

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Darija KOS

**UPORABA KOMETNEGA TESTA ZA ODKRIVANJE
KEMIČNIH IN VIRUSNIH POŠKODB DNA PRI KROMPIRJU
(*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE APPLICATION OF COMET ASSAY FOR THE
DETECTION OF CHEMICAL AND VIRAL DAMAGE
IN POTATO
(*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Pretežni del praktičnega dela diplomske naloge je bil opravljen na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani, na oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, računalniško podprta analiza kometnega testa pa na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, na Oddelku za zootehniko, na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobio biotehnologijo.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof.dr. Romano Marinšek-Logar. Za recenzentko je bila imenovana prof.dr. Maja Ravnikar.

Mentorica: prof.dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Recenzentka: prof.dr. Maja RAVNIKAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof.dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof.dr. Romana MARINŠEK-LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof.dr. Maja RAVNIKAR
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Darija Kos

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 575.153:632.38:633.491(043)=863
KG krompir/ protoplasti/ virus PVY^{NTN}/ Benzo(a)piren/ kometni test/
genotoksičnost/poškodbe DNA
AV KOS, Darija
SA MARINŠEK-LOGAR, Romana (mentorica)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2008
IN UPORABA KOMETNEGA TESTA ZA ODKRIVANJE KEMIČNIH IN VIRUSNIH
POŠKODB DNA PRI KROMPIRJU (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 45 str., 10 pregl., 20 sl., 52 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V diplomskem delu smo ugotavljali genotoksičnost pri vzorcih krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée s kometnim testom. Želeli smo preveriti vpliv genotoksičnega policikličnega aromatskega ogljikovodika benzo[a]pirena in vpliv krompirjevega virusa PVY^{NTN} na rastlinsko DNA. Vodikov peroksid (H₂O₂) je služil kot pozitivna kontrola pri obeh poskusih. Benzo[a]pirenu smo izpostavili protoplaste, celice brez celične stene. Uporabili smo dve različici kometnega testa: nevtralnno nevtralni (N/N) in alkalno nevtralni (A/N) postopek. Kvantitativna analiza genotoksičnih poškodb je bila izvedena z računalniškim programom Komet 5. Pri celicah, izpostavljenih benzo[a]pirenu, smo opazili močno povečano stopnjo genotoksičnosti v primerjavi z negativno kontrolo. S poskusi nismo dokazali od koncentracije odvisnega genotoksičnega odgovora pri benzo[a]pirenu. Pri protoplastih pridobljenih iz neokuženih rastlin in iz rastlin okuženih s krompirjevim virusom PVY^{NTN} so rezultati pokazali trend povečane poškodbe DNA pri z virusom okuženih rastlinah. V vseh primerih je kot negativna kontrola služil fosfatni pufer PBS. Ugotovili smo, da je kometni test dovolj občutljiva metoda za ugotavljanje poškodb dednine pri rastlinah, ki jih povzročajo kemični dejavniki.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 575.153:632.38:633.491(043)=863
CX potato/ protoplasts/ virus PVY^{NTN} / Benzo[a]pyrene/ Comet assay/genotoxicity/ DNA damage
AU KOS, Darija
AA MARINŠEK-LOGAR, Romana (supervisor)/RAVNIKAR, Maja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI THE APPLICATION OF COMET ASSAY FOR THE DETECTION OF CHEMICAL AND VIRAL DAMAGE IN POTATO (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée)
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 45 P., 10 tab., 20 fig., 52 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of this graduation thesis was to determine the genotoxicity of potato *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée samples by Comet assay. We wanted to examine the influence of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene and influence of potato virus Y (PVY^{NTN}) on plant DNA. The protoplasts, cells without cell wall, were exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as positive control in both experiments. Two different protocols of comet assay were performed: the neutral denaturation / neutral gel electrophoresis (N/N) variant and alkaline denaturation / neutral gel electrophoresis (A/N) variant. The quantitative analyses of DNA damage were carried out by computer programme Komet 5. Cells exposed to benzo[a]pyrene showed highly increased DNA damage compared to negative control. No dose response effect has been proved for benzo[a]pyrene. The results showed increased DNA damage in cells infected with virus, compared to healthy, noninfected cells. Phosphate buffered saline (PBS) was used as negative control in all experiments. The results show that Comet assay is sensitive enough to detect the DNA damage in plants, caused by chemical agents.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA..... | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION..... | IV |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | VII |
| KAZALO SLIK..... | VIII |
| TABELA OKRAJŠAV / KRATIC..... | X |
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA | 1 |
| 1.2 HIPOTEZA | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV..... | 3 |
| 2.1 KROMPIR <i>Solanum tuberosum</i> L.cv. Desirée | 3 |
| 2.2 BENZO[A]PIREN (Benzo[a]pyrene) | 3 |
| 2.3 KROMPIRJEV VIRUS Y ^{NTN} | 8 |
| 2.4 VODIKOV PEROKSID H ₂ O ₂ | 9 |
| 2.5 PROTOPLASTI | 10 |
| 2.6 KOMETNI TEST | 10 |
| 2.6.1 Osnovni koraki kometnega testa | 11 |
| 3 MATERIALI IN METODE..... | 13 |
| 3.1 RASTLINSKI MATERIAL | 13 |
| 3.1.1 Priprava gojišča MS za razmnožitev rastlin krompirja | 14 |
| 3.1.2 Razmnoževanje rastlin | 15 |
| 3.2 PROTOPLASTIRANJE | 15 |
| 3.2.1 Priprava rastlinskega tkiva in encimska razgradnja | 15 |
| 3.2.2 Čiščenje protoplastov | 16 |
| 3.2.3 Preverjanje živosti protoplastov | 17 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3 | KOMETNI TEST: | 18 |
| 3.3.1 | Priprava minigelov na mikroskopskih objektivih | 19 |
| 3.3.2 | Izpostavitve celic genotoksičnim dejavnikom | 20 |
| 3.3.3 | Spiranje celic v elektroforetskem pufru | 22 |
| 3.3.4 | Elektroforeza | 23 |
| 3.3.5 | Nevtralizacija | 23 |
| 3.3.6 | Barvanje z etidijevim bromidom | 23 |
| 3.3.7 | Ocenjevanje poškodb DNA z merjenjem kometnih parametrov | 24 |
| 3.3.8 | Statistična analiza rezultatov | 25 |
| 4 | REZULTATI..... | 27 |
| 4.1 | Rezultati vpliva benzo[a]pirena pri alkalno nevtralnem postopku | 27 |
| 4.2 | Rezultati vpliva okužbe virusa pri nevtralnem postopku | 31 |
| 4.3 | Ocena živosti protoplastov | 33 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 37 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 37 |
| 5.1.1 | Rastlinski material (<i>Solanum tuberosum</i> L.cv. Desirée) | 37 |
| 5.1.2 | Vpliv benzo[a]pirena na poškodovanost jedrne DNA | 38 |
| 5.1.3 | Vpliv virusa PVY ^{NTN} na poškodovanost jedrne DNA | 39 |
| 5.1.4 | Protoplastiranje in ocena živosti protoplastov | 41 |
| 5.1.5 | Kometni test in rastline | 42 |
| 5.2 | SKLEPI | 43 |
| 6 | POVZETEK | 44 |
| | LITERATURA..... | 46 |
| | ZAHVALA..... | 52 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Sestava sestavin za MS gojišče..... | 14 |
| Preglednica 2: Sestava raztopin za protoplastiranje | 16 |
| Preglednica 3: Sestava in koncentracija Na-K PBS; pH= 7,2-7,4 | 19 |
| Preglednica 4: Sestava raztopin za nevtralno in alkalno lizo | 22 |
| Preglednica 5: Sestava kemikalij za pripravo elektroforetskega pufra | 22 |
| Preglednica 6: Dunnov test; statistična analiza rezultatov A/N postopka | 27 |
| Preglednica 7: Dunnov test; statistična analiza rezultatov A/N postopka | 28 |
| Preglednica 8: Dunnov test; statistična analiza rezultatov A/N postopka | 29 |
| Preglednica 9: Dunnov test; statistična analiza rezultatov N/N postopka | 32 |
| Preglednica 10: Dunnov test; statistična analiza rezultatov N/N postopka | 33 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|------------------------------|
| Slika 1: benzo[a]piren (Pradhan P., 2001) | 4 |
| Slika 2: Benzo[a]piren diol epoksid (Pradhan P., 2001)..... | 6 |
| Slika 3: Pretvorba B[a]P do depoksida in vezava na DNA (Karle in sod., 2004) | 7 |
| Slika 4: Nalaganje benzo[a]piren diol epoksida na DNA (Pradhan P., 2001)..... | 7 |
| Slika 5: Komet, nastal pri protoplastu krompirja zaradi potovanja DNA proti anodi | 11 |
| Slika 6: Rastline krompirja <i>S. tuberosum</i> L. cv. Desirée v tkivni kulturi stare 5 tednov..... | 13 |
| Slika 7: Shema poskusov | 18 |
| Slika 8: Elektroforeza; nastajanje kometov | 23 |
| Slika 9: Analiza slike z računalniškim programom Komet 5 | 24 |
| Slika 10: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée zdravih rastlin izpostavljenih 400µM H ₂ O ₂ in 0,5% DMSO. | 27 |
| Slika 11: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée zdravih rastlin izpostavljenih 400µM H ₂ O ₂ , 0,5% DMSO in 10µg/ml B[a]P. | 28 |
| Slika 12: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée zdravih rastlin, izpostavljenih 400µM H ₂ O ₂ , 10µg/ml B[a]P in 20 µg/ml B[a]P. | Error! Bookmark not defined. |
| Slika 13: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée zdravih rastlin (PVY-) in okuženih s PVY ^{NTN} (PVY+). | 31 |
| Slika 14: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée zdravih rastlin (PVY-) in okuženih s PVY ^{NTN} (PVY+). | 32 |
| Slika 15: Nepoškodovana celica neokuženega (PVY-) krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée v vzorcu za negativno kontrolo obdelana z negativno negativnim postopkom..... | 34 |
| Slika 16: Komet nastal v nevtralnem postopku po obdelavi celice z H ₂ O ₂ (pozitivna kontrola) krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée, okuženega z virusom PVY ^{NTN} | 34 |
| Slika 17: Celica krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desirée izpostavljena 0,5% DMSO v alkalno nevtralnem postopku | 35 |

- Slika 18: Komet nastal po obdelavi celice krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée z alkalno nevtralnimi postopkom z 10mg/ml B[a]P 35
- Slika 19: Komet nastal po obdelavi celice krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée z alkalno nevtralnimi postopkom z 20mg/ml B[a]P 36
- Slika 20: Kometi zaradi nejasne slike in prevelike poškodovanosti neprimerni za analizo ... 36

TABELA OKRAJŠAV / KRATIC

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| A/N | alkalno nevtralni |
| B[a]P | benzo[a]piren |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| EDTA | etilendiaminotetraocetna kislina |
| FDA | fluorescein diacetat |
| N/N | nevtralno nevtralni |
| PBS | kalij-natrijev fosfatni pufer |
| PVY ^{NTN} | krompirjev virus Y ^{NTN} |

1 UVOD

V evolucijskem procesu okolje povzroča spreminjanje dednega materiala v celicah. S človeško dejavnostjo se te spremembe še povečujejo. Spremembe genotipa pa niso odvisne samo od okolja, temveč so lahko dedne, in lahko ali pa tudi ne povzročijo spremenjeno delovanje celic. Spremembe dednine v večini primerov za organizem niso koristne, zato se skozi daljše časovno obdobje obdržijo le tiste, ki izboljšajo prilagoditev nekega organizma na spreminjajoče se okolje.

Zapis dednega materiala v molekuli dezoksiribonukleinske kisline (DNA) ima več vrst popravljalnih mehanizmov, ki varujejo celico pred propadom ali spremembo delovanja celice. Ti mehanizmi prevelikih napak ne morejo odpraviti, manjše pa lahko celo spregledajo, takrat pride do propada ali spremenjenega delovanja celic.

Za odkrivanje poškodb DNA uporabljamo moderne molekularne metode, med katere spada tudi kometni test. Do sedaj so ga uporabljali predvsem za živalske celice in evkariontske mikroorganizme, v zadnjem času pa tudi za celice rastlin, predvsem korenin in listov. Zaradi njenih prednosti jo nekateri laboratoriji uporabljajo celo v diagnostične namene, predvsem v farmacevtski industriji.

1.1 NAMEN DELA

Za nekaj vrst rastlinskih celic že obstajajo različice kometnega testa, predvsem so uporabni postopki s celičnimi jedri. V tem delu bomo optimizirali in preizkusili kometni test, prilagojen za protoplaste, rastlinske celice brez celične stene. Izpostavili jih bomo dvema toksičnima kemikalijama benzo[a]pirenu in vodikovemu peroksidu in ju primerjali z negativno kontrolo. Statistično značilne razlike v poškodovanosti DNA celic, ki so bile izpostavljene genotoksičnemu dejavniku v primerjavi z negativno kontrolo, bodo jasno dokazovale genotoksično delovanje uporabljenih kemikalij. Primerjalno bomo tudi ugotavljali genotoksičnost pri zdravih protoplastih krompirja in pri protoplastih z virusom Y^{NTN} okuženih

rastlin. Z različnimi modifikacijami in optimizacijo lahko tak test kasneje uporabimo za različne diagnostične in raziskovalne namene.

1.2 HIPOTEZA

Glede na objavljene rezultate nekaterih raziskav poškodb rastlinske jedrne DNA, ki so jih dokazali s kometnim testom, predvidevamo, da bomo to metodo lahko uporabljali za odkrivanje poškodb dednine pri krompirju (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée).

Pričakujemo povečano stopnjo poškodovanosti DNA pri celicah krompirja, izpostavljenim okužbi s krompirjevim virusom PVY^{NTN} in genotoksičnemu dejavniku benzo[a]pirenu .

Predvidevamo tudi, da bi s kometnim testom lahko dokazali poškodovanost jedrne DNA, ki jo pri krompirju predvidoma lahko povzroči biotski stres ali kemični dejavnik.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR *Solanum tuberosum* L.cv. Desirée

Krompir je pomembno živilo v prehrani ljudi. Spada v družino *Solanaceae* (razhudnikovke). Rastlina je zelnata z razvejanim stebлом, škrlatnimi cvetovi, pernato deljenimi listi in odebeljenimi podzemnimi gomolji.

