

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLGIJE

Marko FLAJŠMAN

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH MARKERSKIH GENOV
ZA IZRAŽANJE β -GLUKURONIDAZE ZA
DESTRUKTIVNO IN NEDESTRUKTIVNO
HISTOKEMIČNO TESTIRANJE V TRANSGENEM
TOBAKU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLGIJE

Marko FLAJŠMAN

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH MARKERSKIH GENOV ZA
IZRAŽANJE β -GLUKURONIDAZE ZA DESTRUKTIVNO IN
NEDESTRUKTIVNO HISTOKEMIČNO TESTIRANJE V
TRANSGENEM TOBAKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF DIFFERENT REPORTER GENES FOR
EXPRESSION OF β -GLUCURONIDASE FOR DESTRUCTIVE AND
NON-DESTRUCTIVE HISTOCHEMICAL GUS-ASSAY IN
TRANSGENIC TOBACCO**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Komisija za dodiplomski študij Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca, za recenzentko pa prof. dr. Majo Ravnikar.

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: prof. dr. Maja Ravníkar
Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
Nacionalni inštitut za biologijo

Datum zagovora: 12.9.2011

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

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Flajšman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606: 633.71: 577.2 (043.2)
KG	markerski geni/gus markerski sistem/ β -glukuronidaza/destruktivno histokemično testiranje/nedestruktivno histokemično testiranje
AV	FLAJŠMAN, Marko
SA	BOHANEC, Borut (mentor)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
KZ	SI 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	PRIMERJAVA RAZLIČNIH MARKERSKIH GENOV ZA IZRAŽANJE β -GLUKURONIDAZE ZA DESTRUKTIVNO IN NEDESTRUKTIVNO HISTOKEMIČNO TESTIRANJE V TRANSGENEM TOBAKU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 63 str., 9 pregl., 23 sl., 63 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	S posredno metodo transformacije z vektorskim sistemom <i>A. t.</i> LBA4404 smo v listne diske tobaka (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) vnesli tri različne <i>gus</i> markerske gene na treh plazmidih: <i>gus</i> gen iz <i>Escherichie coli</i> (<i>gus</i> ^{Eco}) na plazmidu pCAMBIA1301 za destruktivni histokemični (DH) GUS test; <i>gus</i> gen (GUSPlus TM) iz <i>Staphylococcus</i> sp. (<i>gus</i> ^{Ssp}) na plazmidu pCAMBIA1305.1 za DH GUS test in <i>gus</i> gen (GUSPlus TM) iz <i>Staphylococcus</i> sp. (<i>gus</i> ^{Ssp}) z dodano GRP signalno sekvenco na plazmidu pCAMBIA1305.2 za ne-destruktivni histokemični (NDH) GUS test. Na vsakem plazmidu se je nahajal še selekcijski gen <i>hptII</i> . Namen naloge je bil raziskati lastnosti novega GUSPlus TM markerskega sistema, zlasti intenziteto obarvanja tarčnega tkiva, večjo občutljivost na substrat in ne-destruktivnost testa. Z metodo DH GUS testa aktivnosti β -glukuronidaze smo primerjalno testirali transformirane poganjke <i>gus</i> ^{Eco} iz plazmida pCAMBIA1301 (22,9 % transformiranih regenerantov) in <i>gus</i> ^{Ssp} iz plazmida pCAMBIA1305.1 (32,2 % transformiranih regenerantov). Slednji je omogočal pojav izrazite in intenzivnejše modre barve transformiranih poganjkov. Z NDH GUS testom smo testirali <i>gus</i> ^{Ssp} iz plazmida pCAMBIA1305.2. NDH GUS test je omogočal nadaljnjo rast testiranih poganjkov, 57,6 % GUS pozitivnih poganjkov je preživelilo. Poganjki, ki so rasli na gojišču brez selekcije, so bili GUS negativni. Poganjki, ki so rasli na selekcijskem gojišču (25 mg/L higromicina), so bili GUS pozitivni (38,8 % transformiranih regenerantov). Z dupleks PCR metodo smo v večini primerov pozitivni GUS fenotip potrdili z namnoževanjem fragmentov za markerski in selekcijski gen.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 606: 633.71: 577.2 (043.2)
DX marker genes/gus marker sistem/β-glucuronidase/destructive histochemical GUS-assay/ non-destructive histochemical GUS-assay
AU FLAJŠMAN, Marko
AA BOHANEC, Borut (mentor)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
PB SI 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study program of Biotechnology
PY 2011
TI COMPARISON OF DIFFERENT REPORTER GENES FOR EXPRESSION OF β-GLUCURONIDASE FOR DESTRUCTIVE AND NON-DESTRUCTIVE HISTOCHEMICAL GUS-ASSAY IN TRANSGENIC TOBACCO
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 63 p., 9 tab., 23 fig., 63 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco leaf disks was used for introducing three different GUS reporter genes from three plasmids: *gus* gene from *Escherichia coli* (*gus*^{Eco}) on the plasmid pCAMBIA1301 for destructive histochemical (DH) GUS-assay; *gus* gene (GUSPlus^{TM*}) from *Staphylococcus* sp. (*gus*^{Ssp}) on the plasmid pCAMBIA1305.1 for DH GUS-assay and *gus* gene (GUSPlus^{TM*}) from *Staphylococcus* sp. (*gus*^{Ssp}) with GPR signal sequence added on the plasmid pCAMBIA1305.2 for non-destructive (NDH) GUS-assay. Every plasmid contains also selectable marker gene *hptII*. Our goal was to explore some properties of the new GUSPlusTM in particular staining intensity of target tissue, sensitivity to substrate and non-destructiveness of test. DH GUS-assay was used to analyse β-glucuronidase activity in tobacco plants, transformed with plasmid pCAMBIA1301, carrying *gus*^{Eco} gene (transformation rate 22,9 %) and compare with tobacco plants, transformed with plasmid pCAMBIA1305.1, carrying *gus*^{Ssp} gene (transformation rate 32,2 %). Profound and intense blue color was achieved using pCAMBIA1305.1 plasmid. NDH GUS-assay was tested using pCAMBIA1305.2 plasmid. NDH GUS-assay enable further regeneration of tested tobacco plant, 57,6 % of GUS positive regenerants show further regeneration. Regenerants from selection free medium was GUS negative. Regenerants, derived from selection medium (hygromycin 25 mg/L), was GUS positive (transformation rate 22,9 %). Molecular analysis by duplex PCR confirmed integration of reporter and selection genes into tobacco plants.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TOBAK	3
2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE	3
2.2.1 Posredni vnos genov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
2.2.1.1 Mehanizem prenosa T-DNA v rastlinsko celico	6
2.2.1.1.1 T-DNA	7
2.2.1.1.2 Kromosomalni geni	8
2.2.1.1.3 Virulentni geni	8
2.2.1.1.4 Vključitev T-DNA v genom rastlinske celice	8
2.2.1.2 Zgradba Ti plazmidnega vektorja za prenos genov v rastlinske celice	9
2.2.2 Seleksijski geni	11
2.2.3 Markerski ali testni geni	12
2.2.3.1 GUS markerski sistem	13
2.2.3.2 GUSPlus™ markerski sistem	17
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 SESTAVA RASTLINSKIH IN BAKTERIJSKIH GOJIŠČ	20
3.2 RASTLINSKI MATERIAL	21
3.3 SEV BAKTERIJE IN TIPI PLAZMIDOV	21
3.4 VNOS GENOV V TOBAK Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
3.5 HISTOKEMIČNI TEST	27
3.5.1 Destruktivni test aktivnosti <i>gus</i>^{Eco} gena iz plazmida pCAMBIA1301 in <i>gus</i>^{Ssp} gena iz plazmida pCAMBIA1305.1	27
3.5.2 Ne-destruktivni test aktivnosti <i>gus</i>^{Ssp} gena iz plazmida pCAMBIA1305.2	28
3.6 ANALIZA PRISOTNOSTI <i>gus</i> ^{Eco} , <i>gus</i> ^{Ssp} IN <i>hptII</i> GENOV V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH S PCR METODO	28
3.6.1 Izolacija rastlinske DNA	28
3.6.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom	28
3.6.3 PCR (polimerazna verižna reakcija)	29
3.6.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno elektroforezo	30

3.7	KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA	30
4	REZULTATI	31
4.1	PRIMERJAVA MARKERSKIH GENOV gus^{Eco} IZ PLAZMIDA pCAMBIA1301 IN gus^{Ssp} GENA IZ PLAZMIDA pCAMBIA1305.1	31
4.1.1	Uspešnost regeneracije poganjkov iz transformiranih izsečkov	31
4.1.2	Histokemični destruktivni test aktivnosti gus^{Eco} gena v plazmidu pCAMBIA1301 in gus^{Ssp} gena v plazmidu pCAMBIA1305.1	31
4.1.3	Razlike v intenziteti obarvanja listov tobaka med genoma gus^{Eco} in gus^{Ssp} pri destruktivnem testiranju	32
4.2	GEN gus^{Ssp} V PLAZMIDU pCAMBIA1305.2	33
4.2.1	Rast transformiranih listnih izsečkov na gojiščih z rastlinsko selekcijo in brez	33
4.2.2	Histokemični ne-destruktivni GUS test	34
4.2.3	Uspešnost nadaljnje rasti poganjkov po ne-destruktivnem testiranju	36
4.3	ANALIZA PRISOTNOSTI gus^{Eco} , gus^{Ssp} in $hptII$ GENA V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH S PCR METODO	37
4.3.1	Analiza prisotnosti gus^{Ssp} in $hptII$ gena v regenerantih, transformiranimi s plazmidoma pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2	38
4.3.2	Analiza prisotnosti gus^{Eco} in $hptII$ gena v regenerantih, transformiranimi s plazmidom pCAMBIA1301	39
4.4	KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1	RAZPRAVA	41
5.1.1	Primerjava gus^{Eco} gena iz plazmida pCAMBIA1301 in gus^{Ssp} gena (GUSPlus TM) iz plazmida pCAMBIA1305.1 za uporabo pri preverjanju uspešnosti transformacij z destruktivnim histokemičnim GUS testom	41
5.1.2	Gus^{Ssp} gen (GUSPlus TM) iz plazmida pCAMBIA1305.2 za uporabo preverjanja uspešnosti transformacij z ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom	45
5.2	SKLEPI	52
6	POVZETEK	56
7	VIRI	58
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Največ uporabljeni testni geni za transformacije rastlin in še nekaj ostalih testnih genov (povzeto po Chawla, 2009; Barampuram in Zhang, 2011; Shaner in sod., 2004)	13
Preglednica 2: Uporabljeni plazmidi z vključenimi geni za bakterijsko in rastlinsko selekcijo (Cambia, 2011)	21
Preglednica 3: Nomenklatura pCAMBIA plazmidov (1301, 1305.1 in 1305.2) (Cambia, 2011)	22
Preglednica 4: Število transformiranih izsečkov na posamezen plazmid	26
Preglednica 5: DNA sekvene parov začetnih oligonukleotidov za namnoževanje transgenov gus^{Eco} , gus^{Ssp} in $hptII$ ter pričakovane dolžine namnoženih fragmentov	29
Preglednica 6: Odstotek modro obarvanih regenerantov tobaka po destruktivnem histokemičnem GUS testu	31
Preglednica 7: Odstotek modro obarvanih regenerantov tobaka po ne-destruktivnem histokemičnem GUS testu	35
Preglednica 8: Odstotek preživelih poganjkov tobaka glede na predhodno rast izsečkov na gojišču z rastlinsko selekcijo ali brez selekcije in glede na obarvanost/neobarvanost pri ne-destruktivnem GUS testu	36
Preglednica 9: Poganjki tobaka, ki smo jih testirali z destruktivnim in ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom ter vgradnjo gus^{Eco} oz. gus^{Ssp} in $hptII$ genov v genom preverili s PCR metodo	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Površine s transgenimi rastlinami po svetu v milijonih ha (prirejeno po James, 2010)	5
Slika 2: Genska transformacija rastlinske celice z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , glavnih korakov (prirejeno po Tzfira in Citovsky, 2006)	10 7
Slika 3: A-integrirani vektorski sistem in B-trans vektorski sistem umetnega Ti plazmidnega vektorja (prirejeno po Lee in Gelvin, 2008)	
Slika 4: 3D struktura encima β -glukuronidaze iz <i>E. coli</i> (Wallace in sod., 2010)	15
Slika 5: Umetno sestavljen <i>guA</i> ^{Ssp} gen iz štirih fragmentov (Nguyen, 2002)	18
Slika 6: Prerez korenine riža pod fluorescenčnim mikroskopom. Po fiksiranju transformiranega tkiva v formladehidu je bil celicam dodan substrat ELF-97-glcA, ki ga GUS encim pretvori v netopno fluorescenčno barvilo. Signal <i>gus</i> ^{Ssp} je lokaliziran v celičnih stenah. Celične stene so zato obarvane zeleno (Nguyen, 2002)	19
Slika 7: Plazmid pCAMBIA1301 (Cambia, 2011)	23
Slika 8: T-DNA plazmida pCAMBIA1301 (Cambia, 2011)	23
Slika 9: Plazmid pCAMBIA1305.1 (Cambia, 2011)	24
Slika 10: T-DNA plazmida pCAMBIA1305.1 (Cambia, 2011)	25
Slika 11: Plazmid pCAMBIA1305.2 (Cambia, 2011)	25
Slika 12: T-DNA plazmida pCAMBIA1305.2 (Cambia, 2011)	26
Slika 13: Regeneracija poganjkov po 7 tednih: A - po transformaciji listnih izsečkov tobaka s plazmidom pCAMBIA1301 in B - po transformaciji listnih izsečkov tobaka s plazmidom pCAMBIA1305.1	31
Slika 14 : Fenotipsko testiranje <i>gus</i> ^{Eco} gena iz plazmida pCAMBIA1301	32
Slika 15 : Fenotipsko testiranje <i>gus</i> ^{Ssp} gena iz plazmida pCAMBIA1305.1	32
Slika 16: Primerjava obarvanosti koščkov listov tobaka po destruktivnem GUS testiranju: A – C obarvanje transformiranih listov tobaka po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1301; D – E obarvanje transformiranih listov tobaka po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1305.1	33
Slika 17: Razlike v rasti poganjkov po 6,5 tednih: A - rast na gojišču brez selekcije in B - rast na gojišču z rastlinsko selekcijo (25 mg/L higromicina)	34
Slika 18: Razlike v rasti poganjkov po 14,5 tednih: A - rast na gojišču brez selekcije in B - rast na gojišču z rastlinsko selekcijo (25 mg/L higromicina)	34
Slika 19: Obarvanje transformiranih poganjkov iz listnih izsečkov tobaka po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1305.2 pri ne-destruktivnem histokemičnem testu	35
Slika 20: Preverjanje uspešnosti rasti poganjkov tobaka po histokemičnem ne-destruktivnem GUS testiranju: A – inokulacija GUS pozitivnih (modrih)	

poganjkov v steklene kozarce s pokrovčki; B – razrasel poganjek tobaka po 5 tednih od inokulacije 36

Slika 21: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za *gus^{Ssp}* (163 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za *hptII* gen (641 bp) za preverjanje uspešnosti transformacije s plazmidoma pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2 (GUSPlus™ markerksi sistem): A namnoženi DNA fragmenti iz regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1305.2, ki smo jih testirali z ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom (2 – 11 GUSPlus™ pozitivni/obarvani, 12 – 25 GUSPlus™ negativni/neobarvani; neobarvani poganjki 21, 22, 23, 24 in 25 so rasli na gojišču brez rastlinske selekcije), 1 in 26 velikostni standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); B namnoženi DNA fragmenti iz regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1305.1, ki smo jih testirali z destruktivnim histokemičnim GUS testom (27 – 36 GUSPlus™ pozitivni/obarvani, 37 – 46 GUSPlus™ negativni/neobarvani); 47 plazmid pCAMBIA1305.1; 48 plazmid pCAMBIA1305.2, 49 kontrola – netransformiran tobak; 50 slepi vzorec; 1 in 26 velikostni standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) 38

Slika 22: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za *gus^{Eco}* (408 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za *hptII* gen (641 bp) za preverjanje uspešnosti transformacije s plazmidom pCAMBIA1301: 2 - 9 namnoženi DNA fragmenti iz GUS pozitivnih/obarvanih regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1301, ki smo jih testirali z destruktivnim histokemičnim testom; 10 – 19 namnoženi DNA fragmenti iz GUS negativnih/neobarvanih regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1301, ki smo jih testirali z destruktivnim histokemičnim testom; 20 plazmid pCAMBIA1301; 21 kontrola – netransformiran tobak; 22 slepi vzorec; 1 in 23 velikostni standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) 39

Slika 23: Kontrolni poskus z neokuženimi listnimi izsečki tobaka na T2 gojišču: A – brez selekcije po 5,5 tednih; B – na selekciji s 25 mg/L higromicina po 7 tednih 41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAC	gentamicin acetiltransferaza
<i>A. r</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	bazni par (angl. base pair)
DEAE	polimer dietil amino etil
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvojno vijačana DNA (angl. double-stranded DNA)
ER	endoplazmatski retikulum
GFP	zeleno fluorescentni protein (angl. Green Fluorescent Protein)
GRP	z glicinom bogat protein (angl. Glycine Rich Protein)
GS	gensko spremenjen
GSR	gensko spremenjene rastline
GUS	β -glukuronidaza
<i>gus</i> ^{Eco}	gen <i>gusA</i> iz bakterije <i>Escherichia coli</i>
<i>gus</i> ^{Ssp}	gen <i>gusA</i> iz bakterije <i>Staphylococcus</i> sp.
HPT	higromicin fosfotransferaza
LUC	luciferaza
MCS	multiplo mesto za kloniranje (angl. Multiple Cloning Site)
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
MUG	4-methyl umbelliferyl glucuronide (angl.)
NPT	neomicin fosfotransferaza
PCR	polimerazna verižna reakcija (angl. Polymerase Chain Reaction)
pNPG	p-nitrofenil- β -D-glukuronid
RNA	ribonukleinska kislina
ssDNA	enojno vijačna DNA (angl. single-stranded DNA)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tris borat-EDTA
TE	tris EDTA
Ti-plazmid	(»tumor inducing«) – plazmid iz <i>A. t.</i> , ki povzroča novotvorbe
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
UV	ultravijolična svetloba
X-glcA	5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronid

1 UVOD

Markerskim genom pravimo tudi testni geni. To so geni, ki kodirajo lahko določljive substance, ki v rastlini niso prisotne. Markerske ali teste gene se uporablja pri genski transformaciji rastlin, saj omogočajo identifikacijo transformiranih celic. Celicam ne zagotavljajo selekcijske prednosti (kot jo selekcijski geni), ampak lahko na podlagi njihovega izražanja ločimo transformiran material od netransformiranega (Miki in McHugh, 2003). Tuj gen, ki ga želimo vnesti pri genski transformaciji, je opremljen poleg selekcijskega tudi z markerskim genom. Če lahko zaznamo aktivnost markerskega gena, lahko domnevamo, da je bil vključen tudi želeni gen. Najbolj pogosto uporabljeni markerski proteini so β -glukuronidaza (GUS) iz *Escherichie coli*, liciferaza (LUC) iz kresnice *Photinus pyralis* in zeleno fluorescentni protein (GFP) iz meduze *Aequorea victoria*. V rastlinah doslej najbolj uporabljen markerski sistem je *gus* markerski gen.

Gensko spreminjaanje kmetijskih rastlin za posamezno ali večje število agronomsko pomembnih lastnosti je ena izmed ključnih tehnologij za izboljšanje količine in kakovosti pridelka (Meyers in sod., 2010). Genske transformacije rastlin so pomembno eksperimentalno orodje za raziskovanje različnih procesov v rastlinah, ki jih proučujejo rastlinska fiziologija, genetika, razvojna, celična in molekularna biologija (Bhat in Srinivasan, 2002). Z agronomskega vidika imajo genske transformacije kmetijskih rastlin velik pomen predvsem zaradi dejstva, da so ena izmed metod žlahtnjenja rastlin, s katero je mogoče v relativno kratkem času doseči izboljšanje točno določene lastnosti. Klasično žlahtnjenje je dolg proces, ki lahko traja tudi 10 let in več. Z genskimi transformacijami pa dobimo rezultat v krajšem času, ker omogočajo relativno hitro introdukcijo samo želenih lastnosti v že obstoječe kultivarje kmetijskih rastlin, saj lahko vnašamo samo posamezen gen za določeno lastnost, torej žlahtnimo »nadzorovano« in ciljno. Še ena velika prednost omenjene metode je tudi prenos genov med različnimi organizmi brez filogenetskih omejitev. Na ta način lahko v rastline vnesemo lastnosti, kot so odpornost na biotski in abiotični stres, povečana proizvodnja boljših ali novih substanc s farmacevtsko in industrijsko vrednostjo, izboljšana hrnilna vrednost, ipd.

1.1 NAMEN NALOGE

Med sabo smo želeli primerjati tri različne markerske *gus* gene za encim β -glukuronidazo, in sicer dva za destruktivno in enega za ne-destruktivno histokemično testiranje v tobaku. Vnos genov je potekal z *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*). Namenski naloge je bil:

- primerjati učinkovitost in zanesljivost destruktivnega in ne-destruktivnega histokemičnega testa pri detekciji transgenov
- ugotoviti zanesljivost vizualnega določanja uspešnosti transformacije pri destruktivnem in ne-destruktivnem histokemičnem testu

- ugotoviti, ali lahko na podlagi pozitivnega rezultata pri ne-destruktivnem testu potrdimo uspešnost transformacije
- ugotoviti, ali uporaba novega gusa gena omogoča, da transformirani regeneranti uspešno rastejo tudi na gojišču brez rastlinske selekcije
- preizkusiti ne-destruktivnost testa z regeneracijo transformantov
- ugotoviti razlike med dvema različnima genoma za GUS encim v uporabnosti in zanesljivosti pri destruktivni detekciji transformantov
- s PCR analizo potrditi transformante in netransformante

2 PREGLED OBJAV

2.1 TOBAK

Tobak (*Nicotiana tabacum* L.) je tetraploid z velikostjo genoma $3,7 \times 10^9$ baznih parov (bp). Spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*) in je samoprašna enoletna zelnata rastlina (Henry, 1997). Raste v subtropskih podnebjih. Glavna učinkovina je alkaloid nikotin, ki nastaja v korenina in se nato transportira v liste. Nikotin je tudi učinkovit insekticid, zato se ga uporablja kot bioinsekticid.

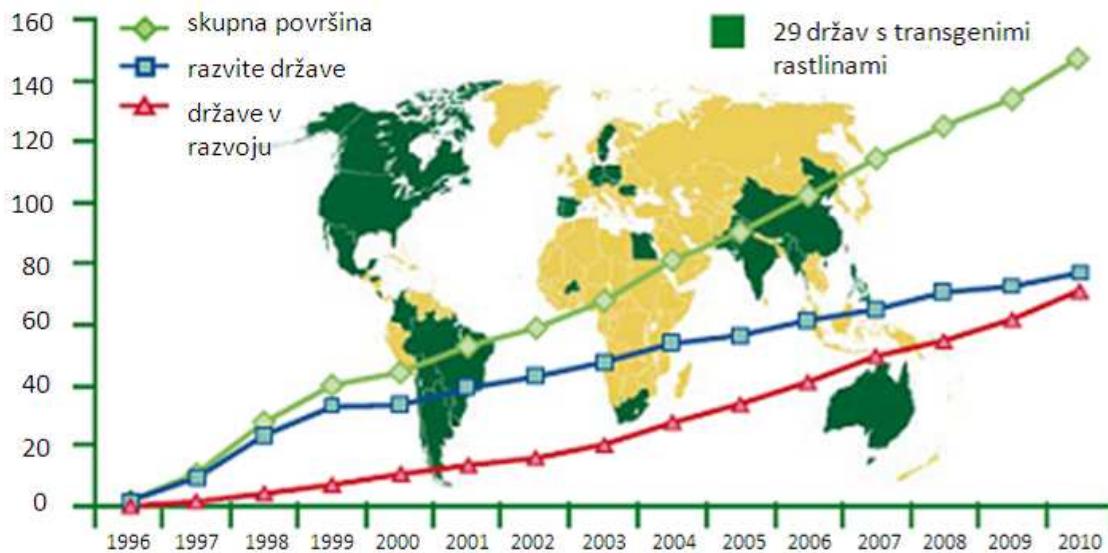
Tobak je bil prva uspešno transformirana rastlina. Leta 1983 je bil v tobak vnesen gen za odpornost na antibiotik kanamicin (Horsch in sod., 1984). Prvi eksperimentalni poljski poskusi z gensko spremenjenimi organizmi so bili izvedeni leta 1986 v Franciji in ZDA na tobaku, ki je bil odporen na glifosat. Prav tako je bil tobak med prvimi gensko spremenjenimi rastlinami z dovoljenjem za komercialno pridelavo leta 1994 (Javornik, 2004). Trenutno ima dovoljenje za tržno pridelavo tobak s toleranco na herbicida bromoksinil in ioksinil v Evropski uniji in tobak z zmanjšano vsebnostjo nikotina v Združenih državah Amerike (CERA, 2011). Tobak je dovzet na transformacije, enostavno ga je transformirati, cena pridelovanja velikega volumna biomase na hektar na leto ni velika. Poleg tega se ga ne uporablja za prehrano ljudi niti za krmo, zato velja za najbolj primerne rastline za masovno proizvodnjo aktivnih učinkovin za farmacevtsko industrijo (Fischer in sod., 2004). Tobak se uporablja največ kot testna rastlina pri različnih študijah transformacije. Hitro raste v tkivni kulturi, regeneracija iz listnih izsečkov je hitra in uspešna. Najbolj primerna metoda pri transformaciji tobaka je transformacija listnih diskov. Transformacija protoplastov je manj primerna zaradi težavne regeneracije (Chawla, 2009).

2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE

Z razvojem tehnologije so se odprle možnosti za genske transformacije rastlin, te pa so omogočile nove pristope k žlahtnjenju rastlin in uspešnemu iskanju rešitev hitrejšega napredka v dolgotrajnih procesih žlahtnjenja. Možnost regeneracije novega organizma iz ene same celice ali delčka rastlinskega tkiva ter razvitje tehnik za prenos genov v rastlinske celice so omogočili uporabo genskega inženiringa v praksi za spremnjanje lastnosti najpomembnejših svetovnih kmetijskih rastlin (Rao in sod., 2009). Prva genska transformacija pri rastlinah je bila izvedena leta 1983, ko je uspel vnos bakterijskega gena za odpornost na antibiotik v tobak (Horsch in sod., 1984) s posredno metodo transformacije, ki temelji na naravnem sistemu vnosa genov v rastlinski genom s talno fitopatogeno bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*. Kot modelna rastlina pri razvoju tehnologij transformacije se je v zadnjih desetletjih največ uporabljal tobak (*Nicotiana tabacum* L.), na katerem so proučevali tudi številčnost in stabilnost vgradnje transgenov. K

temu je največ pripomoglo dejstvo, da je bil tobak prva rastlinska vrsta, ki so jo gojili *in vitro* in na podlagi katere sta Murashige in Skoog leta 1962 oblikovala standardne pogoje za gojenje tkivnih kultur. Vrste, katere so bile največ vključene v genske transformacije v letih od 1973 do 1988, so paradižnik, petunija, krompir in koruza. V letih 1989 do 1993 se je vrstni red nekoliko spremenil, in sicer je bila na prvem mestu po številu raziskav koruza, nato riž, pšenica in soja. V obdobju od 1999 do 2003 pa prednjači riž, sledijo mu pšenica, modelna rastlina navadni repnjakovec in ječmen. V zadnjem obdobju se poskuša tehnologije genske transformacije čim bolj optimizirati na rižu, pšenici, ječmenu in bombažu z namenom komercialnega pridobivanja novih gensko spremenjenih (GS) rastlin (Rao in sod., 2009).

