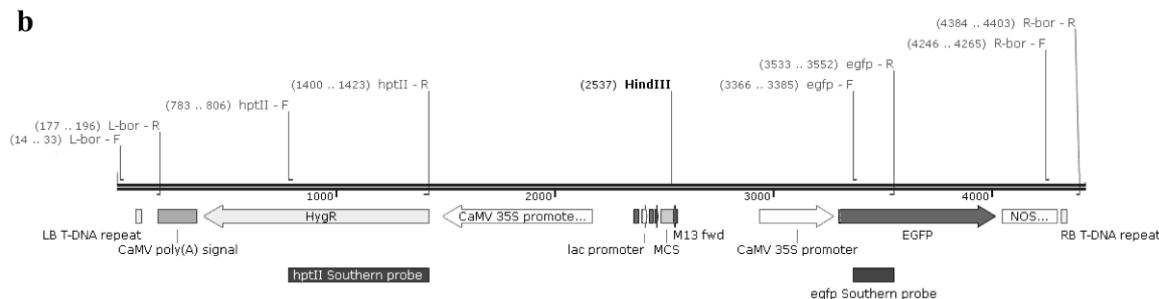
### Sheme T-DNA iz plazmidov (a) pCAMBIA 1301, (b) pCAMBIA 1302-EGFP in (c) pCAMBIA 1302-ZsGreen

Označeni sestavni elementi zaporedja: (CaMV 35S) promotor iz mozaičnega virusa cvetače; (cat1) intron iz ricinusove katalaze; (GUS) zaporedje gena *gusA* za β-glukuronidazo; (EGFP) zaporedje gena *EGFP*; (ZsGreen) zaporedje gena *ZsGreen*; (6xHis) zaporedje polihistidinske afinitetne oznake; (NOS terminator) zaključevalno zaporedje nopalinske sintaze; (RB T-DNA repeat) zaporedje desne mejne sekvene T-DNA; (LB T-DNA repeat) zaporedje leve mejne sekvene T-DNA; (CaMV poly(A) signal) poliadenilacijsko signalno zaporedje iz mozaičnega virusa cvetače; (HygR) zaporedje gena *hptII* za higromicin B fosfotransferazo; (lac) bakterijski *lac* promotor; (MCS) multiplo mesto za kloniranje; (M13) fragment vektorja M13. Slika prikazuje še mesto delovanja restrikcijskega encima *HindIII*, mesta naleganja parov začetnih oligonukleotidov (gusA-F, gusA-R, egfp-F, egfp-R, ZsGreen-F, ZsGreen-R, R-bor-F, R-bor-R, L-bor-F, L-bor-R, hptII-F, hptII-R) in mesta hibridizacije DNA sond pri analizi Southern (hptII/egfp/ZsGreen Southern probe). Slika je bila ustvarjena s programskim orodjem SnapGene® Viewer, DNA zaporedje pa pridobljeno iz NCBI.

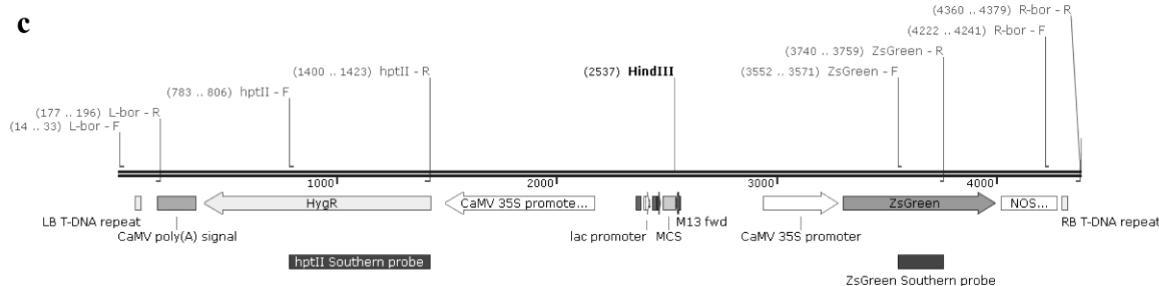
**a**



**b**



**c**



### Priloga E

Razvrstitev vzorcev DNA regeneriranih rastlin iz poskusov transformacij v skupine glede na prisotnost mejnih regij T-DNA in število kopij genov.

Prisotnost mejnih sekvenc ( <i>bor</i> ) <sup>a</sup>	Število kopij gena <sup>b</sup>				Skupno št. vzorcev [N (%)] <sup>c</sup>
	0	1	2	3	
0	0 (0)	18 (12,16)	7 (4,73)	0 (0)	
1	2 (1,35)	7 (4,73)	2 (1,35)	0 (0)	148 (100)
2	11 (7,43)	62 (41,89)	34 (22,97)	5 (3,38)	

<sup>a</sup> prisotnost mejnih sekvenc *L-bor* in *R-bor* določena s PCR. Razlaga oznak: 0 = ni prisotnih mejnih sekvenc; 1 = prisotna je *L-bor* ali *R-bor* sekvenca; 2 = prisotni sta obe mejni sekvenki

<sup>b</sup> število kopij gena določeno glede na rezultate analize Southern

<sup>c</sup> skupno število vzorcev vključenih v analizo. Iz celokupnega števila vzorcev (N = 154), smo odbrali take, ki so kazali okužbo z bakterijo *A. tumefaciens*.