Gomolji vsebujejo škrob, velike količine vitaminov A, B1, B2, C in K, rudnine (predvsem kalij) in zelo majhne količine atropinskih alkaloidov. Ena od lastnosti teh alkaloidov je zaviranje izločanja prebavnih sokov, tudi kisline pri človeku. Na začetku 16. stoletja so španski osvajalci Novega sveta prinesli krompir v Evropo, vendar so gomolji postali pomemben vir hrane šele v 18. stoletju (Petauer, 1993).

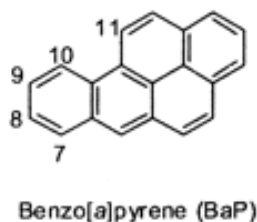
Cveti julija in avgusta, plod je češnji podobna jagoda zelene barve, ki hrani v dveh predelih mnogo semen. Vse vrste rodu *Solanum* vsebujejo solanin, alkaloid s steroidno zgradbo ki je strupen (Taiz in Zeiger, 2002). Krompir vsebuje okoli 80 % vode, 17% ogljikovih hidratov, 1,7 % beljakovin, izredno malo maščob 0,1% in okoli 1% mineralnih snovi. Ima visoko hranilno vrednost (100g vsebuje 320 kJ) (Petauer, 1993).

Nizozemska sorta Desirée spada med srednje pozne sorte, s svetlo rumenim mesom in rdečim ovojem. Gomolji so veliki, podolgovato ovalni, globina očesc je precej plitva. Vsebnost DNA v genomu je večinoma konstantna. Sorta je dovzetna na virusno okužbo z PVY^{NTN}, pojavijo se lokalna in sistemska bolezenska znamenja, ki pa niso izrazita.

2.2 BENZO[A]PIREN (Benzo[a]pyrene)

Čeprav je benzo[a]piren dobro znana genotoksična snov, je malo znanega o razsežnosti njegovega vpliva na rastlinske celice. Spada med policiklične aromatske ogljikovodike (PAH-polycyclic aromatic hydrocarbons), ki so zelo razširjeni v naravnem okolju. Ker so lipofilni, se

akumulirajo v lipidnih slojih rastlin in živali in tako vstopajo v prehranjevalno verigo (Schwab, 1998). Raztaplja se v acetonu, DMSO ali kloroformu. Ima veliko molekulsko maso in je sestavljen iz petih benzenovih obročev.



Slika 1: Benzo[a]piren (Pradhan, 2001)

S citogenetskimi testi so ugotovili da je genotoksičen za živali in rastline (Aina, 2006). Benzo[a]piren je močno mutagen in karcinogen PAH. Pokazali so, da inducira genetske mutacije, kromosomske aberacije in ima genotoksične vplive v *in vitro* in *in vivo* raziskavah (Li in sod., 1996).

Prisoten je v cigaretnem dimu, pri izgorevanju lesa, v izpušnih plinih dizelskih motorjev, v zraku urbanega okolja, motornem olju, v nekaterih vrstah procesirane hrane, premogu, asfaltu, industriji aluminija, kuhinjskih pečicah in livarnah jekla (Hattemer-Frey, 1991). Benzo[a]piren ni karcinogen sam po sebi, ampak potrebuje metabolno aktivacijo celice do elektrofilnih metabolitov ki stopijo v interakcijo z DNA. To sta benzo[a]pyrene diol-epoksid (BPDE) in kisikove reaktivne zvrsti (ROS). Ti metaboliti se kovalentno vežejo na DNA in jo poškodujejo (Li in sod., 1996). Če poškodb zaradi preobsežnosti celični popravljalni mehanizmi ne morejo popraviti, vodi to k enojnim prelomom DNA in mutacijam, predvsem transverzijam G→T in A→T (Eastman in Barry, 1992). Metabolizem poteka predvsem preko citokroma P₄₅₀. Pri ljudeh največ benzo[a]pirena pride v telo s hrano, predvsem z žiti, olji, maščobami, sadjem, dimljenim mesom, zelenjavo in morskno hrano. Iz onesnaženih tal pridejo PAH v rastline in posledično v prehranjevalno verigo (Kulhanek in sod., 2005).

PAH so bili odkriti v vseh rastlinah, ki so rastle v kontaminiranih tleh, vendar je bila njihova koncentracija nizka v primerjavi s koncentracijo v tleh. Z naraščanjem koncentracije PAH v

tleh pa je naraščala tudi koncentracija v rastlinah. Razporeditev PAH v različnih delih rastlinskega tkiva pa nam kaže, da je največji vnos visokomolekularnih PAH v rastlino preko korenin in nizkomolekularnih PAH preko atmosfere v liste (Lin in sod., 2007). Po drugi strani pa hrana bogata s flavonoidi ščiti pred različnimi oblikami raka predvsem z antioksidativnim delovanjem in preko inhibicije nekaterih izoform citokromov P₄₅₀, ki so odgovorni za biotransformacijo prokarcinogena benzo[a]pirena v karcinogen (Ferlan in Sollner Dolenc, 2006).

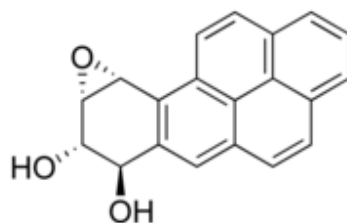
Citokromi P₄₅₀ (CYP) oksidirajo široko paleto ksenobiotikov, posebno hidrofobnih. Substratom uvajajo hidroksilno skupino in jih naredijo bolj polarne. Napolarni se namreč nabirajo v celici in ovirajo delovanje celice. Zaradi citokromov P₄₅₀ se ne nabirajo in jih telo lažje izloči (Ferlan in Sollner Dolenc, 2006). Benzo[a]piren pri ljudeh z vezavo na receptor inducira poddružino 1A citokromov P₄₅₀. Benzo[a]piren je že sam po sebi rahlo karcinogen produkt, v katerega ga katalizira CY P₄₅₀ pa je še bolj karcinogen. Kljub temu poškodba celice ni nujna, citokrom P₄₅₀ doda oz. izpostavi funkcionalne skupine, tako naredi molekulo bolj polarno in prepoznavno za dodatne encimske sisteme, ki skrbijo za detoksifikacijo (Ferlan in Sollner Dolenc, 2006).

Mehanizem reakcije, ki jo katalizira citokrom P₄₅₀ še do danes ni povsem pojasnjen. Hipoteza, ki danes velja je, da gre za večstopenjski reakcijski mehanizem, kjer se substrat najprej reverzibilno veže na encim, in se nato preko več intermediatov oksidira (Ferlan in Sollner Dolenc, 2006). CYP so značilni za nekatere bakterije, glive, rastline, žuželke in sesalce. Citokromi P₄₅₀ so encimi hem proteinov ki katalizirajo oksidacijo strukturno različnih molekul endogenega in eksogenega izvora. Tisti ki so vključeni v metabolizem endogenih substratov, so specifični pri izbiri substrata, medtem ko CYP eksogenega metabolizma lahko metabolizirajo veliko število različnih substratov. Uvrščamo jih med monooksigenaze, saj eno molekulo kisika vgradijo v substrat, drugo pa v vodo (Debeljak, 2002).

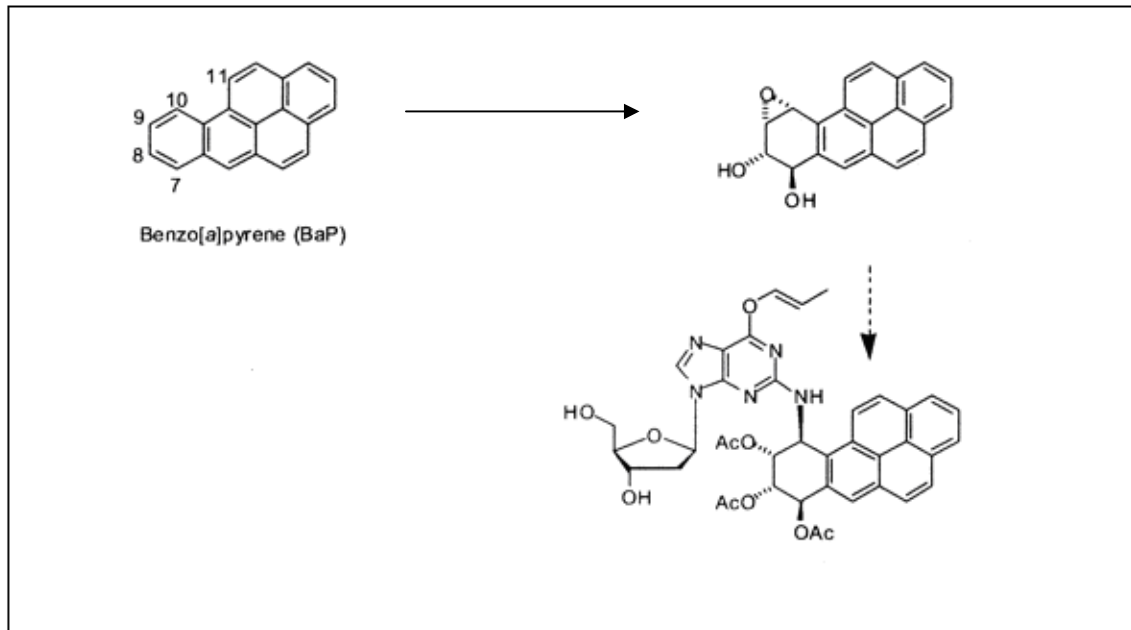
Benzo[a]piren se najprej metabolizira do epoksida. Tvorba epoksidov iz policikličnih aromatskih ogljikovodikov in njihov metabolizem pa vodi do nastanka visoko reaktivnih produktov (Garry in sod., 2004). Mehanizem delovanja benzo[a]pirenovih metabolitov in

kisikovih reaktivnih zvrsti (ROS), ki so posledica oksidacije benzo[a]pirena preko citokromov, je pri živalih in rastlinah podoben, vendar za živali vedo, kateri encimi so vključeni v proces, pri rastlinah pa še niso točno znani (Aina, 2006).

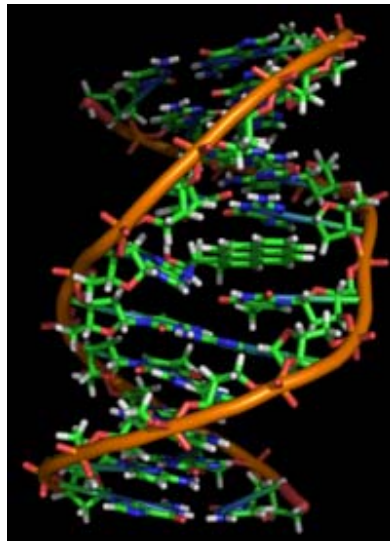
Nekatere bakterije npr. *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 bi lahko uporabili za bioremediacijo oz. fitoremediacijo benzo[a]pirena v tleh. Rastejo v rizosferi korenin in uporabljajo eksudate rastline kot vir ogljika in energije. Bakterija *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 lahko metabolizira nekatere PAH, med njimi tudi benzo[a]piren. Z rastjo bakterije na eksudatih rastline so opazili zmanjšanje koncentracije benzo[a]pirena v tleh (Rentz in sod., 2005).



Slika 2: Benzo[a]piren diol epoksid (Pradhan, 2001)



Slika 3: Pretvorba B[a]P do epoksida in vezava na DNA (Karle in sod., 2004)



Slika 4: Nalaganje benzo[a]piren diol epoksida na DNA (Pradhan, 2001)

2.3 KROMPIRJEV VIRUS Y^{NTN}

Med gojenimi rastlinami ima krompir največ boleznih in škodljivcev. Krompirjev virus Y (potato virus Y = PVY) pripada rodu *Potyvirus* in družini Potyviridae, ki tvori največjo znano in ekonomsko najpomembnejšo družino rastlinskih virusov. Razširjen je po celem svetu in ima širok krog gostiteljev, med katerimi so tudi žita, paradižnik, poper in tobak (Brunt in sod., 1996). Spada med RNA viruse brez ovojnice.

Nov sev virusa PVY, ki povzroča močno izražene nekrotične obročke na krompirjevih gomoljih, pripada nekrotični skupini PVY. Akronim tega novega seva je PVY^{N(ew) T(uber) N(ecrosis)}, torej PVY virus z novo nekrozo na gomoljih. Sev PVY^{NTN} sta opisala (Beczner in sod., 1984; Le Romancer in sod., 1994). Bolezen obročkasta nekroza krompirjevih gomoljev (PTNRD) prepoznamo po površinskih lokih in obročkih okrog oči, ki so najprej izbočeni, nato pa udrti in nekrotični. Prenašajo ga listne uši, redkeje se prenaša z dotikom (Kus, 1995). PVY^{NTN} naj bi nastal z rekombinacijo izolatov PVY^O in PVY^N (Kogovšek in sod., 2006).

V Sloveniji je ta bolezen izbruhnila leta 1988 in se razširila na različne sorte krompirja in tudi na druge rastline iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*), zlasti na papriko in paradižnik. (Kus, 1995). Krompirjev virus Y^{NTN} je najbolj prizadel sorto 'Igor', ki je tedaj predstavljala največjo pridelavo krompirja v Sloveniji. V treh letih po izbruhu boleznih so to sorto prenehali pridelovati (Kus, 1995).

Ker se rastline na virusno okužbo različno odzovejo, naj bi bila interakcija med virusom in rastlino specifična. Vrste krompirja lahko glede na odziv razdelimo na tri skupine: občutljive sorte, ki izražajo bolezenska znamenja, tolerantne sorte, kjer so bolezenska znamenja slabše izražena in odporne sorte, ki ne razvijejo bolezenskih znamenj (Ravnikar, 1995). Sorta 'Igor' je na ta virus zelo občutljiva, sorta 'Desirée' je manj občutljiva, medtem ko je sorta 'Sante' proti virusu odporna. Po okužbi z virusom PVY^{NTN} se je povečala količina jasmonske kisline pri sorti 'Desirée' (Milovanović Jarh, 2004). Opazili pa so, da je občutljivost rastlin pogojena z okoljem, saj so bile sorte, ki so *in vivo* zelo občutljive, *in vitro* zelo odporne in obratno (Ravnikar, 1991). Občutljive sorte krompirja, okužene s PVY^{NTN} so v *in vitro* razmerah

manjše od zdravih rastlin, stebelni meristemi so manjši z manj celicami, prav tako je v stebelnem meristemu manjša mitotska aktivnost kot v zdravih rastlinah. Znižana je tudi količina fotosintetskih pigmentov, spremenjen je metabolizem in sestava citokininov (Milavec in sod.,1999). Največ sprememb se je zgodilo pri občutljivi sorti 'Igor' ki je zelo občutljiva na okužbo z PVY^{NTN}. Pri virusni okužbi krompirja sorte Igor s PVY^{NTN} se spremeni razmerje med aktivnimi in neaktivnimi oblikami citokininov. Koncentracija aktivnih oblik pade po primarni okužbi z virusom in je trajno nizka pri sekundarno okuženih rastlinah na račun velike količine citokininskih 9-glukozidov (Dermastia in sod., 1995).