Prvi eksperimentalni poljski poskusi z GS rastlinami (GSR) so bili izvedeni leta 1986, in sicer dva v Franciji in trije v ZDA s preizkušanjem odpornosti transgenega tobaka na glifosat. Po letu 1995 je preizkušanje GSR skokovito naraslo in število lokacij je samo v letih 1995-97 znašalo 10 000, poskusi pa so se izvajali že v 45 državah. V poljske poskuse je bilo vključenih več kot 70 različnih rastlinskih vrst, največ koruze, krompirja, oljne ogrščice, soje in paradižnika. Sledijo bombaž, tobak, sladkorna pesa in riž. Leta 1994 so bila izdana prva dovoljenja za komercialno pridelovanje FlavrSavrTM paradižnika (upočasnjeno mehčanje), Roundup-ReadyTM soje (toleranca na glifosat), bombaža (toleranca na oksinil), oljne ogrščice (sprememba olja) v ZDA in tobak (toleranca na oksinil) v EU (Javornik, 2004). Leta 1996 se je začela komercialna pridelava transgenih poljščin, in sicer v 6 državah. Tega leta je bilo na svetu s transgenimi poljščinami posajenih 1,7 milijona ha površina, leta 2010 pa že 148 milijonov ha, kar pomeni 87-kratno povečanje površin. Pridelovanje transgenih poljščin je tako postala najhitreje sprejeta tehnologija pridelovanja poljščin v zgodovini sodobnega kmetijstva. Leta 2010 so transgene poljščine pridelovali v 29 državah po svetu, deset največjih držav je preseglo vsaka 1 milijon površin. Največje pridelovalke GSR so ZDA (66,8 mio ha, kar predstavlja 45 % vseh svetovnih površin GSR), sledijo Brazilija (25,4 mio ha = 17 %), Argentina (22,9 mio ha = 15,5 %), Indija (9,4 mio ha = 6 %), Kanada (8,8 mio ha = 5,9 %), Kitajska (3,5 mio ha = 2,4 %), Paragvaj (2,6 mio ha = 1,8 %), Pakistan (2,4 mio ha = 1,6 %), Južna Afrika (2,2 mi ha = 1,5 %) in Urugvaj (1,1 mio ha = 0,7 %). GS soja, tolerantna na herbicid, je najbolj razširjena GS kmetijska rastlina v tržni pridelavi (50 % površin) (James, 2010). Na herbicid tolerantna transgena soja je v ZDA leta 2005 obsegala 87 % vseh površin, posejanih s sojo (Fernandez-Cornejo in Caswell, 2006). Na drugem mestu po razširjenosti GS rastlin v tržni pridelavi je koruza (31 %), sledita bombaž (14 %) in oljna ogrščica (5 %). Najbolj razširjena GS lastnost v tržni pridelavi v letu 2010 je bila toleranca na herbicide (61 % površin), nato združene dve ali tri odpornosti v eni rastlini (22 %) ter odpornost na žuželke (17 %). V Evropi je najbolj razširjena GS Bt koruza z odpornostjo na koruzno veščo, katere največja pridelovalka je Španija (James, 2010).



Slika 1: Površine s transgenimi rastlinami po svetu v milijonih ha (prijejeno po James, 2010)

Vnos genov v rastline ali transformacija lahko poteka posredno ali neposredno. Posredni vnos poteka s pomočjo bakterij (*Agrobacterium tumefaciens* in *Agrobacterium rhizogenes*) in virusov (kaulimovirusi, geminivirusi, RNA virusi). Metod neposrednega vnosa pa je več: fizikalne metode (elektroporacija, biolistika, makro in mikro vbrizgavanje DNA, prenos DNA z liposomi, prenos DNA z silikonskimi karbidnimi vlakni, ultrazvok, prenos DNA s pelodom) - uporablja se, kjer po naravni poti ni mogoče doseči prenosa DNA v gostiteljske celice; kemične metode (prenos DNA v prisotnosti polietilen glikola ali poli L-ornitina, nastanek DNA oborine s kalcijevim fosfatom, polikation DMSO tehnika, postopek z DEAE dekstranom) - gre za destabilizacijo membrane in povečanje njene prepustnosti (Chawla, 2009).

2.2.1 Posredni vnos genov z *Agrobacterium tumefaciens*

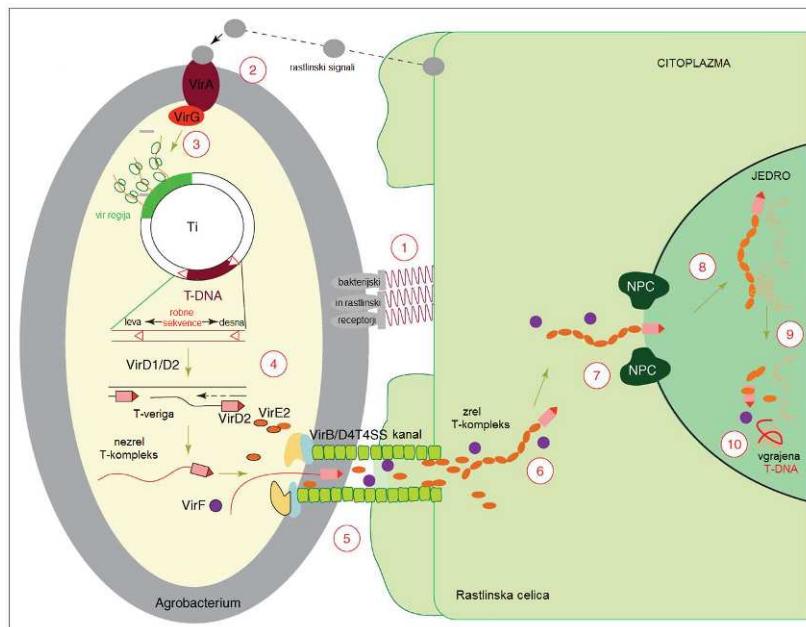
Posredni način pri transformacijah rastlinskih tkiv omogoča fitopatogena bakterija *Agrobacterium tumefaciens* in njeni sorodniki, kot je *Agrobacterium rhizogenes* (*A. r.*). *A. t.* v naravi vdre v rastline na ranjenem mestu in na njih izzove nastanek neke vrste tumorjev. Ta njena lastnost je dedovana na večjem plazmidu, imenovanem Ti plazmid. Bakterija vključi del plazmidne DNA ob pomoči več beljakovin, ki jih tudi kodira isti plazmid v rastlinske celice, kjer pride do vgraditve v genom. Ne vnese se gola DNA, ampak nekoliko zavarovana z beljakovinami, ki tudi olajšajo prehod citoplazme in prehod v jedro. Za namene genske transformacije je bil naravni plazmid povsem modificiran, tako da so ostale ohranjene le tiste regije, ki omogočajo replikacijo in vnos tarčne DNA. Na mesto, kjer so bili prej kodirani bakteriji koristni geni, pa vstavimo želen genski konstrukt (Bohanec, 2004).

Talna fitopatogena bakterija *A. t.* je bila intenzivno preučevana od leta 1907 naprej, ko sta jo, takrat pod imenom *Bacterium tumefaciens*, Smith in Townsend definirala kot povzročiteljico rakaste tvorbe – »crown gall« bolezen. Sorodna bakterija *A. r.* pa povzroča rak v obliki koreninskih laskov (Chawla, 2009). Proti koncu 70. let prejšnjega stoletja so se začele pojavljati ideje, da bi *A. t.* uporabljali kot vektor za pridobivanje transgenih rastlin. Danes je mogoče veliko agronomsko in hortikultурno pomembnih rastlin rutinsko transformirati z uporabo *A. t.* (Gelvin, 2003). Dvokaličnice so bolj dovetne za transformacijo z *A. t.* od enokaličnic. Naravni sev *A. t.* je bil spremenjen, tako da uspešno okužuje tudi enokaličnice (Hiei in sod., 1994). *A. t* poleg svojega kromosoma vsebuje še t. i. Ti (tumor-inducing) plazmid (dolžine približno 200 kbp), ki vsebuje gene za tvorbo rakastih celic (*onc* geni), gene za virulenco (*vir* geni) ter gene za sintezo in razgradnjo opinov. Bakterija povzroči nastanek rakastega tkiva na način, da v gostitelja prenese del lastne DNA s Ti plazmidom, ki se vgradi v genom gostitelja. Del bakterijske DNA, ki se vgradi v gostiteljski genom, se imenuje T-DNA (dolžine okoli 25 kbp) in v naravnem bakterijskem plazmidu vsebuje gene za tvorbo rakastih celic (*onc* geni, ki kodirajo zapise za encime, sposobne sinteze rastlinskih hormonov avksinov in citokinov, zaradi katerih prihaja v poškodovanem in okuženem rastlinskem tkivu do povečane intenzivnosti celičnih delitev in nekontrolirane rasti tkiva - nastanek tumorja) in gene za sintezo opinov, katerih ekspresija v rastlinskih celicah vodi do produkcije opinov. To so derivati aminokislin in sladkorja ali pa fosforilirani sladkorni derivati, ki jih uporablja bakterija kot vir dušika, ogljika in energije (Tzfira in Citovsky, 2006).

2.2.1.1 Mehanizem prenosa T-DNA v rastlinsko celico

Braun in Stonier sta leta 1958 dokazala, da ni potrebna prisotnost žive bakterije za nastanek tumorja. Bakterija namreč ne prodre v tiste rastlinske celice, ki se spremeni v tumorske, ampak preide v intercelularni prostor ali v ranjene celice, nato pa se pritrdi na celično steno zdravih celic.

Ti plazmid je odgovoren za nastanek tumorja v rastlini, saj se delček plazmida prenese in funkcionalno vstavi v rastlinske kromosome. Chilton in sodelavci so leta 1977 ugotovili, da se v rastlino prenese in vstavi zelo majhen del plazmida, ki mu pravimo T-DNA (transferred DNA, transforming DNA). Elementi, ki so nujno potrebi za prenos T-DNA v rastlino, so: T-DNA, kromosomalni geni in virulentni geni (Chawla, 2009).



Slika 2: Genska transformacija rastlinske celice z *Agrobacterium tumefaciens*, 10 glavnih korakov (prirejeno po Tzfira in Citovsky, 2006)

2.2.1.1.1 T-DNA

Gre za 10 do 30 kbp dolgo regijo na Ti plazmidu, kar običajno predstavlja manj kot 10 % velikosti Ti plazmida. V naravni T-DNA se nahajajo *onc* geni in geni za sintezo opinov. Pomemben element T-DNA so tudi mejne sekvene. To so 25 bp dolge sekvene na levi in desni strani T-DNA, ki imajo visoko ohranjena homologna zaporedja. Imenujemo jih leve in desne robne sekvene. Vsebujejo specifična mesta za endonukleazno cepitev enojne verige, ki se na ta način sprosti iz Ti plazmida, znotraj robnih sekven na plazmidu pa se sintetizira nova veriga. Izločena T-DNA se akumulira v bakterijski celici, pred razgradnjo z nukleazami pa je najverjetneje zaščitenega z *virE2* proteini (Gelvin, 2003; Zupan in sod., 2000). Za prenos T-DNA v rastlinsko celico geni iz T-DNA regije niso potrebni. Bistvenega pomena za vgradnjo T-DNA v genom gostiteljske rastlinske celice so robne sekvene. V bistvu se kakršna koli DNA zaporedja, ki se nahajajo znotraj robnih sekven, lahko vgradijo v rastlinski genom, in to dejstvo omogoča uporabo *A. t.* kot vektorja za vnos želenih genov v rastline pri procesu genske transformacije za pridobitev transgenih rastlin (Chawla, 2003).

2.2.1.1.2 Kromosomalni geni

Kromosomalni geni se nahajajo na kromosomu bakterije in se imenujejo *chv* geni. Produkti *chvA* in *chvB* genov kodirajo zapise za eksopolisaharide, ki sodelujejo pri pritrjevanju bakterijske celice na rastlinsko. Geni iz teh dveh lokusov se izražajo konstitutivno in niso regulirani s posameznimi faktorji. *ChvE* geni kodirajo glukozno/galaktozni transporter, ki je pomemben pri vezavi specifičnih sladkorjev, ki so koaktivatorji *vir* genov. Drugi kromosomalni geni (*chvD*, *ilv*, *miaA*, *att*) so manj pomembni za virulenco *A. t.*, v nekaterih primerih njihova vloga še ni jasna (Chawla, 2009).

2.2.1.1.3 Virulentni geni

Sistem genov, ki so vključeni v fizični prenos T-DNA iz bakterije v rastlinsko celico, imenujemo virulentni ali *vir* geni in se nahajajo na Ti plazmidu, toda zunaj regije T-DNA. Orientirani so *cis* glede na T-DNA. Okoli 35 *vir* genov se nahaja v 7 operonih, ki jih označujemo z *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* in *virG* (Hellens in sod., 2000). Večina operonov vsebuje več genov, torej so policistronični (Chawla, 2009). VirA protein zazna specifične signalne molekule (kot sta acetosiringon in hidroksiacetosiringon), ki jih oddaja poškodovano rastlinsko tkivo, se z njimi poveže in tako aktivira. Ta kompleks fosforilira VirG protein v bakterijski citoplazmi, ki pa aktivirata *vir* regijo oz. ostale *vir* gene na Ti plazmidu (slika 2). Kompleks VirD1/D2 sproži prepisovanje T-DNA, ki se prepše v enojno T-DNA, ki je mobilna kopija plazmidne T-DNA in ji pravimo »nezrel T-kompleks«. Na »nezrel T-kompleks« se veže protein VirD2 in še nekaj drugih Vir proteinov, ki se preko bakterijskega pilusa, ki se mora povezati z vsaj enim specifičnim gostiteljskim proteinom na površini rastlinske celice, skupaj prenesejo v citoplazmo gostiteljske celice. Ob prehodu v gostiteljsko citoplazmo »nezrel T-kompleks« postane »zrel T-kompleks«. V gostiteljski citoplazmi je »zrela« T-DNA veriga v celoti obdana s številnim VirE2 proteini, ki ji zagotavljajo pravilno obliko in jo ščitijo pri prehodu skozi citoplazmo. Mogoče je, da *Agrobacterium* uporablja citoskelet rastlinske celice kot vodilo, po katerem »zrela« T-DNA potuje skozi subcelularni prostor do jedra. Za prenos T-DNA v jedro je potreben aktivni transport, sodelujeta pa tudi VirD2 in VirE2 proteini.

2.2.1.1.4 Vključitev T-DNA v genom rastlinske celice

Pri celotnem procesu transformacije ima rastlinska/gostiteljska celica največ vpliva ravno na vključitev T-DNA v rastlinski genom. Ko T-DNA preide jedrno membrano, se poveže z rastlinskim jedrnim proteinom VIP1 (VirE2-interacting protein) in še z nekaterimi drugimi jedrnimi proteini, ki nato T-DNA vodijo na mesto integracije v rastlinski kromatin. Protein VIP1 ima sposobnost, da se poveže s histoni na rastlinskem kromatinu in na ta način privede T-DNA do mesta vključitve. Prav tako *Agrobacterium* izkorišča rastlinski proteolizni sistem, da se odcepijo proteini, ki so T-DNA obdajali na poti do mesta

vključitve. Rastlinski jedrni proteini pa niso pomembni samo pri potovanju T-DNA do mesta vključitve, ampak imajo verjetno ključno vlogo tudi pri vgradnji v kromatin. Molekulo T-DNA, ki pride v jedro kot enojna veriga (ssDNA), spremenijo v dvojno vijačno (dsDNA) verigo. Rastlinska celica te dsDNA prepozna kot odlomljene fragmente DNA in jih v svoj genom vključi v procesu rekombinacije, in sicer pogosteje v tista območja rastlinske DNA, ki se intenzivno prepisujejo (Tzfira in Citovsky, 2006). Rekombinacija je nehomologna (Mayers in sod., 2010).

2.2.1.2 Zgradba Ti plazmidnega vektorja za prenos genov v rastlinske celice

Ti plazmid v naravni *A. t.* je velika krožna DNA molekula, velika do 200 kbp z molekulsko težo $1,2 \times 10^8$, kar predstavlja 3 do 8 % bakterijskega kromosoma. Na naravnem Ti plazmidu se nahajajo naslednje regije: *vir* regija, ori mesto, *onc* regija ter regija za sintezo in razgradnjo opinov. V bakterijski celici je plazmid neodvisna genetska enota, ki se podvaja samostojno. V bistvu je Ti plazmid naravni vektor za gensko spremiščanje rastlin, saj lahko svojo T-DNA prenese iz bakterije in vgradi v rastlinski genom. Vseeno pa naravni Ti plazmid ni primeren kot genski vektor, ker zaradi onkogenov povzroča nenadzorovan in neorganizirano rast gostiteljskih rastlinskih celic, obenem pa onkogeni zavirajo regeneracijo novih rastlin iz okuženih rastlinskih tkiv (Chawla, 2009). Zato so za namene uporabe Ti plazmida kot vektorja za vnos želenih genov v rastlino izdelani različni sistemi umetno pripravljenega Ti plazmidnega vektorja. Skupno vsem sistemom je, da so iz naravne T-DNA odstranjeni *onc* geni in geni za sintezo opinov, zato takšen plazmid ne povzroča nenadzorovane rasti gostiteljskih celic. T-DNA pa obdrži sposobnost vključevanja v rastlinski genom, saj v plazmidu ostanejo mejne sekvene, med katere pa lahko vnesemo želene gene. Takemu plazmidu pravimo tudi razorožen plazmid, ker ne more inducirati rakaste tvorbe (Zambryski in sod., 1983).

Znani sta dve osnovni oblici vektorjev:

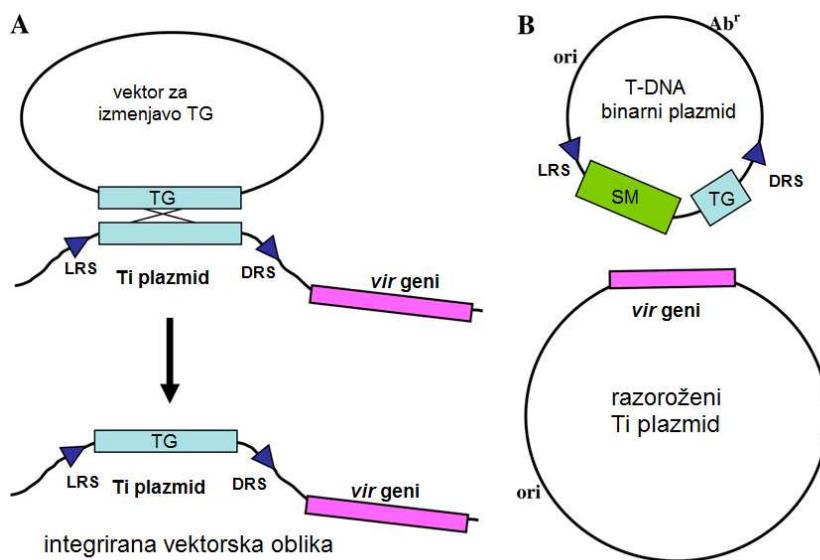
- integrirana oz. *cis* vektorska oblika: T-DNA, ki jo želimo vnesti v rastlino, in *vir* regija sta na istem plazmidu;
- binarna oblika: sistem dveh plazmidov, izmed katerih je prvi večji in mu pravimo razoroženi Ti plazmid (vsebuje *vir* regijo), drugi pa je manjši in se imenuje binarni plazmid (vsebuje T-DNA z želenimi geni) (Hellens, 2000). Na tem plazmidu se nahajata dve replikacijski mesti za namnoževanje plazmida v *A. t.* in *E. coli*.

Več kot dve desetletji znanstveniki že uporabljajo *A. t.* za gensko transformacijo rastlin (Lee in Gelvin, 2008). Težavo pri izolaciji in spremiščanju integrirane vektorske oblike plazmida predstavlja predvsem njegova velikost (okoli 100 kbp) in malo število prisotnih kopij. Ne moremo jih namnoževati v *E. coli*, ki je najboljši gostitelj za genske manipulacije (Mayers in sod., 2010). Zelo pomembno je bilo odkritje, da se lahko T-DNA in *vir* regije nahajajo ločeno, to je trans, na dveh plazmidih brez izgube prenosa T-DNA v rastlinsko

celico. To sta leta 1983 odkrili dve skupini, in sicer Hoekema s sod. in de Framond s sod. Odkrili so, da se lahko *vir* regija in T-DNA nahajata na dveh ločenih plazmidih. Dokler se oba plazmida nahajata znotraj iste celice *A. t.*, lahko *vir* proteini izvedejo prenos in integracijo T-DNA v gostiteljski genom. T-DNA se nahaja na binarnem plazmidu, ki vsebuje še ori mesto (deluje v *E. coli* in v *A. t.*) in selekcijske gene za antibiotik, s katerimi preverimo vključenost binarnega plazmida v celicah *A. t.*. Razoroženi Ti plazmid pa vsebuje *vir* gene (Lee in Gelvin, 2008). Binarni plazmid se lahko razmnožuje v *E. coli* in v *A. t.* (Bevan, 1984). Tako lahko z njim laže manipuliramo, saj gre za manjši plazmid, ki ga nato vstavimo v *A. t.*, ki že vsebuje razoroženi Ti plazmid.

Prednosti uporabe binarnega sistema pred *cis* vektorskim sistemom so:

- vstavljanje želenih genov ne poteka *in vivo* v *A. t.*;
- za uspešno transformacijo z binarnim vektorjem moramo zagotoviti le, da pride binarni plazmid nepoškodovan v tarčno bakterijsko celico, kar nato omogoča učinkovito in hitro bakterijsko transformacijo;
- manipulacije binarnega plazmida niso zahtevne;
- binarni plazmid je številčno neodvisen od Ti plazmida (Chawla, 2009).



LRS-leva robna sekvenca; DRS-desna robna sekvenca; TG-tarčni geni; SM-selekcijski marker

Slika 3: A-integrirani vektorski sistem in B-trans vektorski sistem umetnega Ti plazmidnega vektorja (prirejeno po Lee in Gelvin, 2008)

Želeni geni, ki jih vstavimo v T-DNA, sami po sebi niso dovolj. Nujno za njihovo izražanje je vstavljanje določenih promotorjev na 5' od zapisa za posamezni gen. Promotorji so specifična zaporedja baz, ki uravnava prepis DNA v mRNA. Določajo

kdaj, kje in v kakšnem obsegu bo prišlo do prepisa določenega gena in s tem nastanka proteina. V grobem jih delimo na konstitutivne in inducibilne. Prvi regulirajo gene, ki se izražajo neprekinjeno (npr. »house keeping« geni). Geni, regulirani z inducibilnimi promotorji, pa se izrazijo le v določenem tkivu ali ob določeni fazi razvoja ali ob določenem dražljaju. Promotorji omogočajo, da se lahko bakterijski geni, opremljeni z rastlinskim promotorjem, izrazijo v rastlinah. Največkrat uporabljen konstitutivni promotor pri rastlinskih transformacijah je bil izoliran iz virusa kumaričnega mozaika in ga imenujemo CaMV-35S (Bohanec, 2004). Ob uporabi ustreznega promotorja lahko v rastlino vnesemo kateri koli gen in katerega koli organizma, saj ga bodo na ta način rastlinski transkripcijski proteini prepoznali in protein se bo izražal.

2.2.2 Seleksijski geni

Ločevanje transformiranih celic od netransformiranih je ključen korak pri uspešni uporabi metod genske transformacije. To omogočajo seleksijski geni, ki se vgradijo v rastlinski genom skupaj z želenimi geni. Seleksijski geni omogočajo selektivno prednost in rast transformiranemu tkivu (Chawla, 2009). Selekcija je lahko pozitivna ali negativna in je lahko pogojena z dodatkom substrata ali ne. Pozitivni seleksijski geni delujejo na način, da spodbujajo rast transformiranega tkiva, ki ima metabolno prednost pred netransformiranim, zaradi česar to propade. Negativni seleksijski geni vodijo v uničenje transformiranih celic oz. tkiva (Miki in McHugh, 2004). Bakterijski gen za encim neomicin fosfotransferazo II (NPT II) je najpogosteje uporabljen seleksijski marker. Encim kodira gen *nptII* iz transpozona Tn5 in inaktivira številne aminoglikozidne antibiotike, kot so kanamicin, neomicin, geneticin in paromicin. Kanamicin je najpogosteje uporabljen antibiotik za rastlinsko selekcijo. Rastline so nanj občutljive in propadejo, če ga vključimo v gojišče. Z vnosom gena *nptII* v rastline pa postanejo nanj rezistentne. Uporabljajo se še drugi seleksijski geni: *hpt* gen iz *E. coli* za encim higromycin fosfotransferazo za odpornost na antibiotik higromycin; trije geni (AAC (3)-I, AAC (3)-III in AAC (3)-IV) kodirajo encim gentamicin acetyltransferazo AAC (3) za odpornost na antibiotik gentamicin; gena *spt* in *aad A* kodirata encima za odpornost na antibiotika streptomycin in spektinomycin. Posebnost slednjega seleksijskega sistema je, da omogoča barvno razlikovanje med transformiranimi in netransformiranimi celicami. Za seleksijske gene se uporabljajo tudi geni za odpornost na herbicide, kot so *bar* oz. *pat* gen za encim fosfinotricin acetyltransferazo iz *Streptomyces hygroscopicus* oz. *S. viridochromogenes* za toleranco na herbicid fosfinotricin; *EPSP* oz. *aroA* gen kodira encim 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintazo, ki inaktivira herbicid glifosat. Isti gen se uporablja tudi pri pridobivanju na glifosat tolerantnih GS rastlin, namenjenih za komercialno uporabo; *als* gen kodira encim acetolaktat sintazo, ki deluje kljub prisotnosti aktivnih snovi sulfonilurea in imidazolinon; *bxn* gen inaktivira herbicid bromoksinil, ki v rastlini inhibira fotosistem II (Chawla, 2009). Novejši seleksijski markerji omogočajo selekcijo z dodatkom netoksičnih metabolnih analogov ali brez njih (npr. *xylA* – gen za ksilozno izomerato iz *Streptomyces rubiginosus*,

manA gen za fosfomanozno izomerazo iz *E. coli*, *BADH* –špinačni gen za betain aldehid dehidrogenazo, *ipt* – gen za izopentil izomerazo iz *Agrobacterium tumefaciens* in *Arabidopsis thaliana*) (Miki in McHugh, 2004).

