

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOTEHNOLOGIJO

Anita LENARČIČ

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ZA  
SPREMINJANJE IZRAŽANJA GENOV V  
KROMPIRJU (*Solanum tuberosum*) SORTE DÉSIRÉE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOTEHNOLOGIJO

Anita LENARČIČ

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ZA SPREMINJANJE  
IZRAŽANJA GENOV V KROMPIRJU (*Solanum tuberosum*) SORTE  
DÉSIRÉE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR CHANGING  
GENE EXPRESSION IN POTATO (*Solanum tuberosum*) CULTIVAR  
DÉSIRÉE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programu biotehnologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Po sklepu komisije za dodiplomski študij oddelka za biotehnologijo z dne 16.6.2010 je bila za somentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Jana Žel, za mentorico diplomskega dela pa prof. dr. Maja Ravnikar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: Prof. dr. Jana ŽEL

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: prof. dr. Borut BOHANEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 12. 11. 2010

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

Anita LENARČIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 575.17:577.2.08 (043.2)=163.6
KG	Krompir/ <i>Solanum tuberosum</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /transformacija rastlin/RNAi
AV	LENARČIČ, Anita
SA	RAVNIKAR, Maja (mentorica)/ ŽEL, Jana (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ZA SPREMINjanJE IZRAŽANJA GENOV V KROMPIRJU ( <i>Solanum tuberosum</i> ) SORTE DÉSIRÉE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 57 str., 13 pregl., 28 sl., 6 pril., 65 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za spreminjanje izražanja genov v rastlinah lahko uporabimo različne metode transformacije. Z biotehnološkimi orodji lahko povečamo pridelek krompirja in naredimo rastline odporne na bolezni. Namen diplomskega dela je bila uporaba različnih metod spreminjanja izražanja genov (za povečanje ali utišanje izražanja) v krompirju sorte Désirée. Stabilno transformacijo smo izvedli s pomočjo posrednega vnosa genov za manitol dehidrogenazo (MTD) in krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor (PCPI) z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Uspešnost transformacije za konstrukt z genom MTD je bila 1,25%, medtem ko je bila frekvenca transformacije za konstrukt PCPI 0,25%. Drugi del diplomske naloge je bila prehodna transformacija za utišanje gena glukanaze s sistemom dvooverižne RNA. Naredili smo tri različne poskuse, kjer smo spreminjali starost rastlin ob tretiranju, št. dni tretiranja ter liste za analizo. Uspešno utišanje glukanaze smo dosegli pri poskusu 2, kjer so bile 14 dni stare rastline tretirane z dsRNA 21 dni. Izražanje glukanaze je bilo pri skupini tretirani z dsRNA statistično značilno nižje (približno 4x) kot izražanje pri kontrolni skupini. Če primerjamo obe metodi lahko zaključimo, da je za izbiro ene ali druge potrebno upoštevati, za kakšne študije se bodo transformirane rastline uporabile.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 575.17:577.2.08 (043.2)=163.6
CX	Potato/ <i>Solanum tuberosum</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /plant transformation/RNAi
AU	LENARČIČ, Anita
AA	RAVNIKAR, Maja (supervisor)/ ŽEL, Jana (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2010
TI	THE COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR CHANGING GENE EXPRESSION IN POTATO ( <i>Solanum tuberosum</i> ) CULTIVAR DÉSIRÉE
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIV, 57 p., 13 tab., 28 fig., 6 ann., 65 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	To modify the expression of genes in plants we can use different methods of transformation. The biotechnological tools can increase yield and make the potato resistant to disease. Purpose of this study was the use of different methods for changing of gene expression (increase or silencing of expression) in the potato cultivar Désirée. Stable transformation was performed using indirect transfer of mannitol dehydrogenase (MTD) and potato cysteine proteinase inhibitor (PCPI) genes with <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . The frequency of transformation with MTD gene was 1,25%, while the frequency of transformation with PCPI gene was 0,25%. The second part of this work was transient transformation for silencing of glucanase gene with dsRNA. We made 3 different experiments where we varied the age of plants at point of treatment, number of treatment days and leaves for analysis. Successful silencing of glucanase was achieved in test 2, where the 14 days old plants were treated with dsRNA for 21 days. The expression of glucanase in group treated with dsRNA was significantly lower (about 4x) than the expression in the control group. When we compare these two methods we have to consider the aim of the study for right choice of method.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XIV
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3 HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 FUNKCIONALNA ANALIZA GENOV	2
2.2 TRANSFORMACIJA	4
<b>2.2.1 Mehanizem prenosa T-DNA v rastlinsko celico</b>	<b>6</b>
2.2.1.1 Modeli za integracijo T-DNA v rastlinsko celico	7
<b>2.2.2 Stabilna transformacija rastlin</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3 Prehodna transformacija rastlin</b>	<b>8</b>
2.3 MEHANIZMI UTIŠANJA GENOV	9
<b>2.3.1 Utišanje genov povzročeno z virusom (VIGS)</b>	<b>11</b>
2.3.1.1 Sistemski transport RNA v rastlinah	12
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIAL	14
<b>3.1.1 Gojišča</b>	<b>14</b>
<b>3.1.2 Laboratorijska oprema</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3 Kompleti</b>	<b>17</b>
<b>3.1.4 Pufri in raztopine</b>	<b>17</b>
<b>3.1.5 Reagenti in barvila</b>	<b>17</b>
<b>3.1.6 Encimi</b>	<b>17</b>
<b>3.1.7 Rastlinski material</b>	<b>17</b>

<b>3.1.8</b>	<b>Bakterijski material in plazmidi</b>	<b>18</b>
3.1.8.1	Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
3.1.8.2	Plazmid pMDC32	18
3.2	METODE	19
<b>3.2.1</b>	<b>Priprava MS gojišča</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Transformacija rastlin z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>20</b>
3.2.2.1	Priprava bakterije <i>A. tumefaciens</i> za transformacijo rastlin	20
3.2.2.2	Transformacija rastlin	20
<b>3.2.3</b>	<b>Transformacija rastlin z dvočleno RNA</b>	<b>22</b>
3.2.3.1	Priprava matrične DNA	22
3.2.3.2	Čiščenje PCR produkta	23
3.2.3.3	Agarozna gelska elektroforeza	23
3.2.3.4	Priprava dvočlenne RNA	23
3.2.3.5	Čiščenje dvočlenne RNA	23
3.2.3.6	Merjenje koncentracije celokupne RNA	23
3.2.3.7	Metoda tretiranja rastlin	24
3.2.3.8	Preverjanje genske ekspresije na stopnji mRNA	26
3.2.3.8.1	Izolacija celokupne RNA iz rastlinskega materiala	26
3.2.3.8.2	Merjenje koncentracije celokupne RNA	27
3.2.3.8.3	Tretiranje izolirane celokupne RNA z DNazo	27
3.2.3.8.4	Reakcija reverzne transkripcije	27
3.2.3.8.5	Reakcija PCR v realnem času	27
3.2.3.8.6	Relativna kvantifikacija podatkov	28
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>28</b>
4.1	TRANSFORMACIJA RASTLIN Z BAKTERIJO <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
4.2	PREHODNA TRANSFORMACIJA RASTLIN S SISTEMOM DVOČLENNE RNA	35
<b>4.2.1</b>	<b>Potrditev dela gena za glukanazo</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Določanje koncentracije dvočlenne RNA</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Izražanje glukanaze po tretiranju z dsRNA</b>	<b>36</b>
4.2.3.1	Poskus 1	36
4.2.3.2	Poskus 2	37

4.2.3.3	Poskus 3	39
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>52</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestavine gojišča MS za regeneracijo tkivnih kultur krompirja	14
Preglednica 2: Sestava gojišč R3B, PACM, Zcvh, cvh, YM in LB	15
Preglednica 3: Kontrole transformacije za konstrukta z genom MTD in PCPI v pMDC32	20
Preglednica 4: Priprava reakcijske mešanice za pripravo matrične DNA	22
Preglednica 5: Program podaljševanja matrične DNA	22
Preglednica 6: Reakcija priprave dvočlenje RNA	23
Preglednica 7: Starost rastlin ob tretiranju, število dni tretiranja in oznaka listov, ki smo jih analizirali v poskusu 1, 2 in 3	25
Preglednica 8: Reakcijska mešanica za reakcijo reverzne transkripcije	27
Preglednica 9: Reakcijska mešanica za qPCR	28
Preglednica 10: Potek transformacije za konstrukta z genom MTD in PCPI v pMDC32	31
Preglednica 11: Prisotnost promotorja 35S v transformiranih rastlinah z genom MTD in PCPI, ki so rastle na selekcijskem gojišču cvh.	34
Preglednica 12: Uspešnost transformacije za konstrukta MTD in PCPI.	34
Preglednica 13: Izmerjene koncentracije očiščene dvočlenje RNA	36

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Mehанизem prenosa T-DNA v rastlinsko celico (Tzfira in Citovsky, 2006)	7
Slika 2: Mehанизem utišanja genov z RNAi (Azorsa in sod., 2003)	11
Slika 3: Tkivna kultura zdravega krompirja Désirée	17
Slika 4: Plazmidna karta vektorja pMDC32 (Curtis in Grossniklaus, 2003)	19
Slika 5: Področje T-DNA med mejnima sekvencama RB in LB v plazmidu pMDC32, z označenima mestoma attR1 in attR2 za Gateway rekombinacijsko kloniranje gena (Curtis in Grossniklaus, 2003)	19
Slika 6: Poganjki krompirja Désirée	24
Slika 7: Rastline krompirja Désirée	24
Slika 8: Prikaz tehnike tretiranja in odvzema listov za vzorčenje	25
Slika 9: Prikaz kontrol transformacije po 3 tednih rasti na gojišču brez higromicina	29
Slika 10: Negativna kontrola (netransformiran Désirée) na gojišču s higromicinom po 6 tednih rasti	29
Slika 11: Prvi kalusi transformiranega Désirée-ja z genom MTD (levo) in z genom PCPI (desno) na gojišču s higromicinom po 6 tednih rasti	30
Slika 12: Kalusi transformiranega Désirée-ja z genom MTD (levo) in genom PCPI (desno) po 9 tednih rasti	30
Slika 13: Prvi poganjki transformiranega Désirée-ja z genom MTD (levo) in genom PCPI (desno) na gojišču s higromicinom po 15 tednih rasti	31
Slika 14: Negativna kontrola (netransformiran Désirée) na gojišču s selekcijo po 15 tednih rasti	32

Slika 15: Negativna kontrola na selekcijskem gojišču cvh (na sliki je videti posušene mlade rastline)	32
Slika 16: Transformirane rastline z genoma PCPI in MTD na selekcijskem gojišču za koreninjenje (cvh)	33
Slika 17: Analiza PCR produktov z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za del gena glukanaze	35
Slika 18: Relativno izražanje gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo za poskus 1	37
Slika 19: 21 dni stari kontrolna rastlina a) in b) rastlina tretirana z dsRNA	37
Slika 20: Relativno izražanje gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo za poskus 2	38
Slika 21: 35 dni stare kontrolne rastline (14 dni stare rastline smo tretirali z vodo)	38
Slika 22: 35 dni stare tretirane rastline z dsRNA (14 dni stare rastline smo tretirali z dsRNA)	39
Slika 23: 35 dni stari a) rastlina kontrolne skupine in b) tretirana rastlina z dsRNA	39
Slika 24: Relativno izražanje gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo za poskus 3	40
Slika 25: 39 dni stare kontrolne rastline netransformiranih krompirjev	40
Slika 26: 39 dni stare tretirane rastline transformiranih krompirjev	41
Slika 27: 39 dni stari a) kontrolna rastlina in b) transformirana rastlina Désirée	41
Slika 28: Primerjava tretiranih listov s slepim vzorcem in dsRNA 39 dni starih rastlin	41

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Koncentracije celokupne RNA pobranih vzorcev poskusa 1
- Priloga A2: Koncentracija celokupne RNA pobranih vzorcev poskusa 2
- Priloga A3: Koncentracija celokupne RNA pobranih vzorcev poskusa 3
- Priloga B1: Relativno število kopij gena za glukanazo in citokrom oksidaze upoštevajoč redčitve vzorcev, število kopij gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo in povprečje za poskus 1
- Priloga B2: Relativno število kopij gena za glukanazo in citokrom oksidaze upoštevajoč redčitve vzorcev, število kopij gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo in povprečje za poskus 2
- Priloga B3: Relativno število kopij gena za glukanazo in citokrom oksidaze upoštevajoč redčitve vzorcev, število kopij gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo in povprečje za poskus 3