2.4 VODIKOV PEROKSID H₂O₂

Vodikov peroksid je brezbarvna tekočina s kemijsko formulo H₂O₂ in zlahka razpada na vodo in kisik. Ima močan vonj in se dobro topi v vodi ali etru. V bioloških sistemih nastaja kot stranski produkt metabolnih in katabolnih procesov v celici. Prosti kisikovi radikali, vodikov peroksid H₂O₂, superoksidni anion O₂⁻ in hidroksilni radikal OH[·] lahko nastanejo endogeno, v kloroplastih, mitohondrijih in mikrosomih med transportom elektronov po elektronski transportni verigi ali eksogeno zaradi onesnaževanja. V manjših količinah služi H₂O₂ kot obramba rastline pred patogeni, v večjih količinah pa je toksičen za celico saj lahko poškoduje celične makromolekule, kot so DNA, proteine, lipide in ogljikove hidrate. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS), inducirajo ali inhibirajo različne signalne poti, ker delujejo na proteinske kinaze, fosfataze in faktorje transkripcije. S tem spremenijo ekspresijo genov, kar povzroči različne biološke odgovore celice. Pride lahko do propada celic (nekroza, apoptoza) (Rumora in sod., 2003).

Obramba rastline pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) z antioksidanti, je lahko encimska ali neencimska. Najpomembnejši encimi so katalaze, peroksidaze, superoksid dismutaze in glutation reduktaze. Odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti poteka tudi preko askorbatno glutationske verige, karotenoidov, vitamina tokoferola (vitamina E), ali askorbinske kisline (vitamina C). Ker so katalaze glavni odstranjevalci vodikovega peroksida v rastlinah, služijo kot njegov ponor (Gichner, 2003). Vodikov peroksid lahko prehaja tudi

skozi celične membrane (Hrováthová in sod., 1998). S starostjo celic se povečuje stopnja poškodovanosti DNA, kar je povezano s katalazno aktivnostjo, ki je veliko večja v mladi kot starejši kulturi.

Poškodbe, ki jih povzroča vodikov peroksid lahko zaganamo tudi z nevtralnimi postopki kometnega testa, saj enojni prelomi sprostito superzvito DNA, ki migrira med elektroforezo (McKelvey-Martin in sod., 1993).

2.5 PROTOPLASTI

Vse rastlinske celice imajo tanko in gibko primarno celično steno. Sestavljena je iz celuloze, pektinskih polisaharidov, hemiceluloz in proteinov.

Protoplasti so rastlinske celice, ki nastanejo s popolno mehansko ali encimsko odstranitvijo celične stene. Celično steno odstranimo z uporabo ustreznih encimov, predvsem celulaz in pektinaz. Protoplasti se uporabljajo v študijah lastnosti celičnih membran in za vnos makromolekul in virusov v celico, za vnos tuje DNA pri genskem inženiringu. Celična stena namreč predstavlja oviro pri transformaciji tuje DNA. Po odstranitvi celične stene, protoplast zavzame sferično obliko zaradi površinskega pritiska plazmaleme (Šircelj, 2004).

2.6 KOMETNI TEST

V primerjavi z ostalimi klasičnimi metodami detekcije poškodb DNA, ima kometni test ali (elektroforeza posameznih celic, angl. SCGE single cell gel electrophoresis) prednost da pokaže poškodbe DNA v posameznih celicah. Je direktna, zelo občutljiva, hitra in natančna metoda, uporabna v eksperimentalne in diagnostične namene (Lah in sod., 2005). Ime je dobila po značilnih kometom podobnih 'repih' ki predstavljajo poškodovano DNA. S kometnim testom lahko odkrivamo več tipov poškodb DNA, enojne in dvojne prelome vijačnice, navzkrižne povezave, alkalno labilna mesta, ki so izražena kot enojni prelomi in enojne prelome, ki so posledica nedokončanega popravljanja napake (Hartman in sod., 2003). Uporablja se lahko za raziskave na različnih področjih, od okoljskega biomonitoringa,

toksikoloških študij v farmacevtski industriji, medicinskih raziskavah in na področju kmetijske in kemične dejavnosti (Marinšek Logar in sod., 2004)

Osnovni princip kometnega testa je potovanje poškodovane DNA v agaroznem gelu v električnem polju. DNA potuje iz jedra proti anodi (+). Jedro dobi zaradi migracije DNA obliko kometa. Okrogla 'glava' predstavlja jedrno regijo, podaljšan 'rep' pa vsebuje DNA fragmente in odvito DNA.



Slika 5: Komet, nastal pri protoplastu krompirja zaradi potovanja DNA proti anodi (Darija Kos, 2006)

Detekcija DNA migracije je odvisna od več parametrov, kot so koncentracija agaroze v gelu, čas izpostavljanja celic določenemu dejavniku, pH, temperature, voltaže, časa elektroforeze (Hartman in sod., 2003). Do sedaj je bilo razvitih več verzij kometnega testa glede na pH: nevtralnno nevtralni, alkalno nevtralni in alkalno alkalni postopek. Z nevtralnim postopkom odkrivamo predvsem dvojne prelome DNA, z alkalnim pa enojne prelome in alkalno labilna mesta. Tehnika je uporabna tudi za ovrednotenje popravila DNA. Aplikacije postopka so možne za katerekoli evkariontske celice, ki jih je možno suspendirati, kar je prav tako velika prednost. Variacije postopka za različne tipe celic objavljajo različni avtorji. Za vsak tip celic je namreč potreben malo drugačen postopek (Hartman in sod., 2003).

2.6.1 Osnovni koraki kometnega testa

Osnovni koraki protokola vključujejo pripravo celic vključenih v agarozni gel in pripravo minigelov na objektnikih. Sledi liza celic, ki osvobodi DNA, spiranje v elektroforetskem

pufri (nevtralnem ali alkalnem, odvisno od različice postopka). Elektroforeza, ki jo lahko izvedemo pri nevtralnih ali alkalnih pogojih, sproži potovanje poškodovane DNA proti anodi, kar ustvari sliko kometa. Čas trajanja elektroforeze je odvisen od kontrolnih celic. Pogoji elektroforeze morajo biti takšni, da DNA kontrolnih celic kaže nekaj migracije. Količina migracije kontrolnih celic je pomembna tudi v tistih poskusih, kjer pride do DNA-DNA ali DNA-protein navzkrižnih povezav, saj tam zasledimo zmanjšan premik DNA, glede na kontrolne celice (Hartmann in sod., 2003).

Elektroforezi sledi nevtralizacija in barvanje preparatov. Katero barvo uporabimo je odvisno od metode pregledovanja in ocenjevanja kometov. Najpogosteje uporabljamo fluorescentna barvila, kot so etidijev bromid, 4,6-diamid-ino-2-phenylindol (DAPI), SYBR Green. V uporabi je tudi nefluorescentna tehnika barvanja s srebrovim nitratom. Katera povečava mikroskopa pa je primerna za ocenjevanje kometov, je odvisno od tipa celic, dolžine kometov, omejitev mikroskopa in programa za ocenjevanje poškodb DNA (Hartmann in sod., 2003).

Za analizo mora biti ocenjenih dovolj celic, od 50 do 100 na objektnik. Priporočljivo je, da slikovna analiza vsebuje odstotek DNA v glavi in repu (odstotek migrirane DNA), dolžino repa in repni moment (Hartman in sod., 2003). Repni moment je količina migrirane DNA pomnožena z nekaterimi meritvami dolžine repa (Hartmann in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za raziskavo smo uporabili krompir *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée, ki smo ga gojili v tkivni kulturi, v rastni komori na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo. Rastline so bile izpostavljene 16-urni osvetlitvi z žarnico Osram L58W/77 z gostoto pretoka fotonov od 50 DO 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$. Temperatura v komori je bila 21°C v času osvetlitve (16 ur) in 19°C osem ur v temi. Uporabili smo neokužene, zdrave rastline za poskuse z benzo[a]pirenom. Okužene rastline z virusom PVY^{NTN} in zdrave rastline smo izpostavili vodikovemu peroksidu in jih primerjali z negativno kontrolo. Rastline smo vzgajali v epruveh, na modificiranem gojišču MS (Murashige in Skoog, 1962)



Slika 6: Rastline krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée v tkivni kulturi stare 5 tednov (Darija Kos, 2007)

3.1.1 Priprava gojišča MS za razmnožitev rastlin krompirja

Preglednica 1: Sestava sestavin za gojišče MS

| sestavine | | | KOLIČINA |
|--|-------------------|---|----------|
| M I N E R A L I | OR1 (g/l) | NH ₄ NO ₃ , KNO ₃ , MgSO ₄ *7H ₂ O KH ₂ PO ₄ CaCl ₂ *2H ₂ O mioinozitol | 100ml |
| | OR2 (mg/100ml) | MnSO ₄ *H ₂ O ZnSO ₄ *7H ₂ O H ₃ BO ₃ | 10 ml |
| | OR3 (mg/100ml) | Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O KI CuSO ₄ *5H ₂ O CoCl ₂ *6H ₂ O | 1 ml |
| | OR4 (mg/100ml) | NaFe EDTA | 10 ml |
| VITAMINI | OR5 | Glicin, nikotinska kislina, Piridoksin, tiamin | 1 ml |
| SAHAROZA 3% | | | 30 g |
| BACTO AGAR 0,8 % | | | 8 g |

V bidestilirani vodi (bidestilirana z aparatom MilliQ) smo raztopili osnovne raztopine (OR 1-5), (količina in sestava je navedena v preglednici 1), dodali smo še saharozo (Kemika 1800408), da je bila končna koncentracija 3%. Dodali smo bidestilirano vodo do končnega volumna 1 liter in dobro premešali. Nastali raztopini smo z NaOH priredili pH na 5,8. Nato smo na kuhalniku ob hkratnem mešanju v vrelo raztopino dodali še 8 gramov agarja, da smo dobili končno koncentracijo 0,8% (BactoTM Agar, Difco 214010). Ko se je raztopina zbistrila, smo po 10 ml gojišča prelili v epruvete in jih avtoklavirali pri temperaturi 121 °C in tlaku 2,3 bara (Avtoklav Gambič, tip A 500/700) . Shranjevali smo jih do 14 dni pri 10 °C .

3.1.2 Razmnoževanje rastlin

Rastline smo razmnoževali s mikropropagacijo, modernejšo tehniko za hitro razmnožitev velikega števila rastlin. To je tehnika tkivnih kultur, ki omogoča vzgojo velikega števila rastlin v izjemno kratkem času.

Iz rastlin ki so rastle v tkivni kulturi v rastnih komorah, smo izrezali posamezne nodije brez listov iz sredine rastline in jih vcepili v gojišče MS. Razmnoževanje rastlin je potekalo v sterilnih razmerah v laminariju.

3.2 PROTOPLASTIRANJE

Postopek protoplastiranja je bil povzet po Vilhar in sod. (1991).

3.2.1 Priprava rastlinskega tkiva in encimska razgradnja

Od 4-5 tednov starim rastlinam, velikim od 10-18 cm, smo odrezali liste s sredine rastline. Liste brez pecljev smo s skalpelom razrezali na 0,5 mm² velike koščke. Luč v prostoru ni bila prižgana, da ne bi svetloba povzročila še dodatnih poškodb DNA. Masa listov ki smo jo uporabili za posamezen poskus je bila okoli 0,5 g, za kar smo potrebovali od 6-8 rastlin. Razrezane liste smo prenesli v 5 ml encimske raztopine, katere sestava je prikazana v tabeli 2. Rastlinsko tkivo smo inkubirali v encimski raztopini v temi (zavijemo v alu folijo) 16-18 ur ob rahlem stresanju (100 obratov na minuto) na temperaturi 19-21 °C.

Preglednica 2 : Sestava raztopin za protoplastiranje
ST makro je 10x koncentrirana raztopina makroelementov medija A (Shepard in Totten, 1977)

| | | | | |
|---|--------------------------------------|----------|--------|---------|
| Osnovna raztopina ST makro | KNO ₃ | 1,9 g/l | Merck | 1.05063 |
| | MgSO ₄ *7H ₂ O | 0,37 g/l | Kemika | 1303406 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,17 g/l | Merck | 1.04873 |
| | CaCl ₂ *2H ₂ O | 0,44 g/l | Merck | 1.02382 |
| Encimska raztopina pH=5,7 | Saharoza | 0,3 M | Kemika | 1800408 |
| | D-manitol | 0,1 M | Kemika | 13202 |
| | MES* | 5 mM | Sigma | M-3023 |
| | ST –makro | 2ml/20ml | | |
| | Macerocim | 0,1 % | Serva | 28302 |
| | Celulaza | 0,5 % | Serva | 16419 |
| Raztopina za izpiranje protoplastov pH=5,7 | Saharoza | 0,3 M | Kemika | 1800408 |
| | MES | 5 mM | Sigma | M-3023 |
| | ST- makro | 10 ml | | |

*MES: 2- [N- morfolino]etansulfonska kislina

* ST makro: je 10 krat koncentrirana osnovna raztopina ST-medija A (Shepard in Totten, 1977).

Za 20 ml encimske raztopine raztopimo 2,054g saharoze, 0,364 g D-manitola in 0,01952g MES (2- [N- morfolino]etansulfonske kisline) v nekaj ml bidestilirane vode, dobro premešamo in dodamo 2ml ST- makro. Dodamo 0,02g macerocima in 0,1 g celulaze in bidestilirano vodo do 20 ml. Po dodatku encimov mešamo počasi in previdno. Z 0,1M NaOH uravnamo pH na 5,7.