2.2.3 Markerski ali testni geni

Spremljanje in ugotavljanje uspešnosti rastlinske transformacije omogočajo markerski ali testni geni, ki se vnesejo v rastlinski genom skupaj s tarčnimi geni. Omogočajo preverjanje uspešnosti vnosa in izražanja transgenov tako pri prehodni kot tudi stabilni transformaciji. Kodirajo proteine, ki navadno v rastlini niso prisotni in nam na ta način povedo, ali je bila vgradnjha želenega gena v rastlinski genom uspešna oz. ali je vgrajen želeni gen aktivien in ali se izraža v celi ali le v določenem delu rastline. Testni geni vplivajo na fenotip transformiranih celic, in sicer vidimo barvno spremembo od dodatku substrata ali pa markerski protein ob osvetljevanju z UV svetlobo emitira določeno fluorescenco. Genski produkt markerskih genov je torej možno vizualno prepoznati. Če zaznamo aktivnost markerskega gena, lahko predvidevamo, da je bil vključen tudi želen gen. Zaželjene lastnosti testnih genov so: visoka občutljivost testa; detekcija aktivnosti testnega encima že pri nizki koncentraciji; ni znakov endogene aktivnosti markerskega proteina v rastlini; možnost kvantitativne določitve izražanja proteina; ne-destruktivni test za preverjanje izražanja; enostavnost izvajanja in nizka cena testov preverjanja (Chawla, 2009).

Markerski proteini, ki potrebujejo dodatek substrata, so največ v uporabi. Vsem je skupno to, da določen substrat razgradijo, pri čemer pride do barvne spremembe, ki jo lahko opazimo. Markerski proteini, ki potrebujejo dodatek substrata, so: *gus* gen za encim β -glukuronidazo iz *E. coli*, *cat* gen za kloramfenikol acetil transferazo iz kloramfenikol odpornih bakterij, ki se uporablja tudi kot seleksijski gen (Jefferson in sod., 1987), *lacZ* gen iz *E. coli* za encim β -galaktozidazo (Tanaka in Matsui, 1991), encim oksalatna oksidaza iz pšenice (Wang, 2006). Druga skupina markerskih proteinov so fluorescentni proteini, katere kodirajo geni iz morskih nevretenčarjev. Za ugotavljanje njihove prisotnosti/delovanja v določenem tkivu ne potrebujemo dodajati eksogenih substratov. Detektiramo jih lahko v živih intaktnih tkivih, celicah ali celičnih organelih, ne da bi jih uničili, z osvetljevanjem tkiva s svetlobo določene valovne dolžine, signal pa je emitirana fluorescensa v določeni barvi. Sistemi fluorescentnih markerskih proteinov so manj razviti kot sistemi, kjer dodajamo substrat, zato so zaenkrat tudi manj v uporabi. Kljub temu se pogosto uporablja zeleno fluorescentni protein iz meduze *Aequorea victoria* (Prasher in sod., 1992). V zadnjih letih so kot možne nove markerske sisteme odkrili in preizkusili več različnih proteinov iz morskih koral in anemon iz razreda Anthozoa: HcRed iz *Heteractis crispa* (Gurskaya in sod., 2001), AsRed iz *Anemonia sulcata* (Lukyanov in sod., 2000), AmCyan iz *Amnemonia majano*, ZsGreen in ZsYellow iz *Zoanthus* sp. in DsRed iz *Discosoma* sp. (Stewart, 2006).

Preglednica 1: Največ uporabljeni testni geni za transformacije rastlin in še nekaj ostalih testnih genov (povzeto po Chawla, 2009; Barampuram in Zhang, 2011; Shaner in sod., 2004)

Testni gen	Encim	Substrat	Vir gena	Identifikacija
<i>gus</i>	β -glukuronidaza	glukuronidi (npr. X-glcA, MUG, pNPG)	<i>Echerichia coli</i>	fluorescenca, kolorimetrično, histokemično
<i>ocs</i>	oktopin sintaza	arginin+piruvat+NADH	<i>A. t.</i>	elektroforeza, kromatografija
<i>nos</i>	nopalin sintaza	arginin+ketoglutarat+NADH	<i>A. t.</i>	elektroforeza, kromatografija
<i>cat</i>	kloramfenikol acetiltransferaza	^{14}C klormafenikol + acetil CoA	kloramfenikol odporne bakterije	avtoradiografija
<i>luc</i>	luciferaza	ATP + O ₂ + luciferin	<i>Photinus pyralis</i>	bioluminiscenca
antocianinski regulatorni gen	antocianski regulatorji	ni potreben	<i>Zea mays</i>	vizualno
oksalat oksidazni gen	oksalat oksidaza	oksalna kislina + 4-kloro-1-naftol	<i>Triticum aestivum</i>	histokemično
<i>gfp</i>	zeleno fluorescentni protein	ni potreben; uporaba UV svetlobe	<i>Aequorea victoria</i>	detekcija fluorescence
<i>DsRed</i>	DsRed	ni potreben; uporaba UV svetlobe	<i>Discosoma</i> sp.	detekcija fluorescence

2.2.3.1 GUS markerski sistem

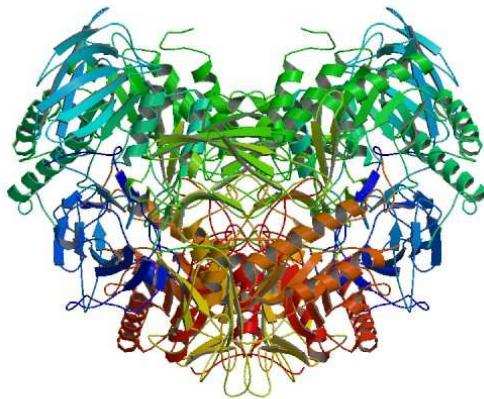
Markerski sistem, ki je v rastlinah doslej najbolj uporabljen, je *gus* markerski gen. Jefferson in sod. so leta 1986 gen izolirali iz *E. coli* iz seva K12 in uporabili kot markerski gen pri transformaciji tobaka. *Gus* gen se nahaja na GUS operonu na bakterijskem kromosomu. *Gus* operon je s štirimi geni, ki kodirajo represor, glukuronidazo, permeazo in purinu podoben protein, odgovoren za hidrolizo glukuronidov. *Gus* gen kodira zapis za encim β -glukuronidazo, ki se je v transgenem tobaku izražal v visokih količinah, kar pa ne vpliva na rast, razmnoževanje in zdravstveno stanje rastline. Ugotovili so, da rastlinske celice ne kažejo endogene aktivnosti GUS encima, zato je njegovo aktivnost mogoče dokazati histokemično z modrimobarvanjem, kvantitativno pa jo lahko merimo fluorometrično. Prednosti GUS markerskega sistema so: GUS encim je zelo stabilen pod različnimi fiziološkimi pogoji in ne potrebuje kofaktorjev; v različnih neugodnih pogojih testiranja (temperatura, pH) ohranja aktivnost; GUS encim specifično katalizira veliko število substratov, aktivnost encima pa je mogoče enostavno in natančno zmeriti s spektrofotometričnimi ali fluorometričnimi metodami; substrati in produkti ne inhibirajo

delovanja encima; aktivnost GUS encima lahko detektiramo *in situ* s histokemičnim testom; na N-terminalnem in C-terminalnem koncu lahko poteče fuzija z drugimi proteini, zaradi česar pa ne izgubi encimske aktivnosti. Glavna slabost GUS proteina je destruktivnost GUS testa. Celice/tkiva, ki jih opazujemo, je potrebno uničiti. Encim je lokaliziran v citosolu, zato je potrebno destabilizirati celično membrano, da pride encim v stik s substratom (Jefferson in sod., 1987).

Gus markerski gen je modificiran *uidA* (*gusA*) gen iz *E. coli*, ki kodira encim β -glukuronidazo. Vendar pa se *gus* gen nahaja še v drugih bakterijskih vrstah, npr. v vrstah *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Alcaligenes*, enterobakteriji *Shigella*, idr. Osnovna naloga encima v bakterijah je, da jim zagotavlja vir ogljika in energije. Aktivnost encima lahko zaznamo tudi pri vretenčarjih. Npr. pri človeku je zapis za *gus* gen na 7. kromosому (Francke, 1976), aktivnost pa lahko zaznamo med drugim v materinem mleku. Osnovna naloga encima pri vretenčarjih je razstrupljanje organizma. Encim se nahaja tudi v nevretenčarjih (mehkužci, nečlenarji, žuželke). Aminokislinska (AK) zaporedja GUS encima so med vrstami visoko ohranjena, npr. človeško in podganje AK zaporedje za GUS encim je v 47 % enako AK sekvenci za GUS encim iz *E. coli* (Jefferson in sod., 1986).

Encim β -glukuronidaza je eksohidrolaza, ki katalizira hidrolizo širokega razpona β -galakturonidov in β -glukuronidov, ki razpadajo na D-glukoronsko kislino in aglikon. β -glukuronidi so komercialno dostopni v obliki spektrofotometričnih, fluorometričnih in histokemičnih substratov. Za svoje delovanje encim ne potrebuje kofaktorjev in deluje v širokem pH območju, med 5'0 in 7'5. K encimu je pripet ostanek 9 cisteinov. Encim je odporen na delovanje tripsina in kimotripsina, ki sta serinski proteazi in se nahajata v prebavnem traktu gostiteljev (vretenčarji) *E. coli*, kjer pa druge prebavne tekočine encim razgradijo prej kot v 15 sekundah. β -glukuronidaza je občutljiva na delovanje (glivne) proteinaze K. Encim je termostabilen, razpolovni čas pri 55 °C je okoli 2 uri, pri 60 °C pa 15 min (Jefferson, 1993).

Aktivnost GUS proteina, ki se v aktivni obliki sestavi v homotetramerno obliko (vsak monomer ima molekulsko maso 68 kDa), lahko detektiramo s histokemičnim kromogenim (barvnim) testom s 5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronidom (X-glcA), ki je substrat za encim. β -glukuronidaza hidrolizira X-glcA v brezbarven indoksil derivat, ki se z oksidativno dimerizacijo preoblikuje v moder precipitat, zato je rezultat testa modri precipitat oz. modroobarvanje transformiranega tkiva (Jefferson in sod., 1987).



Slika 4: 3D struktura encima β -glukuronidaze iz *E. coli* (Wallace in sod., 2010)

Endogena aktivnost GUS encima v rastlinah obstaja, toda je zelo nizka. Kljub temu pa so raziskovalci občasno dobili lažno pozitivne rezultate. Endogeno aktivnost GUS encima kažejo mladi razvijajoči se primarni listi rji, kjer visoko specifična β -glukuronidaza sodeluje pri matabolizmu flavonoidov. Pri nekaterih drugih rastlinskih vrstah so endogeno aktivnost encima zaznali v moških gametofitih, pelodu, embriih, v plodovih in semenih. V nekaterih primerih je bil razlog lažno pozitivnih rezultatov v endofitskih mikroorganizmih, ki so izražali β -glukuronidazo. Endogene aktivnosti GUS encima pa ne kažejo nižje rastline (alge, mahovi, praproti) in glice. Endogeno aktivnost GUS encima v rastlini, ki lahko povzroča motnje v detekciji signala transgenega markerskega encima, lahko odpravimo z enostavnimi ukrepi, kot je povečanje vrednosti pH, dodatek metanola v GUS reakcijski pufer ali inkubacija tkiva na povišani temperaturi (Thomasset in sod., 1996).

Na kakšne način se GUS encim izraža v transgenih rastlinah, je odvisno od vrste promotorja. Če je gen pod nadzorom konstitutivnega promotorja, se izraža po celi rastlini. Količina encima v posamezni celici pa je odvisna od aktivnosti promotorja. Inducibilni promotor potrebuje nek signal, da aktivira transkripcijo genov. Signal lahko prestavljam elicitorji (Corrado in Karali, 2009). Ker je encim relativno stabilen, se v celici akumulira, in sicer v citoplazmi. Na encimu ne prihaja do post-translacijskih modifikacij. Transgenu je dodana signalna peptidna sekvenca, zato se lahko encim prenaša preko membrane v endoplazmatski retikulum (ER), kjer se N-glikolizira (Philip in sod., 1998), kar pa zmanjša njegovo aktivnost (Iturriaga in sod., 1989). Ta problem sta Farrell in Beachy (1990) rešila tako, da sta mesto glikozilacije spremenila z mestno specifično mutagenezo, kar se je izkazalo še posebej koristno pri usmerjanju proteinov (Gilissen in sod., 1998).

Gus gen izvira iz prokariontske bakterije *E. coli* in se ga kot markerski gen uporablja pri transformacijah z *A. t.*, ki je tudi prokariont. To pomeni, da bi lahko *A. t.* sama izražala *gus* encim, saj vsebuje encimske mehanizme za izražanje prokariontskih genov, torej tudi *gus* gena. To bi lahko predstavljal težavo pri testiranju uspešnosti transformacije, ker bi lahko pozitiven rezultat izviral iz aktivnosti *gus* gena iz ostankov *A. t.* in ne iz transformiranih celic rastline. Zato je *gus* gen iz *E. coli* opremljen z rastlinskim intronom, ki omogoča izražanje encima v rastlinah, obenem pa onemogoča *A. t.* izdelovanje encima. Gre za prvi intron iz gena za ricinusovo katalazo (*ric-1*). Mehanizem transkripcije in translacije je v evkariontih nekoliko drugačen od mehanizmov v prokariontih. Pri evkariontih pravilno odstranjevanje intronov omogoča, da je zrela mRNA funkcionalna, obenem pa poveča nivo ekspresije proteina. Prisotnost introna v *gus* genu močno vpliva na izražanje GUS proteina v enokaličnicah, saj se izmerjena aktivnost GUS encima poveča za nekaj 10-krat (do 90-krat v tkivih transgenega riža), medtem ko je prisotnost introna v *gus* genu za dvokaličnice manjšega pomena, saj se je izmerjena aktivnost GUS encima v tkivih transgenega tobaka povečala le za 2,2-krat (Tanaka in sod., 1990).

Gus gen se uporablja v komercialne namene za pridobivanje GS poljščin. Dovoljenje za komercialno pridelavo imajo sladkorna pesa, papaja, soja, bombaž in slive z *gus* markerskim genom (CERA, 2011). *Gus* gen nima nobene agronomiske vrednosti za gensko spremenjene (GS) poljščine, saj se pri transformacijah rastlin uporablja le kot markerski gen. Vendar pa ima lahko sproščanje transgenih rastlin v okolje negativne ekološke in toksikološke posledice, zato je pred komercialno uporabo GS rastlin potrebno preučiti njihove vplive na okolje (Stewart Jr. in sod., 2000). GUS encim se pojavlja v številnih organizmih (bakterije, vretenčarji, nevretenčarji). *Gus* gen, ki se kot markerski gen uporablja pri transformacijah rastlin, izvira iz enterobakterije *E. coli*, ki je razširjena bakterija v prebavilih vretenčarjev, nahaja pa se tudi v zemlji in v vodnih ekosistemih. Kakršno koli dodajanje GUS aktivnosti k tem okoljem z razširjanjem GS rastlin bi imelo zelo malo ali nič vpliva, saj je GUS encim preko bakterij že prisoten in aktiven. Da bi GS rastline imele zaradi vključenosti *gus* gena seleksijsko prednost pred ne GS rastlinami, ni verjetno. Prav tako ni pričakovati, da bi se GS poljščine z *gus* genom razširile kot plevel oz. da bi divji sorodniki v naravi, ki bi preko medvrstnega križanja sprejeli *gus* gen, zaradi tega dobili lastnostni plevela. Zaradi velike razširjenosti *E. coli* in s tem GUS encima v prebavilih potrošnikov ni verjetno, da bi dodatne količine GUS encima iz GS rastlin v krmi in hrani povzročale dodatne težave. Zato lahko GS rastline, transformirane z *gus* testnim genom, in njihove produkte obravnavamo kot varne za okolje in potrošnika (Gilissen in sod., 1998).

2.2.3.2 GUSPlusTM markerski sistem

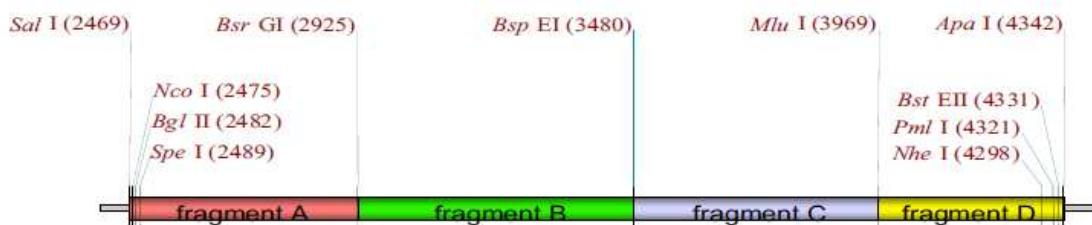
GUSPlusTM je markerski sistem, ki ga je razvila družba Cambia iz Brisbanea, Avstralija. Cambia je neodvisna, mednarodna neprofitna organizacija, ki se zavzema za zmanjševanje nivoja patentiranosti inovacij in s tem za večjo dostopnost novih tehnologij in orodij za večje splošno dobro. GUSPlusTM je komercialno ime za *gus* gen iz talnih bakterij *Staphylococcus* sp., ki ga označujejo kot *gus*^{ssp}. Družba Cambia je leta 2000 s patentom pri Svetovni organizaciji za intelektualno lastnino (WIPO) zaščitila in tudi omogočila uporabo do tedaj še neuporabljenega *gus* gena iz *Staphylococcus* sp., ki naj bi služil kot nov markerski sistem (Jefferson in Mayer, 2000).

Gus gen iz *E. coli* (*gus*^{Eco}) velja za popoln markerski sistem s to pomanjkljivostjo, da omogoča le destruktivni histokemični test za ugotavljanje uspešnosti transformacije. Za rešitev tega problema obstajata dve poti, in sicer ali bi dostavili substrat v citosol celice, kjer se nahaja encim, ali pa bi spremenili *gus* gen tako, da bi se encim izločal v medcelični prostor, kjer se nahaja tudi substrat. Bilo je nekaj poskusov, ko so skušali spremeniti *gus*^{Eco} gen tako, da bi se izločal izven celice. Znano je namreč, da imajo proteini, ki se izločajo iz celice, priset signalni peptid na N-koncu proteina, ki je signal za celični mehanizem, da usmeri protein v ER, ki je prva postaja na poti sekrecije proteina. Raziskovalci so uporabili rastlinski signalni peptid in encim se je transportiral v ER, kjer pa encim ni bil aktiven, saj je bil na N-koncu glikoliziran. Ko so mesta za glikolizacijo mutirali, je encim postal aktiven, vendar se ni izločal iz celice. Alternativa h genskemu sprememjanju *gus*^{Eco} gena je izolacija in uporaba povsem novega *gus* gena iz neke druge bakterije. Na inštitutu Cambia, kjer že več let med drugim intenzivno preučujejo delovanje GUS markerskega sistema in iščejo nove rešitve, so izolirali mnogo *gus* genov iz številnih mikroorganizmov in gliv. Izkazalo se je, da je imel najboljše lastnosti encim, kodiran z *gus* genom iz talnih bakterij *Staphylococcus* sp., ki so ga poimenovali GUSPlusTM. Preizkusi GUSPlus encima so pokazali naslednje prednosti pred GUS encimom iz *E. coli*:

- večja občutljivost na substrat, kar vodi do hitrejšega pojava barve pri reakciji encima s substratom X-glcA;
- encim bolj stabilen pri visokih temperaturah;
- večja toleranca na kemikalije, ki se uporabljajo pri testu;
- izločanje encima iz celice v apoplast, če ima gen priset sekvenco za signalni peptid, kar omogoča ne-destruktivni histokemični test za detekcijo uspešnosti transformacije. Na ta način rastlinskega tkiva ni potrebno uničiti oz. ga lahko nadalje uporabimo.

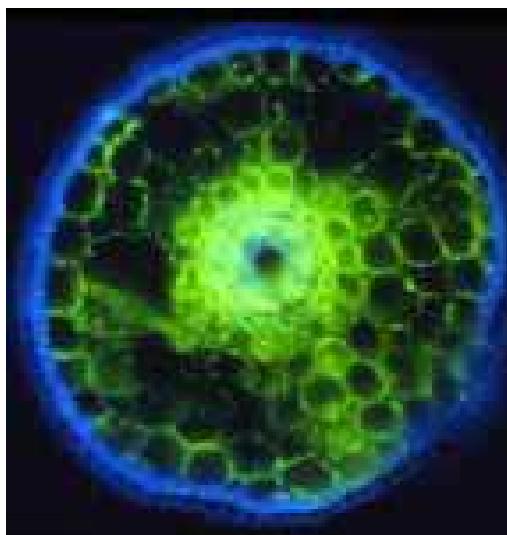
Nov encim je približno v 47 % enak GUS encimu iz *E. coli*. Priset ima le en cisteinski ostanek in ne 9, kot jih ima GUS iz *E. coli*, kar omogoča izločanje proteina iz celice. Naravni gen novega encima vsebuje veliko AT (adenin, timin) ponovitev, kar omejuje ekspresijo v heterolognih sistemih. Zato so oblikovali umetno verzijo gena, in sicer so gen

močno spremenili z optimizacijo kodonov, tako da se lahko izraža v rastlinah. S programi GCG Wisconsin Package so gen optimizirali za ekspresijo v *E. coli* in rastlinah. Vsebnost AT ponovitev so iz 65,8 % zmanjšali na 44,9 %. V MCS mestu so odstranili poliadenilacijski signal (AATAA) in restriktijska mesta. Še z nekaterimi drugimi spremembami so zmanjšali možnost za nastanek sekundarnih struktur. Gen, ki je velik 1875 bp in vsebuje 302 kodona, so sestavili iz štirih fragmentov, velikih okoli 500 bp. Vsak fragment pa je sestavljal 10 do 15 oligonukleotidov dolžine 80 bp (slika 4). Blizu 5' konca gena so vstavili intron iz ricinusove katalaze, ki preprečuje izražanje GUSPlus encima v bakterijah, a omogoča ekspresijo encima v rastlinah. Na ta način je mogoče brez dvomov povezati glukuronidazno aktivnost z uspelo transformacijo v rastlini. V nekaterih primerih vključenost introna povečuje nivo ekspresije proteina, verjetno s stabilizacijo mRNA (Nguyen, 2002).



Slika 5: Umetno sestavljen *gus^{ssp}* gen iz štirih fragmentov (Nguyen, 2002)

Prav lastnost, da se lahko encim izloča izven celice in zato destruktiven test ni več potreben, je pomenila velik napredok pri razvoju GUS markerskega sistema. Ideja o ne-destruktivnem testu je nastala zaradi dejstva, da nizke koncentracije substrata X-glcA rastlinskih celic ne poškodujejo in lahko uspevajo tudi ob prisotnosti končnega produkta GUS ecimske reakcije (indigo). Gotovo je največja prednost GUSPlus™ markerskega sistema v ne-destruktivnosti testa. Izločanje encima iz celice so dosegli tako, da so zaporedju gena umetno dodali sekvenco, ki kodira zapis za signalni peptid z visokim deležem glicina (GRP). Signalni peptid usmerja izločanje encima iz celice v periplazmo oz. v apoplast, kjer je encim aktiven. Tako tkiva ni potrebno uničiti, da bi pri testu zagotovili reakcijo med substratom in encimom. Testiramo lahko *in vivo*, tkiva pa lahko rastejo kljub obarvanju naprej. Če pa zaporedju gena GRP sekvenca za izločanje proteina iz celice ni dodana, moramo za detekcijo GUS aktivnosti narediti histokemični destruktivni test. Kljub temu, da moramo opraviti destruktivni test, pa lastnosti *gus^{ssp}* gena zagotavljajo prednosti uporabe GUSPlus™ markerskega sistema pred GUS markerskim sistemom iz *E. coli*.



Slika 6: Prerez korenine riža pod fluorescenčnim mikroskopom. Po fiksiranju transformiranega tkiva v formladehidu je bil celicam dodan substrat ELF-97-glcA, ki ga GUS encim pretvori v netopno fluorescenčno barvilo. Signal *gus*^{Ssp} je lokaliziran v celičnih stenah. Celične stene so zato obarvane zeleno (Nguyen, 2002)

GUSPlus™ markerski sistem so za potrebe svojih študij uporabili tudi že nakteri raziskovalci. Chen in sod. (2006) so pri razvoju protokola za uporabo transformacije krilate trdoleske (*Euonymus alatus*) z *Agrobacterium* uporabili GUSPlus™ gen kot markerski gen. Uporabili so *gus*^{Ssp} gen iz plazmida pCAMBIA1305.1 brez GRP peptida. Izvorni plazmid so nekoliko modificirali in uporabili pri transformaciji krilate trdoleske. Beltran in sod. (2010) so GUSPlus™ gen uporabili za testni gen pri transformaciji kasave. Z destruktivnim histokemičnim GUS testom so testirali različna rastlinska tkiva iz kasave, izrazito modro obarvanje pa so določili v založnih koreninah in vaskularnem tkivu. Vickers in sod. (2003) so z markerskim genom, ki kodira sintetično ksilanazo, kvantitativno določali ekspresijsko moč različnih promotorjev v endospermu pšenice. Kot interno kontrolo so uporabili GUSPlus™ markerski gen, za katerega navajajo, da se je izkazal za zelo občutljivega za nizke koncentracije substrata, zato so ga lahko uporabili pri preizkušanju ekspresijske moči šibkih promotorjev. V raziskovalne namene pa so že uporabili tudi GUSPlus™ markerski gen, ki ima pripet GRP protein in se izloča izven celice. Chen in sod. (2010) so poskušali izboljšati metodo posredne transformacije enokaličnic z *A. t.* Transformacije so izvajali na 3 dni starih kalčkih trajnega prosa (*Panicum virgatum*). Gre za travo, ki se jo že od leta 1991 uporablja za biogoriva. Uporabili so 4 različne seve *A. t.*, kot markerski gen pa GUSPlus™. V raziskavi so s kvantitativnim fluorometričnim testom naredili tudi primerjavo med *gus*^{Ssp} genom, ki ima pripeto sekvenco za GRP signalni peptid in se izloča v apoplast in *gus*^{Ssp} genom, ki sekvence za signalni peptida ne vsebuje. Izmerjena aktivnost *gus*^{Ssp} gena z GRP sekvenco je bila večja od *gus*^{Ssp} gena brez GRP sekvenco.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SESTAVA RASTLINSKIH IN BAKTERIJSKIH GOJIŠČ

T1 gojišče za rast in mikropromulgacijo rastlin tobaka:

MS bazalno gojišče: makro- in mikroelementi, brez vitaminov	4,302 g/l
Tiamin	2 mg/l
Piridoksin	1 mg/l
Nikotinska kislina	1 mg/l
Saharoza	30 g/l
Agar	8 g/l
pH 5,8	

T2 gojišče za adventivno regeneracijo rastlin tobaka:

MS bazalno gojišče: makro- in mikroelementi, brez vitaminov	4,302 g/l
Fe-Na ₂ -EDTA	0,1 mg/l
Mio-inozitol	0,1 mg/l
Tiamin	0,1 mg/l
Saharoza	30 g/l
Agar	8 g/l
NAA	0,1 mg/l
BAP	1,0 mg/l
Agar	8 g/l
pH 5,8	

YEB tekoče gojišče za namnoževanje *A.t.* LBA4404:

Saharoza	5 g/l
Pepton	5 g/l
Goveji ekstrakt	5 g/l
Kvasni ekstrakt	1 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g/l
pH 7,0	

½ MS tekoče gojišče za transformacijo:

½ MS bazalno gojišče: makro- in 2,151 g/l
mikroelementi, brez vitaminov
Saharoza 10 g/l
pH 7,0

3.2 RASTLINSKI MATERIAL

V poskusu smo uporabili liste tobaka (*Nicotiana tabacum* L.) kultivarja Havana 38. Iz listov smo za namene transformacije rezali približno 1 cm² velike izsečke, ki smo jih po transformaciji gojili na ustremnem gojišču. Pred rezanjem izsečkov iz listov smo vedno vršiček rastline tobaka odrezali in ga sterilno prestavili na T1 gojišče za rast in mikropropagacijo. Rastline so nato rasle v rastnih komorah pri 24 ± 1 °C pri fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme ter osvetlitvi 34 µE/m²s. Ti pogoji veljajo za vse poskuse gojene v rastnih komorah.