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A..... absorbanca

*A. tumefaciens* ..... *Agrobacterium tumefaciens*

bp..... bazni par

CaMV..... virus mozaika cvetače (angl. cauliflower mosaic virus)

cox gen ..... gen za citokrom oksidazo

DNA ..... deoksiribonukleinska kislina

DSBR ..... popravljanje dvojnega preloma (angl. double-strand-break repair)

dsRBD..... vezavna domena za dvoverižno RNA (angl. double-stranded RNA-binding domain)

dsRNA..... dvoverižna RNA

EDTA..... etilendiamin tetraocetna kislina

LB ..... Lauria-Bertani bogato gojišče

MS ..... Murashige in Skoog gojišče

miRNA..... mikro RNA

MTD..... manitol dehidrogenaza

NIB..... Nacionalni inštitut za biologijo

NTC..... slepi vzorec

Obr/min..... obratov na minuto

- OR ..... osnovna raztopina za pripravo MS gojišča
- PACM ..... osnovno MS gojišče z dodanimi avksini in citokinini
- PCPI ..... krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor
- PCR ..... verižna reakcija s polimerazo
- pMDC ..... komercialni ekspresijski plazmid
- PTGS ..... posttranskripcijsko utišanje genov
- R3B ..... osnovno MS gojišče z dodanimi avksini in citokinini
- RNA ..... ribonukleinska kislina
- RNAi ..... RNA interferenca
- qPCR ..... verižna reakcija s polimerazo v realnem času
- siRNA ..... majhna interferenčna RNA
- SSGR ..... popravljanje enojne verzeli (angl. single-strand-break repair)
- T-DNA ..... transfer DNA
- Ti plazmid ..... tumor inducirajoči plazmid
- VIGS ..... utišanje gena povzročeno z virusom
- YM ..... gojišče za rast kvasovk (angl. yeast and mold broth)
- Zcv(h) ..... gojišče z zeatin ribozidom, klaforanom, vankomicinom  
(in higromicinom)

## SLOVARČEK

- cDNA ..... Komplementarna DNA, ki nastane z reverznim prepisom mRNA.
- DNaza ..... Encim, ki razgrajuje DNA.
- mRNA ..... RNA, z vlogo posrednika za določanje zaporedja aminokislin pri translaciji in nastajanju polipeptidov.
- Napredna genetika ..... Koncept genetske analize, ki za izhodišče vzame fenotip in išče ustrezен genotip.
- Reverzna genetika ..... Koncept genetske analize, ki za izhodišče vzame genotip in analizira fenotipske spremembe.
- Reverzna transkripcija ..... Sinteza DNA na podlagi RNA matrice.
- RNaza ..... Encim, ki razgrajuje RNA.

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Genska transformacija rastlin postaja vse bolj uveljavljena tehnologija za izboljšanje kmetijskih rastlin (Sidorov in sod., 1999). Izboljšanje lastnosti poljščin s tradicionalnimi postopki traja od 10 do 15 let. Rastlinske tkivne kulture in genski inženiring sta postala temelj rastlinske biotehnologije in lahko močno pospešita pridobivanje rastlin z izboljšanimi lastnostmi (Pauls, 1995).

V zadnjih nekaj letih je genski inženiring rastlin močno napredoval, saj je znanstvenikom uspelo razviti mnogo metod za prenos DNA. Prednostna metoda za genski inženiring poljščin je uporaba bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, ki ima naravno sposobnost prenosa genov (Conner in Jacobs, 1999). Prvi dosežki uspešnega vnosa heterolognih genov v genom krompirja z bakterijo *A. tumefaciens* segajo v leto 1986 (Mullins in sod., 2006). Vendar je njena uporaba omejena pri nekaterih poljščinah, predvsem pri žitih in ostalih enokaličnicah. Transformacijo s pomočjo bakterije *A. tumefaciens* povezujemo z dvema potencialnima težavama in sicer prenos dela DNA izven mejnih sekvenc T-DNA in prisotnost bakterije v rastlinski kulturi po transformaciji. Pri rastlinah, kjer transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* ni možna, se poslužujemo alternativnih metod kot so neposredni privzem gole DNA v protoplaste ali tkiva z uporabo elektroporacije, tehniko bombardiranja celic (Conner in Jacobs, 1999) ali tehniko mikroinjiciranja (Käppeli in Auberson, 1998).

V zadnjih nekaj letih je bil dosežen pomemben napredek tudi na področju utišanja genov v rastlinah. RNA interference (RNAi) je ena izmed najzanimivejših odkritij na področju genomike. Je pojav, kjer posttranskripcijsko utišanje genov sproži dvooverižna RNA (dsRNA). RNAi postaja pomembna metoda za preučevanje funkcij genov pri evkariontih. Čeprav tehnika utišanja z RNAi še ni optimizirana, so jo že leta 1988 označili za perspektivno tehniko pridobivanja rastlin z 'znotraj celično odpornostjo' proti virusom (povzeto v Rahman in sod., 2008).

## 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Za ovrednotenje vloge genov, ki sodelujejo v interakciji krompir-virus, je najprimernejši pristop funkcionalne analize genov. Za spreminjanje izražanja genov v rastlinah lahko uporabimo različne metode. Namen diplomskega dela je bil primerjati različne metode spreminjanja izražanja genov (za povečanje ali utišanje izražanja). Bolj natančno smo želeli primerjati metodo stabilne transformacije rastlin, izvedeno posredno z bakterijo *A. tumefaciens*, in metodo prehodne transformacije z uporabo dsRNA. Stabilna transformacija za povečano izražanje genov ali z genskim utišanjem je pomembna za funkcionalno analizo genov, vendar je priprava transformant s stabilno vključenim konstruktom dolgotrajjen postopek, medtem ko je prehodna transformacija hitrejši, cenejši in manj zahteven postopek (Yasmin in Debener, 2010).

## 1.3 HIPOTEZE

Metodi transformacije z bakterijo *A. tumefaciens* in s sistemom dsRNA sta primerni za uspešno spreminjanje izražanja genov.

V genom krompirja *Solanum tuberosum* sorte Désirée bomo stabilno vstavili gen za manitol dehidrogenazo (MTD) in gen za cisteinski proteinazni inhibitor (PCPI).

Prehodno transformacijo bomo preverili z genom za glukanazo in pričakujemo, da se bo izražanje gena prehodno spremenilo.

# 2 PREGLED OBJAV

## 2.1 FUNKCIONALNA ANALIZA GENOV

Funkcijska genomika je mlada veda, njeni začetki pa segajo v leto 1980, ko so molekularna orodja postala uporabna za določanje celične funkcije genov (Grotewold, 2003). Leta 1997 so genomiko razdelili na dve vedi in sicer strukturno genomiko in funkcijsko genomiko. Glavne komponente proučevanja funkcijske genomike so mutante na ravni genoma, izražanje RNA, proteini in njihove interakcije ter metaboliti (Leister, 2005). Genetiki preučujejo izražanje in interakcije genskih produktov zadnjih 50 let. Sprva so istočasno preučevali le nekaj genov. S pomočjo genomike in njenih orodij pa lahko danes preučujemo več genskih produktov hkrati. Funkcijska genomika ponuja nove priložnosti za

hitro identifikacijo genov, ki so pomembni v kmetijstvu in predstavlja nove strategije za spremištanje določenih lastnosti. S funkcionalno analizo genov lahko opredelimo vlogo vsakega gena v organizmu. Podaja nam zapletene in dinamične molekularne opise bioloških sistemov, s katerimi bo mogoče natančno napovedati, kako lahko te sisteme spremiščamo, da bi izboljšali učinkovitost (Leader, 2005). Če imamo znano sekvenco gena, najenostavnejše pridobimo informacijo o njegovi funkciji, če sekvenco gena primerjamo s sekvencami v bazi podatkov. Vendar pa računalniške analize na splošno ne zadostujejo za natančno določitev funkcije gena in je eksperimentalni pristop v večini primerov nujno potreben. Razvojno funkcijo gena lahko preučujemo z utišanjem gena ali njegovim prekomernim izražanjem (Bouchez in Höfte, 1998). Funkcijska genomika uporablja visoko zmogljive tehnologije in uvaja globalen pristop na ravneh transkriptomike (za merjenje nivoja mRNA), proteomike (za določanje koncentracije posameznega proteina), metabolomike (za določanje količine pomembnih metabolitov) in transgenomike (utišanje, gensko označevanje, mutageneza) in jih povezuje v holističen pogled na celico, njeno strukturo in njeno vlogo (Oliver in sod., 2002). Večinoma se pristopi funkcijске genomike nanašajo na generacijo populacije organizmov, pri katerih so bili geni utišani, oziroma je prišlo do njihovega prekomernega izražanja. Označevanje spremenjenega gena omogoča hitro identifikacijo in neposredno povezavo gena s fenotipom. Take populacije lahko uporabimo v napredni (angl. forward) genetiki, vendar je njihova uporaba bolj značilna za reverzno (angl. reverse) genetiko (Leader, 2005). Napredna genetika je koncept genetske analize, ki za izhodišče vzame fenotip, neko mutacijo, in nato išče ustrezni genotip z uporabo pozicijskega kloniranja ali z analizo kandidatnih genov (Sessions, 2005). Reverzna genetika igra pomembno vlogo pri sistematičnem analiziranju genov z neznano funkcijo ter vključuje vrsto metod za inaktivacijo funkcije gena. Pri nekaterih rastlinah so razvili populacije z različnimi stabilnimi transgenimi in netransgenimi pristopi (Leader, 2005).

Preprost pristop za določanje funkcije genov v rastlinskem genomu je zmanjšanje oziroma utišanje izražanja gena. Tipičen transgeni pristop za take študije je insercijska mutageneza (označevanje), kjer vstavimo T-DNA ali heterologne transpozone, vendar jo omejuje izobilje genov, letalno utišanje, neoznačene mutante in nezmožnost ciljanja insercijskega elementa v specifičen gen. Te probleme uspešno rešuje RNA interferenca (Matthew, 2004). Poleg RNAi, utišanje gena povzročimo z virusom (VIGS) in transgeni, ki inducirajo

utišanje. V obdobju funkcijске genomike potreba po orodjih za obsežno ciljano in naključno mutagenezo narašča. Potencialno orodje je transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* (Michielse in sod., 2005).

## 2.2 TRANSFORMACIJA

Poznamo dva glavna načina vnosa genov v rastline: neposreden način (vnos gole DNA) in posreden način (vnos s pomočjo vektorjev). Pri neposrednem načinu uporabljamo postopke, ko golo DNA vnašamo v rastlinske celice. Za predrtje rastlinske stene se poslužujemo različnih načinov (Bohanec in sod., 2004). Trangen se v rastlinski genom lahko vgradi stabilno ali le prehodno (Chung-Pin in sod., 2007). Rastlinsko transformacijo izvajamo z uporabo širokega spektra orodij. Transformacija s pomočjo bakterije *Agrobacterium* je glavna metoda posredne transformacije, ki se uporablja v biotehnologiji, medtem ko so najbolj pogoste metode neposredne transformacije, transformacija protoplastov ali bombardiranje celic z mikroprojektili. Alternativne metode za neposredno transformacijo so infiltracija, transformacija s silikon karbidnimi vlakni, elektroporacija celic ali tkiv, mikroinjiciranje, transformacija z liposomi in transformacija skozi pelodno cevko. Čeprav imajo vse metode prednosti, ki so edinstvene za vsako od njih, sta transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* in bombardiranje z mikroprojektilom najbolj pogosto uporabljeni metodi (Rao in sod., 2009). Biolistika je prednostni postopek neposrednega vnosa in je trenutno najbolj konkurenčna metoda posrednemu vnisu s pomočjo vektorjev (Bohanec in sod., 2004). Po drugi strani pa ima slabosti, saj zaradi fizične moči lahko pride do spremembe transgenov. Transformacija plastidov ima veliko prednost pred transformacijo jedra, saj ne pride do pozicijskih učinkov, izražanje transgena pa je zelo visoko (Sidorov in sod., 1999).

Transformacija s pomočjo bakterije *A. tumefaciens*, je s svojim širokim spektrom gostiteljev danes najbolj pogosto uporabljenatahnologija v rastlinskem genskem inženiringu (Chung in sod., 2006). Da bakterija *A. tumefaciens* povzroča rastlinskega raka je že dobro poznano dejstvo. Že zgodaj so odkrili, da tvorbo tumorjev lahko povzroči plazmid ali virus. Odkrili so velike plazmide, ki so bili prisotni samo v virulentnih sevih bakterije *A. tumefaciens*. Te tumorje so poimenovali Ti plazmidi (tumor-inducirajoči). Ti plazmidi kodirajo proteine, ki omogočajo bakteriji *A. tumefaciens*, da okuži rastlino in povzroči tvorbo tumorjev (Kreuzer in Massey, 2008). Le majhen del plazmida T-DNA naj

bi bil odgovoren za tvorbo tumorja (Rao in sod., 2009). Ta bakterija ima naravno sposobnost prenosa T-DNA (angl. transferred DNA) v gostiteljev genom (Chung-Pin in sod., 2007). T-DNA vsebuje gene za fitohormone, ki so odgovorni za celično proliferacijo in tvorbo tumorjev, kot tudi gene za tvorbo posebnih hrani (opinov) v rastlinski celici (Heller, 2003). Ta del segmenta vsebuje tudi gene za sintezo avksinov in citokinov. Noben izmed genov T-DNA nima vloge pri transportu. Levo od T-DNA segmenta so virulentni (*vir*) geni, ki kodirajo proteine za infektivne procese. Njihova naloga je, da bakterijo vežejo na rastlinsko celično steno in prenesejo T-DNA v rastlinsko celico. *Vir* geni so pomembni za prenos genov vendar sami ostanejo zunaj rastlinske celice. Ob poškodbi se izloči rastlinski sok, ki sproži izražanje *vir* genov. Preden lahko bakterijo *A. tumefaciens* uporabimo v genskem inženiringu, moramo iz Ti plazmida odstraniti tumor producirajoče gene. *Vir* geni ostanejo nedotaknjeni, gene T-DNA pa zamenjamo z drugimi, željenimi geni, katere želimo vnesti v rastlino. Spremenjen plazmid nato vrnemo nazaj v bakterijo, ki jo dalje gojimo v kulturi. Bakterija *A. tumefaciens* je učinkovit vektor za tobak, petunije, paradižnik in ostale dvokaličnice. Bakterija ni učinkovita pri večini enokaličnic, kar predstavlja velik problem, saj med enokaličnice spada večina žit, kot so koruza, pšenica, ječmen, riž in rž. Le-te predstavljajo precejšenj delež v prehrani (Kreuzer in Massey, 2008). Uporaba transformacije z bakterijo *A. tumefaciens* se kaže v visoki ekspresiji rekombinantnega proteina. V nasprotju z bakterijo *A. tumefaciens* so virusni vektorji omejeni z velikostjo transgena (Chung-Pin in sod., 2007).