Za 100 ml raztopine za izpiranje v bidestilirani vodi (MilliQ) raztopimo 10,27g saharoze in 0,0976 g MES, dodamo 10 ml ST-makro in vodo do 100 ml (preglednica 2).

3.2.2 Čiščenje protoplastov

Po inkubaciji smo čašo s protoplasti previdno rahlo stresli, da so se iz razgrajenega rastlinskega tkiva sprostili protoplasti. Raztopino smo filtrirali skozi najlonski filter z

velikostjo por 118 μm . Raztopino s protoplasti, ki smo jih dobili v filtratu smo prelili v stekleno centrifugirko (Babcock bottle) do 1,5 cm pod robom, pokrili in centrifugirali (centrifuga Sigma 3K18; pospešek $100 \times g$ ($100 \times 9,1 \text{ m/s}^2$), hitrost 745, rotor 11133). Centrifugirali smo pri nizkih obratih zaradi občutljivosti protoplastov. Po centrifugiranju se tvori na vrhu centrifugirke zelen prstan živih protoplastov, v usedlini pa ostanejo mrtve celice in ostanki tkiva. Prstan protoplastov v smo pobrali s pasteurjevo pipeto s širokim vratom, jih prenesli v novo centrifugirko in do 1,5 cm pod robom dolili raztopino za izpiranje protoplastov (preglednica 2). Postopek centrifugiranja smo ponovili še 2 krat. Po zadnjem centrifugiranju smo ponovno dobili na vrhu centrifugirke zelen prstan živih protoplastov. Previdno smo jih odpipetirali skupaj z okoliško raztopino do 1 ml v epruveto in zavili v alu folijo.

3.2.3 Preverjanje živosti protoplastov

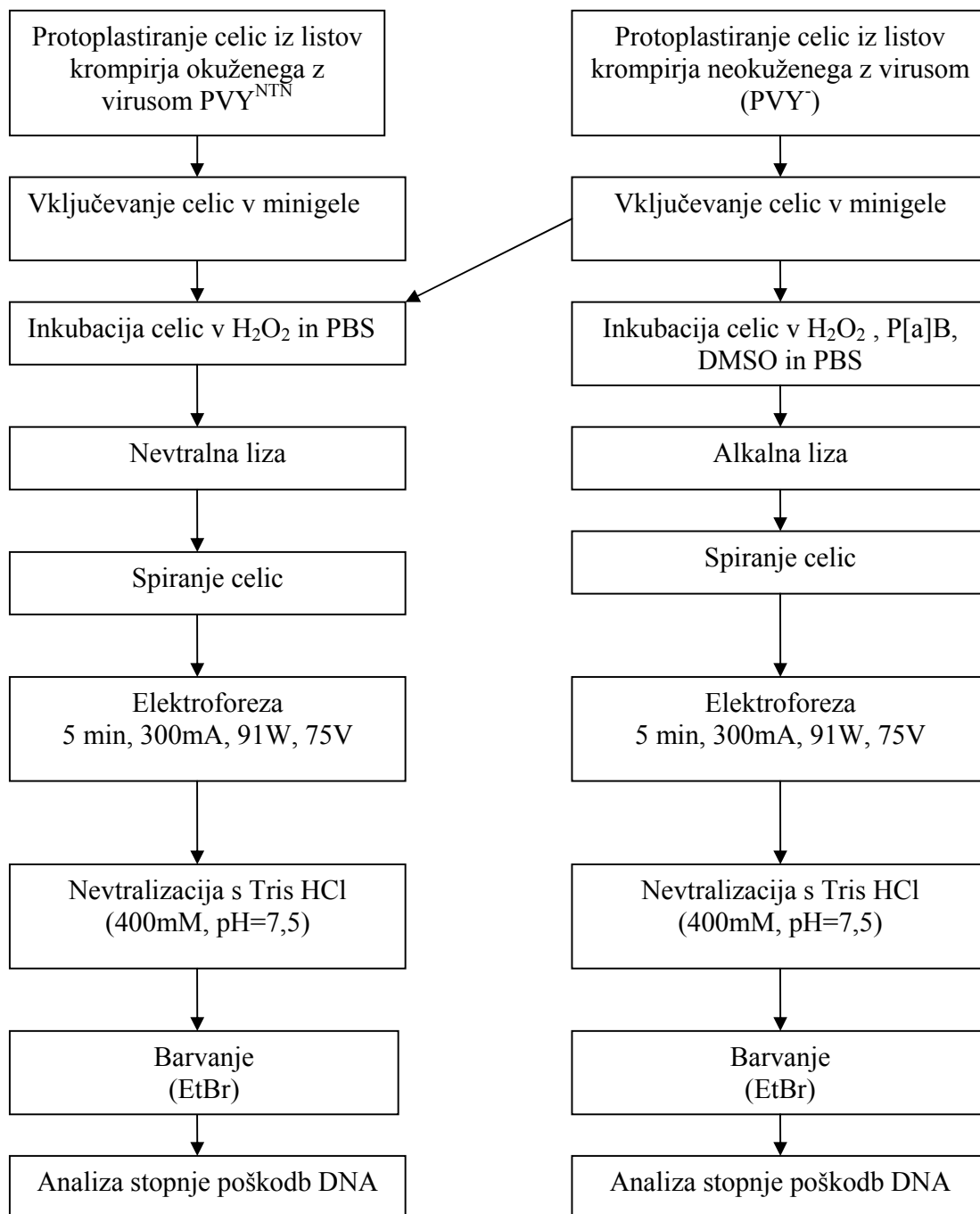
Živost celic smo preverjali fluorescein diacetatom (FDA), barvilom ki ga po vstopu v celice esteraze (v živih celicah z intaktno membrano) razcepijo v fluorescein, ki pod UV svetlobo fluorescira zeleno medtem ko mrtve celice ostanejo neobarvane.

5 mg FDA (Sigma, F-7378) raztopimo v 1 ml acetona. Iz raztopine FDA v acetonu (5 mg/ml) in raztopine za izpiranje protoplastov (preglednica 2) smo zmešali novo raztopino v razmerju 1:4, ki smo jo uporabili za barvanje protoplastov. Na mikroskopski objektnik smo kanili kapljico suspenzije protoplastov in 1 kapljico raztopine FDA. Celice smo opazovali pod mikroskopom z UV lučjo pri valovni dolžini 490nm in filtrom UVB-2A pri 520 nm pri 20 ali 40 kratni povečavi objektiva. V več vidnih poljih smo pod svetlobnim mikroskopom prešteli vse protoplaste in pod UV svetlobo žive protoplaste (fluorescirajo zeleno).

Odstotek živih protoplastov smo izračunali iz razmerja živih protoplastov in vseh protoplastov.

Postopek preverjanja živosti protoplastov smo povzeli po Žnidar, 2003.

3.3 KOMETNI TEST:



Slika 7: Shema poskusov

3.3.1 Priprava minigelov na mikroskopskih objektnikih

Na vsak objektnik smo nanesti štiri sloje agaroze z različnimi temperaturami želiranja. Vsa stekelca smo označili s kratico raztopin, katerim smo jih kasneje izpostavili (negativna kontrola, pozitivna kontrola: H₂O₂ in B[a]P). Vse sloje agaroze smo pripravili tik pred uporabo.

Priprava prvega sloja minigelov

Delovno površino smo pokrili z alu folijo in papirnatimi brisačami, na katere smo položili objektna stekelca in jih označili. Za prvi sloj smo uporabili NMP (normal melting point) agarozo (Sigma A-9539, s temperaturo želiranja pod 36°C), ki smo jo raztopili v PBS pufri, katerega sestava je prikazana v preglednici 3, v mikrovalovni pečici. Toplo raztopino smo po 400 µl 1% NMP agaroze (0,3g NMP+30 ml PBS) na objektnik razmazali s plastično razmazovalko (Flexi Strip, BiWeX N.V., Nizozemska). Razmaze smo pokrili in jih sušili od 15-18 ur na sobni temperaturi (24-26 °C).

Preglednica 3: Sestava in koncentracija Na-K PBS (Phosphate Buffered Saline); pH= 7,2-7,4

| Kemikalija | Proizvajalec | Kat.št. | Koncentracija |
|---|--------------|---------|---------------|
| NaCl | Merck | 1.06404 | 8 g/l |
| KaCl | Kemika | 11496 | 0,2 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | Merck | 1.04873 | 0,2 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O | Merck | 1.06580 | 1,15 g/l |

Priprava drugega sloja minigelov

Na prvi posušen sloj agaroznega gela smo nanesti 700 µl 0,6% tople raztopine NMP agaroze raztopljene v PBS pufri. Raztopljeno agarozo smo nanašali s pipeto in nanjo položili gladek objektnik, da se je enakomerno porazdelila po prvem sloju. Gel smo utrdili s polaganjem objektnikov na hladno ploščo za 10 minut. Po 10 minutah smo previdno odstranili gladke objektnike.

Priprava tretjega sloja minigelov

Pri delu od tretjega sloja naprej smo bili posebej previdni, delali smo v zatemnjenem prostoru, da svetloba ne bi dodatno poškodovala DNA protoplastov. Za vključevanje protoplastov v agarozno raztopino smo uporabili 0,6 % LMP agarozo (Sigma A-9414), ki ima temperaturo želiranja pod 30°C. Protoplaste smo previdno dodali raztopini agaroze v PBS-u, ki je bila ohlajena malo nad 30°C, v razmerju 1: 5 (suspenzija protoplastov: raztopina agaroze). Na posamezni objektnik smo nanašali 500 µl mešanice protoplastov v agarozni in jo enakomerno porazdelili po objektniku s polaganjem drugega gladkega objektnika. Nato smo jih za 10 minut položili na hladno ploščo, pokrite z alu folijo. Stekelca smo odmaknili s plošče in zgornje objektnike previdno odstranili.

Priprava četrtega sloja minigelov

Na tretji sloj nanese 500 µl 0,5% raztopino LMP agaroze, raztopljene v PBS pufru. Po celotnem objektniku jo enakomerno porazdelimo s polaganjem drugega gladkega objektnika, kot smo to storili pri drugem in tretjem sloju. Položimo jih na hladno ploščo za 10 minut in gladke objektnike odstranimo. Stekelca s štirimi sloji minigelov takoj položimo v različne testne raztopine.

3.3.2 Izpostavitve celic genotoksičnim dejavnikom

Imobilizirane protoplaste smo izpostavili različnim genotoksičnim dejavnikom, 0,5% dimetilsulfoksidu (DMSO, Sigma D 8418), vodikovemu peroksidu 400µM H₂O₂ v PBS-u (priprava iz H₂O₂ 30% Merck 1.07209) ki nam je služil kot pozitivna kontrola in benzo[a]pirenu 10µg/ml in 20µg/ml (Trinova M 60-114), katerega genotoksičnost smo preverjali. Za negativno kontrolo smo uporabili PBS (tabela 3). Benzo[a]piren 200 µg (v nadaljevanju B[a]P), smo raztopili v 1 ml DMSO in dodali toliko PBS, tako da smo dobili koncentraciji 10µg/ml in 20µg/ml.

Stekelca smo položili v banjice z zgoraj omenjenimi raztopinami in jih inkubirali različno dolgo. Opravili smo dva različna poskusa z več ponovitvami.

Prvi poskus (alkalno nevtralni postopek A/N)

V prvem poskusu smo uporabili protoplaste zdravih rastlin, ki smo jih izpostavili 0,5% DMSO v PBS-u (45 minut), 400 μ M H₂O₂ v PBS-u (9 minut) in 10 in 20 μ g/ml B[a]P (45 minut). DMSO smo spirali s PBS-om 15 minut in medtem 3 krat zamenjali pufer. H₂O₂ smo spirali 51 minut s PBS-om, tako da smo 3 krat zamenjali pufer, B[a]P smo spirali z 10 % DMSO 15 minut. Negativna kontrola so bila stekelca izpostavljena PBS-u 1 uro.

Alkalna liza celic

Raztopini 1 in 2 za alkalno lizo imata enako sestavo kot raztopini za nevtralno lizo 1 in 2, le da smo pH uravnali na 10 z koncentrirano HCl (sestava raztopin v preglednici 4). Minigele smo za 10 minut potopili v raztopino za alkalno lizo 1 s pH 10 in jih nato preložili v raztopino za alkalno lizo 2 s pH 10 za 45 minut. Alkalna liza je potekala pri 4 °C.

Drugi poskus (nevtralno nevtralni postopek N/N):

V drugem poskusu smo uporabili protoplaste okuženih rastlin z virusom PVY^{NTN} in protoplaste zdravih rastlin. Inkubirali smo jih v 400 μ M H₂O₂ v PBS-u, 9 minut pri 4°C. Po inkubaciji smo objektive spirali s PBS pufrom 3 krat po 5 minut. Kot negativno kontrolo smo obe vrsti protoplastov inkubirali 24 minut v PBS-u pri 4 °C.

Nevtralna liza celic

Raztopini za lizo smo pripravili na dan uporabe. Sestava raztopin je v preglednici 4. Minigele smo potopili za 10 minut v raztopino za nevtralno lizo 1, ki je vsebovala 2,5g Na-sarkozinata in 60ml 0,25M EDTA in bidestilirano vodo do 500 ml. Raztopino EDTA smo pripravili z bidestilirano vodo in z dodajanjem zrn NaOH.

Nato smo stekelca preložili za 45 minut v raztopino za nevtralno lizo 2, ki je vsebovala 2,5g Na-sarkozinata, 60 ml 0,25M EDTA, 73,1g NaCl in bidestilirano vodo da 500ml. V obeh raztopinah smo uravnali pH s koncentrirano HCl na 8,3. Priprava obeh raztopin je potekala v laminariju. Liza je potekala na sobni temperaturi od 22-24 °C.