3.3 SEV BAKTERIJE IN TIPI PLAZMIDOV

Gene smo v tobak vnesli s posredno metodo transformacije z *A. t.* Izbrali smo komercialni sev LBA4404, ki ima na kromosому TiAch5 *rif* gen za odpornost na rifampicin in vsebuje razoroženi Ti plazmid pAL4404 za katabolizem oktopinov in z bakterijsko odpornostjo na spektinomicin in streptomycin (Hellens in sod., 2000). V izbrani sev so bili z elektroporacijo vneseni trije različni binarni komercialni plazmidi družbe Cambia iz Brisbanea, Avstralija, z oznakami pCAMBIA1301, pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2 (preglednica 2).

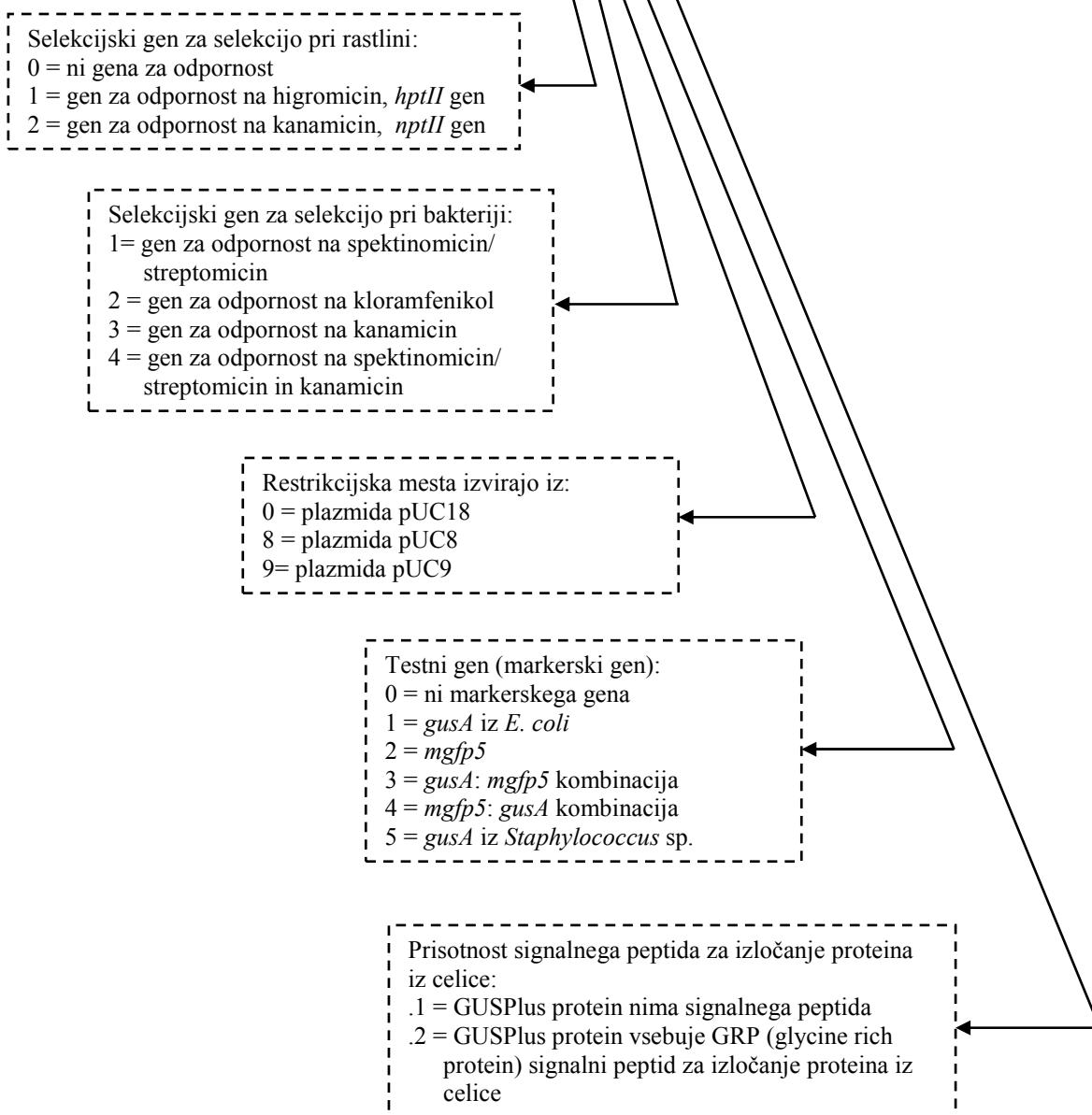
Preglednica 2: Uporabljeni plazmidi z vključenimi geni za bakterijsko in rastlinsko selekcijo (Cambia, 2011)

Oznaka plazmida	Bakt. selekcija	Gen	Rastl. selekcija	Gen	Velikost T-DNA (bp)	Velikost plazmida (bp)	Markerski gen
pCAMBIA1301	kanamicin	<i>nptII</i>	higromicin	<i>hptII</i>	5607	11849	<i>gus</i> ^{Eco}
pCAMBIA1305.1	kanamicin	<i>nptII</i>	higromicin	<i>hptII</i>	5592	11846	<i>gus</i> ^{Ssp}
pCAMBIA1305.2	kanamicin	<i>nptII</i>	higromicin	<i>hptII</i>	5667	11921	<i>gus</i> ^{Ssp}

Preglednica 3: Nomenklatura pCAMBIA plazmidov (1301, 1305.1 in 1305.2) (Cambia, 2011)

npr.

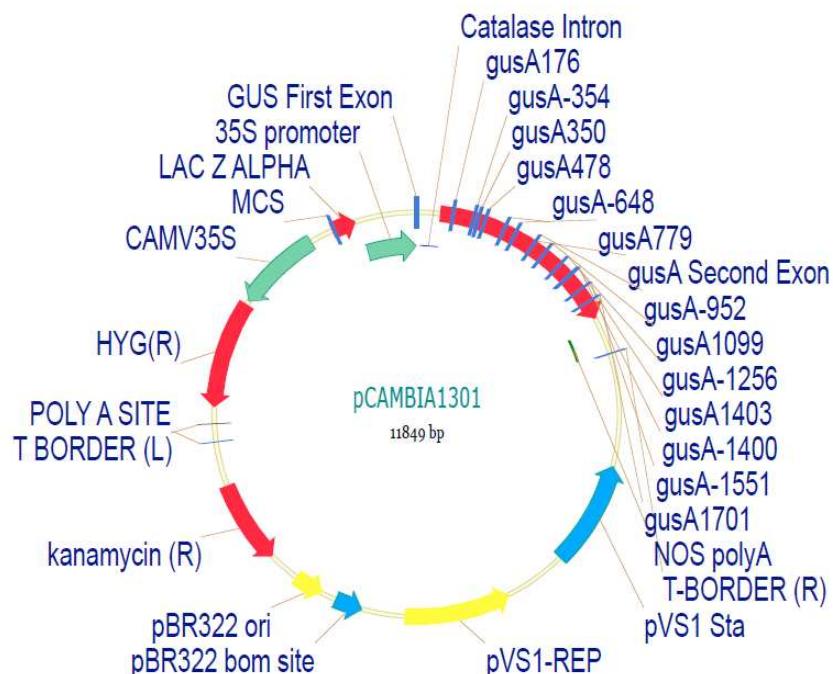
pCAMBIA1305.1



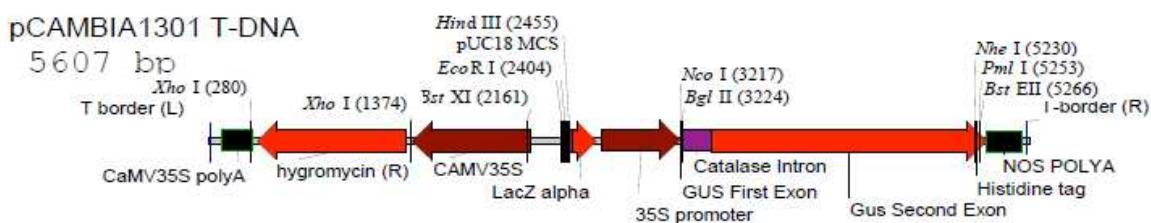
pCAMBIA1301 (slika 7)

T-DNA regija je dolga 5607 bp, celoten plazmid pa 11849 bp (preglednica 2). T-DNA vsebuje v celoti funkcionalni *gus* testni gen za enostavno in natančno analizo prisotnosti ali izražanja gena v regeneriranih rastlinah z GUS analizo. Gen *gus* izvira iz *E. coli* in vsebuje N358Q mutacijo, zaradi česar ne poteče N-glikozilacija in pride do vezave na signalni peptid. Gen ohrani popolno aktivnost v rastlinski celici. Gen vsebuje intron iz ricinusove katalaze, ki preprečuje ekspresijo encima v prokariontih, kot je *Agrobacterium*. Na ta način je zagotovljeno, da ves GUS encim prihaja iz

rastlinskih celic in ne iz ostankov *A. t.* Testni *gus* gen je mogoče iz T-DNA regije na plazmidu izrezati in ga nadomestit z želenimi geni, ali pa želene gene le dodati h *gus* genu. T-DNA vsebuje še *hptII* gen za odpornost na antibiotik higromicin za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv in pUC18 polilinker z lacZ α (slika 8). Polilinker je drug izraz za multiplno mesto kloniranja (MCS). Na plazmidu izven T-DNA regije se nahajajo selekcijski *nptII* gen za odpornost na antibiotik kanamicin za selekcijo transformiranih bakterij in restriktijska mesta za vključitev želenih genov z lastnimi promotorji in terminatorji regijami. Plazmid je stabilen v *Agrobacterium* tudi pri gojenju v neselektivnih pogojih zaradi prisotnosti *rep* (funkcija podvajanja plazmida) in *sta* (funkcija stabilnosti plazmida) regij iz plazmida pVS1 (Cambia, 2011).



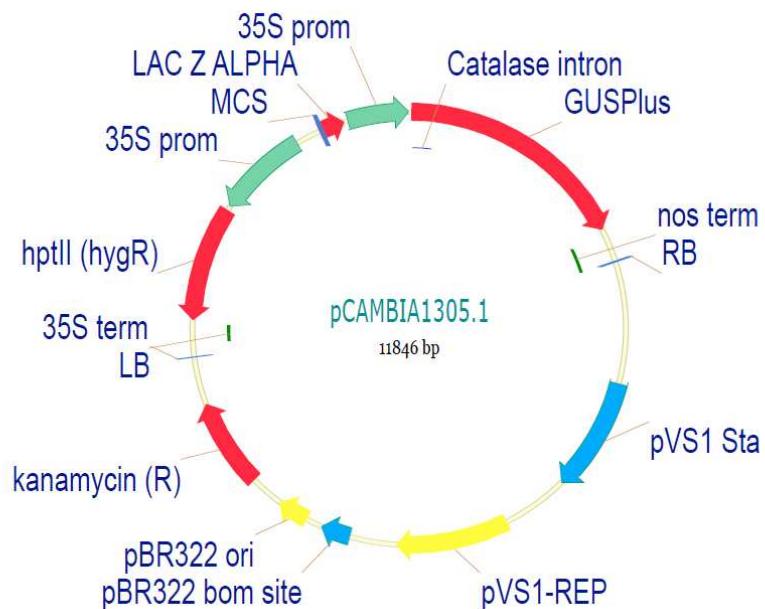
Slika 7: Plazmid pCAMBIA1301 (Cambia, 2011)



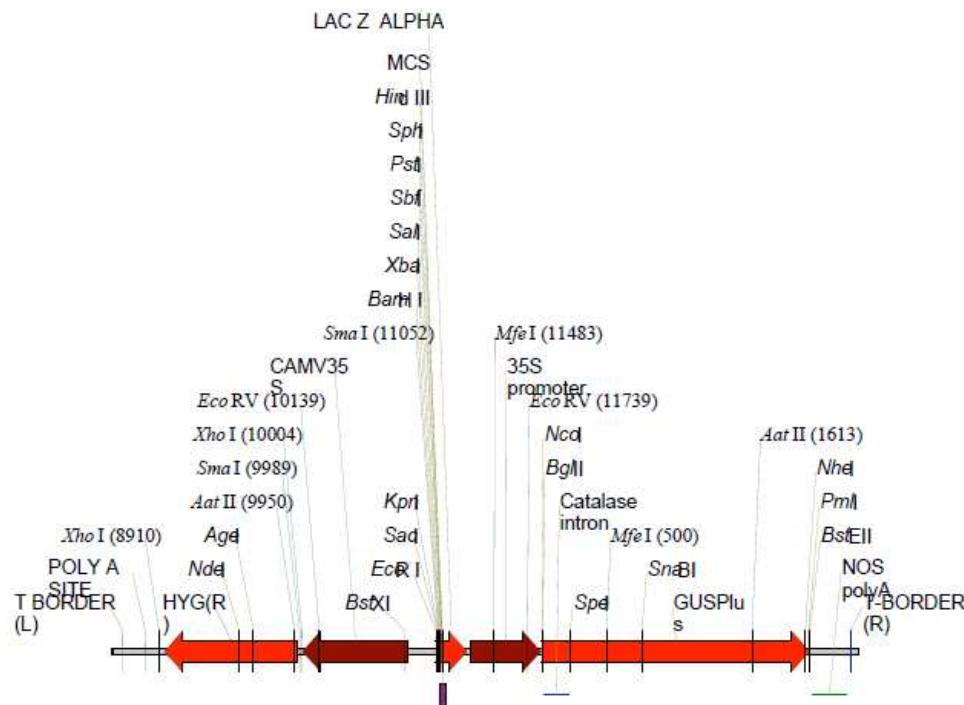
Slika 8: T-DNA plazmida pCAMBIA1301 (Cambia, 2011)

pCAMBIA1305.1 (slika 9)

T-DNA regija je dolga 5592bp, celoten plazmid pa 11846 bp (preglednica 2). Zgradba plazmida temelji na plazmidu pCAMBIA1301 s to razliko, da je gen guA^{Eco} zamenjan z genom gus^{Ssp} . Plazmid vsebuje pBR322 *ori* in pBR322 *bom* mesti za namnoževanje velikega števila kopij plazmida v *E. coli* in za prenos plazmida v druge bakterije s parjenjem (ali elektroporacijo). Vsebuje dve različni *ori* mesti iz plazmida pVS1 za ohranjanje maloštevilne (*rep* regija), a stabilne (*sta* regija) replikacije plazmidov v *Agrobacterium* in drugih kompetentnih bakterijah. Na plazmidu se nahaja selekcijski *nptII* gen za odpornost na antibiotik kanamycin za selekcijo transformiranih bakterij, na T-DNA pa *hptII* gen za odpornost na antibiotik higromycin za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv. Gus^{Ssp} gen na T-DNA regiji vsebuje intron iz ricinusove katalaze, ki preprečuje izražanje gena v bakterijah in omogoča izražanje v rastlinah ter s tem detekcijo glukuronidazne aktivnosti v transformiranih rastlinskih regenerantih. GUSPlusTM gen je mogoče iz plazmida odstraniti, ali pa poleg gena vstaviti želene gene. T-DNA vsebuje še pUC18 polilinker z lacZ α (slika 10).



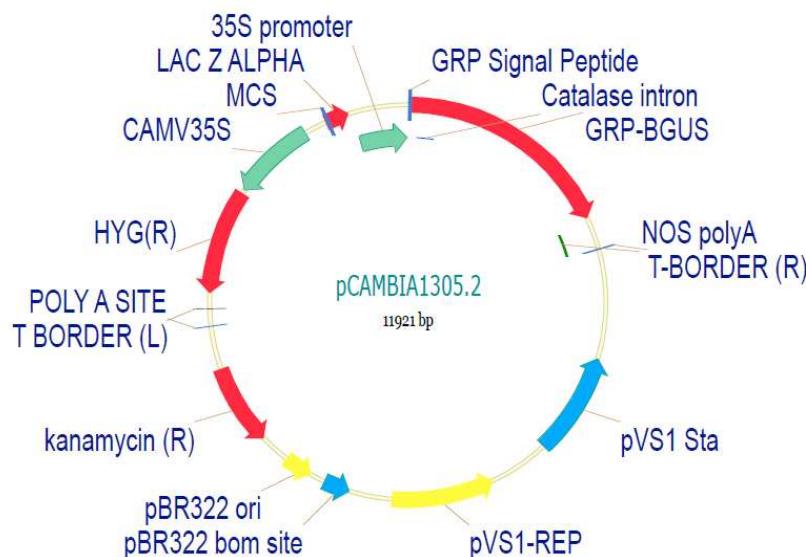
Slika 9: Plazmid pCAMBIA1305.1 (Cambia, 2011)



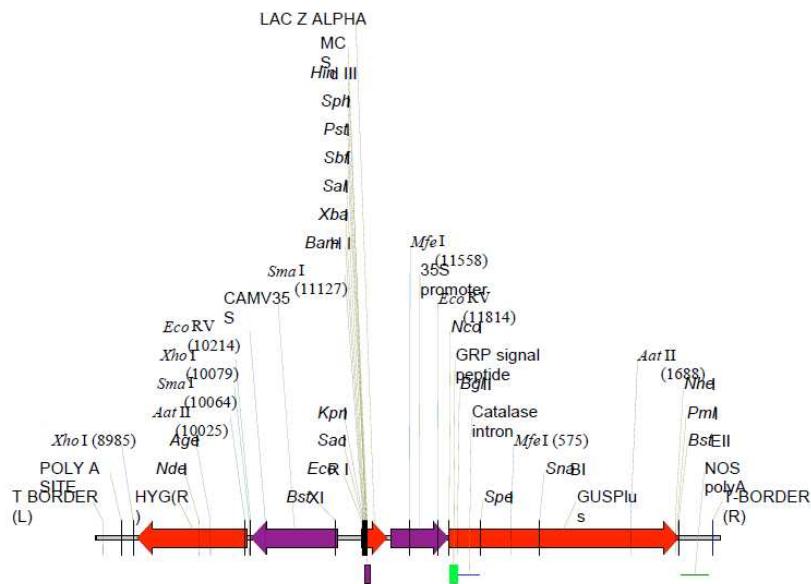
Slika 10: T-DNA plazmida pCAMBIA1305.1 (Cambia, 2011)

pCAMBIA1305.2 (slika 11)

T-DNA regija je dolga 5667, celoten plazmid pa 11921 bp (preglednica 2). Plazmid je praktično enak plazmidu pCAMBIA1305.1, s to razliko, da je v T-DNA pred sekvenco za gen dodan zapis za z glicinom bogat protein (GRP) iz riža, ki služi kot signalni protein (slika 12). GRP omogča izločanje encima v periplazmo ali apoplast.



Slika 11: Plazmid pCAMBIA1305.2 (Cambia, 2011)



Slika 12: T-DNA plazmida pCAMBIA1305.2 (Cambia, 2011)

3.4 VNOS GENOV V TOBAK Z *Agrobacterium tumefaciens*

Transformacija tobaka je potekala posredno z *A.t.* po nekoliko modificirani metodi transformacije listov tobaka (Horsch in sod., 1985; Fisher in Guiltinan, 1995). Poganjke tobaka, ki smo jih *in vitro* gojili na T1 gojišču za rast in mikropropagacijo rastlin tobaka, smo v sterilnih razmerah narezali na izsečke približno enake velikosti (1 cm^2). Število transformiranih izsečkov na posamezen plazmid je prikazano v preglednici 4.

Preglednica 4: Število transformiranih izsečkov na posamezen plazmid

Plazmid	Število izsečkov
pCAMBIA1301	100
pCAMBIA1305.1	50
pCAMBIA1305.2	50 - gojišče brez rastlinske selekcije 50 - gojišče z rastlinsko selekcijo
Netransformirani izsečki tobaka (kontrola)	20 - gojišče brez rastlinske selekcije 20 - gojišče z rastlinsko selekcijo

Bakterije *A. t.* v suspenziji (sev LBA4404) smo hranili na -80°C . Pred namnoževanjem smo suspenzijo odtalili, nato pa v 100 mL YEB gojišča nacepili 100 μL bakterijske suspenzije ter dodali 100 μL rifampicina in 100 μL kanamicina (založni raztopini obeh antibiotikov sta bili 50 mg/mL). Sledila je inkubacija čez noč, pri temperaturi 28°C in tresenju 120 obratov/min.

Naslednji dan smo bakterijsko suspenzijo pripravili za transformacijo. Najprej smo suspenzijo v 50 mL centrifugirkah Sterilin centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/min. Nato smo supernatant odlili, belo-siv pelet bakterij pa prelili s tekočim $\frac{1}{2}$ MS gojiščem za transformacijo ter dodali 45 μL acetosiringona. Izsečke tobaka smo v pripravljeni suspenziji *A. t.* inkubirali 15 min. Nato smo jih zračno osušili na sterilnem filtrskem papirju in prenesli v petrijevke premera 90 mm in višine 15 mm na gojišče T2 (gojišče za adventivno regeneracijo rastlin tobaka), kateremu smo dodali 100 μM acetosiringon, ki poveča učinkovitost okuževanja z *Agrobacterium*, da bi povečali uspešnost transformacije. Izsečke smo kokultivirali z *Agrobacterium* tri dni v rastni komori v kartonasti škatli, ki je zagotavljala temo tekom transformacije. Po treh dneh kokultivacije smo izsečke dvakrat sprali v raztopini antibiotika timentina s koncentracijo 200 mg/L [100:1 (w/w) tikarcilin : klavulonska kislina] in jih zračno osušili na sterilnem filtrskem papirju.

Listne izsečke smo nato prestavili na selekcijsko T2 gojišče z dodatkom 25 mg/L higromicina in 150 mg/L timentina. Vsi trije v poskusu uporabljeni plazmidi (pCAMBIA1301, pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2) imajo na T-DNA za rastlinsko selekcijo vgrajen gen za odpornost na higromicin. Antibiotika smo dodali v gojišče po avtoklaviranju in ohlajanju na 55 °C, ker bi sicer razpadla.

3.5 HISTOKEMIČNI TEST

3.5.1 Destruktivni test aktivnosti gus^{Eco} gena iz plazmida pCAMBIA1301 in gus^{Ssp} gena iz plazmida pCAMBIA1305.1

Po približno 8 tednih po okužbi smo iz izsečkov, transformiranih s plazmidoma pCAMBIA1301 in pCAMBIA1305.1, porezali regenerirane poganjke in jih sterilno prestavili v steklene kozarce s pokrovom na T1 gojišče ter jih inkubirali nadaljnjih 5 tednov. Aktivnost genov gus^{Eco} in gus^{Ssp} smo pri poganjkih tobaka testirali z destruktivnim histokemičnim GUS testom (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994). Uporabili smo substrat X-glcA (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronid), ki ga encim razgradi v moder produkt. Iz izbranih poganjkov smo odrezali liste, jih razrezali na koščke in jih v 24-valjnih ploščicah inkubirali pri 37 °C eno uro v 50 mM fosfatnem pufru NaPO₄ [NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, pH 6,8] z dodatkom Triton X-100. Pufer smo nato odstranili in dodali sveži fosfatni pufer z dodatkom barvila 1.0 mM X-glcA in 20 % metanola. Reakcijsko zmes smo nato inkubirali čez noč na 37 °C. Naslednji dan smo pregledali obarvan produkt aktivnih genov gus^{Eco} in gus^{Ssp} . Kot kontrola je bil uporabljen netransformiran tobak, katerega smo pripravili na enak način kot transformirane regenerante.

3.5.2 Ne-destruktivni test aktivnosti gus^{Ssp} gena iz plazmida pCAMBIA1305.2

Regenerante smo ne-destruktivno testirali v treh časovnih obdobjih: po 4, po 8 in po 12 tednih. Za vsako testiranje smo iz izsečkov sterilno porezali ustrezno velike poganjke, jih prestavili v steklene čašo ter prelili z 200 μ g/mL substrata X-glcA v 20 mM fosfatnem pufru NaPO₄ [NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, pH 7,0]. Sledila je inkubacija v substratu na sobni temperaturi 1-2 uri. V tem času je v nekaterih tkivih poganjkov tobaka prišlo do modrega obarvanja.

3.6 ANALIZA PRISOTNOSTI gus^{Eco} , gus^{Ssp} IN $hptII$ GENOV V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH S PCR METODO

3.6.1 Izolacija rastlinske DNA

Pri destruktivnih in ne-destruktivnih histoloških GUS-testih smo dobili pozitivne kot tudi negativne rezultate. DNA smo izolirali samo iz listov tobaka, in sicer za regenerante, ki so bili tako pozitivni kot tudi negativni pri GUS-testiranju. Celokupno genomsko DNA smo izolirali z modificirano CTAB metodo (Kump in sod., 1992). Raslinski material regenerantov smo prestavili v terilnice in dodali 700 μ L na 68 °C segretega CTAB ekstrakcijskega pufra [2 % (w/v) CTAB: 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM TRIS-HCl (pH 8.0)], liste dobro zdrobili v terilnici, nastalo suspenzijo prelili v 1,5 mL centrifugirke in inkubirali 1 h na 68 °C. Nato smo dodali 700 μ L topila kloroform : izoamilalkoho 24 : 1, dobro premešali in centrifugirali 10 min na 14 000 obratih/min pri 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odpipetirali v nove centrifugirke in dodali 70 μ L 3 M NaOAc (pH 5.2) in 700 μ L ledenohladnega izopropanola ter dobro premešali. Nato smo vzorce inkubirali 30 min v zmrzovalniku na -18 °C. Sledilo je centrifugiranje 10 min na 14 000 obratih/min pri 4 °C. Supernatant smo odlili, dodali 500 μ L 70 % etanola in ponovno centrifugirali 10 min na 14 000 obratih/min pri 4 °C. Nato smo etanol previdno odpipetirali stran in zračno (okoli 20 min) posušili DNA na dnu mikrocentrifugirk. DNA smo raztopili v 30 μ L TE pufru [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)], premešali in shranili v hladilniku na 4 °C.

3.6.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom

Koncentracijo izolirane DNA tobaka smo izmerili z DNA fluorometrom DyNA Quant™ 200 po navodilih proizvajalca Amersham Biosciences, Velika Britanija. Pri merjenju koncentracije smo uporabili barvilo Hoechts 33258, ki smo ga dodali v delovno raztopino 10 X TNE pufra [0,2 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4]. Kot standard smo za kalibracijo fluorometra uporabili DNA telečjega timusa (koncentracija 1000 ng/mL v 10 X TNE pufru). DNA izoliranih vzorcev smo razredčili na koncentracijo 4 ng/ μ L.