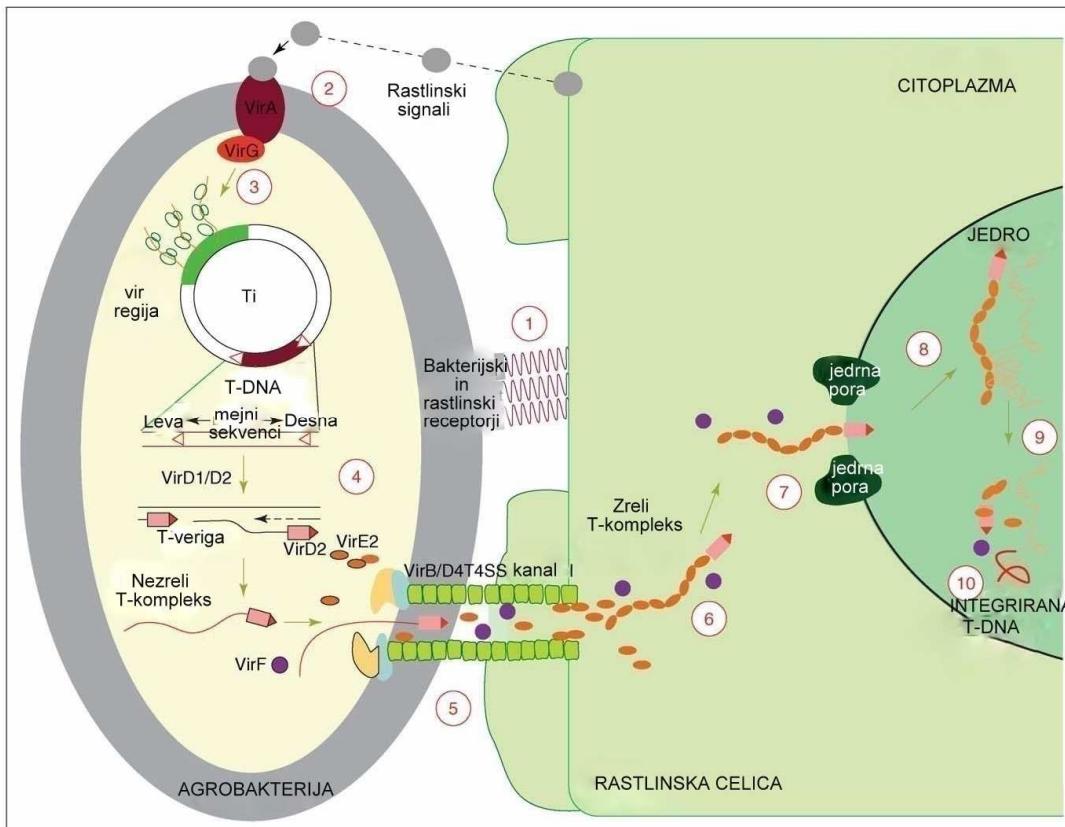
Bakterijo *A. tumefaciens* lahko uporabimo tudi za prehodno produkcijo rekombinantnih proteinov v rastlinskih celicah, običajno po okužbi gostiteljskih tkiv. Ta tehnologija je pogosto imenovana kot 'agroinfiltracija' in ima veliko prednost pred stabilno transformiranimi rastlinami, saj ne zahteva stabilne integracije T-DNA v genom gostitelja. Izražanje proteina je mogoče doseči v nekaj dneh po okužbi. Listi okuženi z bakterijo *A. tumefaciens* običajno izražajo majhen nivo proteinov v primerjavi s stabilno transformiranimi rastlinami. Virusni vektorji so ponavadi upravičena alternativa transformaciji z bakterijo *A. tumefaciens* kot orodje za prehodno ekspresijo v rastlinskih celicah. Kot orodje za prehodno izražanje proteinov v rastlinskih celicah, so pomembni zaradi svoje sposobnosti podvojevanja v avtonomnih celicah gostitelja. Virusni vektorji se pomikajo lokalno iz celice v celico, včasih tudi sistemsko iz lista v list. To se lahko kaže v visokem donosu rekombinantnih proteinov (Chung in sod., 2006).

### 2.2.1 Mehanizem prenosa T-DNA v rastlinsko celico

Osnova za patogenezo bakterije *A. tumefaciens* je prenos tumorogene DNA v genom rastline (transformacija). Posledica je sprememba rastlinskega celičnega metabolizma, ki se kaže v celični proliferaciji in sintezi hraničnih snovi, ki zagotavljajo selektivno prednost bakteriji *A. tumefaciens* (tumorogeneza).

Proces transformacije vključuje več glavnih korakov (Slika 1). Najprej je prepoznavna in pritrdiritev bakterije na rastlinsko celico. Aminokisline, organske kisline in sladkorji, ki se sprostijo iz ranjenih celic, delujejo kot kemoatraktanti za tumorogeno agrobakterijo. Bakterija se ob prihodu do ranjenega dela veže v rastlinske celice v polarni orientaciji. Sprva se veže šibko preko sinteze acetiliranih polisaharidov. Nato sledi močno pritrjanje z izrivanjem celuloznih vlaken. Hkrati je aktiviran *vir* regulon z *VirA/VirG* dvokomponentnim regulatornim sistemom. *Vir* regulon je set operonov, ki so potrebni za prenos virulentne DNA. Aktiviran *VirA* prenese svoj fosfat v citoplazemski protein *virG*, ta pa se nato veže na ojačevalne elemente *vir* zaporedja v promotorje *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* in *virG*. Preko ko-operativnega delovanja *virD1* in *virD2* proteinov, je fragment enoverižne DNA oziroma T-veriga sintetizirana iz enega ali večih delov Ti plazmida. *VirD2* se kovalentno veže na 5'konec T-verige, ki je nato obdana z *VirE2*, enoverižnim DNA vezavnim proteinom. Kompleks T-veriga/*Vir* beljakovina (T-kompleks) je nato eksportiran iz agrobakterije v citoplazmo rastlinske celice. To pot vodita operona *virB* in *virD4*. Ko je kompleks enkrat v citoplazmi gostiteljeve celice, T-veriga verjetno obstaja kot nukleoproteinski kompleks (T-kompleks) z enojno *VirD2* molekulo, ki je kovalentno pritrjena na svoj 5' konec. Številne molekule *VirE2* pokrivajo celotno dolžino. T-kompleks je nato prenesen v jedro gostiteljeve celice s pomočjo *VirD2* in *VirE2*. Ko je T-DNA enkrat v jedru, je pripravljena za integracijo. Integracija T-DNA ni mestno specifična. Integrirane T-DNA se po rastlinskem genomu razporedijo naključno (Escobar in Dandekar, 2003).

Raziskave so pokazale, da so za integracijo T-DNA bolj sprejemljiva intergenska področja. Študije na rastlini *Arabidopsis thaliana* in tobaku so pokazale, da je integracija T-DNA povezana z delecijo v DNA rastlinske celice. Pogostejše delecije so na 3'koncu T-DNA v primerjavi s 5'koncem. Opazili so tudi več zelo majhnih homolognih področij v bližini 3'konca (Escobar in Dandekar, 2003).



Slika 1: Mehanizem prenosa T-DNA v rastlinsko celico (Tzfira in Citovsky, 2006)

### 2.2.1.1 Modeli za integracijo T-DNA v rastlinsko celico

Bakterija *A. tumefaciens* lahko uporablja različne poti za popravilo DNA in različne dejavnike gostiteljeve celice za integracijo bodisi enoverižne molekule T-DNA ali dvoverižne pri različnih celičnih linijah in rastlinskih vrstah. Razvili so različne modele za pojasnjitev integracije T-DNA v rastlinsko celico. Za integracijo enoverižne ali dvoverižne T-DNA obstajata dva modela in sicer popravljanje dvojnega preloma (angl. double-strand-break repair, DSBR) in popravljanje enojne vrzeli (angl. single-strand-break repair, SSGR) (Dafny-Yelin in sod., 2009).

Pri modelu DSBR je dvojni prelom (angl. DSB) v ciljni (gostiteljevi) DNA predpogoj za integracijo T-DNA (Escobar in Dandekar, 2003). Integracija T-DNA se začne s prileganjem koncov dvoverižne T-DNA z delom, kjer je prišlo do DSB v ciljni DNA. Slednja je pred tem izgubila nekaj nukleotidov zaradi aktivnosti svojih eksonukleaz. Sledi odstranitev štrelčih koncov z endo- ali eks-nukleazo. Konci so nato popravljeni in zlepiljeni v gostiteljevem genomu. SSGR model kot gonilno silo za integracijo izkorišča prisotnost vrzeli (angl. gaps) v gostiteljevem genomu. Take vrzeli dobimo, ko

eksonukleaze podaljšajo zareze (angl. nicks) v vrzeli. Integracija se prične s prileganjem koncov enoverižne T-DNA v gostiteljev genom. Sledi obdelava 3' konca enoverižne T-DNA z endo- ali eksonukleazo. Nato sledi lepljenje 5' konca enoverižne T-DNA v gostiteljev genom in nastanek druge zareze v komplementarni verigi. Zaključek integracije temelji na komplementaciji T-verige v dvoverižno molekulo in ligacijo svojega 3' konca v drugo zarezo (Dafny-Yelin in sod., 2009). DSBR integracijski model zahteva, da se T-DNA pretvori v dvoverižno obliko pred integracijo v DSB, medtem ko SSGR integracijski model podpira tezo, da se T-DNA integrira kot enoverižna molekula. Frekvenca transformacije je višja pri enoverižni DNA kot pri dvoverižni. Raziskave so pokazale, da enoverižna T-DNA predstavlja preferenčni substrat za integracijo. Iz dejstva, da je T-DNA prenesena v gostiteljevo celico kot enoverižna molekula, je postal SSGR preferenčni model za T-DNA integracijo (Escobar in Dandekar, 2003). Tretji model – integracija T-DNA, ki temelji na mikrohomologiji – so izpeljali iz modela SSGR. Pri slednjem se na predintegracijsko mesto v genomu prilegajo le kratke sekvence molekule T-DNA. Model zahteva aktivnost gostiteljeve endonukleaze pri tvorbi genomskeh zarez in pri odstranjevanju 3'konca T-verige med procesom integracije (Dafny-Yelin in sod., 2009).

### **2.2.2 Stabilna transformacija rastlin**

Stabilna transformacija zahteva razpoložljivost ustreznih transfekcijskih plazmidov, poznavanje ustreznega promotorja in zaključnih signalov. Potreben je tudi sistem za prenos eksogene DNA v celice, razpoložljivost selekcijskih markerjev in identifikacija področij, ki so ustrezne tarče za integracijo in katerih motnja ne povzroči izgube viabilnosti (Suarez in McElwain, 2010).

### **2.2.3 Prehodna transformacija rastlin**

Prehodna transformacija zahteva metodo za učinkovit prenos DNA konstrukta v jedro ciljnih celic in metodo za določanje ter merjenje količine izražanja gena (Suarez in McElwain, 2010). Za prehodno transformacijo uporabljajo bakterijo *A. tumefaciens* za induciranje utišanja genov (Roth in sod., 2004), za analizo izražanja tujih genov in interakcije med geni. Prehodna transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* je hitra in zanesljiva metoda za proučevanje cis-elementov in trans-faktorjev ter njihovih interakcij. Poleg tega omogoča hitro analizo nativnih rastlinskih promotorjev, tudi promotorjev

odzivnih na stres (Yang in sod., 2000). Bakterija *A. tumefaciens* je rastlinski patogen, njegova infiltracija lahko sproži obrambo rastline in medsebojno vplivanje z bakterijsko nasprotno obrambo. Ta lahko spremeni aktivnost nekaterih virusnih supresorjev (Roth in sod., 2004). Bombardiranje celic z dvooverižno RNA, siRNA ali DNA konstrukti, ki kodirajo lasnično (angl. hairpin) RNA, lahko povzroči prehodno utišanje tarčnega gena.