Preglednica 4: Sestava raztopin za nevtralno in alkalno lizo

| Kemikalija | Količina | Proizvajalec | Kat.št. |
|-------------------|-----------------|---------------------|----------------|
| Na-sarkozinat | 2.5 g | Sigma | L-5777 |
| EDTA | 60 ml | Sigma | EDS |
| NaCl | 73.1 g | Merck | 1.06404 |
| Konc. HCl | | Merck | 1.00317 |
| Voda mQ | do 500ml | | |

3.3.3 Spiranje celic v elektroforetskem pufu

Od tukaj naprej sta potekala oba poskusa enako. Za spiranje minigelov smo uporabili elektroforetski puffer z nevtralnim pH, ki smo ga pripravili na dan uporabe (Sestava v preglednici 5). Stekelca smo za 15 minut položili v banjico z 500 ml elektroforetskega pufra, pri 10°C. Postopek smo ponovili še za 15 minut v drugi banjici z enakim pufrom.

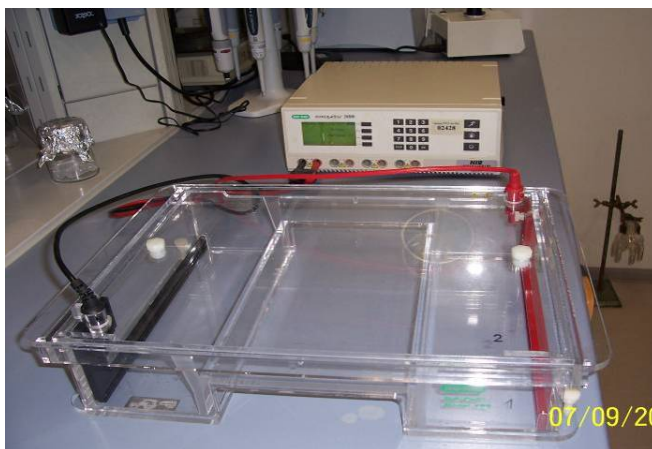
Preglednica 5: Sestava kemikalij za pripravo elektroforetskega pufra

| Kemikalija | Količina | Proizvajalec | Kat.št. |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------|
| TrisHCl | 90ml Tris-HCl založna | * | * |
| H ₃ BO ₃ | 5,56 g | Merck | 165.05 |
| EDTA | 40 ml | Sigma | EDS |
| Voda mQ | do 1000ml | | |

* založno raztopino Tris-HCL smo pripravili tako da smo raztopini Trizma base (Sigma T-6066) dodajali koncentrirano HCl (Merck 317), do pH 7,5

3.3.4 Elektroforeza

Elektroforeza je potekala pri nevtralnih pogojih, z enakim pufrom kot smo ga uporabili za spiranje v prejšnjem koraku (preglednica 5). Gladina pufra v kadi je bila 2mm nad minigeli. Stekelca smo položili na desno stran bliže anodi. Elektroforeza je potekala 5 minut, pri napetosti 75V in električnem toku 300mA, moči 91W in temperaturi 10 °C.



Slika 8: Elektroforeza; nastajanje kometov (Darija Kos, 2007)

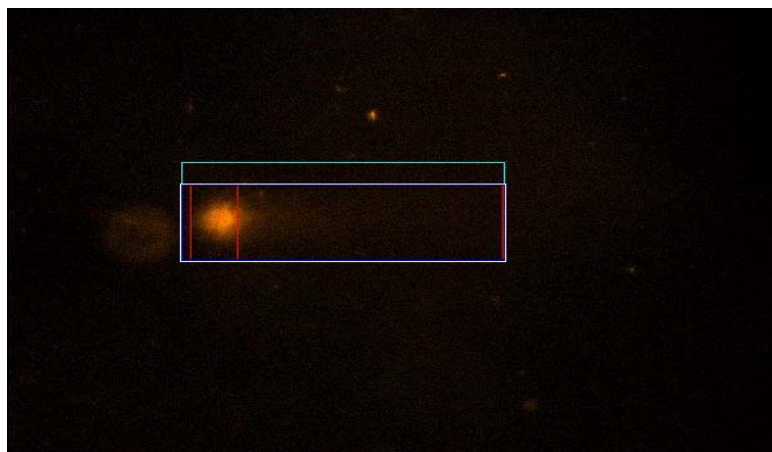
3.3.5 Nevtralizacija

Minigele smo nevtralizirali s Tris HCl (400mM, pH=7,5) delovno raztopino, ki smo jo pripravili iz 400 ml Tris HCl založne raztopine (preglednica 5*), ki smo ji dodali bidestilirano vodo do 1 l. Stekelca smo spirali trikrat po 5 minut in trikrat zamenjali pufer.

3.3.6 Barvanje z etidijevim bromidom

Objektnike smo položili v raztopino etidijevega bromida (2µg/ml) za 20 minut. Barvilo je bilo pripravljeno iz založne raztopine etidijevega barvila (10 µg/ml, Sigma 1510) z dodajanjem 400 mM Tris HCl. Barvanje je potekalo v temi pri temperaturi 5 °C. Po 20 minutah smo stekelca sprali s Tris HCl (400 mM) trikrat po 10 minut in jih shranili v banjici na z Tris HCl (400 mM) navlaženi staničevini v hladilniku od 15 do 20 ur.

3.3.7 Ocenjevanje poškodb DNA z merjenjem kometnih parametrov



Slika 9: Analiza slike z računalniškim programom Komet 5. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna

Komete smo opazovali z epifluorescenčnim mikroskopom Olympus BX 50, pri svetlobi valovne dolžine 515-560 nm in emisijskem filtru 590 nm, pri 20 kratni povečavi objektivna. Prenos slike iz mikroskopa na osebni računalnik je omogočila digitalna kamera Hamamatsu Orca 1. Računalniški program Komet 5 (Kinetic Imaging Limited, 2001) smo uporabili za merjenje poškodb DNA.

Na vsakem objektniku smo analizirali od 50 do 100 naključno izbranih kometov. Vsakemu kometu smo ročno določili mejo med glavo in repom. Program Komet 5 je na podlagi naše ročno postavljene meje izračunal parametre za prikaz poškodovanosti DNA. V našem primeru smo spremljali odstotek DNA v repu in glavi, ter repni moment po Olivu (RM Olive). RM Olive je sestavljen iz parametrov glave in repa po enačbi (1). Odstotek DNA v repu je izračunan po enačbi (2) (Olive in sod., 1990).

$$RM\ Olive = (povp.DNA\ v\ repu - povprečje\ DNA\ v\ glavi) \times \% DNA\ v\ repu \times 0,01 \quad \dots(1)$$

$$\% DNA\ v\ repu = 100 - \% DNA\ v\ glavi \quad \dots(2)$$

Merjenje in izračun poškodb DNA smo opravili po navodilih opisanih v priročniku za uporabo programa Komet (Komet User Guide, 2001). Pri poskusu z zdravimi in okuženimi rastlinskimi protoplasti, smo uporabili dva načina ocenjevanja celic pod mikroskopom, z malce drugačnimi nastavitvami programa.

3.3.8 Statistična analiza rezultatov

Podatki, ki jih dobimo z meritvami poškodovanosti posameznih celičnih jeder z namenskim programom Komet 5.0 (Kinetic Imaging, Limited, 2001) nimajo Gaussove porazdelitve.

S statističnim programom GraphPad Prism (verzija 3.0) smo izračunali vrednosti repnega momenta po Olive: minimum, maksimum, 1. in 3. kvartil, mediano (srednjo vrednost), standardno deviacijo in standardno napako za vsak vzorec in negativno kontrolo v vsakem poskusu posebej.

Povprečje (3), standardno deviacijo (4), standardno napako (5) in disperzijo (6) repnega momenta po Olive smo izračunali s formulami podanimi spodaj.

$$\sum x / n = \bar{x} \quad \dots(3)$$

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} = SD \quad \dots(4)$$

$$SD / \sqrt{n} \quad \dots(5)$$

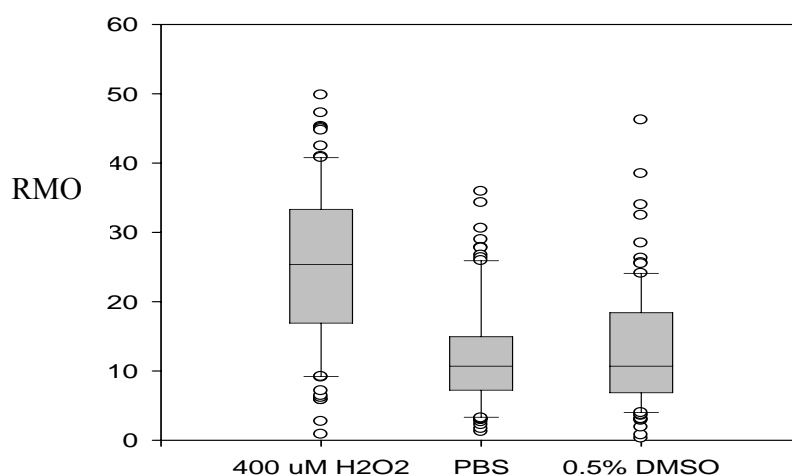
$$\frac{SD^2}{\bar{x}} \quad \dots(6)$$

Z Dunnovo statistiko in Kruskal-Wallis-ovim testom (Graph Pad Prism 4, 2004) smo primerjali dobljene rezultate posameznega poskusa in izračunali statistično značilne razlike med medianami repnega momenta po Olive. Grafikone »box-plot« smo narisali s programom SigmaPlot (verzija 7). Grafikoni »box-plot« kažejo porazdelitev vrednosti RM Olive. Osrednja črta v pravokotniku je mediana, spodnja predstavlja prvi kvartil in zgornja tretji kvartil. Črti nad in pod pravokotnikom obsegata 25 % vrednosti nad tretjim kvartilom in 25 % vrednosti pod prvim kvartilom. Zunanjiki (zelo odstopajoče vrednosti) so označeni točkovno.

4 REZULTATI

4.1 Rezultati vpliva benzo[a]pirena pri alkalno nevtralnem postopku

Slika 10 prikazuje rezultate A/N postopka kometnega testa, v katerem smo neokužene krompirjeve protoplaste izpostavili 400 μ M H₂O₂ in 0,5% DMSO in jih primerjali z negativno kontrolo(PBS).V preglednici 6 je prikazana statistična analiza teh rezultatov.



Slika 10: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste z virusom PVY neokuženega krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée izpostavljenih 400 μ M H₂O₂ in 0,5% DMSO. Poškodbe jedrne DNA so izražene z RMO (repni moment po Olivu).

Preglednica 6: statistična analiza rezultatov A/N postopka

| Dunnov test primerjave | | Povzetek |
|---|--------------|----------|
| 400 μ M H ₂ O ₂ | vs PBS | *** |
| 400 μ M H ₂ O ₂ | vs 0.5% DMSO | *** |
| PBS | vs 0.5% DMSO | * |

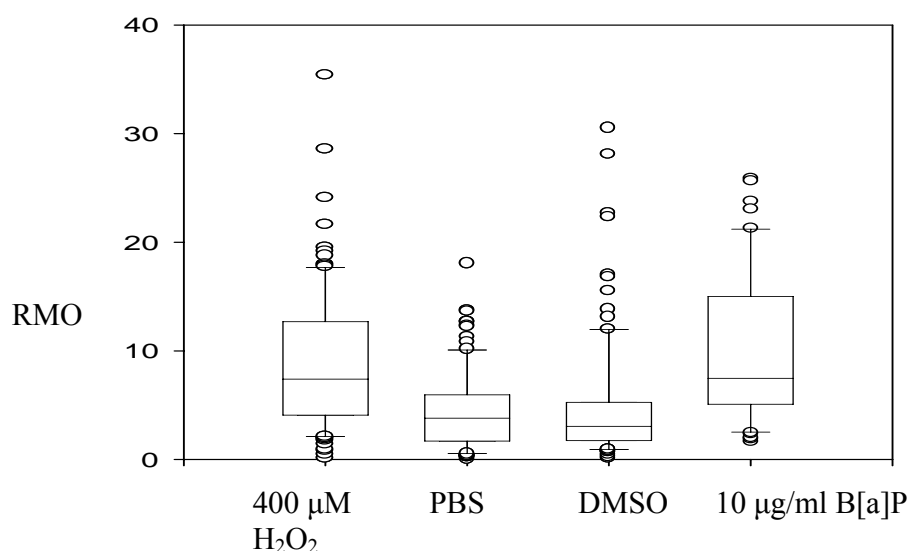
Legenda:

ns - statistično neznačilna razlika (P>0,05) * - statistično značilna razlika (P<0,05)
 *** - statistično značilna razlika (P<0,001) (mejna vrednost)

Rezultati prikazani na sliki 10 kažejo majhno razliko v poškodovanosti DNA med negativno kontrolo (PBS) in protoplasti ki smo jih izpostavili 0,5% DMSO (*mejna vrednost P)

Pokazala pa se je velika razlika v poškodovanosti DNA med pozitivno kontrolo (400 μ M H₂O₂) in protoplasti, ki smo jih izpostavili 0,5% DMSO. DMSO ne povzroča velike statistično značilne poškodovanosti DNA krompirjevih protoplastov. Tako lahko uporabimo DMSO za raztapljanje B[a]P brez statistično signifikantnega vpliva na rezultat poškodovanosti DNA z B[a]P.

Slika 11 prikazuje rezultate A/N postopka kometnega testa, v katerem smo z virusom PVY neokužene krompirjeve protoplaste izpostavili 400 μ M H₂O₂, 0,5% DMSO in 10 μ g/ml B[a]P in jih primerjali z negativno kontrolo(PBS).V preglednici 7 je prikazana statistična analiza teh rezultatov.



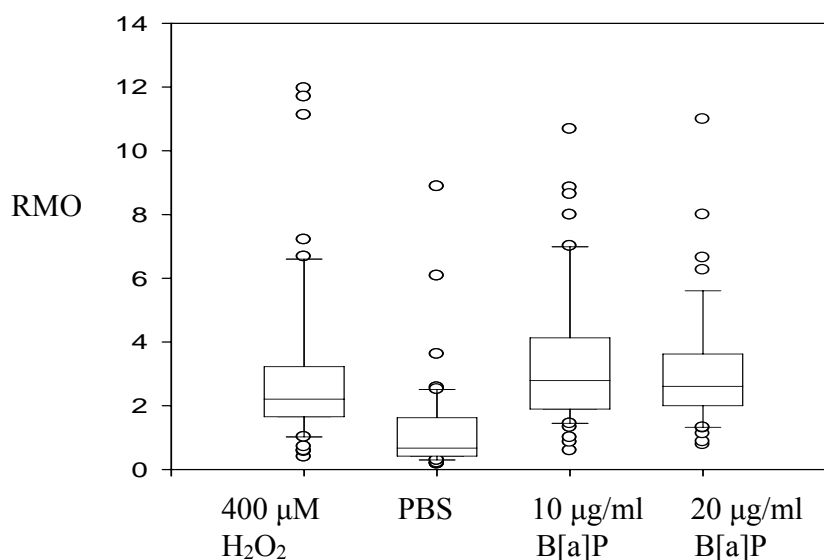
Slika 11: Grafični prikaz poškodovanosti DNA z RMO za protoplaste krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée zdravih, z virusom PVY neokuženih rastlin izpostavljenih 400 μ M H₂O₂, 0,5% DMSO in 10 μ g/ml B[a]P. Poškodbe jedrne DNA so izražene z RMO (repni moment po Olivu).