3.6.3 PCR (polimerazna verižna reakcija)

Specifično namnoževanje gus^{Eco} , gus^{Ssp} in $hptII$ genov je potekalo v dupleks polimerazni verižni reakciji (PCR) z uporabo po dveh parov začetnih oligonukleotidov, ki so navedeni v preglednici 5. Uporabili smo kombinacije parov začetnih oligonukleotidov GUS3for/GUS3rev in HPTII-for/HPTII-rev1 za analizo vključitve gus^{Eco} markerskega in $hptII$ selekcijskega gena v rastlinski genom po transformaciji z *A. t.*-pCAMBIA1301. GUSPlus-for/GUSPlus-rev in HPTII-for/HPTII-rev1 začetne oligonukleotide smo uporabili za analizo vključitve gus^{Ssp} markerskega in $hptII$ selekcijskega gena po transformaciji z *A. t.*- pCAMBIA1305.1 oz. *A. t.*- pCAMBIA1305.2.

Končni volumen reakcijske mešanice, v katerem je potekalo namnoževanje DNA, je bil 20 μL . Od tega je bilo 5 μL DNA vzorca, 15 μL pa dupleks PCR reakcijske mešanice. Dupleks PCR reakcijske mešanice smo pripravili v 1,5 mL mikrocentrifugirkah. Zmešali smo 1 x PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl], 2 mM MgCl₂, 0,2 mM vsakega deoskinukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 4 x 0,5 μM ustreznega začetnega oligonukleotida in 0,5 enote encima Taq DNA polimeraza (Promega). Do volumna 15 μL smo dodali vodo brez encimov RNAz (RNAse-free water). V PCR mikrocentrifugirke smo odpipetirali 5 μL DNA vzorca in dodali 15 μL dupleks PCR reakcijske mešanice. Polimerazna verižna reakcija je potekala v cikličnem termostatu DNA Thermal Cycler 2720 (PE Applied Biosystems, ZDA) po modificiranem temperaturnem vzorcu (Lakshmi in sod., 1998):

- začetna denaturacija 5 min pri 94 °C
- 33 ponavljajočih se ciklov:
 - denaturacija DNA 1 min pri 94 °C
 - prileganje začetnih oligonukleotidov 1 min pri 58 °C
 - sinteza fragmentov DNA 1,5 min pri 72 °C
- končna 7-minutna inkubacija pri 72 °C

Preglednica 5: DNA sekvence parov začetnih oligonukleotidov za namnoževanje transgenov gus^{Eco} , gus^{Ssp} in $hptII$ ter pričakovane dolžine namnoženih fragmentov

Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5' - 3'	Pričakovana dolžina fragmenta
GUS3for	GGC GAA CAG TTC CTG ATT AAC	408 bp
GUS3rev	TTC GTT GGC AAT ACT CCA CAT	
GUSPlus-for	AGG ACA TCT CGG TTG TGA CC	163 bp
GUSPlus-rev	TTC GGA ATC TCC ACG TTA CC	
HPTII-for	ATG ACC GCT GTT ATG CGG CCA TTG	641 bp
HPTII-rev1	AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG ACG	

3.6.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno elektroforezo

Agarozno elektroforezo smo uporabili za analizo vključitve transgenov v rastlinsko DNA. Namnožene fragmente smo ločevali v 1,4 % agaroznem gelu [za 250 mL gela: agarosa 3,5 g, 1 x TBE pufer 50 mL, etidijev bromid (10 mg/mL) 12,5 μ L], ki smo ga namestili v elektroforetsko posodo in prelili z 1 TBE puferom [890 mM Tris, 890 mM borna kislina, 10 mM EDTA]. Vzorcem DNA smo dodali 5 μ L nanašalnega barvila [12.5 % (w/v) ficol 400, 0.2 % (w/v) bromfenol modro, 6.7 % (v/v) 10 x TBE], premešali in po 23 μ L posameznega vzorca nanesli na agarozni gel. Na gel smo nanesli še negativno kontrolo (DNA iz listov netransformiranega tobaka), pozitivno kontrolo (čisti plazmidi), slepi vzorec (voda brez RNAz) in velikostni standard (Gene RulerTM 100 bp Plus DNA LADDER z 10 fragmenti: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 in 1000 bp). Elektroforeza je potekala pri 130 V okoli 1,5 ure. Gel je vseboval 0,05 μ L/mL etidijevega bromida, ki je v kompleksu z dvojnoverižnimi DNA molekulami omogočal njihovo detekcijo pod UV svetlobo (302 nm). Elektroforetske gele pod UV svetlobo smo fotografirali z polaroidnim fotoaparatom.

3.7 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA

Vzporedno s kokultiviranimi listnimi izsečki tobaka smo naredili dva kontrolna poskusa z neokuženimi izsečki, katere smo inokulirali na T2 gojišče z rastlinsko selekcijo in brez rastlinske selekcije. Za vsako kontrolo smo pripravili 2 petrijevki z 10 izsečki v vsaki petrijevki. Neokužene izsečke smo gojili v rastni komori pod enakimi pogoji kot okužene.

4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA MARKERSKIH GENOV gus^{Eco} IZ PLAZMIDA pCAMBIA1301 IN gus^{Ssp} GENA IZ PLAZMIDA pCAMBIA1305.1

4.1.1 Uspešnost regeneracije poganjkov iz transformiranih izsečkov

Po transformaciji in spiranju izsečkov v 200 mg/L timentina so izsečki rasli na T2 selekcijskem gojišču s 150 mg/L timentina. Razlik v rasti nismo opazili. Tako poganjki na izsečkih, transformirani z genom gus^{Eco} iz plazmida pCAMBIA1301 kot tudi poganjki na izsečkih, transformirani z genom gus^{Ssp} iz plazmida pCAMBIA1305.1 so bili v času vzporedne rasti približno enako veliki in so izgledali normalno oz. razlik v rasti glede na transformiran plazmid ni bilo (slika 13). Antibiotik timentin v gojišču je uspešno zavrl rast bakterije, rastlin tobaka pa ni poškodoval ali oviral regeneracije.



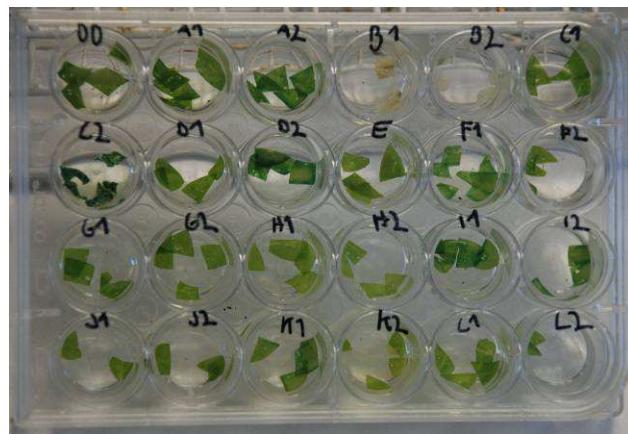
Slika 13: Regeneracija poganjkov po 7 tednih: A - po transformaciji listnih izsečkov tobaka s plazmidom pCAMBIA1301 in B - po transformaciji listnih izsečkov tobaka s plazmidom pCAMBIA1305.1

4.1.2 Histokemični destruktivni test aktivnosti gus^{Eco} gena v plazmidu pCAMBIA1301 in gus^{Ssp} gena v plazmidu pCAMBIA1305.1

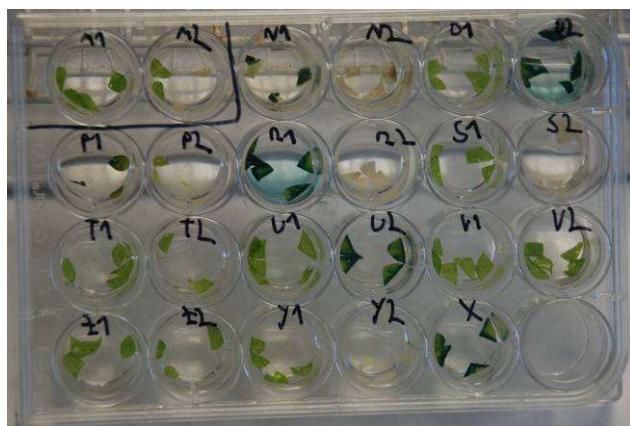
Z destruktivnim histokemičnim testom smo testirali regenerante, ki so zrasli po transformaciji listnih izsečkov tobaka s plazmidoma pCAMBIA1301 in pCAMBIA1305.1 (preglednica 6). Modro obarvanje se vidi pri tistih celicah oz. tkivih, ki so v svoj genom vključile gus^{Eco} oz. gus^{Ssp} gen in aktivno izražajo GUS encim. Oba plazmida imata gus gen opremljen s konstitutivnim promotorjem CaMV35S, zato se markerski gen izraža v vseh tkivih. Aktivnost GUS proteina smo testirali samo v listih tobaka (sliki 14 in 15).

Preglednica 6: Odstotek modro obarvanih regenerantov tobaka po destruktivnem histokemičnem GUS testu

Plazmid	Št. testiranih regenerantov	Št. modro obarvanih regenerantov	Odstotek GUS test. pozitivnih reg. (%)
pCAMBIA1301	35	8	22,9
pCAMBIA1305.1	31	10	32,3



Slika 14 : Fenotipsko testiranje gus^{Eco} gena iz plazmida pCAMBIA1301

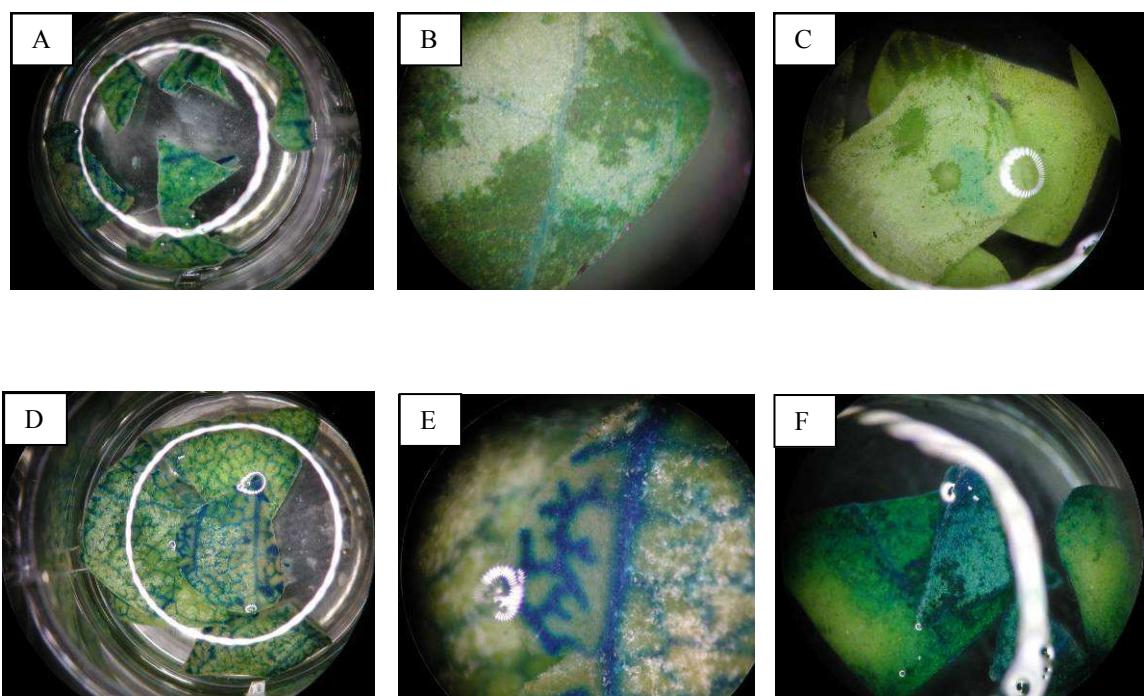


Slika 15 : Fenotipsko testiranje gus^{Ssp} gena iz plazmida pCAMBIA1305.1

4.1.3 Razlike v intenziteti obarvanja listov tobaka med genoma gus^{Eco} in gus^{Ssp} pri destruktivnem testiranju

Po opravljenem destruktivnem testu smo že s prostim očesom lahko videli, da so listi tobaka, transformirani z genom gus^{Ssp} iz plazmida pCAMBIA1305.1, bolj intenzivno modro obarvani (slika 16, D - F). Zato za prepoznavanje modro obarvanih transformiranih listov mikroskopski detajlni pregled pod lupo ni bil potreben. Nasprotno pa so listi tobaka, transformirani z genom gus^{Eco} iz plazmida pCAMBIA1301, kazali slabotnejše modro obarvanje in določene pozitivne transformante smo odkrili šele po detajlnem mikroskopskem pregledu pod lupo (slika 16, A - C). Na sliki 16 vidimo razliko v intenzivnosti obarvanja koščkov listov tobaka, transformiranih s plazmidoma pCAMBIA1301 in pCAMBIA1305.1, po destruktivnem GUS testiranju. Slika 16A prikazuje najbolj intenzivno obarvanje koščkov lista tobaka, transformiranega s plazmidom

pCAMBIA1301, ki smo ga dosegli z destruktivnim testom. Predvsem so se temno modro obarvale žile, medžilni prostor na listni ploskvi pa manj. V večini primerov je bila intenziteta obarvanja slaba, bledo so bili obarvani robovi listov in žile (slika 16B). Posamezne pozitivne transformante smo odkrili šele po detajlnem mikroskopskem pregledu pod lupo (slika 16C). Testirani koščki listov tobaka, transformirani s plazmidom pCAMBIA1305.1, so kazali veliko večjo intenziteto modrega obarvanja (slika 16. D - F). Značilnosti obarvanja pozitivnih transformantov sta predvsem intenzivno temno modro obarvanje žil (slika 16D) ali pa intenzivno temno modro obarvanje celotne listne ploskve (slika 16F). Slika 16E prikazuje modro obarvane žile lista, gledano pod veliko povečavo lupe.

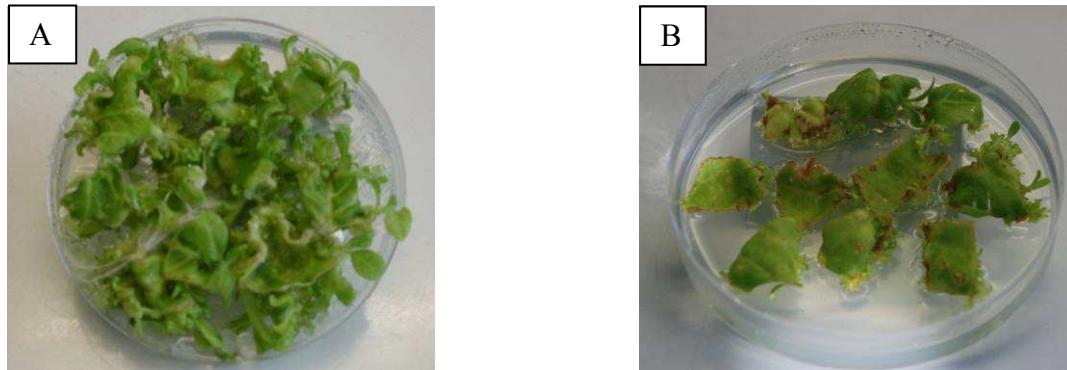


Slika 16: Primerjava obarvanosti koščkov listov tobaka po destruktivnem GUS testiranju: A – C obarvanje transformiranih listov tobaka po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1301; D – E obarvanje transformiranih listov tobaka po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1305.1

4.2 GEN *gus^{Ssp}* V PLAZMIDU pCAMBIA1305.2

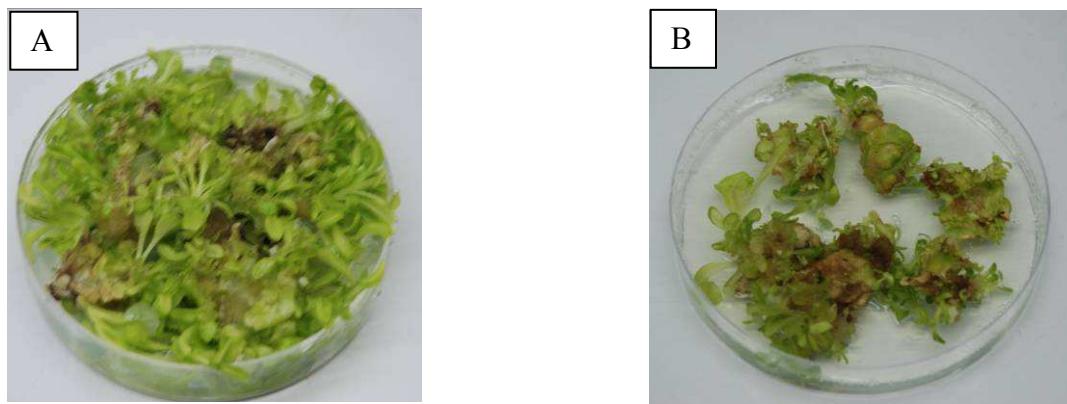
4.2.1 Rast transformiranih listnih izsečkov na gojiščih z rastlinsko selekcijo in brez

50 listnih izsečkov tobaka smo gojili na gojišču z rastlinsko selekcijo (25 mg/L higromicina), 50 pa na gojišču brez selekcije. Po 6,5 tednih rasti izsečkov tobaka na gojišču brez rastlinske selekcije so poganjki močno prerasli izsečke in pognali dolge korenine po celotni petrijevki. Kalusa je bilo malo (slika 17A). Na izsečkih na gojišču s selekcijo so bili poganjki majhni, slabo razviti, brez lastnih korenin (slika 17B).



Slika 17: Razlike v rasti poganjkov po 6,5 tednih: A - rast na gojišču brez selekcije in B - rast na gojišču z rastlinsko selekcijo (25 mg/L higromicina)

Po 14,5 tednih inkubiranja izsečkov tobaka na gojišču brez rastlinske selekcije smo opazili zelo bujno rast, poganjki so povsem prerasli celotno površino petrijevke in se prepletli med sabo. Iz vsakega izsečka je zraslo veliko poganjkov, ki so razvili dolge bele korenine in z njimi prepletli celotno gojišče. Posamezni izsečki so začeli rjaveti in propadati (slika 18A). Na izsečkih na gojišču s selekcijo so bili poganjki bistveno manjši, manj številčni in brez lastnih korenin (slika 18B).



Slika 18: Razlike v rasti poganjkov po 14,5 tednih: A - rast na gojišču brez selekcije in B - rast na gojišču z rastlinsko selekcijo (25 mg/L higromicina)

4.2.2 Histokemični ne-destruktivni GUS test

Gen *gus^{Ssp}* omogoča ne-destruktivni test, saj se encim izloča v apoplast. Modro se obarvajo tista tkiva, ki imajo v genom vključen in aktiven *gus^{Ssp}* gen. *Gus^{Ssp}* gen je v plazmidu pCAMBIA1305.2 opremljen s konstitutivnim promotorjem CaMV35S, zato se markerski gen izraža v vseh tkivih. Aktivnost GUS proteina smo testirali v celotnih poganjkih, ki so zrasli na transformiranih listnih izsečkih tobaka. 38,8 % testiranih poganjkov iz listnih

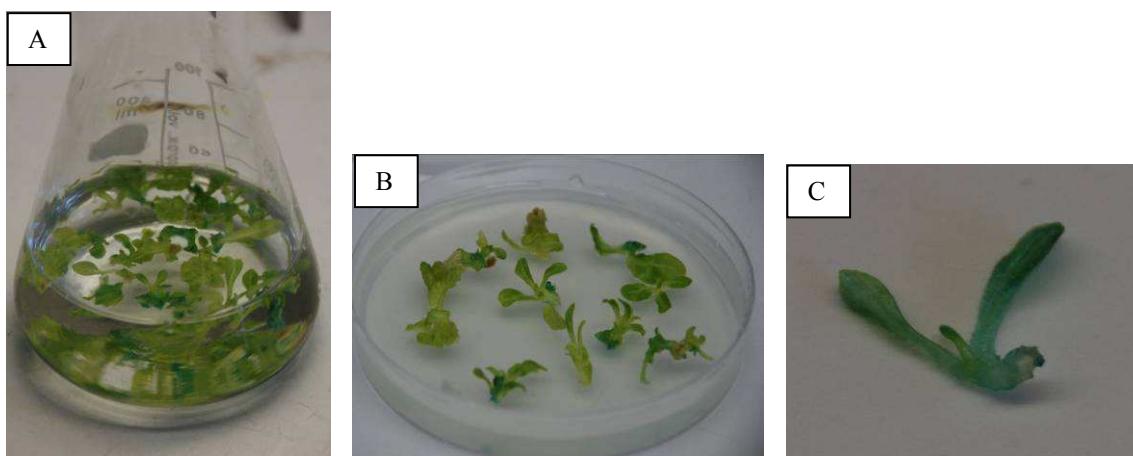
izsečkov, ki so rasli na gojišču z rastlinsko selekcijo, se je pri testu modro obarvalo. Nobeden od poganjkov iz listnih izsečkov, ki so rasli na gojišču brez rastlinske selekcije, se pri testiranju ni obarval (preglednica 7). Po 14,5 tednih rasti izsečkov na gojišču brez selekcije so poganjeni v celoti prerasli izsečke in gojišče. Izsečki so začele propadati, poganjeni pa so bili bledo zeleni in zelo številčni. Ker v predhodnih testiranjih regenerantov iz teh izsečkov nismo dobili pozitivnega rezultata in zaradi njihove nadaljnje številne in bujne rasti, teh regenerantov nismo več rezali iz izsečkov in naprej ne-destruktivno testirali.

Preglednica 7: Odstotek modro obarvanih regenerantov tobaka po ne-destruktivnem histokemičnem GUS testu

Plazmid	Rastlinska selekcija	Št. testiranih regenerantov	Št. modro obarvanih regenerantov	Odstotek GUS pozitivnih reg. (%)
pCAMBIA1305.2	DA	232	90	38,8
	NE	340 + ∞^*	0	0

* po 14,5 tednih rastli so poganjeni popolnoma prerasli izsečke, zato izolacija in testiranje poganjkov ni bilo več smiselno

Poganke smo v substratu X-glcA na sobni temperaturi inkubirali 1 – 2 uri. V tem času so se pozitivni poganjeni obarvali svetlo modro, kar smo lahko videli s prostim očesom (slika 19A). Vsi poganjeni pa niso bili enako obarvani in na istih predelih. Mesta obarvanja so bila v večini primerov steba oz. spodnji deli stebel, robovi listov in dna poganjkov (slika 19B). Le v redkih primerih se je zgodilo, da je bil modro obarvan celoten poganjek (slika 19C).



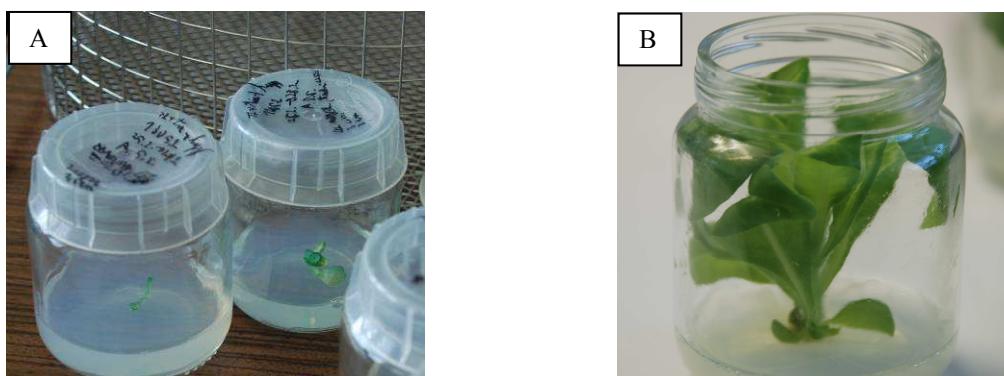
Slika 19: Obarvanje transformiranih poganjkov iz listnih izsečkov tobaka po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1305.2 pri ne-destruktivnem histokemičnem testu

4.2.3 Uspešnost nadaljnje rasti poganjkov po ne-destuktivnem testiranju

Po opravljenem ne-destruktivnem histokemičnem testiranju smo poganjke sprali v sterilni vodi in jih prenesli na gojišče T1 za mikropropagacijo tobaka v sterilne steklene kozarce s pokrovom (slika 20A). Uspešnost nadaljnje rasti je prikazana v preglednici 8. Za preživel poganjek smo označili tistega, ki ni propadel, ni pa nujno, da je rasel. Namreč nekateri poganjki po inokulaciji v časovnem okvirju, ki je bil določen za poskus, niso odgnali, vendar tudi niso propadli. Poganjki, ki so se pri ne-destruktivnem GUS testuobarvali modro in po inokulaciji na T1 gojišče niso odgnali in tudi niso propadli, so ostali modro obarvani. Drugi poganjki, ki pa so nakazali rast in pognali korenine ter liste, so se razvili v normalne rastline. Modro obarvanje je izginilo (slika 20B).

Preglednica 8: Odstotek preživelih poganjkov tobaka glede na predhodno rast izsečkov na gojišču z rastlinsko selekcijo ali brez selekcije in glede na obarvanost/neobarvanost pri ne-destruktivnem GUS testu

Plazmid	Rastlinska selekcija	GUS ne-destr. test	Št. inokuliranih pog. na T1 gojišče	Št. preživelih poganjkov	Odstotek preživelih poganjkov (%)
pCAMBIA1305.2	DA	obarvani	33	19	57,6
		neobarvani	21	13	61,9
	NE	obarvani	0	0	0
		neobarvani	20	20	100



Slika 20: Preverjanje uspešnosti rasti poganjkov tobaka po histokemičnem ne-destruktivnem GUS testiranju:
A – inokulacija GUS pozitivnih (modrih) poganjkov v steklene kozarce s pokrovčki; B – razrasel poganjek tobaka po 5 tednih od inokulacije

4.3 ANALIZA PRISOTNOSTI gus^{Eco} , gus^{Ssp} in $hptII$ GENA V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH S PCR METODO

Genomsko DNA smo izolirali iz listov regenerentov tobaka. Z dupleks PCR metodo smo preverili vključitev transgenov v rastlinski genom. Pregledali smo 18 regenerantov, transformiranih s plazmidom pCAMBIA1301, 20 regenerantov, transformiranih s plazmidom pCAMBIA1305.1 in 24 regenerantov, transformiranih s plazmidom pCAMBIA1305.2 (preglednica 9). Predhodno smo regenerante testirali z destruktivnim oz. ne-destruktivnim GUS histokemičnim testom. Določeno število regenerantov tobaka, ki so bili negativni pri destruktivnem oz. ne-destruktivnem GUS testu, je kljub temu uspešno raslo na ustremnem selekcijskem gojišču. S dupleks PCR metodo smo testirali tudi te, in sicer na enak način kot GUS pozitive regenerante.