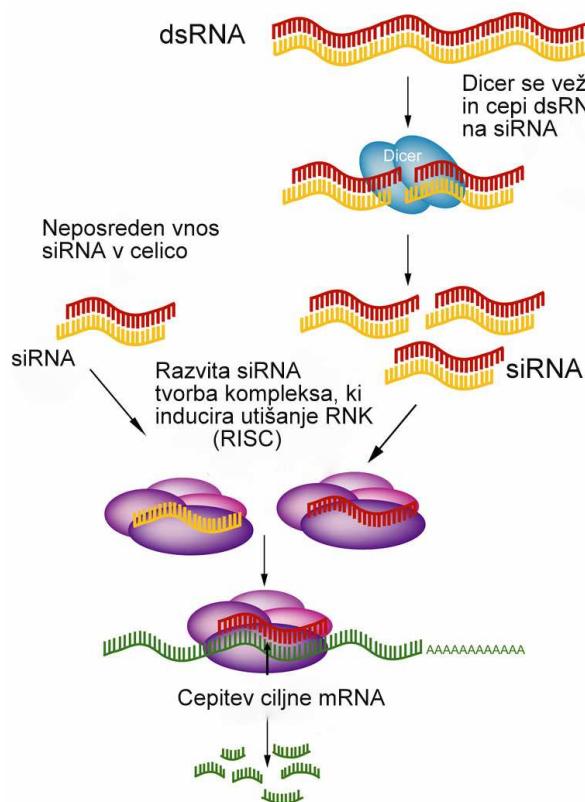
Prav tako prehodno utišanje povzroči obstreljevanje s smiselno (angl. sense) ali protismiselno (angl. antisense) RNA. Podobno povzročijo utišanje genov DNA konstrukti, vstavljeni v T-DNA bakterije *A. tumefaciens*, ki so vneseni z metodo agroinfiltracije. Obe metodi utišanja trajata le nekaj dni in se uporablja samo za utišanje majhnega števila endogenih genov (Watson in sod., 2005).

### 2.3 MEHANIZMI UTIŠANJA GENOV

Utišanje genov je oblika regulacije, ki jo uporabljajo rastline, živali in glice za kontrolo izražanja določenih proteinov. Utišanje genov se lahko zgodi na ravni transkripcije (transkripcija je preprečena), kar imenujemo transkripcijsko utišanje genov (TGS). TGS običajno sproži metilacija DNA. Posttranskripcijsko utišanje genov (PTGS) povzroči specifični razpad celičnih ali virusnih mRNA molekul. PTGS sproži od RNA odvisna RNA polimeraza, ki razgradi dvooverižno RNA v majhne interferenčne RNA (Shepherd in sod., 2009). Če PTGS vpliva na transgene in endogene gene, ga imenujemo tudi kosupresija. Kosupresija in antisense supresija utišata samo gene ali viruse z visoko stopnjo homologije v sekvenkah do transgena (>75%). Ta specifičnost in sposobnost transgene mRNA, da utiša virusno genomske RNA, kaže na to, da rastlinska kodirajoča od RNA odvisna RNA polimeraza (RDRP) producira majhne RNA molekule, ki so komplementarne transgeni mRNA (Dougherty in Parks, 1995). TGS in PTGS sta odvisna od homologije zaporedja nukleotidov. Geni, ki so utišani v transkripciji so homologni v promotorski regiji, medtem ko so tarčni geni za PTGS homologni v prepisani regiji. TGS utiša gene na nivoju transkripcije v jedru. V nasprotju pa PTGS nima jasne vloge pri transkripciji tarčnega gena, ampak pomaga pri hitri in specifični reorganizaciji RNA transkriptov v citoplazmi. PTGS sprožimo z virusom ali transgenom, lahko pa tudi z vnosom eksogene DNA z bombardiranjem celic ali agroinfiltracijo.

Višji evkarionti so razvili sekvenčno specifičen mehanizem razpada RNA, ki ga imenujemo utišanje RNA (Kalantidis in sod., 2008). Biološki odgovor na dvooverižno RNA (dsRNA) poznamo pod izrazom RNA interference (RNAi) ali zgoraj omenjeno posttranskripcijsko utišanje gena (PTGS) (Hannon, 2002). Tehnika utišanja z RNAi je zanimiva predvsem za preučevanje funkcij genov pri različnih organizmih (Kusaba, 2004). Pojav RNAi so prvič odkrili leta 1993 pri črvu *Caenorhabditis elegans*, kjer je prišlo do utišanja sekvenčno specifičnega gena, kot odgovor na dsRNA. Guo in Kemphues (1995) sta uporabila protismiselno RNA za utišanje izražanja genov za rast in razvoj črva *C. elegans*. Ugotovila sta, da sta imeli smiselna in protismiselna RNA enak učinek. Študije na črvih so nadaljevali z uporabo protismiselne RNA za utišanje genskega izražanja. Primerjali so medsebojno delovanje smiselne in protismiselne RNA. Ugotovili so, da je bila mešanica dsRNA vsaj 10-krat bolj učinkovita pri utišanju, kot posamezni smiselna in protismiselna RNA (Hannon, 2002). Protismiselna tehnologija se uporablja za utišanje oziroma zmanjšanje produkcije določenih proteinov. Tehnologija temelji na majhnih enoverižnih nukleinskih kislinah (oligonukleotidi), ki preprečijo prepis DNA v protein. Znanstveniki so odkrili, da imajo podoben učinek tudi majhni delci dsRNA (Kreuzer in Massey, 2008).

dsRNA je pomemben regulator ekspresije genov pri večini evkariontov. Sproži različne tipe utišanja genov, ki se v celoti nanašajo na utišanje RNAi. Le – ta je ena izmed komponent obrambe pred dsRNA. Ključni korak je procesiranje dsRNA ali mikroRNA v 21-23 nukleotidov dolge majhne interferenčne RNA molekule (siRNA) z endonukleazo iz družine RNaze III, ki jo poznamo pod imenom DICER (Kalantidis in sod., 2008) (Slika 2). Encim vsebuje katalitično RNazo III in vezavne domene za dsRNA (dsRBD). siRNA in miRNA dupleks vsebujejo delce ribonukleoproteina (RNP), ki se nato preuredijo v kompleks, ki inducira utišanje RNA (RISC). Kompleks RISC poleg siRNA vsebuje številne proteine. Eden izmed dobro poznanih proteinov je argounaut2 protein (AGO2) (Rahman, 2008). Argounaut, kot jedro RISC-a, vsebuje majhne RNA (sRNA) in RNazno aktivnost. Argounaut protein je ribonukleaza, poznana kot SLICER, ki razgradi ciljno RNA (Carthew, 2001).



Slika 2: Mehanizem utišanja genov z RNAi (Azorsa in sod., 2003)

Utišanje z RNAi je enostavna metoda, ki se uporablja za utišanje genov tudi pri heksaploidnih organizmih in enokaličnicah, kjer so drugi pristopi neučinkoviti.

### 2.3.1 Utišanje genov povzročeno z virusom (VIGS)

Utišanje genov povzročeno z virusom (VIGS) delno sproži enak mehanizem utišanja genov kot RNAi. Sprožen je z dsRNA, ki nastane pri replikaciji virusnega genoma (Leader, 2005). Sprva so izraz VIGS uporabljali kot pojav, ko si je rastlina opomogla zaradi okužbe z virusom. Danes je izraz dobil sinonim za tehniko, kjer se rekombinantne virusne vektorje uporablja za utišanje izražanja endogenih genov. Metoda utišanja genov z VIGS je enostavna, pogosto vključuje agroinfiltracijo ali biolistično metodo. Rezultate dobimo hitro, 2-3 tedne po inokulaciji (Purkayastha in Dasgupta, 2009). Večina rastlinskih virusov ima RNA genom, vendar jih veliko obstaja tudi z DNA genomom. Infekcijo povzročimo z virusnim genomom, ki ga prineseta ali virus, ki vsebuje RNA ali virus, ki vsebuje DNA. Rastlino okužimo z bakterijo *A. tumefaciens*, ki vsebuje T-DNA plazmid, katerega predhodno modificiramo, da vsebuje virusne sekvene. Eksogene sekvene lahko vstavimo na določeno lokacijo v virusni genom, ne da bi pri tem uničili njegovo

infektivnost. Ko tako modificirane genome uporabimo za okužbo rastline, pri tem induciramo tudi tuje sekvence, ki povzročijo odgovor RNAi gostiteljske rastline (Voinnet, 2001). Utisanje lahko sprožimo lokalno, ki se nato razširi po celotni rastlini. Vendar pa VIGS ni primeren za vse pristope funkcijске genomike. Veliko virusov ne vstopi v tkiva kot so meristemi in semena, zato je težko razviti sistem, ki je ustrezen za vnos pomembnih genov v za viruse težko dostopna tkiva. V tem primeru sta primernejša pristopa utisanja z RNAi ali utisanje s pomočjo transgena, čeprav je v teh dveh primerih vpliv na izražanje genov manjši (Leader, 2005). Kot je poznano že nekaj časa, si rastline okužene z virusi lahko opomorejo in tvorijo nove poganjke, ki ne kažejo simptomov okužbe. Rastline lahko zmanjšajo replikacijo virusov z utisanjem RNA. Čeprav se rastlinski virusi med seboj zelo razlikujejo po morfologiji, organizaciji genoma, po izbiri gostiteljev, replikaciji in ekspresiji proteinov, vse rastline kopijo virusno RNA kot del njihovega življenskega cikla (Stanley, 2008). Kot odgovor na okužbo z virusom, gostiteljska rastlina prične z utisanjem RNA proti virusni RNA in producira mobilni signal utisanja. Mobilni signal se premika vzdolž iste poti kot virus. Med virusom in rastlino se prične tekmovanje. Če se virus pomika pred signalom, lahko povzroči infekcijo v oddaljenih celicah. Če mobilni signal utisanja prispe do oddaljenih celic prvi, bo povzročil utisanje RNA in okužba ne bo sistemská. Transgene rastline imajo tri tipe odgovorov na inokulacijo: občutljivost, rezistenca in ponovna obnovitev fenotipa. Le-te rastline so sprva okužene sistemsko, kasneje poženejo nove liste s postopoma manj izrazitimi simptomi okužbe, navsezadnje pa poženejo liste brez sledi virusa in so popolnoma rezistentni na 'super' okužbo (Meister in Tuschl, 2004).

### 2.3.1.1 Sistemski transport RNA v rastlinah

RNA se lahko razširi po celotni rastlini na tri načine. Prvi izmed njih je gibanje na dolgih razdaljah. Virus vstopi ob mehanski poškodbi rastlinskih celic, se razširi po rastlini iz celice do celice preko plazmodezme, dokler ne preide v vaskularni sistem. Virus se nato prenese sistemsko po žilnem sistemu, to pa zahteva dodatno funkcijo, ki jo običajno kodira virusni plaščni protein. Najbolj preučen gibljiv protein je 30 kDa velik protein mozaičnega virusa tobaka (TMV). TMV veže virusno RNA in tvorita podaljšan transportni kompleks TMV-RNA. Ta gre nato v plazmodezmo preko interakcije z elementi citoskeleta celice gostitelja. Drugi način širjenja RNA po rastlini je sistemski transport RNA elicitorjev

posttranskripcijskega utišanja genov. Kot tretji način je transport specifičnih endogenih RNA molekul na dolge razdalje. Endogene celične RNA se transportirajo po rastlinskem žilnem sistemu. Z *in situ* hibridizacijo so dokazali, da je mRNA za listni transporter saharoze (SUT1) locirana zlasti znotraj sitastih cevi, medtem ko se njihova transkripcija zgodi v sosednjih celicah spremljevalkah. To dokazuje, da se mRNA giblje skozi floem v krompirju. Kako RNA molekule vstopijo v vaskularni sistem in nato izstopijo v tarčno tkivo je nejasno. Virusni gibljivi proteini naj bi delovali kot čaperoni, ker se vežejo na T-RNA (angl. transferred RNA), jo razvijejo in preskrbijo funkcijo prenosa (Citovsky in Zambryski, 2000).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Gojišča

Preglednica 1: Sestavine gojišča MS za regeneracijo tkivnih kultur krompirja

Osnovna raztopina	Sestavine	Proizvajalec	Končna koncentracija	Opombe
OR 1	MAKROELEMENTI			
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma	1650 mg/L	pH=5,8
	KNO <sub>3</sub>	Merck	1900 mg/L	
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck	440 mg/L	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kemika	170 mg/L	
OR 2	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Merck	370 mg/L	
	mioinozitol		100 mg/L	
OR 3	MIKROELEMENTI			
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck	1,9 mg/L	
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	Sigma	22,3 mg/L	
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Merck	0,025 mg/L	
OR 4	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	Merck	0,025 mg/L	
	KI	Merck	0,83 mg/L	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Sigma	0,25 mg/L	
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sigma	27,8 mg/L	
OR 5	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	Kemika	37,3 mg/L	
	VITAMINI			
	glicin	Merck	2 mg/L	
	nikotinska kislina	Kemika	0,5 mg/L	
	piridoksin - HCl	Sigma	0,5 mg/L	
Za trdno gojišče MS30 dodamo:	tiamin - HCl	Caldiochem	0,5 mg/L	
	saharoza (3%)	Kemika	30 g/L	
Za trdno gojišče MS20 dodamo:	agar (0,8%)	Bacto	8 g/L	
	saharoza (3%)	Kemika	20 g/L	
	agar (0,8%)	Bacto	8 g/L	