Preglednica 7: Dunnov test; statistična analiza rezultatov A/N postopka
 Dunnov test primerjave POVZETEK

| | | | |
|---|----|----------------|-----|
| 400 μ M H ₂ O ₂ | vs | PBS | *** |
| 400 μ M H ₂ O ₂ | vs | 0.5 % DMSO | *** |
| 400 μ M H ₂ O ₂ | vs | 10 mg/ml B[a]P | ns |
| PBS | vs | 0.5 % DMSO | ns |
| PBS | vs | 10 mg/ml B[a]P | *** |
| 0.5% DMSO | vs | 10 mg/ml B[a]P | *** |

Opomba. Velja enaka legenda kot pri preglednici 6

Slika 12 in preglednica 8 prikazujeta, da ni statistično značilne razlike v poškodovanosti DNA celic izpostavljenih 400 μM H_2O_2 in benzo[a]pirenu. Rezultati dokazujejo da 400 μM H_2O_2 in B[a]P statistično značilno in v približno enaki meri poškodujeta protoplaste krompirja.



Slika 12: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée zdravih rastlin, izpostavljenih 400 μM H_2O_2 , 10 $\mu\text{g/ml}$ B[a]P in 20 $\mu\text{g/ml}$ B[a]P. Poškodbe jedrne DNA so izražene z RMO (repni moment po Olivu).

Preglednica 8: Dunnov test; statistična analiza rezultatov A/N postopka

| Dunnov test primerjave | POVZETEK |
|--|----------|
| 400 μM H_2O_2 vs PBS | *** |
| 400 μM H_2O_2 vs 20 mg/ml B[a]P | ns |
| 400 μM H_2O_2 vs 10 mg/ml B[a]P | ns |
| PBS vs 20 mg/ml B[a]P | *** |
| PBS vs 10 mg/ml B[a]P | *** |
| 20 mg/ml B[a]P vs 10 mg/ml B[a]P | ns |

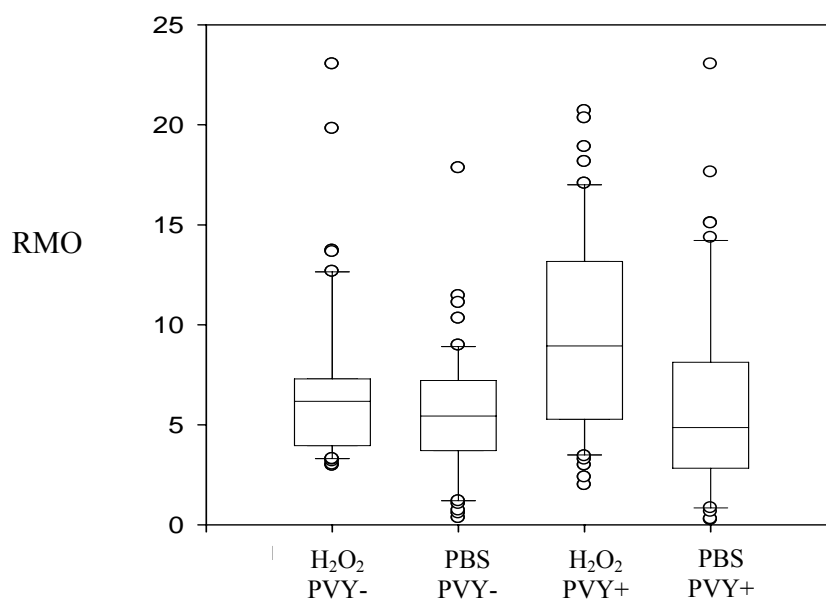
Opomba. Velja enaka legenda kot pri preglednici 6

Rezultati kažejo razliko v poškodovanosti DNA celic tretiranih z benzo[a]pirenom in negativno kontrolo. Nismo pa dokazali razlik v poškodovanosti DNA celic, izpostavljenih

različnim koncentracijam benzo[a]pirena, kar pomeni, da nismo dokazali od koncentracije snovi odvisnega odgovora. Prav tako ni statistično značilnih razlik v poškodovanosti DNA med vzorci, izpostavljenimi vodikovemu peroksidu in benzo[a]pirenu, kar pomeni, da približno do enake stopnje poškodujejo jedrno DNA krompirjevih protoplastov.

4.2 Rezultati vpliva okužbe virusa pri nevtralnem postopku

Sliki 13 in 14 prikazujeta rezultate ene biološke ponovitve in dveh tehničnih priprav stekelc nevtralnega postopka kometnega testa, v katerem smo neokužene in z virusom PVY^{NTN} okužene krompirjeve protoplaste izpostavili 400 μ M H₂O₂. Za vsak poskus smo uporabili dva različna načina ocenjevanja pod mikroskopom. V preglednicah 9 in 10 je prikazana statistična analiza teh rezultatov.



Slika 13: Grafični prikaz poškodovanosti DNA protoplastov krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée zdravih rastlin (PVY-) in okuženih s PVY^{NTN} (PVY+). Protoplasti so bili izpostavljeni 400 μ M H₂O₂ (pozitivna kontrola) in PBS-u (negativna kontrola). Črta v sredini pravokotnika predstavlja mediano, spodnja prvi kvartil in zgornja tretji kvartil. Zunanji so določeni točkovno. Poškodbe jedrne DNA so izražene z RMO (repni moment po Olivu).

Preglednica 9: Dunnov test; statistična analiza rezultatov N/N postopka (1. ponovitev)

| Dunnov test primerjave | | | POVZETEK | |
|------------------------|------|----|-----------|-----|
| H2O2 | PVY- | vs | PBS PVY- | ns |
| H2O2 | PVY- | vs | H2O2 PVY+ | * |
| H2O2 | PVY- | vs | PBS PVY+ | ns |
| PBS | PVY- | vs | H2O2 PVY+ | *** |
| PBS | PVY- | vs | PBS PVY+ | ns |
| H2O2 | PVY+ | vs | PBS PVY+ | *** |

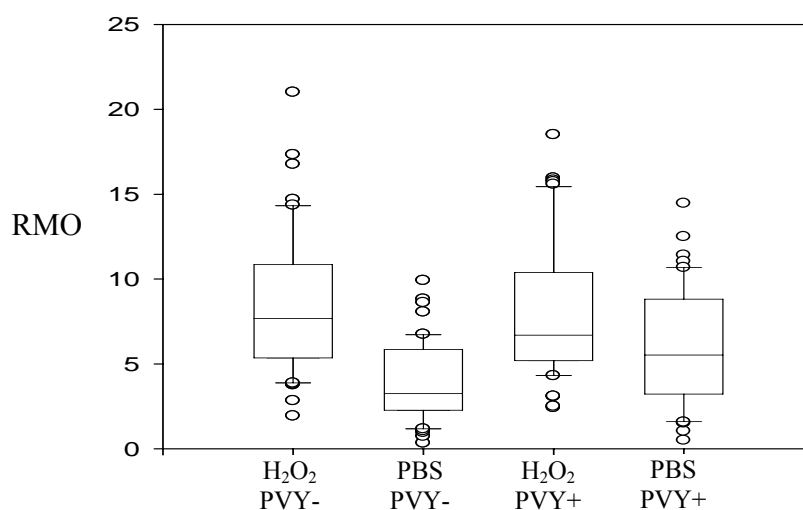
Legenda:

ns - statistično neznačilna razlika ($P > 0,05$)

* - statistično značilna razlika ($P < 0,05$)

*** - statistično značilna razlika ($P < 0,001$)

(mejna vrednost)



Slika 14: Grafični prikaz poškodovanosti DNA za protoplaste krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée zdravih rastlin (PVY-) in okuženih s PVY^{NTN} (PVY+). Protoplasti so bili izpostavljeni H₂O₂ (pozitivna kontrola) in PBS-u (negativna kontrola). Črta v sredini pravokotnika predstavlja mediano, spodnja prvi kvartil in zgornja tretji kvartil. Zunanji so določeni točkovno. Poškodbe jedrne DNA so izražene z RMO (repni moment po Olivu).

Preglednica 10: statistična analiza rezultatov N/N postopka (2. ponovitev)

| Dunnov test primerjave | POVZETEK |
|------------------------|----------|
| H2O2 PVY- vs PBS PVY- | *** |
| H2O2 PVY- vs H2O2 PVY+ | ns |
| H2O2 PVY- vs PBS PVY+ | * |
| PBS PVY- vs H2O2 PVY+ | *** |
| PBS PVY- vs PBS PVY+ | * |
| H2O2 PVY+ vs PBS PVY+ | ns |

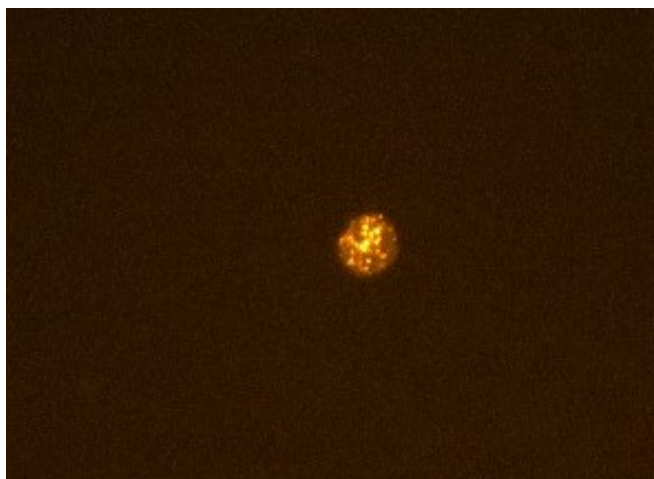
Opomba: velja enaka legenda kot pri preglednici 9

Rezultati poskusa kažejo razliko v poškodovanosti DNA med okuženimi in neokuženimi krompirjevimi protoplasti če jih izpostavimo H₂O₂. Primerjava vzorcev rastlin, ki niso bile tetirane z vodikovim peroksidom kaže majhno statistično značilno razliko, vendar trend v to smer ostaja. Nismo pa opazili razlike v poškodovanosti DNA med z H₂O₂ tretiranimi vzorcema neokuženih in okuženih rastlin. Različni obdelavi enega biološkega poskusa z dvema tehničnima ponovitvama kažejo spremenjene rezultate. Ocenjevanje poškodb DNA protoplastov krompirja pod mikroskopom, smo z različnimi nastavitvami optimirali, tako da smo izboljšali kakovost slike.

4.3 Ocena živosti protoplastov

Odstotek živosti protoplastov je bil pri vseh poskusih 68 % do 74 %.

Slike 15- 20 prikazujejo različne stopnje poškodb DNA protoplastov krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée, zaradi biološkega ali kemičnega stresa.



Slika 15: Nepoškodovano celično jedro neokuženega (PVY-) krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée v vzorcu za negativno kontrolo, obdelano z N/N postopkom kometnega testa. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna



Slika 16: Komet nastal v nevtralnem postopku po izpostavitvi celic H_2O_2 (pozitivna kontrola) krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée, okuženega z virusom PVY^{NTN}. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna



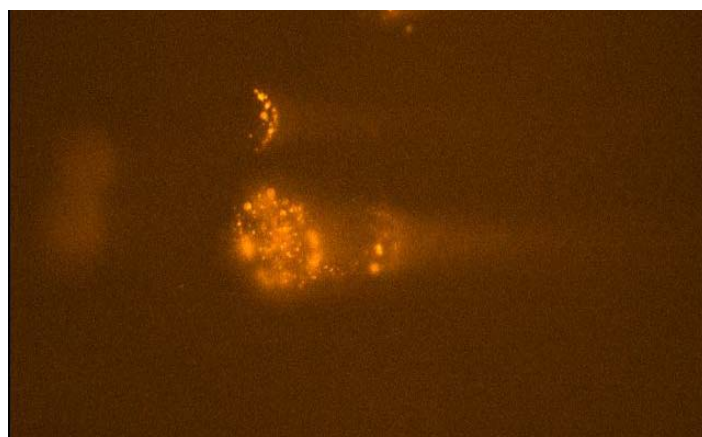
Slika17: Jedro krompirjevega protoplasta *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée, izpostavljenega 0,5% DMSO v alkalno nevtralnem postopku. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna



Slika 18: Komet, nastal po izpostavitvi celic krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée z 10mg/ml B[a]P; alkalno nevtralni postopek. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna



Slika 19: Komet, nastal po izpostavitvi celic krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée z 20mg/ml B[a]P; alkalno nevtralni postopek. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna



Slika 20: Kometi so zaradi nejasne slike in prevelike poškodovanosti neprimerni za analizo. Epifluorescenčni mikroskop: Olympus BX 50, 20 kratna povečava objektivna

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Uporaba novih, enostavnejših in cenejših metod za ugotavljanje citotoksičnih in genotoksičnih poškodb, je v današnjem času vedno bolj pomembna. Z delovanjem kemičnih substanc, ki so danes v splošni rabi v industriji in skorajda v vsakem gospodinjstvu in katerih vpliva na organizme ne poznamo dovolj natančno, ustvarjamo idealne pogoje za nastanek različnih bolezni. Da lahko neko kemikalijo uvrstimo med nenevarne, potencialno nevarne ali nevarne snovi, moramo poznati njen vpliv na organizme. Vpliv na organizme je mogoče dokazati samo s kombinacijo bioloških in kemijsko-fizikalnih metod.