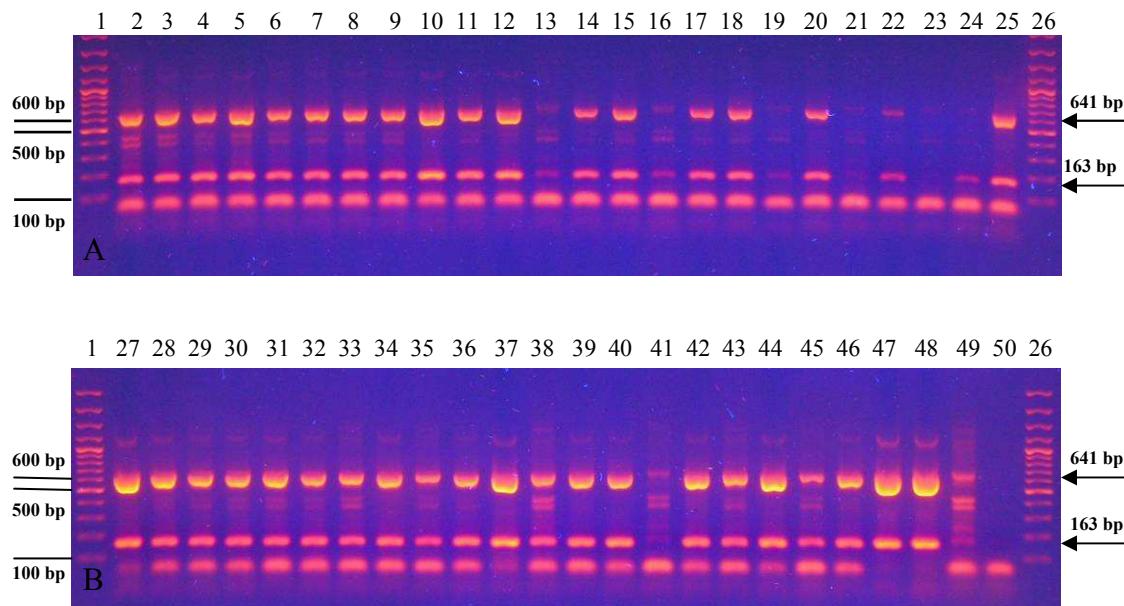
Preglednica 9: Poganjki tobaka, ki smo jih testirali z destruktivnim in ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom ter vgradnjo gus^{Eco} oz. gus^{Ssp} in $hptII$ genov v genom preverili s PCR metodo

		plazmid		
		pCAMBIA1301	pCAMBIA1305.1	pCAMBIA1305.2
Število test.. poganjkov (skupaj)		18	20	24
GUS pozitivni	Št. test. pog	8	10	10
	PCR pozitivni	8	10	10
	PCR negativni	0	0	0
GUS negativni	Št. test. pog	10	10	Selekcijsko goj. Neselekcijsko goj.
	PCR pozitivni	10	9	6 2
	PCR negativni	0	1 ¹	3 3 ²
GUS skupaj (pozitivni + negativni)	Število PCR pozitivnih pog. skupaj	18	19	18
	PCR pozitivni skupaj [%]	100	95	75

¹ namnožen je bil samo fragment za gen $hptII$ gen (641 bp)

² pri enem vzorcu (od treh) je bil namnožen fragment za $hptII$ gen (641 bp)

4.3.1 Analiza prisotnosti gus^{ssp} in $hptII$ gena v regenerantih, transformiranimi s plazmidoma pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2

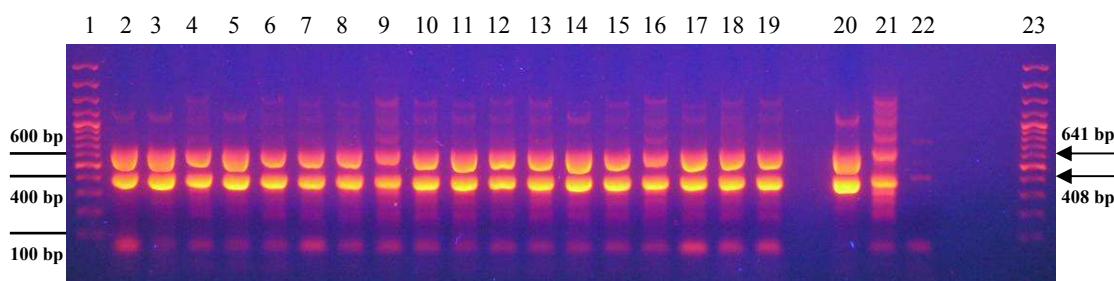


Slika 21: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za gus^{ssp} (163 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za $hptII$ gen (641 bp) za preverjanje uspešnosti transformacije s plazmidoma pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2 (GUSPlus™ markerksi sistem): A namnoženi DNA fragmenti iz regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1305.2, ki smo jih testirali z ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom (2 – 11 GUSPlus™ pozitivni/obarvani, 12 – 25 GUSPlus™ negativni/neobarvani; neobarvani poganjki 21, 22, 23, 24 in 25 so rasli na gojišču brez rastlinske selekcije), 1 in 26 velikostni standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); B namnoženi DNA fragmenti iz regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1305.1, ki smo jih testirali z destruktivnim histokemičnim GUS testom (27 – 36 GUSPlus™ pozitivni/obarvani, 37 – 46 GUSPlus™ negativni/neobarvani); 47 plazmid pCAMBIA1305.1; 48 plazmid pCAMBIA1305.2, 49 kontrola – netransformiran tobak; 50 slepi vzorec; 1 in 26 velikostni standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Regenerante tobaka, nastale po transformacijah z *A. t.*-pCAMBIA1305.1 in *A. t.*-pCAMBIA1305.2, smo analizirali z dupleks PCR reakcijo s kombinacijo parov začetnih oligonukleotidov GUSPlus-for/GUSPlus-rev in HPTII-for/HPTII-rev1. Gre za plazmida, ki vsebuje enake gene, zato smo tudi uporabili iste kombinacije začetnih oligonukleotidov. Pri vseh 10 testiranih regenerantih tobaka, transformiranimi z *A. t.*-pCAMBIA1305.2, ki so se pri ne-destruktivnem histokemičnem GUS testu obarvali modro, sta se namnožila fragmenta dolžine 163 bp (markerski gus^{ssp} GUSPlus™ gen) in 641 bp (seleksijski $hptII$ gen), kar vidimo na sliki 21A, vzorci 2 – 11. Od 14 testiranih regenerantov, ki so bili transformirani z *A. t.*-pCAMBIA1305.2 in pri ne-destruktivnem histokemičnem GUS testu negativni (slika 21A, vzorci 12 - 25), se enaka fragmenta istih dolžni nista namnožila pri vzorcih 13, 16, 19 (gre za regenerante, ki so rasli na gojišču z rastlinsko selekcijo) ter pri 21, 23 in 24 (gre za regenerante, ki so rasli na gojišču brez rastlinske selekcije). Pri vseh 10 s PCR pregledanih regenerantih tobaka, transformiranih z *A. t.*-pCAMBIA1305.1, ki so se

pri destruktivnem histokemičnem GUS testu obarvali modro, sta se namnožila fragmenta dolžine 163 bp (markerski gus^{Ssp} GUSPlusTM gen) in 641 bp (selekcijski $hptII$ gen), kar predstavlja slika 21B, vzorci 27 – 36. Od 10 z *A. t.*-pCAMBIA1305.1 transformiranih regenerantov, ki so pri destruktivnem histokemičnem GUS testu dali negativen rezultat (slika 21B, vzorci 37 - 46), edino pri vzorcu 41 ni prišlo do namnoževanja fragmentov obeh transgenov, namnožil se je le fragment dolžine 641 bp (selekcijski $hptII$ gen). Vzorec 49 je bil netransformiran tobak in je služil kot negativna kontrola. Presenetljivo so se tudi tu namnožili PCR fragmenti različnih dolžin.

4.3.2 Analiza prisotnosti gus^{Eco} in $hptII$ gena v regenerantih, transformiranimi s plazmidom pCAMBIA1301



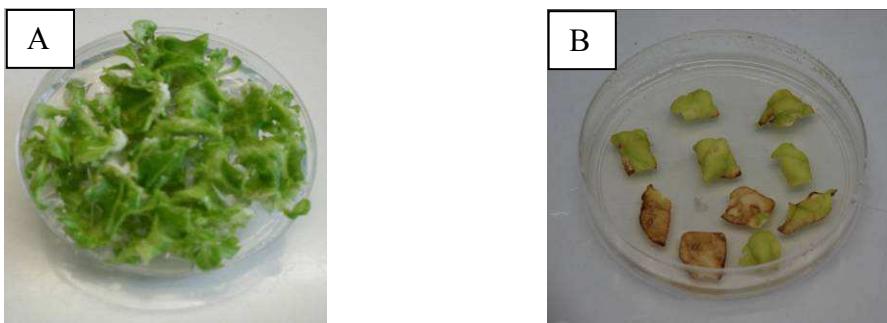
Slika 22: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za gus^{Eco} (408 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za $hptII$ gen (641 bp) za preverjanje uspešnosti transformacije s plazmidom pCAMBIA1301: 2 - 9 namnoženi DNA fragmenti iz GUS pozitivnih/obarvanih regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1301, ki smo jih testirali z destruktivnim histokemičnim testom; 10 – 19 namnoženi DNA fragmenti iz GUS negativnih/neobarvanih regenerantov tobaka po okužbi s plazmidom pCAMBIA1301, ki smo jih testirali z destruktivnim histokemičnim testom; 20 plazmid pCAMBIA1301; 21 kontrola – netransformiran tobak; 22 slepi vzorec; 1 in 23 velikostni standard GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Regenerante tobaka, nastale po transformacijah z *A. t.*-pCAMBIA1301, smo analizirali z dupleks PCR reakcijo s kombinacijo parov začetnih oligonukleotidov GUS3for/GUS3rev in HPTII-for/HPTII-rev1. Pri vseh 18 vzorcih (tako GUS pozitivnih kot tudi GUS negativnih) sta se namnožila fragmenta dolžine 408 bp (markerski gus^{Eco} gen) in 641 bp (selekcijski $hptII$ gen) (slika 22).

Vzorca 49 na slika 21B in 21 na sliki 22 predstavlja kontrolo – netransformiran tobak. V PCR reakciji je bila vzorcu 49 dodana PCR reakcijska mešanica s paroma začetnih oligonukleotidov GUSPlus-for/GUSPlus-rev in HPTII-for/HPTII-rev1. Vzorcu 21 pa je bila dodana PCR reakcijska mešanica s parom začetnih oligonukleotidov GUS3for/GUS3rev in HPTII-for/HPTII-rev1. Iz neznenega razloga so se pri obeh vzorcih namnožili številni fragmenti različnih dolžin. Prav tako se je iz neznanega razloga pojavilo nekaj neznanih fragmentov v slepem vzorcu (vzorec 22 na sliki 22), kateremu smo dodali PCR reakcijsko mešanico s parom začetnih oligonukleotidov GUS3for/GUS3rev in HPTII-for/HPTII-rev1.

4.4 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA

Neokužene listne izsečke smo gojili na T2 gojišču. Izsečki, kateri so bili inokulirani na gojišče brez selekcije, so bili zeleni, 2 do 3 krat so se povečali in po dveh tednih se je začela regeneracija. Nobeden od 20 izsečkov ni propadel, da vseh so se pojavili regeneranti (slika 23A). Neokuženi izsečki, inokulirani na selekcijsko gojišče T2 z dodatkom 25 mg/L higromicina, se niso povečali, klorofil je razpadel, vendar so šele po 7 tednih začeli rjaveti in propadati. Na nobenem izsečku ni potekla regeneracija (slika 23B).



Slika 23: Kontrolni poskus z neokuženimi listnimi izsečki tobaka na T2 gojišču: A – brez selekcije po 5,5 tednih; B – na selekciji s 25 mg/L higromicina po 7 tednih

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Markerske gene uporabljamo pri genskih transformacijah rastlin za ločevanje transformiranih regenerantov od netransformiranih. Nefitna mednarodna družba Cambia iz Avstralije je optimizirala *gus* markerski gen iz talne bakterije *Staphylococcus* sp. za izražanje v rastlinah, ki so ga zaradi boljih lastnosti opisali kot *gus* gen druge generacije in poimenovali GUSPlusTM. V opisu novega GUS encima so navedli, da ima encim večjo občutljivost na substrat, kar vodi do hitrejšega pojava barve pri reakciji encima s substratom X-glcA, večjo toleranco na kemikalije, ki se uporablajo pri testu in da se encim lahko izloča iz celice v apoplast, kar omogoča ne-destruktivni histokemični test za detekcijo uspešnosti transformacije. Na ta način rastlinskega tkiva ni potrebno uničiti oz. ga lahko nadalje uporabimo. V naši raziskavi smo želeli nekaj od teh opisanih lastnosti preveriti na testni rastlini tobaku (*Nicotiana tabacum* L.) ter primerjati, kako in v čem se nov GUSPlusTM markerski gen razlikuje od »starega« *gus* gena iz *E. coli*.

5.1.1 Primerjava *gus*^{*Eco*} gena iz plazmida pCAMBIA1301 in *gus*^{*Ssp*} gena (GUSPlusTM) iz plazmida pCAMBIA1305.1 za uporabo pri preverjanju uspešnosti transformacij z destruktivnim histokemičnim GUS testom

V prvem delu našega poskusa smo primerjali najbolj uporabljen *gus* gen iz *E. coli* (*gus*^{*Eco*}) z *gus* genom iz *Staphylococcus* sp. (*gus*^{*Ssp*}), ki ima komercialno ime GUSPlusTM. Gena sta si sicer med sabo samo okoli 47 % podobna, vendar kodirata zapis za enak encim β -glukuronidazo, ki opravlja isto funkcijo v obeh mikroorganizmih, in sicer hidrolizira β -galakturonide in β -glukuronide, ki razpadajo na D-glukoronsko kislino in aglikon. To lastnost encima uporabljamo pri markerskih testih transformiranih regenerantov, saj so β -glukuronidi komercialno dostopni tudi v obliki histokemičnih substratov in z njimi lahko pri GUS testiranju dosežemo razlikovanje transformiranih celic od netransformirnih. Obema encimoma iz *E. coli* in iz *Staphylococcus* sp. je skupno to, da se akumulirata v celični citoplazmi, zaradi česar je potrebno rastlinske celice razbiti, da pridejo v stik s substratom. Temu postopku pravimo destruktivni histokemični GUS test za ugotavljanje učinkovitosti transformacije. V poskusu smo uporabili dva različna plazmida z omenjenima genoma, in sicer se *gus*^{*Eco*} gen nahaja na plazmidu pCAMBIA1301 in *gus*^{*Ssp*} na plazmidu pCAMBIA1305.1. S posredno metodo genske transformacije z *Agrobacterium tumefaciens* smo oba gena vnesli v izsečke tobaka in nato opravili primerjalne analize.

Približno en teden po transformaciji s plazmidoma pCAMBIA1301 in pCAMBIA1305.1 se je na reznih površinah izsečkov začel oblikovati kalus, ki je po približno dven tednih prerasel transformirane dele listov in šele nato se je začela regeneracija. Večina

regenerantov je nastala direktno iz globularnih struktur, ki so nastale iz transformiranih celic. Ti regeneranti so imeli manj anomalij (nepravilna rast in hiperhidriranost) kot regeneranti na kalusu. Razlik v nadaljnji regeneraciji poganjkov glede na transformiran plazmid nismo opazili. Tako poganjki na izsečkih, transformirani z genom *gus*^{Eco} iz plazmida pCAMBIA1301 kot tudi poganjki na izsečkih, transformirani z genom *gus*^{Ssp} iz plazmida pCAMBIA1305.1, so v času vzporedne rasti izgledali podobno; bili so približno enako bujni, oblikovali so svetlo zelene lističe. V kontrolnem poskusu z neokuženimi listnimi izsečki smo na T2 gojišču s selekcijo (25 mg/L higromicina) po sedmih tednih opazili rjavenje in propadanje listnih izsečkov. Higromicin je učinkovito uničil rastlinsko tkivo, ki ni bilo transformirano. Antibiotik je povzročil poškodbe rastlinskega tkiva, razbarvanja, bolj ali manj obsežne lezije in propad tkiva. Preprečeval je oblikovanje adventivnih poganjkov in razvoj regenerantov na izsečkih ter ukoreninjenje netransformiranih regenerantov. Izbrana koncentracija antibiotika za uprabo na selekcijskem gojišču je bila primerna. Rast kontrolnih netransformiranih listnih izsečkov na T2 gojišču brez selekcijskega antibiotika pa je bila zelo intenzivna in bujna. Zametki poganjkov so se pojavili po približno dveh tednih, po štirih tednih je nastalo že veliko število regenerantov, ki so bili temo zelene barve, z več listi in koreninicami.

Za detekcijo β -glukuronidazne aktivnosti v transformiranih celicah smo med *A. t.*-pCAMBIA1301 in *A. t.*-pCAMBIA1305.1 regeneriranimi poganjki primerjalno opravili destruktivni histokemični GUS test. Postopek testiranja se glede na uporabljen plazmid pri transformaciji ni razlikoval, saj oba *gus* gena kodirata enak encim β -glukuronidazo. Ker netransformirane rastline tobaka ne kažejo endogene GUS aktivnosti, transformirana *gus* gena pa sta bila opremljena z intronom iz ricinusove katalaze, ki preprečuje ekspresijo encima v prokariontih, se modro obarvajo le tiste rastlinske celice, tkiva oz. regeneranti, ki imajo v genom vključen in aktiven *gus* gen. Odstotek GUS pozitivnih transformiranih regenerantov z pCAMBIA1305.1 je bil višji od odstotka GUS pozitivnih transformiranih regenerantov z pCAMBIA1301 (32,3 % > 22,9 %). Dobili smo podobne rezultate kot jih najdemo v literaturi. Jia in sod. (2006) poročajo o 34 % transformiranih regenerantov tobaka, s čimer lahko primerjamo naše rezultate.

Razlika v intenziteti pri testu obarvanih koščkov listov tobaka je bila velika in na fotografijah dobro vidna. Medtem ko so bili pozitivni, z *gus*^{Eco} genom transformirani koščki listov v večini primerov bledo obarvani in obarvani samo po žilah, ponekod pa so bili obarvani samo majhni predeli tkiva ali pa trihom, so bili pri GUS testu pozitivni, z *gus*^{Ssp} genom transformirani koščki listov intenzivno obarvani po celotnem tkivu. V primeru obaravnosti žil so bile te intenzivno temno modro obarvane, prav tako robovi listov. Vseeno pa tudi med regeneranti, transformiranimi z enakim plazmidom, prihaja do razlik v obarvanju. Različna mesta vključitve transgena v genom lahko povzročijo kvantitativne razlike v ravni ekspresije enakega transgena med neodvisno transformiranimi linijami, kar imenujemo tudi pozicijski efekt. Izražanje GUS markerskega proteina je

lahko 10-krat večje na enem integracijskem mestu kot na drugem (Day in sod., 2002). Iz podatkov naše analize lahko vseeno potrdimo, da nov gus^{Ssp} (GUSPlusTM) gen intenzivneje obarva testirana tkiva kot pa do sedaj najbolj pogosto uporabljen gus^{Eco} gen, kar je verjetno posledica večje občutljivosti GUSPlusTM gena na substrat in večje toleranco na kemikalije, ki se uporabljajo pri testu.

Uspešnost vgradnje genov gus^{Ssp} , gus^{Eco} in $hptII$ v genom tobaka, transformiranega z *A. t.*-pCAMBIA1301 in *A. t.*-pCAMBIA1305.1, smo dokazali z molekularno analizo. Z dupleks PCR reakcijo smo naenkrat preverjali vključitev tako markerskega kot tudi selekcijskega gena z uporabo kombinacije dveh parov ustreznih začetnih oligonukleotidov. V multipleks PCR reakciji lahko hkrati pomnožujemo in detektiramo več tarčnih DNA sekvenc v eni reakciji in s tem prihranimo čas, delo in denar (Markoulatos in sod., 2002). S PCR metodo smo pregledali GUS pozitivne regenerante in na ta način dokazali, da je razlog v modrem obarvanju tkiva pri destruktivnem GUS histokemičnem testiranju v genom vgrajen in aktiven gus markerski gen, ki ne more biti bakterijskega ali endogenega izvora. Molekularno pa smo analizirali tudi regenerente, ki so bili GUS negativni, a so kljub temu uspešno rasli na selekcijskem gojišču. Na ta način smo žeeli ugotoviti naslednje: ali so tej regeneranti tobaka transformirani in imajo vgrajen in aktiven samo selekcijski $hptII$ gen, gus gen pa ne in se zato pri GUS testiranju niso obarvali; ali imajo vgrajena oba transgena, vednar je aktiven samo $hptII$ gen, ki omogoča rast na selekcijskem gojišču, gus gen pa je prisoten, toda ni aktiven; ali pa so GUS negativni poganjki »pobegnili« rastlinski selekciji, torej posamezne poganjke 25 mg/L higromicina v gojišču ni zavrlo v rasti oz. izbrana koncentracija antibiotika ni preprečila regeneracije netransformiranih rastlin, ki se razvijejo na transformiranih izsečkih zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic (Park in sod., 1998).

Pri vseh regenerantih, transformiranimi z *A. t.*-pCAMBIA1301 (vsebuje gena gus^{Eco} in $hptII$), ki so bili pri destruktivnem histokemičnem GUS testu pozitivni, sta se po pričakovanih namnožila fragmenta dolžine 408 bp (markerski gus^{Eco} gen) in 641 bp (selekcijski $hptII$ gen). Na ta način smo s PCR metodo potrdili pozitivne fenotipske rezultate tako uspešne rasti poganjkov na selekcijskem gojišču, kar kaže na aktivnost $hptII$ gena, kot tudi pozitivne rezultate iz histokemičnega GUS testa, namreč da se je gus^{Eco} gen vgradil v genom tobaka in da je aktiven v rastlinskih celicah. Presenetljivo pa se je fragment za gus gen namnožil čisto pri vseh GUS negativnih poganjkih, ki so bili transformirani z enakim plazmidom. S PCR analizo smo potrdili vključenost obeh transgenov v genom, fenotipsko pa smo lahko potrdili le aktivnost $hptII$ gena, saj so poganjki uspešno rasli na gojišču z rastlinsko selekcijo, torej je bil $hptII$ gen aktiven, histokemični GUS test teh poganjkov pa je bil negativen, torej gus^{Eco} gen kjub vgradnji v genom ni bil aktivен. V primeru neaktivnosti gus^{Eco} gena gre kljub potrjeni vgradnji v genom verjetno za variabilnost izražanja in utišanje transgena, razlogi pa so lahko: naključno mesto vgradnje gena v kromosom – t.i. pozicijski efekt (telomere,

heterokromatin – transkripcijsko aktivna ali neaktivna mesta, mesta bolj dovzetna za metilacijo); število kopij transgena (več kopij celih ali delov transgenov pomeni večjo verjetnost transkripcijskega ali posttranskripcijskega utišanja genov); genske mutacije (možnost točkovnih mutacij, delecij in preureditev v transgenu) in somaklonska variabilnost v tkivni kulturi (spremembe ploidnosti in strukture kromosomov, mutacije v nukleotidnem zaporedju DNA in spremembne zaradi aktivnosti transpozonov) (Ow, 2002).

Podobne rezultate kot pri z *A. t.*-pCAMBIA1301 (vsebuje gena *gus^{Eco}* in *hptII*) transformiranimi poganjki smo dobili pri PCR testiranju poganjkov, ki so bili transformirani z *A. t.*-pCAMBIA1305.1 (vsebuje gena *gus^{Ssp}* in *hptII*); vsi fenotipsko pozitivni regeneranti so bili pozitivni tudi genotipsko. V dupleks PCR reakciji sta se namnožila fragmenta dolžine 163 bp (*gus^{Ssp}* gen) in 641 bp (*hptII* gen). Na ta način smo s PCR metodo (vgradnja transgenov v genom tobaka) potrdili pozitivne rezultate iz histokemičnega GUS testa (aktivnost *gus^{Ssp}* gena v rastlinskih celicah) kot tudi pozitivni fenotip izražanja *hptII* gena, ki je omogočil rast poganjkov na seleksijskem gojišču. Pri GUS testiranih fenotipsko negativnih regenerantih pa se samo pri enem od desetih testiranih regenerantov nista namnožila oba fragmenta. V ostalih devetih testiranih vzorcih smo poleg vgradnje *hptII* gena ponovno določili vgradnjo *gus^{Ssp}* v genom, čeprav pri fenotipskem histokemičnem GUS testiranju ni prišlo doobarvanja tkiva, torej nismo zaznali njegove aktivnosti. Zopet so možni razlogi, da je prišlo do neizražanja sicer v genom vgrajenega *gus^{Ssp}* gena, zaradi utišanja genov, pozicijskega efekta ali preuređitve v insertu. Mogoče se je zgodila vgradnja večjega števila kopij transgena, kar pomeni večjo možnost transkripcijskega in posttranskripcijskega utišanja transgenov z rastlinskimi endogenimi mehanizmi (Matzke in Matzke, 1995). Do utišanja genov lahko pride tudi zaradi aktivacije rastlinskih obrambnih mehanizmov s transgenimi ali njihovimi produkti (Matzke in Matzke, 1998) in je podobno naravni obrambi rastlin pred virusi (Ratcliff in sod., 1997). Pri GUS fenotipsko negativnem regenerantu, transformiranem z pCAMBIA1305.1 (vsebuje gena *gus^{Ssp}* in *hptII*), kjer se nista namnožila oba fragmenta, pa smo doličili prisotnost samo enega fragmenta, in sicer 641 bp dolg fragment, ki dokazuje vključenost *hptII* gena v rastlinski genom. *Gus^{Ssp}* gen se ni vgradil v genom. V tem primeru je mogoče prišlo do nastanka himernega tkiva. To pomeni, da so poganjki, zrasli iz istega listnega izsečka, vgradili gen *hptII*, ne pa tudi *gus^{Ssp}* gen. Matzke in Matzke (1996) sta poročala o podobnem primeru, kjer je prišlo do mozaične narave izražanja gena za odpornost na higromicin, čeprav je bil le-ta opremljen s konstitutivnim 35S promotorjem, pri tobaku, transformiranim z genoma za odpornost na kanamicin in higromicin. Listni izsečki iz istega lista rastline, odporne na kanamicin, so kazali odpornost na higromicin ali pa ne. Mogoče je tudi, da je pri vgradnji z rekombinacijo prišlo do napak in se je v genom vgradil samo delček *gus^{Ssp}* gena. V tem primeru se 163 bp dolg fragment za *gus^{Ssp}* gen prav tako ne bi namnoževal in ga na agaroznem gelu ne bi videli.

Potrebno pa se je zavedati, da PCR analiza predstavlja le preliminarni test, s katerim zagotovo izločimo samo netransformirane regenerante. Za PCR pozitivne vzorce ne velja nujno, da so tudi uspešno transformirani, kajti lažno pozitiven PCR rezultat lahko dobimo npr. zaradi prisotnosti bakterij s transgenu podobnim genskim konstruktom, ki se v PCR reakciji pomnožujejo namesto tarčnega fragmenta tega transgena, ki smo ga transformirali v rastlinsko tkivo. Lahko pride do nepopolne transformacije, ko se vstavi le del transgena v genom gostitelja. PCR produkt v tem primeru lahko nastane, vgrajen gen pa ni funkcionalen, zato transformacija ni bila uspešna kljub transformiranemu rastlinskemu tkivu. Uspešnost trasformacije lahko z gotovostjo potrdimo z analizo po Southernu, pri kateri ne zaznamo samo vgradnje transgena, ampak tudi ugotovimo, v koliko kopijah je transgen prisoten v genomu gostitelja.