Preglednica 2: Sestava gojišč R3B, PACM, Zcvh, cvh, YM in LB

Gojišče	Uporaba	Sestavine	Proizvajalec	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Opombe
R3B	priprava izsečkov na transformacijo	MS gojišče				
		saharoza	Kemika		30g/L	
		agar	Bacto		8g/L	pH=5,8
		NAA		180 mg/L	2 mg/L	
		BAP		220 mg/L	1 mg/L	
PACM	priprava izsečkov na transformacijo	MS gojišče				
		saharoza	Kemika		30g/L	
		kazein			2g/L	
		hidrolizat				pH=6,5
		2,4 D		220 mg/L	1 mg/L	
Zcvh	regeneracija in selekcija izsečkov po transformaciji	MS gojišče				
		saharoza	Kemika		20g/L	
		agar	Bacto		8g/L	
		makrocef	Krka	250mg/mL	200 mg/L	pH=5,8
		zeatin ribozid		220 mg/L	1 mg/L	
		vankomicin		100mg/mL	200 mg/L	
		higromicin		100mg/mL	20 mg/L	
cvh	selekcija poganjkov	MS gojišče				
		saharoza	Kemika		30g/L	
		agar	Bacto		8g/L	pH=5,8
		makrocef	Krka	250mg/mL	200 mg/L	
		vankomicin		100mg/mL	200 mg/L	
YM	namnožitev bakterijske kulture	MS gojišče				
		kvasni ekstrakt	Bacto		0,4 g/L	
		manitol	Kemika		10 g/L	
		MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck		0,2 g/L	
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	Kemika		0,5 g/L	
		NaCl	Merck		0,1 g/L	

Se nadaljuje

### Nadaljevanje

Gojišče	Uporaba	Sestavine	Proizvajalec	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Opombe
LB	gojenje bakterijske kulture	agar	Bacto	15g/L		
		tripton	Bacto	10g/L		
		kvasni ekstrakt	Bacto	5 g/L		
		NaCl	Merck	5 g/L		
		agar *	Bacto	8 g/L		

\*V gojišče smo agar dodali v primeru uporabe petrijevih plošč

### 3.1.2 Laboratorijska oprema

- Termoblok (Kambič)
- PCR naprava (Applied Biosystems)
- Spektrofotometer NanoDrop (Thermo Scientific)
- Pipete (Eppendorf)
- Avtoklav (Kambič)
- Hladna soba (Angelnatoni Scientifica)
- Brezprašna komora za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami (Ehret)
- Brezprašna komora za delo z bakterijami in plazmidi (Biosan)
- Naprava za elektroforezo (Uvi-tec)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Rastna komora (Kambič)
- Stresalnik (Kambič)
- Inkubator (Kambič)
- Homogenizator (Qiagen)
- pH meter (Mettler Toledo)
- Tehtnica (Lotrič)
- Aparatura za PCR v realnem času ABI 7900HT (Applied Biosystems)
- Okrogli sterilni filter papirji
- Sterilne falkonke
- Sita
- 25x25 cm filtrirni papir za sušenje izsečkov
- Mikrocentrifugirke

- Kirurški lepilni trak MICROPORE
- Gorilnik

### 3.1.3 Kompleti

- Replicator™ RNAi Kit (FINNZYMES)
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- innuPREP Plant RNA kit (Analytik Jena)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

### 3.1.4 Pufri in raztopine

- 70% in 96% etanol (Pharmachem)

### 3.1.5 Reagenti in barvila

- Etidijev bromid 10 mg/mL (Sigma)

### 3.1.6 Encimi

- DNase I (Invitrogen)

### 3.1.7 Rastlinski material

Za poskus smo uporabili rastline krompirja *Solanum tuberosum L.* sorte Désirée v tkivni kulturi iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB). Rastlinske izsečke (nodije) smo pripravili v sterilnih pogojih v brezprašni komori za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami. V vsako posodico z gojiščem MS30 (Preglednica 1) smo vcepili po 8 nodijev. Za transformacijo rastlin smo potrebovali 4 tedne stare in približno 10 cm visoke rastline (Slika 3).



Slika 3: Tkivna kultura zdravega krompirja Désirée

## Pogoji v rastni komori

- 16 ur osvetlitve z žarnico (Osram L58 W/77)
- 8 ur teme
- Relativna zračna vlaga:  $94 \pm 2\%$
- Osvetljenost:  $70\text{-}90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$
- Temperatura med osvetlitvijo:  $21^\circ\text{C}$
- Temperatura v temi:  $19^\circ\text{C}$
- Pri enakih pogojih v rastni komori je potekala tudi rast gensko spremenjenih rastlin

### 3.1.8 Bakterijski material in plazmidi

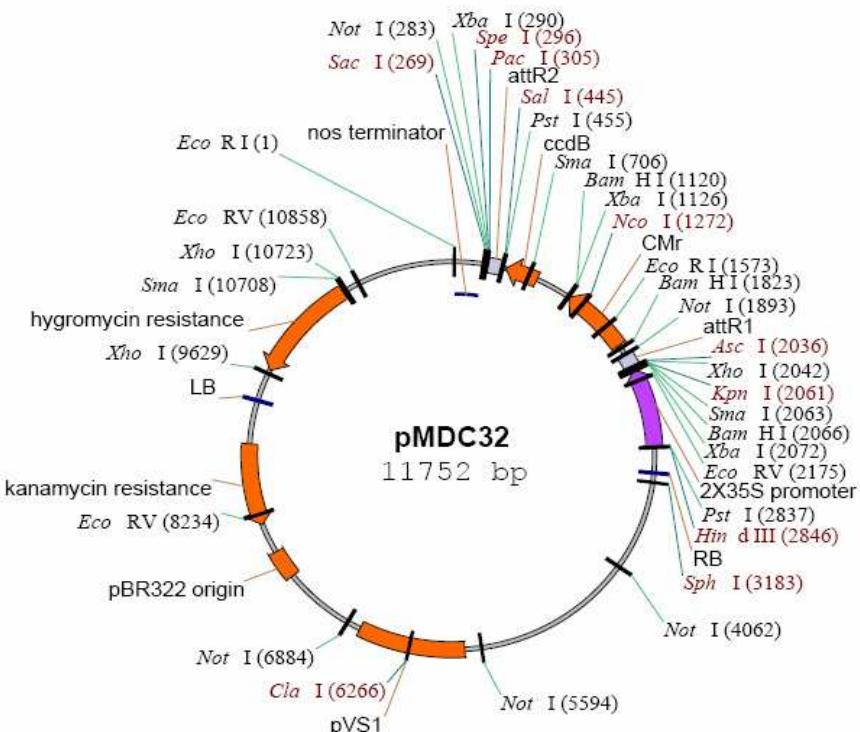
#### 3.1.8.1 Bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

Za transformacijo krompirja smo uporabili že pripravljene elektrokompetentne celice bakterije *A. tumefaciens*, sev LBA4404. Sev vsebuje kromosom TiAch5 in razoroženi Ti plazmid pAL4404. Elektrokompetentne celice so bile pripravljene na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

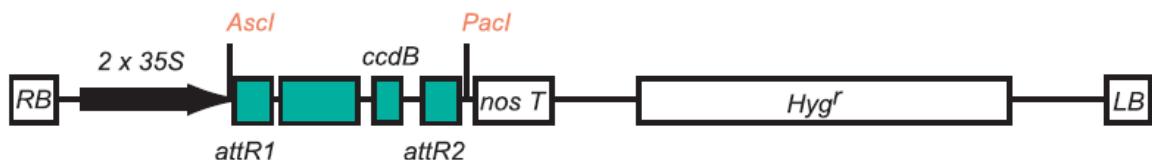
#### 3.1.8.2 Plazmid pMDC32

Za transformacijo rastlin z bakterijo *A. tumefaciens* smo uporabili vektor pMDC32 (Slika 4). Vektor pMDC32 izvira iz pCambia T-DNA. Uporabljam ga za Gateway kompatibilno rekombinacijo. Regijo, ki se bo vnesla v rastlino, omejujeta področji RB (right border) in LB (left border). Regija vsebuje mesto za rekombinacijo, regulatorne elemente in gen za odpornost proti antibiotiku higromicinu, ki služi za selekcijo transformant. AttR1 in attR2 sta značilni mesti za Gateway rekombinacijsko kloniranje. Gen *ccdB*, ki se nahaja med mestoma attR1 in attR2, s toksičnimi produkti omogoča negativno selekcijo vektorjev, katerih rekombinacija ni bila uspešna. Ob rekombinaciji z vstopnim vektorjem, željeni gen zamenja *ccdB* gen. Dvojni 35S promotor predstavlja regulatorni element za izražanje vstavljenega gena. Izhaja iz virusa mozaika cvetače CaMV-35S, ki je visoko aktiven v večini rastlinskih celic. S terminatorjem tNOS predstavljata klasično kombinacijo v pripravi konstrukta za transformacijo (Slika 5). Plazmid zunaj regije vsebuje zapis za odpornost proti antibiotiku kanamicinu (Kn). Področje pVS1 predstavlja mesto za

replikacijo v bakterijo *A. tumefaciens*. Vektorja pMDC32 z vstavljenima genoma MTD in PCPI so pripravili na Nacionalnem inštitutu za biologijo.



Slika 4: Plazmidna karta vektorja pMDC32 (Curtis in Grossniklaus, 2003)



Slika 5: Področje T-DNA med mejnima sekvencama RB in LB v plazmidu pMDC32, z označenima mestoma attR1 in attR2 za Gateway rekombinacijsko kloniranje gena (Curtis in Grossniklaus, 2003)

Oznaki RB (angl. right border) in LB (angl. left border) sta tako imenovani mejni sekvenci, ohranjeni iz naravne T-DNA. ccdB gen: onemogoča rast bakteriji *E. coli* seva Omnimax. Hyg<sup>r</sup>: odpornost proti antibiotiku higromicinu.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava MS gojišča

Gojišče MS smo pripravili v steklenem merilnem valju. V bidestilirani vodi smo raztopili saharozo in osnovne raztopine. Preden smo umerili na ustrezno vrednost pH, smo pustili, da so se vse sestavine dobro raztopile ob mešanju na magnetnem mešalu. pH vrednost smo

umerili z dodajanjem HCl oziroma NaOH. Pred avtoklaviranjem (15 min pri temperaturi 121 °C in 103,4 kPa) smo dodali še potrebno količino agarja. Gojišča smo še topla razlili v sterilne petrijevke ali v sterilne posodice (odvisno od namena) v brezprašni komori. Le-teh nismo popolnoma pokrili s pokrovčkom, dokler se gojišče ni popolnoma strdilo in ohladilo, da ni nastal odvečen kondenz (1-2 uri). Gojišča, katerim je bilo potrebno dodati antibiotike ali hormone, smo pred dodatkom le-teh po avtoklaviraju ohladili na temperaturo pod 50°C.

### 3.2.2 Transformacija rastlin z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*

#### 3.2.2.1 Priprava bakterije *A. tumefaciens* za transformacijo rastlin

Pred samim začetkom eksperimenta smo pripravili bakterijsko kulturo z bakterijo *A. tumefaciens*. Z agarne plošče smo pod sterilnimi pogoji precepili eno kolonijo v 50 ml YM (Preglednica 2) gojišča z antibiotikom higromicinom in inkubirali na stresalniku 36 ur na 30°C, s stresanjem 225 rpm.

#### 3.2.2.2 Transformacija rastlin

Za transformacijo rastlin smo uporabili krompir *Solanum tuberosum L.* sorte Désirée. Za transformacijo rastlin s konstruktoma z genom MTD in PCPI v pMDC32 smo potrebovali 800 izsečkov. Pripravili smo 80 izsečkov za tri kontrole (Preglednica 3).