Metoda kometnega testa ki smo jo uporabili v tem diplomskem delu, je ena izmed novejših, sorazmerno hitrih in cenejših bioloških metod, s katero ugotavljamo stopnjo poškodovanosti dednega materiala. Tako lahko neposredno opazujemo vpliv neke snovi na organizem. Vendar smo ugotovili, da ima metoda tudi nekaj pomanjkljivosti. Rezultati testiranja so lahko odvisni že od variabilnosti pri sami tehnični izvedbi testa: posebej pazljiv je treba biti pri nanašanju agaroznega gela na objektnike, saj to vpliva na jasnost slike pod mikroskopom, kar je izredno pomembno za ocenjevanje stopnje poškodb DNA. Elektroforeza, eden najpomembnejših korakov kometnega testa, kjer pride do nastanka kometov, je časovno odvisna od velikosti in gostote celic. Prav tako ne moremo uporabiti neke standardizirane statistične analize za vse vrste celic, ampak je izbor statistične metode odvisen od statistične porazdelitve podatkov, ta pa od vrste celic.

5.1.1 Rastlinski material (*Solanum tuberosum* L.cv. Desirée)

Rastline krompirja smo razmnoževali z mikropropagacijo. To je preprost postopek za hitro razmnoževanje rastlin, alternativa razmnoževanju s semeni. Čeprav so rastline krompirja rastle v sterilnih razmerah in pri konstantnih pogojih (osvetljenosti, temperaturi, zračni vlagi) smo opazili, da je bila rast sezonsko pogojena. Uporabili smo rastline stare pet tednov, ki so bile v

povprečju visoke 15 cm. Sezonsko pogojena rast z vsemi spremljajočimi pojavi je lahko nekontrolirano vplivala tudi na rezultate kometnega testa.

5.1.2 Vpliv benzo[a]pirena na poškodovanost jedrne DNA

Naši rezultati so pokazali, da so pri celicah, ki so bile tretirane z benzo[a]pirenom, v nekaterih primerih nastale še močnejše poškodbe DNA, kot pri pozitivni kontroli (sliki 11 in 12), čeprav razlike niso statistično značilne. Prav tako ni statistično značilne razlike poškodb DNA med obema koncentracijama benzo[a]pirena, ki smo jih uporabili v poskusu (10 μ g/ml B[a]P in 20 μ g/ml B[a]P), kar je lahko posledica delovanja popravljalnih mehanizmov v celici. Upoštevati moramo, da B[a]P povzroča predvsem enojne prelome DNA, zato je alkalno nevtralni postopek primerna izbira.

Izpostavljanje DNA alkalnim pogojem pred elektroforezo, ki poteka pri nevtralnih pogojih (A/N postopek), prednostno odkriva predvsem enojne prelome. Velika razlika med poškodbami DNA celic, na katere smo delovali z DMSO in tistimi na katere smo delovali z B[a]P, kaže na dobro izbiro kemikalije, v kateri smo raztapljali B[a]P, ki ni topen v čisti vodi (sliki 10, 11).

To pomeni da ni povzročala dodatnih večjih poškodb pri celicah, tretiranih z B[a]P. Tako lahko uporabimo DMSO za raztapljanje B[a]P brez statistično značilnega vpliva na rezultat poškodovanosti DNA z B[a]P.

Veliko policikličnih aromatskih ogljikovodikov je kancerogenih. Tipična vrednost za tveganje za PAH, ki jih predstavlja benzo[a]piren je 1 ng/m³ in predstavlja tveganje za rakom za kar 87 ljudi na milijon prebivalcev. Podobno tveganje predstavljajo tudi težke kovine, kot so arzen, kadmij in nikelj. Za primerjavo: pri enaki vrednosti kot benzo[a]piren, vsak od naštetih predstavlja tveganje za 1.5 do 2 človeka na milijon (Ministrstvo za okolje in prostor, 2003). Na ministrstvu za okolje in prostor, kjer so izvedli meritve kakovosti zraka v Ljubljani so ugotovili, da so višje koncentracije benzo[a]pirena v centru mesta in ob avtocesti, medtem ko na obrobju mesta bistveno nižje. Njihovi rezultati kažejo da koncentracije benzo[a]pirena

lahko občasno v zimskem času presežejo mejno vrednost 1 ng/m^3 (Ministrstvo za okolje in prostor, 2003).

Dobro prilagojeno in optimirano metodo kometnega testa na rastlinskih protoplastih bi potencialno lahko uporabili za monitoring genotoksičnih vplivov te spojine v urbanih okoljih.

Offord in sod. (1997) so pokazali, da nekateri potencialni inhibitorji poškodb DNA povzročenih z B[a]P delujejo preko vsaj dveh mehanizmov : (i) preko inhibicije metabolne aktivacije prokancerogenov z encimi (citokrom P450); (ii) z indukcijo detoksifikacijske poti katalizirane z encimi, kot je na primer glutation S-transferaza ali NAD(P)H kinon reduktaza. Najpomembnejši encim za pospeševanje z B[a]P inducirane karcinogeneze v jetrih pri ljudeh je citokrom 1A1 (CYP1A1) (Drahushuk, 1998). Tudi zmanjševanje genotoksičnih vplivov določenih antioksidantov ali inhibitorjev poškodb DNA bi lahko dokazovali z dobro optimiranim kometnim testom, ki je bil preizkušen v tej diplomski nalogi.

5.1.3 Vpliv virusa PVY^{NTN} na poškodovanost jedrne DNA

Rastline v tkivni kulturi okužene z PVY^{NTN}, se po izgledu niso razlikovale od neokuženih zdravih rastlin. Ker smo jih razmnoževali pri istih pogojih in ker so rastle praktično brez stresa, predvidevamo da poškodbe celic niso nastale v rastnih komorah, ampak šele v postopku priprave in obdelave za kometni test. Iz naših rezultatov, ki so grafično prikazani na sliki 13, lahko sklepamo, da poškodbe ki jih povzroči virus PVY^{NTN} niso signifikantno vplivale na DNA rastlinskih celic. Mogoče tudi zato, ker je prišlo do popravila napak s celičnimi mehanizmi, preden bi jih lahko zaznali s kometnim testom. Čeprav je bila razlika poškodb jedrne DNA neokuženih (PVY-) in okuženih (PVY^{NTN}) celic, ki niso bile tretirane z H₂O₂ statistično zelo majhna, pa trend v to smer ostaja (slika 14). Prav tako smo opazili pri vzorcih okuženih s PVY^{NTN} povečan odstotek DNA v repu, v primerjavi z neokuženimi (rezultati niso prikazani). Po eni strani lahko spekuliramo, da H₂O₂ izkaže povečan vpliv na DNA protoplastov, ki jo je predhodno že delno destabilizirala okužba z virusom (slika 13), lahko pa pride do večjega obrambnega odziva z virusom PVY^{NTN} okužene rastline na H₂O₂. Pokazali smo da okužba z virusom vpliva na poškodovanost jedrne DNA protoplastov

krompirja *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée, vendar rezultat ni ponovljiv v vseh primerih. Iz slike 14 je razvidno, da je ta razlika med z virusom okuženimi (PVY^{NTN}) in neokuženimi celicami (PVY), ki smo jih izpostavili vodikovemu peroksidu statistično neznačilna.

Uporabili smo dva različna načina ocenjevanja poškodb DNA pod mikroskopom, pri obeh ponovitvah istega biološkega poskusa in s tem poskušali optimirati nastavitve, s katerimi smo ocenjevali poškodbe DNA protoplastov. Tako da ne moremo z gotovostjo trditi, da virus ne povzroča signifikantnih poškodb na DNA rastlin. Nadaljna optimizacija postopka in več ponovitev bi bilo potrebnih za natančnejšo analizo rezultatov.

Primerjava rezultatov drugih študij o interakcijah rastlina-virus nam pokaže, da se različni sklopi genov aktivirajo v različnih fazah razvoja bolezni in v različnih gostiteljih. Le obsežne raziskave z različnimi kombinacijami interakcij rastlina-virus, lahko vodijo do glavnih značilnosti teh interakcij (Pompe-Novak in sod., 2006).

Namen poskusov, ki jih je naredil Kovalchuk in sod. (2003), je bil, če lokalna virusna okužba lahko povzroči neavtonomno signaliziranje po rastlini, kar bi se kazalo kot sprememba genoma pri okuženih in neokuženih tkivih.

Poročali so o trikratnem povečanju frekvence homologne rekombinacije pri okuženih in neokuženih rastlinah tobaka, okuženih s tobačnim mozaičnim virusom ali mozaičnim virusom oljne repice. Rezultati nakazujejo obstoj systemskega rekombinacijskega signala, ki ga sproži virusna okužba in se lahko giblje skozi rastlino in proži spremembe genoma. Možno je da ta signal povezan z do sedaj kemično neidentificiranim floemskim signalom, ki je vključen v SAR (systemska pridobljena odpornost) (Kovalchuk in sod., 2003). Ti rezultati kažejo na obstoj rekombinacijskega signala ki potuje pred virusom. Podobno povečanje DNA rekombinacije so opazili tudi pri potomcih inficiranih rastlin, kar nakazuje, da s patogenom inducirana rekombinacija lahko vodi do dedovane adaptacije na okoljski stres. (Dong, 2004).

400 μ M koncentracija vodikovega peroksida, nam je služila kot pozitivna kontrola genotoksičnega učinka pri kometnem testu. V naših poskusih smo pokazali, da so se poškodbe jedrne DNA protoplastov, ki so bili tretirani z H₂O₂, le malo razlikovale pri okuženih in neokuženih celicah. Zelo opazne so bile razlike med negativno (PBS) in pozitivno kontrolo (H₂O₂), kar je tudi pričakovan rezultat..

Nastanek H₂O₂ je del obrambnega mehanizma rastline, saj preprečuje nastanek bolezni, ki jih povzročajo patogeni mikroorganizmi. Odgovor na nek patogen je v naravi povezan z oksidativnim izbruhom, kjer nastajajo reaktivne kisikove zvrsti (ROS), med njimi tudi H₂O₂. Prekomerno nastajanje H₂O₂, ki lahko škodi rastlini ker inducira oksidativni stres in celično smrt, pa preprečujejo katalaze, peroksidaze in drugi antioksidativni encimi, ki ga iz celice odstranijo s pretvorbo v vodo. Vendar pri nizkih koncentracijah H₂O₂ deluje kot signalna molekula kot odgovor na stres in stimulira hormone, aktivira proteinske kinaze, sodeluje pri aktivaciji nekaterih genov povezanih z obrambo rastline (Krečič Stres, 2001).

V naših poskusih smo celice izpostavili 400 μ M koncentraciji H₂O₂, ki naj bi bila po ugotovitvah nekaterih avtorjev (Žnidar, 2003) najprimernejša za pozitivno kontrolo. Glede na naše rezultate predlagamo, da bi pri kometnem testu s krompirjevimi protoplasti uporabili višjo koncentracijo H₂O₂, da bi dosegli optimalnejšo razliko med pozitivno in negativno kontrolo v poskusu.

5.1.4 Protoplastiranje in ocena živosti protoplastov

Živost protoplastov smo preverjali s fluorescein diacetatom (FDA), barvilom, ki po vstopu v celico z neokrnjeno membrano fluorescira zeleno. Celice osvetljujemo z modro svetlobo. V naših poskusih je bila živost okoli 70 odstotna. Ta odstotek je nižji kot priporoča Singh, (2000). Živost celic za izvedbo kometnega testa naj bi bila vsaj 95 % (Singh, 2000). Odmrle celice so med postopkom kometnega testa lahko v fazi apoptoze, kar lažno poveča stopnjo poškodovanosti jedrne DNA vzorca in vpliva na končne primerjave med vzorci.

Predvidevamo da smo dobili manjšo živost zaradi stresa, kateremu so podvrženi protoplasti, med pripravo rastlinskega materiala. Z izgubo celične stene, ki ščiti pred zunanjimi vplivi, izgubi celica prvo obrambno linijo. Celoten postopek priprave protoplastov smo izvajali brez prižgane luči, saj svetloba lahko dodatno poškoduje DNA. Liste rastlin smo razrezali in ne sesekljali, da bi bile poškodbe manjše, kar predlagata tudi Gichner in Plewa, 1998.

5.1.5 Kometni test in rastline

Do sedaj je bilo razvitih več različic kometnega testa, ki jih še dodatno prilagajamo tipom celic ki jih raziskujemo in vrstam poškodb ki jih želimo odkriti. Nevtralni protokol (N/N), pri katerem elektroforeza poteka pri nevtralnih pogojih (uporabimo nevtralni pufer), alkalno nevtralni (A/N), kjer alkalni lizi celic sledi nevtralna elektroforeza in alkalni postopek (A/A), kjer liza in elektroforeza potekata v alkalnem pufru. DNA ostane dvovertična pri nevtralnih pogojih kometnega testa, zato se njena struktura po izpostavitvi genotoksičnemu dejavniku spremeni z dvojnimi prelomi. Pri alkalnih pogojih pa DNA delno izgubi dvovertično strukturo in tako je potovanje DNA olajšano z dvojnimi in enojnimi prelomi. Ker alkalni postopek poleg enojnih in dvojnih prelomov odkriva tudi alkalno labilna mesta, je težko določiti do katerih poškodb je dejansko prišlo, razen če pri istih pogojih izvedemo oba postopka. Vendar tudi enojni prelomi pripomorejo k migraciji, saj sprostitjo superzvito vijačnico, ki tako razteza iz jedra in tvori rep kometa (Östling in Johanson, 1984; Collins in sod., 1997).

Velik pomen imajo preizkušeni postopki kometnega testa za izvajanje monitoringa okolja za ocenjevanje kvalitete vode, tal in zraka. Kometni test je ena najboljčutljivejših metod merjenja kakovosti pitne vode, saj omogoča detekcijo majhnih vsebnosti strupenih in genotoksičnih snovi brez predhodne obdelave vzorcev, ki je lahko vzrok za lažno pozitivne rezultate. Z njim lahko izmerimo direkten vpliv onesnažene vode na organizme, ki so izpostavljeni oporečni vodi (Marinšek-Logar in sod., 2004). Prav tako lahko s kometnim testom merimo parametre genotoksičnosti tal in njihov vpliv na organizme (Lah in sod., 2005)

Sama izvedba kometnega testa zahteva dobro usposobljenost oseb ki ga izvajajo, predvsem ročne spretnosti pri pripravi minigelov. Prednost dela z rastlinskimi protoplasti je predvsem zaradi citoplazme, ki obdaja jedro, tako da je DNA v naravnem okolju. Prednost takega sistema pred postopki kometnega testa z rastlinskimi jedri je tudi, da lahko z njim sledimo tudi genotoksične vplive indirektnih genotoksinov, torej tistih snovi, ki postanejo genotoksične šele po bioaktivaciji v celici, in vplive popravljalnih mehanizmov DNA.