Predvidljivo in stabilno izražanje transgenov ostaja problematično (Gelvin, 2003), zato je pomembno, da je markerski sistem čim bolj zanesljiv. Kot kriterij zanesljivosti uporabe različnih *gus* genov v GUS markerskem sistemu za destruktivno in ne-destruktivno histokemično GUS testiranje regenerantov lahko vzamemo s PCR analizo pridobljen podatek o odstotku uspešne vgradnje transgena v rastlinski genom pri regenerantih, testiranih z destruktivnim ali ne-destruktivnim histrokemičnim GUS testom, ne glede na rezultat testiranja. Rezultatov histokemičnega GUS testiranja pri tem kriteriju ne smemo upoštevati, saj številni dejavniki vplivajo na utišanje transgena in s tem na neizražanje proteina kljub uspešni transformaciji (somaklonska variabilnost, vgradnja gena v neaktivne DNA regije, transkripcionsko ali posttranskripcionsko utišanje genov, genske mutacije), zato rezultati GUS testiranja regenerantov niso nujno odraz dejanske vgradnje gena v genom, kar smo v naši raziskavi tudi videli - tudi GUS negativni regeneranti so imeli v genom vgrajen *gus* gen, ki pa v rastlinskem tkivu ni bil aktiven. Poleg tega ima celično okolje manjši vpliv na vgradnjo transgena v genom kot pa na njegovo izražanje, zato je lahko samo odstotek uspešne vgradnje transgena v genom testiranih regenerantov, in ne tudi podatek o njegovi aktivnosti, dober pokazatelj zanesljivosti markerskega gena. Iz rezultatov našega poskusa lahko zaključimo, da sta nov GUSPlusTM markerski gen (*gus*^{Ssp}) in *gus* gen iz *E. coli* (*gus*^{Eco}) glede na število testiranih regenerantov približno enako zanesljiva. Medtem ko je bila vključenost *gus*^{Eco} gena v genom tobaka prisotna pri 100 % testiranih regenerantov, ki so bili pri GUS testu pozitivni ali negativni, smo vključenost *gus*^{Ssp} gena v genom tobaka določili pri 95 % testiranih poganjkov, ki so bili pri GUS testu pozitivni ali negativni.

5.1.2 *Gus*^{Ssp} gen (GUSPlusTM) iz plazmida pCAMBIA1305.2 za uporabo preverjanja uspešnosti transformacij z ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom

Gus^{Ssp} gen iz plazmida pCAMBIA1305.2 je v celoti enak *gus*^{Ssp} genu iz plazmida pCAMBIA1305.1 s to razliko, da ima k sekvenci gena, ki so jo z izbiro ustreznih kodonov umetno optimizirali za izražanje v rastlinah, pripet z glicinom bogat signalni protein

(GRP), ki usmerja izločanje aktivnega encima v apoplast celice. To naj bi omogočalo ne-destruktivni histokemični GUS test oz. ohranjanje rastnega potenciala rastlinskega tkiva tudi po testiranju. Na ta način bi rastlinsko tkivo, ki bi bilo pri testu pozitivno in bi se tako izkazalo za transformirano, lahko raslo naprej, kar bi bila velika prednost predvsem za tiste rastlinske vrste, pri katerih regeneracija poganjkov po transformaciji predstavlja veliko oviro na poti pridobivanja novih transformantov s spremenjenimi/dodanimi/izboljšanimi agronomskimi ali katerimi drugimi gospodarsko pomembnimi lastnostmi. Ena izmed rastlinskih vrst, ki imajo slabšo regenerativno odzivnost v tkivni kulturi, je hmelj (*Humulus lupulus* L.), in sicer med drugimi tudi slovenska kultivarja 'Savinjski golding' in 'Aurora'. Pri teh kultivarjih regeneracija poteka počasi, indirektno preko kalusa in v relativno nizkem odstotku. Pri transformacijah takšnih rastlinskih vrst je glavna pomanjkljivost GUS testa ravno njegova destruktivnost, pri čemer testirano tkivo uničimo, zato potrebujemo dalj časa za rast večjih regenerantov, mikropropagacijo vršičkov transformantov in več rastlinskega materiala za histokemični test kot tudi za PCR reakcijo (Škof, 2008).

Gus gen iz *E. coli* (*gus^{Eco}*) velja za popoln markerski sistem s to pomanjkljivostjo, da omogoča le destruktivni histokemični test za ugotavljanje uspešnosti transformacije. Gen *gus^{Ssp}* iz plazmida pCAMBIA1305.2, ki ima komercialno ime GUSPlus™, pa naj bi po navedbah proizvajalcev omogočal to, kar do sedaj GUS markerski sistemi niso omogočali: izločanje aktivnega encima iz celice in na ta način ne-destruktivno histokemično GUS testiranje, pri čemer ne bi bilo potrebno uničiti rastlinskega tkiva, da bi zagotovili stik med encimom β -glukuronidazo in njegovim substratom (npr. X-glcA). Testiran rastlinski material bi tako lahko rasel naprej tudi po opravljenem testu. V drugem delu naše raziskave smo želeli preveriti, kako GUSPlus™ markerski sistem za ne-destruktivno histokemično GUS testiranje deluje na testni rastlini tobak, kakšna je zanesljivost *gus^{Ssp}* gena, ki se izloča v apoplast, kako izgledajo obarvani transformirani regeneranti in ali je njihova nadaljnja rast po testiranju res mogoča.

Poskus z GUSPlus™ markerskim sistemom, ki ima v plazmid pCAMBIA1305.2 vključen *gus^{Ssp}* s pripetim GRP signalnim peptidom za izločanje v apoplast, smo razdelili na dva dela, in sicer smo za regeneracijo poganjkov iz transformiranih listnih izsečkov uporabili gojišče z rastlinsko selekcijo (25 mg/L higromicina) in gojišče brez rastlinske selekcije. Za preizkušanje uspešnosti in zanesljivosti GUSPlus™ markerskega sistema za določanje transformantov na gojišču brez rastlinske selekcije smo se odločili zaradi dejstva, da imajo določene rastlinske vrste (npr. hmelj) težavo z regeneracijo, saj različni selekcijski toksični agensi v gojiščih, predvsem antibiotiki in herbicidi, zavirajo regeneracijo transformantov kljub pogojno uspeli transformaciji in vgradnji transgenov za odprosnost v rastlinski genom. Atibiotiki v selekcijskem gojišču povzročajo pri občutljivih in netransformiranih rastlinah razbarvanje rastlinskega tkiva, različno obsežne lezije in na koncu propad tkiva. Najpogosteje uporabljen selekcijski antibiotik v rastlinah je kanamicin, sledi pa mu higromycin, ki pa je na splošno za rastline veliko bolj toksičen. Če pa selekcijskega

substrata v gojišču ni, veliko bolj uspevajo netransformirani poganjki, ki prerasijo transformirane (Miki in Mchugh, 2004). Pri transformaciji rastlinskega tkiva z *A. t.* se transformira le manjše število celic, ki nato na selekcijskem gojišču omogočajo rast regenerantov zaradi vgrajenega gena za encim, ki deaktivira toksičen agens v gojišču. Če pa izsečki rastejo na gojišču brez selekcije, poganjki večinoma poženejo iz netransformiranih celic, saj v tem primeru transformirane celice nimajo selekcijske prednosti. Ravno nasprotno, zaradi vgradnje gena v genom in izdelave encima, ki ga ne potrebujejo, so zaradi dodatno porabljeni energije za sintezo teh encimov v boju za prostor na gojišču in uporabo hranilnih snovi manj konkurenčne kot pa netransformirani poganjki, zato tej prevladajo. Vseeno obstaja možnost, da preživijo tudi transformirani poganjki, za katere pa obstaja majhna verjetnost, da jih odkrijemo, predvsem zaradi številčnosti netrasformiranih poganjkov. V tem naenkrat primeru pridemo do velikega števila poganjkov, ki jih je potrebno testirati ter preveriti uspešnost transformacije in tu bi lahko uporabili ne-destruktivni histokemični GUS test, saj naj bi glede na opisane lastnosti omogočal enostavno in hitro testiranje velikega števila poganjkov. Problem destruktivnega GUS testa za številčne poganjke je prevsem v mikropagraciji poganjkov pred testom, s čimer si zagotovimo dovolj materiala tako za GUS test kot tudi za morebitno PCR analizo in v primeru ugotovitve uspešne transformacije še za nadaljnjo gojenje na gojišču, kar pa predstavlja ogromno dela in porabljenega materiala ter časa. Ne-destruktivni GUS test pa ni zapleten in omogoča testiranje velikega števila regenerantov na enostaven način. Če opravljamo test v tekočem substratu, kot smo naredili v našem poskusi, lahko testiramo kar celoten poganjek, ki naj bi bil velik samo toliko, da lahko po testu samostojno raste na gojišču za mikropagracijo. To bi v praksi pomenilo, da bi lahko takoj, ko bi bili poganjki dovolj veliki za samostojno rast, opravili ne-destruktivni test. Tako bi zmanjšali čas rasti regenerantov in v krajšem času prišli do odraslih transformiranih rastlin. Pozitivni regeneranti tvorijo modro obarvanje in se tako ločijo od netransformiranih. To bi omogočalo enostavno odbiro pozitivnih regenerantov pri testu *in situ*, saj ne bi bilo potrebno paziti na sledljivost in označevanje vzorcev. Naenkrat bi testirali veliko število regenerantov, v množici vseh testiranih pa bi pozitivne/obarvane poganjke enostavno odbrali in prestavili na gojišče za rast. Če bi se ne-destruktivni histokemični GUS test, ki ga po izjavah proizvajalcev omogoča GUSPlusTM markerski sistem s plazmidom pCAMBIA1305.2, izkazal za zanesljivega na regenerantih, ki bi rasli na gojišču brez selekcije, bi bila njegova uporaba boljši način za testiranje velikega števila regenerantov, katere bi v primeru izkazovanja uspešne vgradnje transgenov lahko vzbujali naprej v odrasle rastline. Potrebno pa je poudariti, da GUSPlusTM markerski gen, ki se izloča v apoplast, omogoča samo enostavnejše GUS testiranje, ki je v primeru uporabe plazmida pCAMBIA1305.2 ne-destruktivno. Avtorji novega GUSPlusTM markerskega sistema pa ne navajajo, da bi GUSPlusTM gen vplival na uspešnost transformacije, saj gre le za markerski gen, torej nam uporaba GUSPlusTM markerksega sistema ne zagotavlja višji odstotek regenerantov, ampak le boljši GUS histokemični test.

Iz rezultatov rasti transformiranih listnih izsečkov tobaka na seleksijskem in neseleksijskem gojišču je očitno, da poganjki veliko bolje uspevajo na gojišču brez selekcije. Na teh gojiščih smo opazili, da so se že po dveh tednih izsečki povečali, bili so zeleni in kazali so se prvi zametki za regenerante. Po štririh tednih smo lahko videli že veliko število poganjkov, nekateri med njimi so bili že izdolženi, z dvema ali tremi listi. Izsečki in regeneranti so bili zeleni. V nadaljevanju rastli smo opazili izjemno bujnost v rasti poganjkov, ki so bili še vedno zeleni, so močno zrasli in pognali korenine. Po 6 tednih so nekateri listni izsečki začeli rjavet in propadati. Verjetno so poganjki, ki so se na njih razvili, izsečke tako izčrpali, da ti niso mogli več zagotavljati hranil iz gojišča in so zato propadli. Preživele izsečke pa so poganjki v celoti prerasli in pognali svoje korenine. Poganjki iz izsečkov na gojišču z rastlinsko selekcijo so kazali veliko bolj umirjeno rast, izsečki niso propadali, na posamezen izseček je zraslo manj poganjkov, ki niso rasli bujno. Higromicinska selekcija (25 mg/L) je učinkovito delovala na listne izsečke tobaka in zavirala bujno rast regenerantov.

Za preverjanje uspešnosti transformacije smo opravili ne-destruktivni histokemični GUS test. Potem ko smo poganjke porezali iz izsečkov, smo jih cele inkubirali 1 - 2 uri v substratu X-glcA na sobni temperaturi in opazovali spremembe v obarvanosti poganjkov. Pri testu se je 38,8 % poganjkov, ki so rastli na seleksijskem gojišču s 25 mg/L higromicina, obarvalo modro. Mesta obarvanja so bila v večini primerov steba oz. spodnji deli stebel, robovi listov in dna poganjkov. Le v redkih primerih se je zgodilo, da je bil modro obarvan celoten poganjek. Torej ne-destruktivni GUS test je omogočil vizualno ločevanje med testiranimi poganjki, vendar pa modra obarvanost regenerantov v večini primerov ni bila intenzivna in izrazita. Nobeden od poganjkov iz listnih izsečkov, ki so rastli na gojišču brez rastlinske selekcije, se pri testiranju ni obarval. Kljub velikemu številu testiranih poganjkov in različnim dolžinam inkubacije v substratu X-glcA, pri enem testiranju celo čez noč, pri prav nobenem regenerantu nismo opazili modrega obarvanja. Poleg tega so poganjki po 14,5 tednov rasti na gojišču brez selekcije v celoti prerasli izsečke in gojišče, pognali so dolge korenine in se med sabo močno prepletli, kar je zelo oteževalo njihovo izolacijo v nepoškodovanem stanju iz izsečkov. Zaradi teh težav pri izolaciji in ker pri nobenem predhodnem testiranju kjub velikemu številu testiranih vzorcov nismo dobili pozitivnega rezultata, teh regenerantov nismo več rezali iz izsečkov in naprej ne-destruktivno testirali. Iz opisanih podatkov iz tega dela raziskave smo ugotovili, da ne-destruktivno histokemično GUS testiranje daje pozitivne rezultate samo z regeneranti, ki so rasli na gojišču s selekcijo. Na gojišču brez seleksijskega agensa z ne-destruktivnim histokemičnim GUS testom namreč nismo potrdili nobenega transformiranega poganjka. Očitno je, da je rastlinska selekcija nujno potrebna za regeneracijo transformiranih poganjkov. Iz rezultatov ne-destruktivnega GUS histokemičnega testa smo sklepali, da med testiranimi poganjki, ki so rasli na gojišču brez selekcije, ni bilo uspešno transformiranih.

Te ugotovitve, da GUS negativni testirani poganjki, ki so rasli na gojišču brez selekcije, niso transformirani, pa dupleks PCR analiza ni potrdila. Namreč pri teh GUS negativnih regenerantih, ki so rasli na gojišču brez selekcije, sta se od petih testiranih pri dveh namnožila oba fragmenta za transgena, in sicer fragment dolžine 163 bp (markerski gus^{Ssp} gen) in fragment dolžine 641 bp (selekcijski $hptII$ gen), pri enem vzorcu pa se je namnožil samo fragment dolžine 641 bp (selekcijski $hptII$ gen), markerski gus^{Ssp} pa ne. Namnožen fragment za posamezen gen pomeni, da se je transgen vgradil v genom. GUSPlusTM gen se torej pri dveh od petih testiranih vzorcih, ki so rasli na gojišču brez rastlinske selekcije in so bili GUS negativni, ni vgradil v genom tobaka, pri treh preostalih vzorcih pa očitno ni bil aktivен, saj je PCR analiza pokazala vključitev gena v genom. Slaba ali sploh odsotna ekspresija vključene tuje DNA je lahko posledica pleiotropskih efektov transgena (mesto vključitve v kromoosm – pozicijski efekt, število kopij transgena), somaklonske variabilnosti regeneriranih transformiranih rastlin in okoljskih vplivov na promotorje. Za $hptII$ gen nismo opravili fenotipske analize na teh regenerantih, torej testiranja rasti poganjkov na gojišču s selekcijo, zato ne moremo reči, ali je bil gen v primeru vgradnje v genom tudi aktiven. PCR analiza je potrdila prisotnost DNA fragmenta za $hptII$ gen pri dveh testiranih vzorcih od petih.

Pri regenerantih, ki so rasli na gojišču s selekcijo in so bili pri nedestruktivnem histokemičnem GUS testu pozitivni, smo pri vseh s PCR pregledanih poganjkih določili fragmenta dolžine 163 bp (markerski gus^{Ssp} gen) in dolžine 641 bp (selekcijski $hptII$ gen). Fenotip teh regenerantov smo potrdili z genotipom. Pri poganjkih, ki so bili pri GUS testiranju negativni, a so kljub temu rasli na gojišču s selekcijo, pa smo vključenost v genom določili le pri šestih vzorcih od devet PCR pregledanih. V teh primerih je bil očitno aktivен le $hptII$ gen, ki je omogočal rast regenerantov na selekcijskem gojišču, gus^{Ssp} gen pa ni bil aktiven, zato so bili GUS rezultati testiranja negativni. Verjetno je spet prišlo do utišanja gus^{Ssp} gena, kot se je zgodilo tudi že v prejšnjih primerih naše raziskave, ko smo s PCR potrdili vgradnjo transgena, ki pa fenotipsko ni bil aktiven. Zanimivo pa je bilo, da pri treh regenerantih, ki so bili GUS negativni, a so rasli na selekcijskem gojišču, s PCR analizo nismo potrdili vgradnje $hptII$ gena v genom, a so uspevali na gojišču z antibiotikom. Da nimajo vgrajenega GUSPlusTM gena ni bilo nenavadno, saj smo na to lahko sklepali že iz negativnega GUS rezultata pri testiranju GUS fenotipa, drugače pa je z $hptII$ genom, ki naj bi samo transformiranim regenerantom omogočal rast na selekcijskem gojišču. Tej regeneranti glede na PCR rezultat niso bili transformirani, a so vseeno rasli na selekcijskem gojišču z antibiotikom higromicinom. Očitno se je v teh primerih zgodilo, da so poganjki »pobegnili« selekciji, verjetno zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic.

Iz rezultatov poskusa fenotipskega in genotipskega testiranja GUSPlusTM markerskega gena v plazmidu pCAMBIA1305.2 za ne-destruktivno histokemično GUS testiranje lahko

zaključimo, da je bila vključenost gus^{Ssp} gena v genom tobaka prisotna pri 75 % testiranih regenerantov, ki so bili pri GUS testu pozitivni ali negativni.

Glavna slabost do sedaj pri transformacijah največkrat uporabljenega GUS testa je njegova destruktivnost. Reagenti pri testiranju celice rastlinskega tkiva tako poškodujejo, da ne preživijo. Tako moramo dejansko rastlinski material, za katerega smo se prepričali, da je zaradi izražanja markerskega gena zagotovo transformiran, zavreči. Nov GUSPlusTM markerski sistem pa naj bi zaradi ne-destruktivnosti GUS testa omogočal nadaljno rast regenerantov. Zato smo v naši raziskavi tudi preizkusili, ali ne-destruktivni test po opisu proizvajalcev omogoča nadaljnjo rast GUS pozitivnih poganjkov. Nguyen (2002) je na tobaku, navadnem repnjakovcu in rižu potrdil ne-destruktivnost novega GUS testa in uspešnost nadaljnje rasti testiranih rastlin. Rezultate svoje raziskave je bolj podrobno opisal na rižu (*Oryza sativa* L.). Nekaj dni po transformaciji z gus^{Ssp} genom (posredna metoda transformacije z *A.t.*), ki je vseboval GRP signalni peptid za izločanje encima β -glukuronidaze iz celice, je skupke neproliferiranih celic riža (kalus) testiral z ne-destruktivnim GUS testom. V kalusih so se pojavile posamezne modre pike, ki so pomenile pozitiven rezultat. Obarvan kalus je nato prestavil na trdo gojišče, v katerem se je nahajal substrat X-glcA (50 µg/mL), s katerim je opravil dodatno ne-destruktivno testiranje. Okoli kalusov so se tvorili krogi modregaobarvanja, ki so ponovno kazali na aktivnost gus^{Ssp} gena. Po dveh tednih se je nazorno videla proliferacija modrega kalusa riža, ki je bil testiran z gus^{Ssp} genom, tvorili so se zametki poganjkov. Vzporedno so riž transformirali tudi z gus^{Eco} genom, ki je vsegoval GRP signalni peptid. Po dveh tednih se kalus ni začel proliferirati, ampak je odmrl. Na primeru riža so je videlo, da nov gus gen GUSPlusTM res omogoča nadaljnjo rast po ne-destruktivnem testiranju.

Kljub temu, da smo v naši raziskavi uspešnost nadaljnje rasti po ne-destruktivnem histokemičnem GUS testu preizkušali na tobaku, ki je dvokaličnica, rastlinski material pa ni bil kalus, ampak poganjki iz listnih izsečkov, smo prišli do podobnih rezultatov, in sicer, da nov gus gen GUSPlusTM res omogoča nadaljnjo rast po ne-destruktivnem testiranju. Poganjke iz listnih izsečkov smo ne-destruktivno testirali v približno mesečnem razmiku. Po testiranju smo pozitivne (obarvane) regenerante sprali v destilirani vodi, nato pa jih prestavili na T1 gojišče za mikropagacijo. V enakomernih časovnih presledkih smo spremljali, kaj se s poganjki dogaja in na koncu zabeležili število preživelih poganjkov. Za preživel poganjek smo označili tistega, ki ni propadel, ni pa nujno, da je razvil liste in korenine. Poganjkov, ki so rasli na gojišču z rastlinsko selekcijo in so bili GUS pozitivni, je preživilo 57, 6 %. Poganjkov, ki so prav tako rasli na gojišču s selekcijo, a bili GUS negativni, pa je preživilo še nekoliko več, in sicer 61,9 %. Obarvanih poganjkov iz gojišča brez selekcije ni bilo, od neobarvanih poganjkov pa ni propadel nobeden, preživelost je bila 100 %. Nguyen (2002) ne poroča o odstotku uspešnosti nadaljnje regeneracije testiranega kalusa riža. Ne glede na to, na kakšen način je bil poganjek obarvan (listni robovi, steblo, celoten list ali celoten poganjek), je modro obarvanje tekom aktivne rasli

poganjka izginilo, kar je verjetno posledica delovanja metabolizma poganjkov, ki so substrat X-glcA, ki je razpadel v modri precipitat, razgradili in uspešno rasli naprej. V primeru, ko poganjek na gojišču ni rasel, a tudi ni propadel, pa modro obarvanje ni izginilo. Mogoče je, da poganjki, ki so ostali modri in niso razgradili barve, ravno zaradi tega razloga niso mogli rasti, saj jih je nerazgrajen produkt GUS testa oviral pri regeneraciji. Iz tega smo sklepali, da ima modro obarvanje določene negativne vplive na rast poganjkov. Opazili smo tudi, da so večji, nekoliko bujnejši poganjki, po opravljenem testu z rastjo nadaljevali v večih primerih kot pa majhni poganjki. Sklepali smo, da je čas izolacije in s tem velikost oz. bujnost poganjkov iz izsečkov pomemben dejavnik za uspešnost nadaljnje rasti. Videli smo, da je nadaljnja rast ne-destruktivno testiranih poganjkov mogoča. Kljub izpostavljanju mladih poganjkov, ki so bili stari do enega meseca, reagentom GUS testa, so posamezni poganjki pokazali določeno stopnjo odpornosti in s predstavljenou uspešnostjo nadaljevali rast.

Velika verjetnost, da je rastlinski material transformiran, je rast na selekcijskem gojišču, kjer transformiran rastlinski material izkazuje odpornost na antibiotik ali herbicid. V teh primerih se GUSPlusTM markerski sistem uporablja samo kot testni gen za preverjanje vgradnje želenega gena. Cilj uporabe GUSPlusTM markerskega sistema z vključenim *gus^{Ssp}* genom za ne-destruktivno testiranje bi lahko bil ne samo potrjevanje uspešnosti transformacije, ampak tudi zamenjava selekcijskih genov z uporabo *gus^{Ssp}* gena tako markerskega kot tudi selekcijskega gena. Razlikovanje med transformiranimi in netransformiranimi celicami bi temeljilo na pozitivni selekciji. Ideja o uporabi *gus* gena za pozitivno selekcijo pa ni nova. *Gus* gen so že uporabili v pozitini selekciji. V gojišče je bil dodan neaktivni citokinin glukuronid. Transformirane rastlinske celice, ki so imele vključen in aktiven *gus* gen, so lahko omenjen substrat pretvorile v aktivni citokinin, ki je stimuliral njihovo regeneracijo, netransformirane celice pa so se ustavile v razvoju (Chawla, 2009). Pozitivna selekcija bi lahko tudi bila, da bi *gus^{Ssp}* gen zagotavljal transformiranim celicam prednost v rasti na gojišču, ki bi vsebovalo določen substrat, ki bi bil edini vir sladkorja in bi transformiranim poganjkom mogočal normalno rast, netransformirani poganjki pa bi na tem gojišču stradali. V principu bi bilo mogoče izolirati samo obarvane celice, t.j. GUS pozitivne, in jih naprej gojiti na gojišču, če bi uporabili kulturo v suspenziji ali protoplaste. Veliko teže bi bilo to storiti npr. na kalusu riža ali izsečkih tobaka. Zato bi se v tem pogledu odbira transformantov s pozitivno selekcijo bolje obnesla. Kot možna substrata se omenjata citokinin-glukuronid in CBA kislina (cellobiouronic acid) (Nguyen, 2002). Pozitivna selekcija bi zamenjala negativne učinke negativne selekcije (antibiotiki in herbicidi v gojišču), kot je npr. toksično okolje, ki ga povzročajo odmrle netransformirane celice. Prav tako pa bi se tudi izognili polemičnim razpravam v javnosti o možnih negativnih učinkih uporabe antibiotikov in herbicidov kot selekcijskih agensov in genov za njihovo odpornost.

5.2 SKLEPI

Pri primerjavi plazmidov pCAMBIA1301 in pCAMBIA1305.1 smo najprej opazovali regeneracijo poganjkov. Med regeneranti listnih izsečkov tobaka, transformiranimi s plazmidoma pCAMBIA1301 (vsebuje gus^{Eco} markerski gen) in pCAMBIA1305.1 (vsebuje gus^{Ssp} ali GUSPlusTM markerski gen), nismo opazili vizualnih razlik med regeneranti ali negativnih vplivov plazmidov na regeneracijo poganjkov na selekcijskem gojišču s 25 mg/L antibiotika higromicina. Plazmida sta transformantom omogočala, da so rasli na selekcijskem gojišču, saj smo v kontrolnem poskusu z netransformiranimi listnimi izsečki tobaka videli, da antibiotik higromycin uniči netransformirane izsečke, ki ne sprejmejo genskega konstrukta iz plazmidov z odpornostjo na selekcijski agens.

Pri destruktivnem histokemičnem GUS testiranju poganjkov, ki so bili okuženi z *A. t.*-pCAMBIA1301, smo določili 22,9 % transformiranih regenerantov, pri transformaciji z *A. t.*-pCAMBIA1305.1 pa 32,2 %. Uspeh transformacije je torej nekoliko večji pri *A. t.*-pCAMBIA1305.1 transformantih, ki so bili tudi intenzivneje in izraziteje modro obarvani. Iz podatkov naše analize lahko potrdimo, da nov gus^{Ssp} (GUSPlusTM) gen iz plazmida pCAMBIA1305.1 intenzivneje obarva testirana tkiva kot pa do sedaj najbolj pogosto uporabljen gus^{Eco} gen iz plazmida pCAMBIA1301. Zaradi boljše obarvanosti tkiv in višjega odstotka transformiranih poganjkov lahko pCAMBIA1305.1 GUSPlusTM markerski sistem označimo kot bolj učinkovit v primerjavi s pCAMBIA1301 GUS markerskim sistemom.