Preglednica 3: Kontrole transformacije za konstrukta z genom MTD in PCPI v pMDC32

Število izsečkov	Transformacija z bakterijo <i>A. tumefaciens</i>	Selekcija	Pričakovani rezultati
Negativna kontrola	20	-	s higromicinom Rasti ne pričakujemo
Pozitivna kontrola:			
- konstrukt z genom MTD	20	+	Vsi transformirani izsečki najbrez higromicina bi kalusirali in imeli poganjke
- konstrukt z genom PCPI	20	-	brez higromicina Pričakujemo rast kalusov in poganjkov
Kontrola regeneracije	20	-	brez higromicina Pričakujemo rast kalusov in poganjkov

Postopek transformacije je potekal:

- 1. DAN: Kolonijo bakterijske kulture *A. tumefaciens* smo namnožili v 50 mL gojišča YM s selekcijskim antibiotikom (higromicin). Bakterije *A. tumefaciens* smo čez noč gojili pri 30°C, s stresanjem 225 rpm (točka 3.2.2.1).
- 2. DAN: Po dva okrogle sterilne filter papirja smo položili v vsako petrijevko z R3B gojiščem (Preglednica 2). Papirja smo položili tako, da se z robovi nista popolnoma prekrivala. Na filter papir smo kanili po 2 mL tekočega gojišča PACM (Preglednica 2), tako, da sta se omočila po celotni površini. V sterilnih pogojih smo internodije zdravih rastlin krompirja narezali na izsečke velikosti 2-5 mm. Izsečke smo prenesli na sterilne filter papirje na R3B ploščah s PACM gojiščem. Pripravili smo 6 petrijevk po 100 izsečkov, 2 petrijevki po 20 izsečkov in 2 petrijevki po 120 izsečkov.
- 3. DAN: Bakterijsko kulturo smo prelili v 50 mL centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 4000 rpm. Gojišče YM smo odlili, bakterijsko kulturo pa resuspendirali v 75 ml LB gojišča brez antibiotikov. Premešano kulturo smo vlili v sterilno petrijevko, kamor smo s pinceto prenesli zgornji filter papir z izsečki z R3B gojišča. Izsečke smo v suspenziji pustili 5-10 minut. Nato smo suspenzijo z izsečki precedili skozi sterilno cedilo v sterilno posodico. Bakterijsko suspenzijo smo uporabili večkrat. Izsečke smo odcedili in stresli na suh sterilni filter papir, da so se nekoliko osušili. Pri tem smo pazili, da se niso izsušili preveč. Izsečke smo nato prenesli s pinceto nazaj na gojišče R3B na spodnji filter papir. Izsečke smo porazdelili po celotni površini filter papirja. Petrijeve plošče smo oblepili s parafilmom. Petrijevke z izsečki smo dali v rastno komoro za 48 h.
- 5. DAN: Izsečke smo prenesli na Zvh (Preglednica 2) gojišče s selekcijo (higromicin) in ovili z mikropor trakom.
- 19. DAN: Izsečke smo prenesli na sveže gojišče Zvh s selekcijo (gojišče je vsebovalo antibiotik higromicin) in petrijevke ovili z mikropor trakom.
- 40. DAN: Izsečke smo ponovno prenesli na sveže gojišče Zvh s selekcijo (gojišče je vsebovalo antibiotik higromicin) in petrijevke ovili z mikropor trakom.
- Postopek smo ponavljali na vsake tri tedne, dokler nismo imeli dovolj poganjkov za nadaljnje eksperimente.

- Zrasle poganjke smo odrezali od kalusa in jih prestavili na gojišče cvh (kot Zcvh, le da brez zeatin ribozida). Poganjke, ki so uspešno rasli tudi na cvh gojišču smo prestavili na MS30 (Preglednica 1) gojišče za vzdrževanje v tkivnih kulturah.

### 3.2.3 Transformacija rastlin z dvoverižno RNA

Dvoverižno RNA smo pripravili s pomočjo kompleta Replicator<sup>TM</sup> RNAi Kit (FINNZYMES) po protokolu proizvajalca (specifični podatki, ki so odvisni od posameznega eksperimenta, so prikazani spodaj).

#### 3.2.3.1 Priprava matrične DNA

Najprej smo pomnožili del gena za glukanazo v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Sestavine reakcijske mešanice za prvo stopnjo, pripravo matrične DNA, so prikazane v Preglednici 4. Na podlagi talilne temperature smo izbrali primeren program podaljševanja matrične DNA (Preglednica 5).

Preglednica 4: Priprava reakcijske mešanice za pripravo matrične DNA

Komponenta (po vrstnem redu)	Volumen/ 50 µl reakcije	Končna koncentracija (za eno reakcijo)
Voda	31,5 µl	
5x fuzijski HF pufer	10 µl	1x
dNTP-ji (10mM)	1 µl	200 µM
F začetni oligonukleotid (10µM)	2,5 µl	0,5 µM
R začetni oligonukleotid (10µM)	2,5 µl	0,5 µM
DNA (plazmid z genom glukanaze)	2 µl	
Phusion <sup>TM</sup> DNA polimeraza	0,5 µl	0,02 U/µl

Preglednica 5: Program podaljševanja matrične DNA

Faza	Temperatura	Čas	Ponovitve
Začetna denaturacija	98 °C	30 s	1x
Denaturacija	98 °C	10 s	
Prileganje začetnih oligonukleotidov, podaljševanje	72 °C	35 s	34x
Izgradnja komplementarne verige	72 °C	5 min	1x

Po končani reakciji smo vzorce ohladili na 4°C.

### 3.2.3.2 Čiščenje PCR produkta

Po reakciji smo PCR produkt očistili z Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) po protokolu proizvajalca.

### 3.2.3.3 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost PCR reakcije smo preverili na agarozni gelski elektroforezi. Naredili smo 1% agarozni gel. Na gel smo nanesli 0,5 µl PCR produkta. Elektroforeza je potekala 30 min, pri 100 V. Gel smo nato pogledali pod UV svetlogo v transiluminatorju in ga fotografirali.

### 3.2.3.4 Priprava dvočlenne RNA

Pridobljeno matrično DNA smo uporabili v koraku sinteze dvočlenne RNA, v reakcijski mešanici prikazani v Preglednici 6.

Preglednica 6: Reakcija priprave dvočlenne RNA

Komponenta (po vrstnem redu)	Volumen / 50 µl reakcije	Končna koncentracija
Voda brez RNaz	17	
10x dsRNA sintezni pufer	5	1x
5x NTP mešanica	10	1x
matrična DNA	12,5	20 ng/ µl
MnCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5	
pirofosfataza	1	1,5 mM
T7 RNA polimeraza	1,5	
Phi6 RNA replikaza	1,5	

### 3.2.3.5 Čiščenje dvočlenne RNA

Dvočlenno RNA smo očistili z innuPREP Plant RNA kitom (Analytik Jena) po protokolu proizvajalca (izpustili smo le korak z uporabo membrane filtra D).

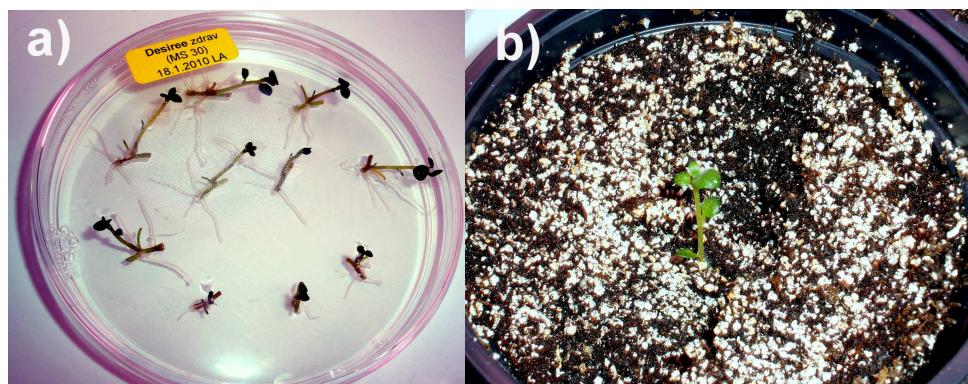
### 3.2.3.6 Merjenje koncentracije celokupne RNA

Po čiščenju dvočlenne RNA smo v izoliranih vzorcih izmerili koncentracijo celokupne RNA s spektrofotometrom Nanodrop pri absorbancah A260/A280 in A260/A230. Iz vsake

mikrocentrifugirke smo odvzeli 1,5 µl vzorca. Pri vsakem vzorcu smo odšteli 20 ng/µl, kar je bil doprinos matrične DNA (koncentracija matrične DNA se v reakciji ni spreminala, prav tako pa prisotnost DNA ni motila nadalnjih poskusov).

### 3.2.3.7 Metoda tretiranja rastlin

Rastline krompirja Désirée smo narezali na nodije in jih po 10 prenesli na petrijeve plošče z gojiščem MS30 (Slika 6a). Teden dni stare rastline smo vsadili v zemljo, vsako rastlino v svoj lonček (Slika 6b).



Slika 6: Poganjki krompirja Désirée

a) Rastline krompirja Désirée smo narezali na nodije in jih po 10 prenesli na petrijeve plošče z gojiščem MS30. b) Poganjke smo po enem tednu rasti v petrijevkah prenesli v zemljo, v vsako posodico po eno rastlino.

Ko so bile rastline dovolj velike so bile pripravljene za poskus (Slika 7).



Slika 7: Rastline krompirja Désirée

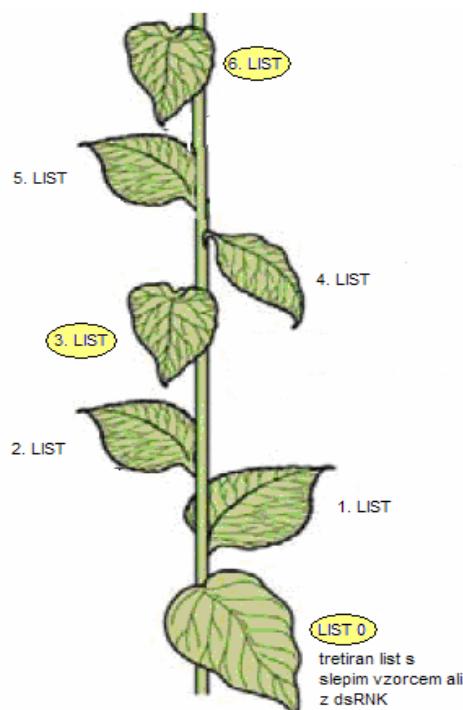
Naredili smo tri različne poskuse. Pri njih smo varirali starost rastlin ob tretiranju (14 ali 32 dni), število dni tretiranja (7 ali 21 dni) ter liste, ki smo jih analizirali (list 0, 3. list, 6. list) (Preglednica 7).

Preglednica 7: Starost rastlin ob tretiranju, število dni tretiranja in oznaka listov, ki smo jih analizirali v poskusu 1, 2 in 3

Poskus	Starost rastlin ob tretiranju [dan]	Število dni tretiranja	Oznaka listov, ki smo jih analizirali (glej Sliko 8)
1	14	7	0, 3
2	14	21	3, 6*
3	32	7	0, 3

\*Tretirani listi (list 0) so zaradi starosti že odpadli

Za vsak poskus smo uporabili 10 rastlin za tretiranje z dsRNA in 5 rastlin za kontrolo. Vsem rastlinam smo označili prvi spodnji list. Označene liste smo nato posuli s karborundom. Liste kontrolnih rastlin smo tretirali samo z vodo. Na označen list smo s pipeto kanili 7 µl vode ter kapljico s prsti nežno vtrli v list. Kapljico smo razmazali po celotni površini lista. Enako količino smo uporabili pri tretiranih rastlinah, le da je v tem primeru vzorec vseboval dvoverižno RNA. Končna koncentracija dvoverižne RNA, katero smo kanili na posamezen list, je bila 5 µg. Pobrali smo liste za analizo ter vsakega dali v svojo mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirke s pobranimi vzorci smo zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80°C. Način izbora listov za analizo je prikazan na Sliki 8.



Slika 8: Prikaz tehnikе tretiranja in odvzema listov za vzorčenje

### 3.2.3.8 Preverjanje genske ekspresije na stopnji mRNA

#### 3.2.3.8.1 Izolacija celokupne RNA iz rastlinskega materiala

Iz pobranih vzorcev listov krompirja smo izolirali celokupno RNA s pomočjo kita innuPREP Plant RNA kit (Analytik Jena). Izolacijo smo izvedli po protokolu proizvajalca z nekaj spremembami:

- Predpripravljene vzorce, ki so vsebovali kovinsko kroglico za homogenizacijo smo vzeli iz skrinje (-80 °C), ter jih homogenizirali (QIAGEN-Tissuelysser) 1 min na 30 Hz.
- RL pufer smo predhodno segreli na 56°C. 500 µl pufra smo dodali v vsako mikrocentrifugirko z vzorcem homogeniziranega rastlinskega materiala in vorteksirali. Mikrocentrifugirke smo nato dali v termoblok na 56°C za 5 minut. Vmes smo nekajkrat premešali.
- Centrifugirali smo pri največji hitrosti 5 minut oziroma 10 minut, če je bilo več rastlinskega materiala. Rastlinski material se je usedel na dno. V supernatantu smo dobili celični lizat.
- 500 µl supernatanta smo odpipetirali v mikrocentrifugirke s filtrom D.
- Vzorce smo centrifugirali 2 minuti na 10000 g.
- V filtratu se je nahajala RNA, filter smo zavrgli.
- V naslednjem koraku smo uporabili mikrocentrifugirke s filtrom R. V filtrat smo dali 450 µl 70% etanola, vsebino premešali s tipsom in prenesli v mikrocentrifugirko s filtrom R. Centrifugirali smo 2 minuti na 10000 g. Filtrat smo zavrgli.
- Na filter R, na katerem je bila vezana RNA, smo dodali 500 µl pufra HS (pufer za spiranje). Centrifugirali smo 1 minuto na 10000 g. Filtrat smo zavrgli.
- Dodali smo 650 µl pufra LS (pufer za spiranje) in centrifugirali 1 minuto na 10000 g. Filtrat smo zavrgli. Ta korak smo ponovili še enkrat.
- Filtre R smo prestavili v 2 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali 4 minute na 10000 g.
- Filtre R smo prestavili v 1,5 ml mikrocentrifugirke in na filter dodali 50 µl vode brez RNaz (predhodno je bila segreta na 56°C). Inkubirali smo 10 minut pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 1 minuto na 6000 g.