Pri interpretaciji rezultatov kometnega testa je zelo pomembna ustrezna statistična analiza podatkov, ki jih za vsak vzorec pridobimo na populaciji celic (50 do 100 podatkov). Za vsako vrsto celic moramo izbrati ustrezno specifično statistično analizo. Različni statistični prijemi so posledica raznolikosti obsega in narave podatkov, ki jih dobimo po računalniško podprti analizi mikroskopske slike. Ker vrednosti RM-Olive v našem primeru niso bile normalno porazdeljene, smo uporabili neparametrično metodo (Kruskall-Wallis test).

5.2 SKLEPI

- Naše analize so pokazale, da je alkalno nevtralni postopek učinkovit za ugotavljanje poškodb jedrne DNA krompirjevih protoplastov z B[a]P.
- B[a]P kot indirektni genotoksin močno poškoduje jedrno DNA protoplastov krompirja.
- S kometnim testom lahko ugotavljamo vrsto in velikost poškodb jedrne DNA krompirjevih protoplastov, povzročenih s kemičnimi genotoksičnimi dejavniki, vendar je potrebno uporabiti ustrezen postopek testa.
- Naši rezultati kažejo, da virus PVY^{NTN} statistično značilno ne poškoduje DNA protoplastov krompirja *Solanum tuberosum* L.cv. Desirée, čeprav se je trend v smeri večje stopnje poškodb jedrne DNA pokazal.
- Za zanesljivo dokazovanje morebitnih poškodb jedrne DNA, ki jih povzročajo rastlinski virusi, bi bilo potrebno metodo kometnega testa z rastlinskimi protoplasti še dodatno prilagoditi in optimirati.

6 POVZETEK

Kometni test je ena od novejših metod, s katerimi ugotavljamo in dokazujemo vplive okoljskih dejavnikov na organizme. Je občutljiva, hitra, sorazmerno enostavna in dokaj poceni metoda za odkrivanje poškodb jedrne DNA. Kljub svojemu preprostem konceptu pa potrebuje visoko usposobljeno osebje za izvedbo postopka. Vsaka vrsta celic potrebuje ustrezno prilagojen in specifičen postopek, čeprav osnovni koraki metode ostajajo enaki. Najprimernejše za analizo so celice, ki so že suspendirane, npr. krvne celice. Pri nesuspendiranih celicah pa moramo sami pripraviti suspenzije celic ali pa samo jeder. Dobra izbira so tudi protoplasti rastlinskih celic, saj lahko tako ugotavljamo vpliv tistih snovi na DNA, ki potrebujejo celično aktivacijo. Protoplasti so namreč celice brez celične stene, ki jo odstranimo, da lahko pride do interakcije testne snovi z DNA. Vendar pa z odstranitvijo celične stene dobimo izredno občutljive celice, katere pazljivo pripravimo za nadaljno analizo. Osnovne tri postopke kometnega testa razdelimo glede na pH raztopin za lizo celic in elektroforetski pufer. To so nevtralnno nevtralni postopek (N/N), alkalno nevtralni postopek (A/N) in alkalno alkalni postopek (A/A).

Pri našem delu smo za protoplaste krompirja, ki so bili okuženi z virusom PVY^{NTN} uporabili nevtralnno nevtralni postopek, medtem ko smo za protoplaste krompirja neokuženih, zdravih rastlin, ki so bile izpostavljene genotoksičnemu dejavniku benzo[a]pirenu uporabili alkalno nevtralni postopek. Raztopina za lizo pri (N/N) postopku ima nevtralen pH, prav tako elektroforetski pufer, medtem ko je raztopina za lizo pri (A/N) postopku alkalna, kar omogoča delno razvijanje dvojne vijačnice. Elektroforeza pa poteka pri nevtralnih pogojih, kot pri (N/N) postopku.

B[a]P je znan genotoksičen in kancerogen policiklični aromatski ogljikovodik, ki glede na naše rezultate močno poškoduje DNA protoplastov, pri obeh poskusnih koncentracijah 10 µg/ml in 20 µg/ml.

Rezultati našega dela kažejo, da virusna okužba statistično značilno ne poškoduje DNA protoplastov krompirja *Solanum tuberosum* L.cv. Desirée, opazen pa je trend večje poškodovanosti kot pri negativni kontroli. Na rezultate verjetno vpliva tudi nizka živost protoplastov, ki je bila 70 odstotna. Možno je tudi, da virus PVY^{NTN}, ki povzroča nekrotične obročke pri krompirjevih gomoljih, na stebli in listih pa simptomi niso izraženi, DNA listov bistveno ne spremeni.

Obe različici kometnega testa smo relativno uspešno preizkusili na protoplastih krompirja, pri čemer ocenjujemo, da bi bilo nevtralnno-nevtralnno različico kometnega testa predvsem za dokazovanje morebitnih virusnih poškodb rastlinske jedrne DNA potrebno še dodatno prilagoditi in optimirati. Akalno-nevtralna različica kometnega testa na krompirjevih protoplastih pa se je izkazala za uspešno pri dokazovanju genotoksičnih učinkov kemičnih snovi na rastline.

LITERATURA

Aina R. 2006. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. *Chemosphere*, 65, 4: 666-673

Beczner L., Horvath J., Romhanyi I., Förster H. 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27: 339-352.

Brunt A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. 1996. Potato Y potyvirus. V: Plant viruses online: Descriptions and lists from the VIDE (Virus Identification Data Exchange) database. <http://image.fs.uidaho.edu/videscr652.htm> (28.3.2008): 1str

Collins A.R., Dobson V. L., Dušinska M., Kennedy G., Štetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193

Debeljak N. 2002. Miš kot modelni organizem za študij vloge gena *Cyp51* v spermatogenezi. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 127 str.

Dermastia M., Ravnikar M., Kovač M. 1995. Increased cytokinin-9-glucosylation in roots of susceptible *Solanum tuberosum* cultivar infected by potato virus Y^{NTN}. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 2: 327-333

Dong X. 2004. Pathogen-induced systemic DNA rearrangement in plant. *Trends in Plant Science*, 9, 2: 60-61

Drahushuk A. T., McGarrigle B. P., Larsen K. E., Stegeman J. J., Olson J. R. 1998. Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture. *Carcinogenesis*, 19, 8: 1361-1368

Eastman A., Barry M.A. 1992. The origins of DNA breaks- A consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis. *Cancer Investigation* 10, 3: 229-240

Ferlan R., Sollner Dolenc M. 2006. Inhibitorji citokromov. *Farmaceutski vestnik*, 57, 2: 140-145

Garry S., Nesslany F., ElMoukhtar A., Haguenoer J.M., Marzin D. 2004. Hematite (Fe₂O₃) acts by oxidative stress and potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutation Research*, 563: 117-129

Gichner T., Plewa M.J. 1998. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutations in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, 401:143-152

Gichner T. 2003. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase – deficient transgenic tobacco. Cellular and acellular comet assays. *Mutation Research*, 535: 187-193

GraphPad Prism 4. 2004. Dunn statistics and Kruskal-Wallis test, ZDA. GraphPad Software Inc.: software

Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18, 1: 45-51

Hattemer-Frey H. A., Travis C.C. 1991. Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicology and Industrial Health*, 7, 3: 141–157

Hrovathova E., Slamenova D., Hlinčikova L., Mandal T.K., Gabelova A., Collins A.R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research*, 409: 163-171

Karle I. L., Yagi H., Sayer J.M., Jerina D.M. 2004. Crystal and molecular structure of a benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine adduct: Absolute configuration and conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101,6: 1433-1438

Kogovšek P., Gow L., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Boonham N., Foster G.D., Ravnikar M. 2006. Possible role of carbon metabolism alterations in

development of symptoms in potato infected with PVY^{NTN} / PVY^N. V: 4. slovenski simpozij o rastlinski biologiji z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 12-15 september 2006. Ljubljana, Društvo za rastlinsko fiziologijo Slovenije.
http://www.plantslo.org/Kongres/PDF/2%20Biotske_interakcije-FINAL.pdf (10.9.2007): 26-27

Komet User Guide- version 5. 2001. Bromborough, Kinetic Imaging Limited: software

Koppen G., Toncelli L.M., Triest L., L. Verschaeve L .1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mechanisms of Ageing and Development*, 110: 13–24

Kovalchuk I., Kovalchuk O., Kalck V., Boyko V., Filkowski J., Heinlein M., Hohn B. 2003. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature*, 423:760-762

Krečič Stres H. 2001. Vloga salicilne in gentiske kisline pri odzivu krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta :95 str.

Kulhanek A., Trapp S., Sismilich M., Janku J., Zimova M. 2005. Crop-specific human exposure assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech soils. *Science of the Total Environment*, 339, 1-3: 71-80

Kus M. 1996. The epidemic of tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) and its effects on potato crops in Slovenia. V: Proceedings of the 9th EAPR Virology Section Meeting, Ribno, Bled, Slovenia, 18-22 June, 1995. [organized by M-KŽK Kmetijstvo Kranj, Laboratory for Physiology and Potato Virus Diseases:159-160

Lah B., Avberšek M., Gorjanc G., Marinšek Logar R. 2005. Vrednotenje strupenosti in genotoksičnosti vzorcev zemlje z biotesti. *Acta Agriculturae Slovenica*, 81,1 : 27-38

Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. 1994. Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43: 138-144

Leksikon Cankarjeve založbe. 2004. 3 izd. Dolinar K. Ljubljana, Cankarjeva založba: 545-545

Li D., Wang M., Cheng L., Spitz M.R., Hittelman W.N. and Wei Q. 1996. *In vitro* induction of benzo[*a*]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer. *Cancer Research*, 56: 3638–3641

Lin H., Tao S., Zuo Q., Coveney R.M. 2007. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environmental Pollution*, 148, 2: 614- 619

Marinšek Logar R., Zrimec A., Berden Zrimec M., Čepeljnik T., Tišler T. 2006. Ugotavljanje strupenosti in genotoksičnosti pitnih vod. V: Zbornik referatov, simpozij z mednarodno udeležbo, Vodni dnevi, Portorož, 18. in 19. oktober 2006. Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda.
http://www.sdzv-drustvo.si/si/VD-06_Referati/07%20Marinsek%20VD06.pdf (14.1 2008): 58-69

McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P., Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288: 47-63

Milavec M., Kovač M., Ravnihar M. 1999. Photosynthetic pigments in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) cv. 'Igor' After Primary Infection with Potato Virus Y^{NTN}. *Phyton*, 39: 265-269.

Milovanovič Jarh D. 2004. Jasmonska kislina zdravih in s krompirjevim virusom Y^{NTN} okuženih rastlinah krompirja *Solanum tuberosum* L. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 61 str.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497

Offord E. A., Macé K., Avanti O., Pfeifer A. M. A. 1997. Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer Letters*, 114: 275-281

Olive, P.L., Banáth, J.P., Durand, R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*, 112: 86–94.

Östling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 1: 291-298

Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. 1 izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 542,543

Pompe Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič Stres H., Kovač M., Jongasma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 237-247

Pradhan P., Tirumala S., Liu X., Sayer J.M., Jerina D.M., Yeh H.J. 2001. Solution structure of a trans-opened (10S)-dA adduct of (+)-(7S,8R,9S,10R)-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a fully complementary DNA duplex: evidence for a major syn conformation. *Biochemistry*, 40: 5870-5881

Preliminarno poročilo projektov AIRPECO in PEOPLE. 2003. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje, Sektor za kakovost zraka.
<http://www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/AIRPECOinPEOPLEporocilo.pdf> (20.12.2007): 8 str.

Ravnikar M. 1991. Fiziološka in anatomsko-morfološka študija vpliva jasmonske kisline na rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi. Doktorsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 101 str.

Ravnikar M., Vilhar B., Gogala N. 1992. Stimulatory effects of jasmonic acid in potato stem node and protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11:29-33

Rentz J.A., Alvarez P.J.J., Schnoor J.L. 2005. Benzo[a]pyrene co- metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution*, 136, 3: 477-484

Rumora L., Žanič Grubišič T. 2003. Oksidativni stres i stanična smrt. Zagreb, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. http://www.kbsm.hr/klinkemija/4_HKMB/PDF/Rumora_Lada.pdf (12.9.2007) 17. str.

Schwab A.P., Al-Assi A.A., Banks M.K. 1998. Adsorption of naphthalene onto plant roots. *Journal of Environmental Quality*, 27 : 220–224

Shepard J.F., Totten R.E. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiology*, 60:313-316

Singh N.P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, 455: 111-127

Šircelj H. 2004. Gradivo za vaje iz botanike za študente univerzitetnega študija agronomije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 101 str.

Taiz L., Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc., Publishers: 690 str.

Vilhar B., Ravnikar M., Schara M., Nemeč M., Gogala N. 1991. The influence of jasmonic acid on biophysical properties of potato leaf protoplasts and roots. *Plant Cell Reports*, 10, 11: 541-544

Žnidar I. 2003. Prilagoditev kometnega testa za protoplaste krompirja (*Solanum tuberosum* L.cv.Desirée). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 78 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

Prof.dr. Romani Marinšek Logar, za strokovno pomoč in praktične nasvete pri izdelavi diplomske naloge;

Prof. dr. Maji Ravnikar, predstojnici oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo, za nasvete pri delu s protoplasti in strokovno recenzijo diplomskega dela;

Dr. Barbari Lah, za pomoč pri računalniški analizi pri delu s programom Komet 5;

Lidiji Matičič, za uvajanje v laboratorijsko delo in pomoč pri težavah, ki so zmeraj prisotne pri praktičnem delu;

Vsem zaposlenim na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, ki so poskrbeli, da je bilo delo v laboratoriju prijetno in učinkovito.

Ireni Žnidar, za nasvete pri statistični obdelavi podatkov

Evi, za vse ure skupnega učenja, nepozabna študentska leta in pogovore o življenju nasploh

Najlepša zahvala gre moji **družini**, za vsa leta podpore in seveda **Maksu**, za dobro voljo in večni optimizem!

HVALA VSEM!