Z dupleks PCR reakcijo sta se pri regenerantih, transformiranimi z *A. t.*-pCAMBIA1301 oz. z *A. t.*-pCAMBIA1305.1, ki so se pri destruktivnem histokemičnem GUS testiranju obarvali modro, namnožila fragmenta tako za markerski gus gen kot tudi za selekcijski $hptII$ gen. S tem smo pokazali, da so se fenotipski znaki obeh genov pojavili zaradi njune vgradnje v genom tobaka. Pri vseh GUS negativnih regenerantih (razen pri enem), transformiranimi z *A. t.*-pCAMBIA1301 oz. *A. t.*-pCAMBIA1305.1, smo prav tako določili vgradnjo obeh genov v genom tobaka. Rast na selekcijskem gojišču je dokazovala aktivnost $hptII$ gena, pri gus genu pa je verjetno prišlo do utišanja gena, zato se fenotipko ni izražal. Pri enem GUS negativnem vzorcu, ki je kljub temu rasel na gojišču z rastlinsko selekcijo, smo določili vgradnjo $hptII$ gena, ne pa tudi gus gena. Razlog za ta pojav, ko se en gen vgradi in izraža, drugi pa ne, bi bil lahko v nastanku himernega tkiva.

Rastlinska selekcija je nujno potrebna za regeneracijo transformiranih poganjkov oz. za izražanje fenotipa transgenov. Z GUSPlusTM markerskim sistemom, ki ima na plazmidu pCAMBIA1305.2 gus^{Ssp} gen, ki omogoča izločanje encima β -glukuronidaze v izvencelični prostor in s tem ne-destruktivni histokemični GUS test, v nobenem primeru kljub fenotipski GUS analizi številnih poganjkov, ki so rastli na gojišču brez selekcijskega antibiotika, nismo opazili pozitivnih regenerantov. Čeprav smo iz rezultatov ne-

destruktivnega GUS histokemičnega testa sklepali, da med testiranimi poganjki, ki so rasli na gojišču brez selekcije, ni bilo uspešno transformiranih, je dupleks PCR analiza pokazala, da sta se fragmenta dolžin 163 bp (markerski *gus^{Ssp}* gen) in 641 bp (selekcijski *hptII* gen) namnožila pri dveh od petih testiranih, pri enem vzorcu pa se je namnožil samo fragment dolžine 641 bp. Torej vgradnja transgenov v genom se je v določenih primerih vseeno zgodila, čeprav tega za *gus^{Ssp}* markerski gen fenotipsko nismo opazili, testa izražanja *hptII* gena za potrditev aktivnosti gena pa nismo opravili. GUSPlus™ markerski sistem s plazmidom pCAMBIA1305.2, v katerem je vgrajen *gus^{Ssp}* markerski gen, bolje deluje na regenerantih, ki rastejo na gojišču s selekcijo.

Odstotek transformiranih regenerantov glede na GUS ne-destruktivni test je bil 38,8 %. Pri teh GUS pozitivnih poganjkih iz gojišča s selekcijo smo z dupleks PCR analizo potrdili vključenost obeh genov v genom. Pri GUS negativnih poganjkih iz gojišča s selekcijo pa se v treh od devetih primerov fragmenta za nobenega od genov nista namnožila. GUS negativen test je bil v tem primeru jasen rezultat, da se *gus^{Ssp}* ni vgradil v genom in zato tudi ni izražal, pri ostalih vzorcih, ko je bil gen vgrajen, a neaktiv, pa smo sklepali na utišanje transgena kot na razlog neizražanja. Nenavadno je bilo, da pri treh vzorcih nismo določili vgradnje *hptII* gena v genom, a so vseeno rasli na selekcijskem gojišču. Očitno se je v teh primerih zgodilo, da so poganjki »pobegnili« selekciji, verjetno zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic.

Pri genotipski analizi fenotipsko izraženih lastnosti markerskega in selekcijskega transgena smo v nekaterih primerih opazili pojav, ko se fenotip ni ujemal z genotipom. To velja za selekcijski *hptII* gen, za katerega se je v določenih primerih izkazalo, da kjub njegovi odsotnosti v rastlinskem genomu poganjki vseeno rastejo na selekcijskem gojišču. V nobenem primeru pa se ni zgodilo, da bi bil regenerant pri GUS testiranju (destruktivnem ali ne-destruktivnem) pozitiven, a se fragment za *gus* gen v PCR reakciji ne bi namnoževal. Za *gus* gen smo opazili, da so brez izjeme GUS pozitivni regeneranti tobaka vedno samo tisti, ki imajo v svoj genom vgrajen *gus* gen.

Nadaljnja rast GUS pozitivnih, z ne-destruktivnim testom testiranih poganjkov, je mogoča. Nguyen (2002) je hipotezo potrdil na rižu, v naši raziskavi pa smo določili 57,6 % preživetje poganjkov, ki so rasli na gojišču z rastlinsko selekcijo in so bili GUS pozitivni; 61,9 % je bilo preživelih poganjkov, ki so prav tako rasli na gojišču s selekcijo, a bili GUS negativni in 100 % je preživelo tistih GUS negativnih poganjkov, ki so rasli na gojišču brez selekcije. Starost poganjkov in s tem njihova velikost ter razraslost ima vpliv na uspešnost rasti poganjka po testiranju. Večji in bujnejši poganjki so z rastjo nadaljevali v večih primerih kot pa majhni poganjki, z manj listov. Pri poganjkih, ki so kazali intenzivno rast po GUS testiranju, je modro obarvanje izginilo. Pri poganjkih, ki po testiranju niso rasli, pa obarvanje ni izginilo. Sklepali smo, da je obarvanje povezano z uspešnostjo

nadaljnje rasti. Za potrditev te hipoteze bi bilo potrebno opraviti dodatne raziskave uspešnosti rasti regenerantov po ne-destruktivnem histokemičnem GUS testu.

V naši raziskavi smo preizkušali tri različne markerske gene na treh različnih binarnih plazmidih za dva različna histokemična testa. Rezultati histokemičnih testov so pokazali, da smo pri transformacijah z *A. t.* glede na podatke iz literature dosegli relativno visoke odstotke transformiranih regenerantov tobaka (22'9 % za *gus^{Eco}* gen iz plazmida pCAMBIA1301, 32'2 % za *gus^{Ssp}* gen iz plazmida pCAMBIA1305.1 in 38'8 % za *gus^{Ssp}* gen iz plazmida pCAMBIA1305.2). Vidimo, da je bil najvišji odstotek transformantov dosežen z *gus^{Ssp}* genom iz plazmida pCAMBIA1305.2. Gre za GUSPlus™ markerski sistem, ki je v naši raziskavi edini omogočal ne-destruktivni histokemični GUS test. Ostala dva GUS markerska sistema sta omogočala destruktivni GUS test. Poudariti je treba, da destruktivnega in ne-destruktivnega testa med sabo ne moremo neposredno primerjati. Čeprav uporabljamo enak substrat, je okolje, v katerem substrat reagira z encimom, med obema testoma zelo različno. Tudi rezultati, t.j. modra obarvanja, med testoma niso primerljivi. Ne-destruktivni GUS test je omogoča vizualno ločevanje med testiranimi poganjki, vendar pa modra obarvanost regenerantov v večini primerov ni intenzivna in izrazita. Pri destruktivnem testu dobimo bolj intenzivno modra obarvanja, ki se po rastlinskem tkivu razporedijo v različnih vzorcih in na različnih mestih (žile, medžilni prostor, listni pecelj, listni rob, trihom). Zaradi naštetih razlogov iz opravljenih poskusov ne moremo zaključiti, kateri GUS markerski sistem izmed preizkušenih v naši raziskavi je absolutno najboljši. So pa Chen in sod. (2010) v svoji raziskavi transformacije trajnega prosa (*Panicum virgatum*) z metodo kvantitativnega fluoromeričnega testa 3 dni starih kalčkov primerjali med sabo GUSPlus™ gena iz plazmidov pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2 (prijet GRP signalni peptid). Čeprav lahko rastlinski material po transformaciji s plazmidom pCAMBIA1305.2 testiramo GUS ne-destruktivno, so v raziskavi vse kalčke testirali destruktivno, da so omogočili razmere za primerjavo. Ugotovili so, da je večjo aktivnost izkazoval *gus^{Ssp}* gen iz plazmida pCAMBIA1305.2. Razlog temu je izločanje encima izven celice. Namreč *gus^{Ssp}* gen iz pCAMBIA1305.1 se akumulira v citosolu, zato pride do barvne reakcije z nekolikšnim zamikom (po 7 dneh od končane kokultivacije kalčkov z *A. t.*), medtem ko so modro obarvanje kalčkov, transformiranih s pCAMBIA1305.2, videli že po 3 dneh. Plazmid pCAMBIA1305.2 se je v primeru GUS testiranja uspešnosti transformacije kalčkov trajnega prosa izkazal za boljši markerski sistem plazmida pCAMBIA1305.1. GUSPlus™ gen, ki kodira encim za izločanje v apoplast, bi lahko tako kljub možnosti ne-destruktivnega GUS testa učinkovito uporabili za destruktivni test. Tudi pri novem GUSPlus™ markerskem sistemu obstajajo prednosti kot tudi pomanjkljivosti. Kateri GUS markerski sistem bi se odločili uporabiti v določeni raziskavi, v kateri bi uporabljali metodo genske transformacije, bi bilo odvisno predvsem od tipa raziskave in verjetno ne toliko od samega GUS markerskega sistema.

Glede zanesljivosti posameznega GUS markerskega sistema lahko zaključimo, da je najbolj zanesljiv *gus^{Eco}* gen na plazmidu pCAMBIA1301, saj je PCR analiza pokazala, da je bila vključenost *gus^{Eco}* gena v genom tobaka prisotna pri 100 % testiranih regenerantov, ki so bili pri GUS testu pozitivni ali negativni. Sledi mu *gus^{Ssp}* gen iz plazmida pCAMBIA1305.1, ki omogoča destruktiven GUS test. Vključenost *gus^{Ssp}* gena v genom tobaka smo določili pri 95 % testiranih poganjkov, ki so bili pri GUS testu pozitivni ali negativni. Najmanj, le pri 75 % testiranih regenerantov, ki so bili pri GUS testu pozitivni ali negativni, smo določili vključenost *gus^{Ssp}* gena iz plazmida pCAMBIA1305.2 v genom tobaka.

Naša raziskava treh različnih GUS markerskih sistemov je bila opravljena na tobaku, ki je zelo primerna testna rastlina, dovetna za genske transformacije in uspešno ter hitro raste v tkivni kulturi. Regeneracija iz koščkov lista je hitra, regenerira se veliko poganjkov. GUSPlus™ je nov markerski sistem, ki omogoča destruktivno in tudi ne-destruktivno histokemično GUS testiranje. V naši raziskavi smo pokazali, da GUSPlus™ markerski sistem na tobaku dobro deluje, saj smo z različnimi analizami preverili tako fenotip kot tudi genotip *gus* gena v tobaku. Novost GUSPlus™ markerskega sistema, ki do sedaj še ni bila v večji meri v literaturi razložena in smo jo v naši nalogi poskušali raziskati, je predvsem ne-destruktivnost GUS testa in uspešna nadaljnja rast pozitivnih testiranih poganjkov tobaka. Nguyen (2002) je uspešnost GUSPlus™ markerskega sistema pokazal na rižu, navadnjem repnjakovcu in tudi na tobaku. Vprašanje pa je, kako bi GUSPlus™ gen, ki omogoča ne-destruktivno histokemično GUS testiranje in rast po testiranju, deloval na rastlinah, ki imajo že v osnovi težave pri regeneraciji tkiv. Ali bi transformirana GUS pozitivna tkiva po opravljenem ne-destruktivnem testu res uspešno rasla tudi naprej? Bi izločanje GUS encima v izvencelični prostor oviralo transformirane celice pri njihovem metabolizmu, celični signalizacij in rasti? Kateri so negativni učinki ne-destruktivnega histokemičnega GUS testa, ki se lahko pojavijo šele pri mikropagraciji testiranih poganjkov? Gotovo obstaja še mnogo nerešenih vprašanj o uspešnosti novega GUSPlus™ markerskega sistema, ki bo verjetno predmet raziskovanja in izpopolnjevanja tudi v bodoče.

6 POVZETEK

Markerski geni ali testni geni so nepogrešljivo orodje pri genskih transformacijah rastlin, saj omogočajo vizualizacijo transformantov in s tem potrditev uspešnosti transformacije oz. vgraditev želenih genov skupaj z markerskim genom v genom rastline. Markerski geni izboljšujejo metode transformacije, saj lahko vgradnjo transgenov v rastlinski genom vizualno zaznamo in tako odberemo transformirane rastline od netransformiranih. V rastlinah doslej največ uporabljen markerski sistem je *gus* markerski gen, ki temelji na bakterijskem *gus* genu iz *E. coli*.

V naši raziskavi smo opravili študijo lastnosti in primerjave treh GUS markerskih sistemov. Preizkušali smo že uveljavljen GUS markerski sistem z *gus^{Eco}* genom na plazmidu pCAMBIA1301, ter nov GUS sistem, ki so ga proizvajalci poimenovali GUSPlus™ in je razdeljen na dva dela: na *gus^{Ssp}* gen iz plazmida pCAMBIA1305.1, ki omogoča samo destruktivni histokemični GUS test ter na *gus^{Ssp}* gen iz plazmida pCAMBIA1305.2, ki omogoča ne-destruktivni histokemični GUS test in možnost nadaljnje rasti rastlinskega materiala po testiranju. GUSPlus™ markerski sistem ima *gus* gen izoliran iz bakterije *Staphylococcus* sp., ki je bil umetno optimiziran z izbiro kodonov za izražanje encima β -glukuronidze v rastlinah.

Želeli smo preveriti, kako markerski geni delujejo v testni rastlini tobaku. Liste tobaka kultivarja Havana 38 smo okuževali z 4404LBA sojem *A. t.* in vsemi tremi plazmidi (pCAMBIA1301, pCAMBIA1305.1 in pCAMBIA1305.2) po nekoliko prirejeni metodi po Horsch in sod. (1985). Liste smo kokultivirali z *A. t.* tri dni z dodatkom acetosiringona (100 μ M) v gojišču. Potem smo liste dvakrat sprali v raztopini antibiotika timentina (200 mg/L) in jih prenesli na gojišče za regeneracijo, ki je vsebovalo selekcijski antibiotik higromicin, ki je predstavljal rastlinsko selekcijo, ali pa v gojišče nismo dodali selekcijskega agensa (za namen raziskave delovanja enega izmed GUS genov). V gojišču se je nahajal tudi timentin (150 mg/L), ki je po koncu transformacije uničil bakterije *A. t.*. Z inkubacijo netransformiranih listnih izsečkov tobaka na selekcijskem gojišču smo videli, da je rastlinska selekcija uspešna, saj so izsečki zaradi delovanja antibiotika propadli.

Aktivnost *gus* gena smo preverili s histokemičnim GUS testom. Primerjalni destruktivni histokemični GUS test smo opravili na poganjkih, ki so bili transformirani s plazmidom pCAMBIA1301 (vsebuje *gus^{Eco}* gen) ali plazmidom CAMBIA1305.1 (vsebuje *gus^{Ssp}* gen). Za plazmid pCAMBIA1301 je bil odstotek transformiranih regenerantov tobaka 22'9 %, za plazmid pCAMBIA1305.1 pa 32'2 %. Poganjki, transformirani z *A. t.*- pCAMBIA1305.1, so pri GUS testu razvili bolj izrazito in intenzivnejšo modro barvo. Obarvali so se listne žile, medžilni prostor ali cele listne ploskve. Glede učinkovitosti smo zaradi višjega odstotka transformiranih poganjkov in intenzivnejšega modrega obarvanja poganjkov

GUSPlusTM markerski sistem na plazmidu pCAMBIA1305.1 označili kot bolj učinkovit markerski sistem od »starega« GUS markerskega sistema z *gus*^{Eco} genom.

Z dupleks PCR analizo smo pri vseh GUS pozitivnih regenerantih destruktivnega testa, ki so rasli na gojišču s selekcijo, potrdili vključenost obeh pričakovanih PCR fragmentov v genom. GUS negativni regeneranti so prav tako vgradili v genom oba gena, od katerih pa je bil aktiven le selekcijski gen, ki je izsečkom omogočal rast na selekcijskem gojišču. GUS gen se ni izražal. V enem primeru regeneranta, ki je glede na PCR rezultat v genom vgradil samo selekcijski gen in ga tudi izražal, *gus* gena pa ne, smo po našem mnenju naleteli na himerni poganjek.

Na poganjkih, ki so bili transformirani s plazmidom pCAMBIA1305.2, ki vsebuje *gus*^{Ssp}, smo opravili ne-destruktivni histokemični GUS test. Opazili smo očitno razliko tako v rasti kot tudi v molekularni analizi med poganjki, ki so rasli na gojišču s selekcijo in med poganjki, ki so rasli na gojišču brez selekcije. Pri GUS ne-destruktivnem testiranju se od slednjih nobeden ni obarval. Z dupleks PCR analizo smo med temi vseeno videli tudi takšne vzorce, ki so imeli oba gena ali pa le enega, vgrajena v svoj genom. Kljub vgradnji pa na gojišču brez selekcije ni prišlo do izražanja. Pri poganjkih, ki so rasli na gojišču s selekcijo, sta se pri PCR reakciji od GUS pozitivnih namnožila oba pričakovana fragmenta. Nasprotno pa je bilo pri GUS negativnih poganjkih nekaj vzorcev tudi takšnih, ki transgena niso vključili v svoj genom. Odstotek transformiranih regenerantov, ki so rasli na gojišču s selekcijo, je bil glede na rezultate GUS ne-destruktivnega testa, 38,8 %. Z rezultati PCR analize pa lahko z gotovostjo trdimo samo, kateri regeneranti niso transformirani. Z analizo po Southernu bi prišli do rezultatov, iz katerih bi zagotovo videli, ali je nek poganjek transformiran ali ne ter v koliko ponovitvah je transgen prisoten v genomu gostitelja.

Nguyen (2002) je v svoji raziskavi na rižu, navadnjem repnjakovcu in tobaku potrdil, da rastlinska tkiva po ne-destruktivnem testu uspešno rastejo naprej. V naši raziskavi smo na gojišče za mikropropagacijo prestavili poganjke tobaka, ki so se pri ne-destruktivnem GUS testiranju obarvali. Na ta način smo preizkušali regeneracijo transformiranega rastlinskega materiala po ne-destruktivnem testu. 100 % je bilo preživetje neobarvanih poganjkov, ki so rasli na gojišču brez selekcije. Toda za njih ne vemo, ali so bili transformirani ali ne. 61,9 % je bilo preživelih poganjkov, ki so rasli na gojišču s selekcijo, a bili GUS negativni. 57,6 % pa je preživelo modro obarvanih poganjkov, ki so rasli na selekcijskem gojišču, kar priča o tem, da je nadaljna rast GUS pozitivnih, z ne-destruktivnim testom testiranih poganjkov, mogoča.

7 VIRI

Barampuram S., Zhang Z.J. 2011. Recent advances in plant transformation. Methods in Molecular Biology, 701: 1-35

Beltrán J., Prías M., Al-Babili S., LadinoY., López D., Beyer P., Chavarriaga P., Tohme J. 2010. Expression pattern conferred by a glutamic acid-rich protein gene promoter in Weld-grown transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Planta, 231: 1413–1424

Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acids Research, 12, 22: 8711-8721

Bhat S.R., Srinivasan S. 2002. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. Plant Science, 163: 673- 681

Bohanec B. 2004. Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 1-28

Cambia. 2011. Mednarodna raziskovalna organizacija. Brisbane, Avstralija.
<http://www.cambia.org/daisy/cambialabs/home.html> (10.avg.2011)

CERA. 2011. GM crop database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C.
http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database (17.avg.2011)

Chawla H.S. 2009. Introduction to plant biotechnology. 3rd edition. Enfield, NH, USA, Science Publishers: 698 str.

Chen Y., Lu L., Deng W., Yang X., McAvoy R., Zhao D., Pei Y., Luo K., Duan H., Smith W., Thammina C., Zheng X., Ellis D., Li Y. 2006. In vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Euonymus alatus*. Plant Cell Reports, 25: 1043–1051

Chen X., Equi R., Baxter H., Berk K., Han J., Agarwal S., Zale J. 2010. A high - throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings. Biotechnology for biofuels, 3: 9

Corrado G., Karali M. 2009. Inducible gene expression systems and plant biotechnology. Biotechnology Advances, 27: 733–743

Day C.D., Lee E., Kobayash J., Holappa D., Albert H., Ow D.W. 2002. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes & Development*, 14: 2869-2880

Fernandez-Cornejo J., Caswell M. 2006. The first decade of genetically engineered crops in the United states. An electronic report from the Economic research service. USDA: 36 str.
<http://www.ers.usda.gov/publications/eib11/eib11.pdf> (5.avg.2011)

Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R.M. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 152–158

Fisher D.K., Guiltinan M.J. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 3: 278-289

Francke U. 1976. The human gene for β -glucuronidase is on chromosome 7. *The American Journal of Human Genetics*, 28: 357-362

Gelvin S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 16-37

Gilissen L.J.W., Metz P.L.J., Stiekema W.J., Nap J.P. 1998. Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Research*, 7: 157-163

Gurskaya N.D., Fradkov A.F., Terskikh A., Matz M.V., Labas Y.A., Martynov V.I., Yanushevich Y.G., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. 2001. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Letters*, 507: 16-20

Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 10: 446-451

Henry R.J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. London, Chapman & Hall: 258 str.

Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6: 271-282

Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223: 496-498

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231

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

James C. 2010. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. Ithaca, New York, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>
(4.avg.2011): 30 str.

Javornik B. 2004. Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 29-58

Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsht D. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 8447-8451

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907

Jefferson R.A. 1993. Plant promoter β -glucuronidase gene construct. United States Patent USPTO 5 268 463

Jefferson R.A., Mayer J. 2000. Microbial β -glucuronidase genes, gene products and uses thereof. World intellectual property organization WO 00/55333

Jia H., Pang Y., Chen X., Fang R. 2006. Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a tobacco mosaic virus vector through agroinfection. *Transgenic Research*, 15: 375–384

Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani – Kmetijstvo*, 59: 63-66

Lakshmi S.G., Sreenivas G.L., Bhattacharya A. 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 4, 3-4: 189-195

Lee L.Y., Gelvin S.B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiology, 146: 325-332

Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zaraisky A.G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S.A. 2000. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. Journal of Biological Chemistry, 275: 25879-25882

Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A radical approach. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 16: 47-51

Matzke M.A., Matzke A.J.M. 1995. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? Plant Physiology, 107: 679-685

Matzke M.A., Matzke A.J.M. 1996. Stable epigenetic states in different plant cells: Implication for somaclonal variation and gene silencing in transgenic plants. V: Epigenetic mechanisms of gene regulation. Russo V.E.A., Martienssen R.A. (eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 377-392

Matzke M.A., Matzke A.J.M. 1998. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. Cellular and Molecular Life Sciences, 54: 94-103

Meyers B., Zaltsman A., Lacroix B., Kozlovsky S.V., Krichevsky A. 2010. Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges. Biotechnology Advances, 28: 747-756

Miki B., McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. Journal of Biotechnology, 107: 193-232

Nguyen T.A. 2002. An improved reporter system based on a novel β -glucuronidase (GUS) from *Staphylococcus* sp. Doctoral dissertation. Canberra, The Australian National University: 135 str.
<http://www.cambia.org/daisy/cambialabs/3707.html> (20.avg.2011): 135 str.

Ow D.W. 2002. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. Plant Molecular Biology, 48: 183-200

- Ow D.W., Jacobs J.D., Howell S.H. 1986. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 84: 4870-4874
- Park S.H., Rose S.C., Zupata C., Srivatanakul M., Smith R.N. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34, 2:117-121
- Philip R., Darnowski D.W., Sundararaman V., Cho M.J., Vodkin L.O. 1998. Localization of β -glucuronidase in protein bodies of transgenic tobacco seed by fusion to an amino terminal sequence of the soybean lectin gene. *Plant Science*, 137: 191–204
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233
- Rao A.Q., Bakhsha A., Kiania S., Shahzada K., Shahida A.A., Husnaina T., Riazuddin S. 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27: 753-763
- Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276: 1558-1560
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22: 1567-1572
- Stewart C.N. 2006. Go with the glow: Fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotechnology*, 24: 155-162
- Stewart Jr.C.N., Richards H.A., Halfhill M.D. 2000. Transgenic plants and biosafety: science, misconceptions and public perceptions. *BioTechniques*, 29: 832-843
- Škof S. 2008. Izražanje markerskih genov pri hmelju (*Humulus lupulus* L.) in tobaku (*Nicotiana tabacum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 119 str.
- 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*, 23: 6767-6770

Tanaka N., Matsui C. 1991. Transient expression of *lacZ* gene in protoplast of *Orychophragmus violaceus*. Plant Tissue Culture Letters, 8, 2: 73-81

Thomasset B., Menard M., Boetti H., Denmat L.A., Inze D., Thomas D. 1996. β -Glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic tobacco cells: specific elimination of plant inhibitors and minimization of endogenous GUS background. Plant Science, 113: 209-219

Tzfira T., Citovsky V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 17: 147 – 154

Vickers C.E., Xue G.P., Gresshoff P.M. 2003. A synthetic xylanase as a novel reporter in plants. Plant Cell Reports, 22: 135–140

Wallace B.D., Wang H., Lane K.T., Scott J.E., Orans J., Koo J.S., Venkatesh M., Jobin C., Yeh L.A., Mani S., Redinbol M.R. 2010. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. Science, 330: 831-835
<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3K46> (17.avg.2011)

Wang K. 2006. *Agrobacterium* protocols. Second edition. Human Press Inc., Totowa, New Jersey, USA: 508 str.
http://www.superkuh.com/library/Biology/Agrobacterium/Agrobacterium%20Protocols_%202nd%20Ed_%20Volume%20I_%20Kan%20Wang_%202006.pdf
(24.avg.2011)

Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO Journal, 2, 12: 2143-2150

Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambyski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. The Plant Journal, 23, 1: 11-28

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Bohancu za mentorstvo in prof. dr. Maji Ravnikar za pregled diplomske naloge.

Zahvala gre tudi asistentki dr. Jani Murovec, ki je bila idejni vodja mojega dela in mi je v preteklem študijskem letu kjub odstotnosti veliko pomagala im me usmerjala. Jana, iskrena hvala za vse nasvete, razlage in pomoč v laboratoriju, kadar sem to potrebal.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, kjer sem opravljal diplomsko nalogo, za sodelovanje tekom trajanja diplomskega poskusa. Še posebej hvala Nataši Hren za vso tehnično pomoč, Aljažu za izvedbo PCR in moji Vesni za pomoč pri izolaciji DNA ter prenašanje mojega razpoloženja med pisanjem diplome.

Velika zahvala pa gre moji družini, ki mi je med študijem vedno stala ob strani in me na vse načine podpirala.