### 3.2.3.8.2 Merjenje koncentracije celokupne RNA

Izoliranim vzorcem smo izmerili koncentracijo celokupne RNA s spektrofotometrom Nanodrop pri absorbancah A260/A280 in A260/A230.

### 3.2.3.8.3 Tretiranje izolirane celokupne RNA z DNazo

Po izolaciji celokupne RNA smo vzorce (po 1,2 µg RNA) tretirali z DNazo (Invitrogen) po protokolu proizvajalca. DNaza je razgradila morebitno DNA prisotno v vzorcu.

### 3.2.3.8.4 Reakcija reverzne transkripcije

Vzorce celokupne RNA smo po reakciji z DNazo uporabili v reakciji reverzne transkripcije. Uporabili smo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in reakcijo izvedli po protokolu proizvajalca (Preglednica 8).

Preglednica 8: Reakcijska mešanica za reakcijo reverzne transkripcije

	Volumen
	[µl]
Vzorec RNA	
RT pufer	2,5
dGTP	1
naključni primer-ji	2,5
RNazni inhibitor	1
voda	4,45
RT encim	1,25

### 3.2.3.8.5 Reakcija PCR v realnem času

Za analizo izražanja gena za glukanazo ( $\beta$ -glu-III) smo uporabili kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) (Kogovšek in sod., 2010). Za normalizacijo smo uporabili gen za citokrom oksidazo (*cox*) (Baebler in sod., 2009). Metodo smo uporabili za analizo izražanja gena za glukanazo in *cox* gena, ki je bil uporabljen kot endogena kontrola za normalizacijo. Priprava reakcijske mešanice je predstavljena v Preglednici 9. Končna koncentracija sonde za *cox* gen je bila 250 nM začetnih

oligonukleotidov, za *cox* gen pa 900 nM. Za *cox* gen je bil uporabljen TaqMan Master Mix (ABI). Končna koncentracija začetnih oligonukleotidov za  $\beta$ -glu-III je bila 300 nM, uporabljen pa je bil SybrGreen Master Mix. Reakcije so bile izvedene v aparaturi ABI 7900HT z beleženjem podatkov v realnem času. Za pomnoževanje so bili uporabljeni standardni pogoji z dodano stopnjo disociacijske krivulje zaradi uporabe SybrGreen-a v reakcijah. Podatki so bili analizirani z uporabo SDS 2.3 programa (ABI). Izražanje glukanaze v posameznem vzorcu je bilo normalizirano na izražanje *cox* gen v istem vzorcu. Analizo so opravili na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Preglednica 9: Reakcijska mešanica za qPCR

	<b>Volumen</b>
	[ $\mu$ l]
cDNA	2
Universal Master Mix	2,5
mešanica začetnih oligonukleotidov in sonde	0,5

### 3.2.3.8.6 Relativna kvantifikacija podatkov

Podatke smo izvozili v program Microsoft Excel. Relativno število kopij smo določili s pomočjo umeritvene krivulje kot odvisnost vrednosti Ct od logaritma koncentracije števila kopij za gen glukanazo in citokrom oksidazo. Iz umeritvene krivulje smo nato izračunali relativno število kopij vzorca za *glu* in *cox* ter upoštevali redčitve. Za normalizacijo podatkov smo za vsak vzorec posebej relativno število kopij gena glukanaze delili z relativnim številom kopij gena citokrom oksidaze. Izračunali smo povprečje obeh redčitev. Relativno izražanje glukanaze smo izračunali kot razmerje števila kopij glukanaze in citokrom oksidaze. Nato smo izračunali povprečje relativnega izražanja glukanaze pri skupini tretirani z dsRNA in kontrolni skupini za list 0, 3. list in 6. list za poskus 1, 2 in 3. (po ustnem viru Davida Dobnika).

## 4 REZULTATI

### 4.1 TRANSFORMACIJA RASTLIN Z BAKTERIJO *Agrobacterium tumefaciens*

Rastline krompirja Désirée smo transformirali z dvema različima genoma. Pripravili smo izsečke za pozitivno kontrolo za oba konstrukta, negativno kontrolo in izsečke za kontrolo

regeneracije. Pri pozitivni kontroli pri transformaciji s konstruktom z genom MTD je po nekaj dneh nastopila okužba. Pri pozitivni kontroli pri transformaciji s konstruktom z genom PCPI so izsečki kalusirali in tvorili poganjke (Slika 9a). Prav tako so izsečki kalusirali in tvorili poganjke pri kontroli regeneracije (Slika 9b). Pri negativni kontroli so nekateri izsečki kalusirali in imeli poganjke (Slika 10), ki pa so po nekaj dneh rasti na gojišču cvh propadli.

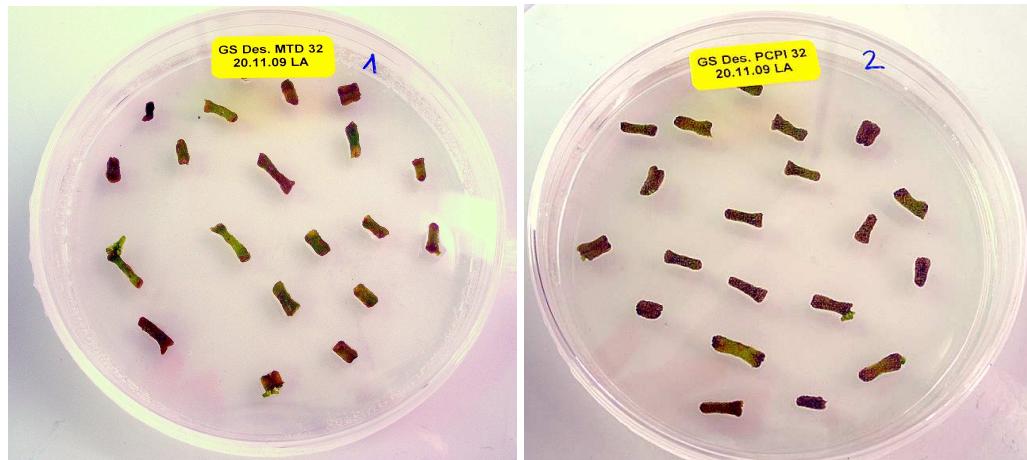


Slika 9: Prikaz kontrol transformacije po 3 tednih rasti na gojišču brez higromicina  
a) Pozitivna kontrola (transformirane rastline Désirée-ja z genom PCPI na gojišču brez higromicina); b) Kontrola regeneracije (netransformirane rastline Désirée-ja na gojišču brez higromicina).



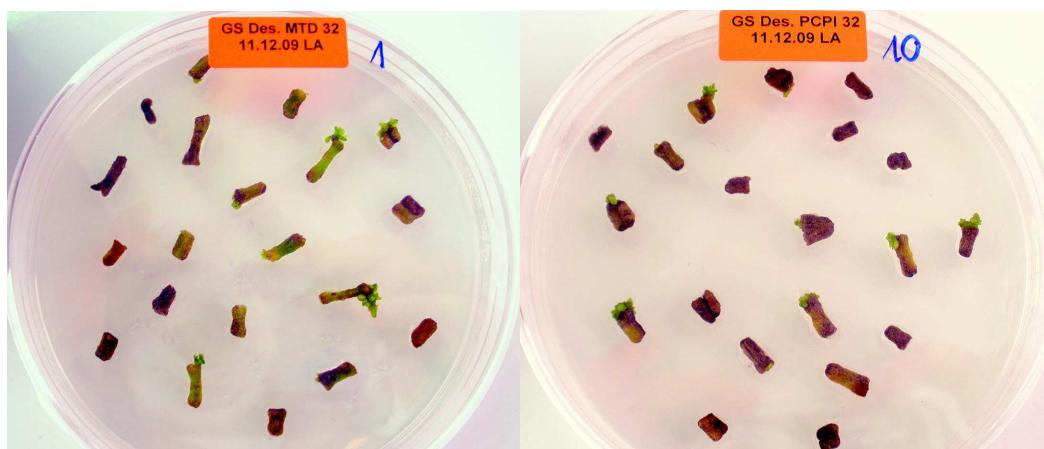
Slika 10: Negativna kontrola (netransformiran Désirée) na gojišču s higromicinom po 6 tednih rasti

Konstrukta z genom MTD in genom PCPI smo s pomočjo bakterije *A. tumefaciens* vnesli v krompir. Pri konstraktu MTD so transformirani izsečki kalusirali po 6-ih tednih. Prav tako so po 6-ih tednih kalusirali izsečki z vstavljenim konstruktom PCPI (Slika 11).



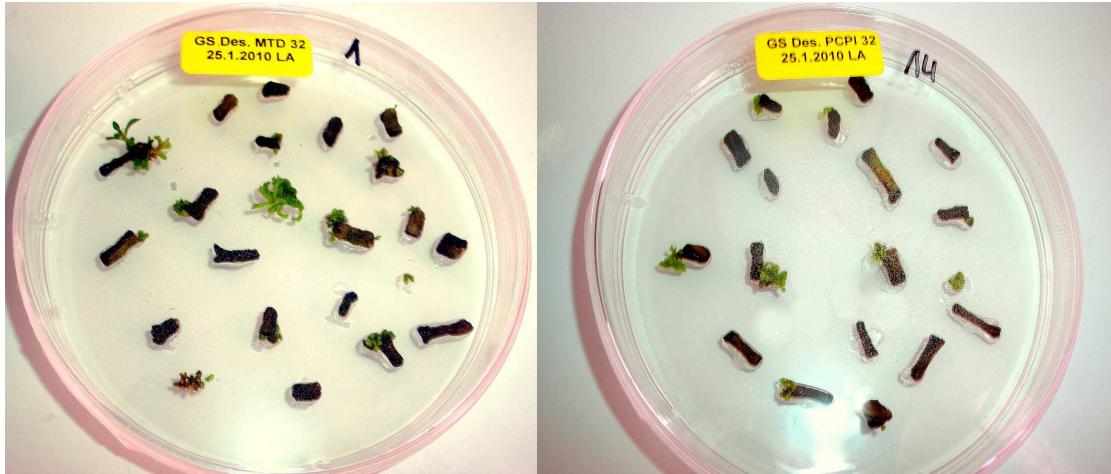
Slika 11: Prvi kalusi transformiranega Désirée-ja z genom MTD (levo) in z genom PCPI (desno) na gojišču s higromicinom po 6 tednih rasti

Kalusi so bili zelo dobro vidni po 9-ih tednih rasti (Slika 12).



Slika 12: Kalusi transformiranega Désirée-ja z genom MTD (levo) in genom PCPI (desno) po 9 tednih rasti

Prve poganjke smo opazili po 15-ih tednih pri izsečkih z vstavljenim konstruktom z genom MTD in konstruktom z genom PCPI (Slika 13).



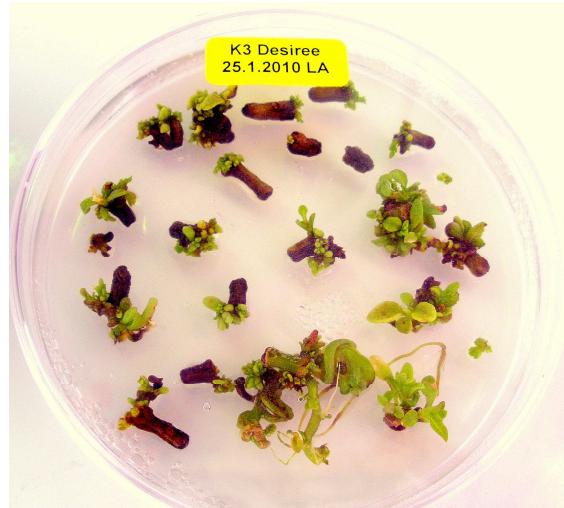
Slika 13: Prvi poganjki transformiranega Désirée-ja z genom MTD (levo) in genom PCPI (desno) na gojišču s higromicinom po 15 tednih rasti

Transformirane izsečke smo prestavljeni na sveže selekcijsko gojišče, dokler se ni regeneriralo dovolj poganjkov za nadaljnje poskuse. Po 24-ih tednih se je pri konstraktu z genom MTD regeneriralo 21 poganjkov, pri izsečkih z vstavljenim genom PCPI pa 11 poganjkov (Preglednica 10).

Preglednica 10: Potek transformacije za konstrukta z genom MTD in PCPI v pMDC32

Teden	Gen MTD	Gen PCPI
6	Transformirani izsečki že kalusirajo	Transformirani izsečki že kalusirajo
13	Opazimo prve poganjke	Opazimo prve poganjke
15	4 novi poganjki	2 nova poganjka
19	1 nov poganjek	2 nova poganjka
22	6 novih poganjkov	4 novi poganjki
24	10 novih poganjkov	3 novi poganjki
<b>Vsi poganjki skupaj</b>		<b>11 poganjkov</b>

Po 15-ih tednih rasti so se izsečki na negativni kontroli močno razrasli (Slika 14).



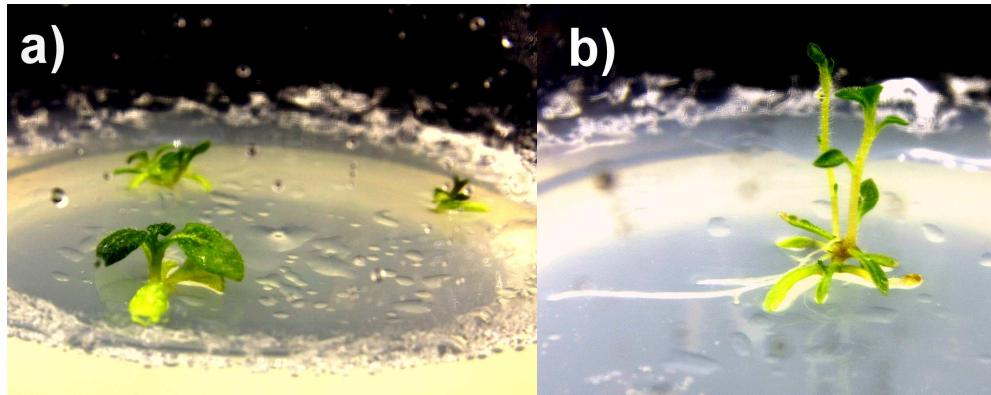
Slika 14: Negativna kontrola (netransformiran Désirée) na gojišču s selekcijo po 15 tednih rasti

Po 2 mesecih smo 7 poganjkov iz negativne kontrole prestavili na gojišče za koreninjenje (cvh) (Slika 15).



Slika 15: Negativna kontrola na selekcijskem gojišču cvh (na sliki je videti posušene mlade rastline)

Pri transformiranih izsečkih so se prvi poganjki pojavili po 15-ih tednih. Ko so bili dovolj veliki, smo poganjek ločili od kalusa in jih prestavili na gojišče cvh (Slika 16).



Slika 16: Transformirane rastline z genoma PCPI in MTD na selekcijskem gojišču za koreninjenje (cvh)  
a) Transformiran Désirée z genom MTD na selekcijskem gojišču cvh, b) Transformiran Désirée z genom PCPI na selekcijskem gojišču cvh. Na sliki je vidna rast korenin.

Izmed sedmih poganjkov iz negativne kontrole so na selekcijskem gojišču oziroma gojišču za koreninjenje (cvh) zrasli vsi poganjki, vendar se je vseh 7 kmalu posušilo. Na cvh gojišče smo prestavili 7 poganjkov z genom MTD, izmed katerih so vsi uspešno zrasli in 3 poganjke z genom PCPI, ki so tudi vsi uspešno zrasli. Pri vseh linijah, ki so zrasle na selekcijskem gojišču cvh smo preverili prisotnost promotorja 35S. Za analizo prisotnosti promotorja 35S smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Alary in sod., 2002). Če je bil promotor prisoten, to pomeni, da je bil konstrukt uspešno vstavljen v genom in je bila rastlina uspešno transformirana. Analizo so opravili na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Pri transformaciji z bakterijo *A. tumefaciens* smo od sedmih rastlin potrdili uspešno stabilno transformacijo linij z vnesenim konstruktom MTD pri petih rastlinah. Manj uspešna je bila transformacija s konstruktom PCPI, kjer smo potrdili prisotnost promotorja 35S le pri eni rastlini izmed treh, ki so rastle na selekcijskem gojišču cvh (Preglednica 11).

Preglednica 11: Prisotnost promotorja 35S v transformiranih rastlinah z genom MTD in PCPI, ki so rastle na selekcjskem gojišču cvh.

Gen v pMDC32	Oznaka poganjka	Prisotnost promotorja 35S
MTD	1	-
MTD	2	+
MTD	3	+
MTD	4	+
MTD	5	+
MTD	6	-
MTD	7	+
PCPI	8	-
PCPI	9	-
PCPI	10	+

Ob koncu poskusa smo izračunali uspešnost transformacije (1).

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

Rezultati frekvence transformacije za konstrukta MTD in PCPI so prikazani v Preglednici 12.

Preglednica 12: Uspešnost transformacije za konstrukta MTD in PCPI.

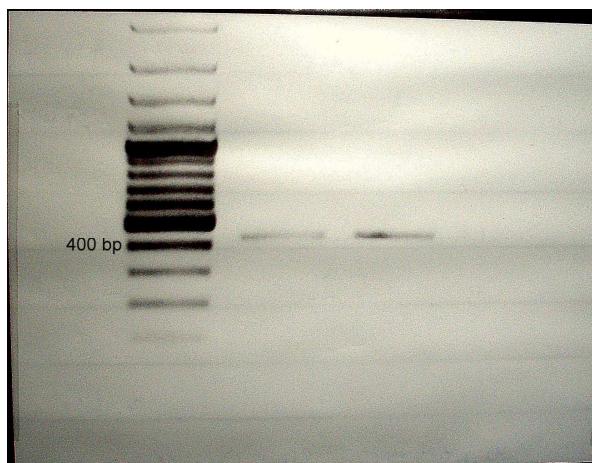
Število vseh izsečkov	Število uspešno transformiranih izsečkov	Transformacija [%]
PCPI v pMDC32	400	1
MTD v pMDC32	400	5

## 4.2 PREHODNA TRANSFORMACIJA RASTLIN S SISTEMOM DVOVERIŽNE RNA

Namen drugega dela diplomske naloge je bila prehodna transformacija krompirja *Solanum tuberosum* sorte Désirée s sistemom dsRNA. Prehodno transformacijo smo preverili z delom gena za glukanazo. Za produkcijo dsRNA smo potrebovali matrično DNA.

### 4.2.1 Potrditev dela gena za glukanazo

Pričakovana velikost PCR produkta za del gena glukanaze z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je 430 bp. Rezultat elektroforeze prikazuje, da smo v obeh vzorcih dobili ustrezni produkt, ki je služil kot matrična DNA za sintezo dsRNA (Slika 17).



Slika 17: Analiza PCR produktov z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za del gena glukanaze

Po končani sintezi smo dsRNA očistili in določili njeno koncentracijo.

### 4.2.2 Določanje koncentracije dvoverižne RNA

Po čiščenju dsRNA smo v vseh vzorcih izmerili koncentracijo RNA. Razmerje A[260/280] nam da podatek o prisotnosti proteinov v vzorcu. Razmerje A[260/230] prikazuje prisotnost soli v vzorcu. Če so razmerja večja od 1,8 pomeni, da je vzorec primerno čist. Količino RNA smo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop. Rezultati meritve s spektrofotometrom Nanodrop (Preglednica 13) so pokazali, da je čistost RNA ustrezna, saj so bile vse vrednosti večje od 1,8.

Preglednica 13: Izmerjene koncentracije očiščene dvoverižne RNA

Vzorec	Količina RNA [ng/µl]	A[260/280]	A[260/230]
1	666,0	2,2	2,15
2	714,7	2,21	2,40
3	717,0	2,21	2,36
4	714,6	2,20	2,40
5	690,4	2,21	2,36
6	682,2	2,23	2,34
7	730,1	2,2	2,35
Povprečje	<b>702,14</b>	<b>2,21</b>	<b>2,34</b>

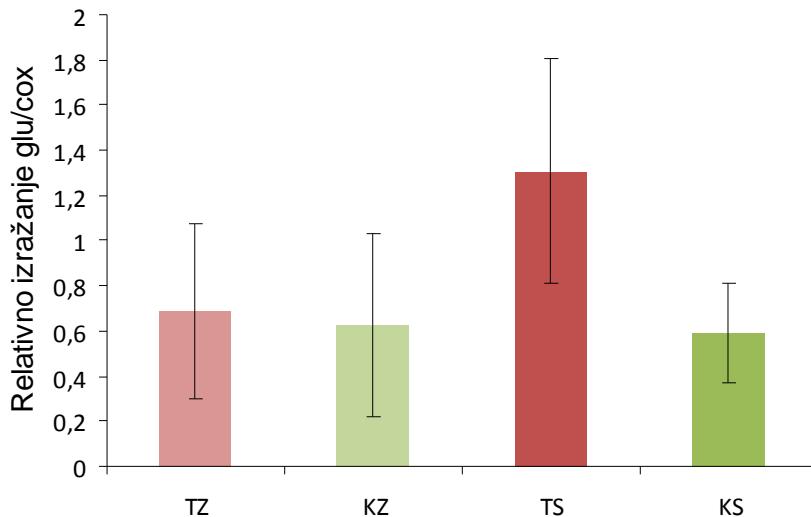
#### 4.2.3 Izražanje glukanaze po tretiranju z dsRNA

Naredili smo tri različne poskuse, kjer smo varirali starosti listov ob tretiranju (14 ali 32 dni), število dni tretiranja (7 ali 21 dni) ter liste, ki smo jih analizirali (list 0, 3. list, 6. list). Iz pobranih vzorcev listov krompirja smo izolirali celokupno RNA in njeno koncentracijo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop pri absorbancah A260/280 in A260/230 (natančnejši podatki v Prilogah A1, A2, A3).

Med rastlinami kontrolne skupine in rastlinami tretirane skupine z dsRNA ni bilo vidnih fenotipskih razlik. S PCR v realnem času smo želeli preveriti ekspresijo gena za glukanazo na prehodno transformiranih linijah krompirja Désirée z dsRNA in kontrolnih rastlinah. Za normalizacijo smo uporabili *cox* gen. NTC kontrola je bila negativna.

##### 4.2.3.1 Poskus 1

Pri poskusu 1 so bile 14 dni stare rastline tretirane 7 dni. Relativno izražanje gena za glukanazo pri listih 0 je bilo 2x višje pri skupini tretirani z dsRNA, kot pri kontrolni skupini. Izražanje glukanaze je bilo v 3. listu pri obeh skupinah enako (Slika 18, natančnejši podatki v Prilogi B1).



Slika 18: Relativno izražanje gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo za poskus 1

TZ – tretirana rastlina (3. list), KZ – kontrolna rastlina (3. list), TS – tretirana rastlina (list 0), KS – kontrolna rastlina (list 0)

Med rastlinami tretiranimi z dsRNA in kontrolnimi rastlinami pri poskusu 1 ni vidnih fenotipskih razlik (Slika 19).

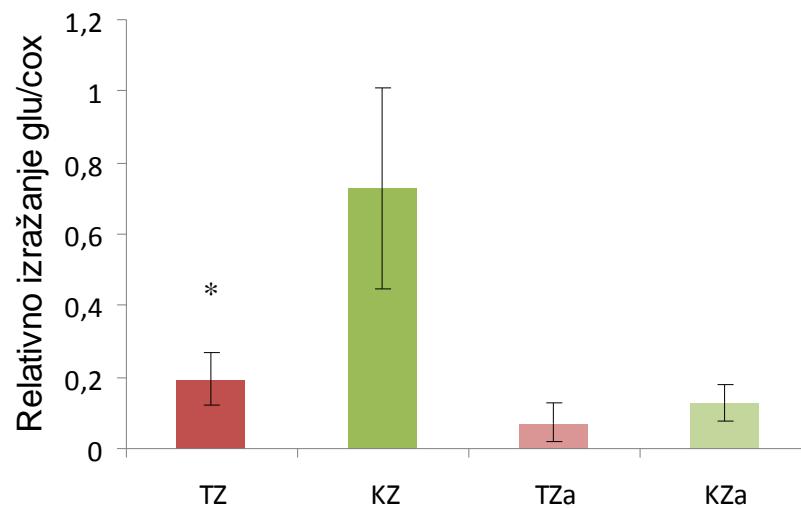


Slika 19: 21 dni stari kontrolna rastlina a) in b) rastlina tretirana z dsRNA

#### 4.2.3.2 Poskus 2

Pri poskusu 2 so bile 14 dni stare rastline tretirane 21 dni. Tretirani listi kontrolnih rastlin in rastlin tretiranih z dsRNA so zaradi starosti rastlin odpadli. Zato smo za analizo listov pobrali vsak tretji list po vrsti za tretiranim in vsak šesti list po vrsti za tretiranim listom. Torej so pri poskusu 2 prikazani rezultati le za 3. ter 6. liste nad tretiranimi. Pri 3. listu je bilo izražanje glukanaze v listih tretiranih z dsRNA statistično značilno nižje (približno 4x) kot izražanje pri kontrolni skupini. Pri 6. listu je bilo izražanje glukanaze polovico nižje pri

listih tretiranih z dsRNA, kot pri kontrolni skupini (Slika 20, natančnejši podatki v Prilogi B2).



Slika 20: Relativno izražanje gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo za poskus 2

TZ – tretirana rastlina (3. list), KZ – kontrolna rastlina (3. list), TZA – tretirana rastlina (6. list), KZA – kontrolna rastlina (6. list), \* Studentov t test ( $p<0,05$ )

Med rastlinami tretiranimi z dsRNA in kontrolnimi rastlinami pri poskusu 2 ni vidnih fenotipskih razlik (Slika 21, 22 in 23).



Slika 21: 35 dni stare kontrolne rastline (14 dni stare rastline smo tretirali z vodo)



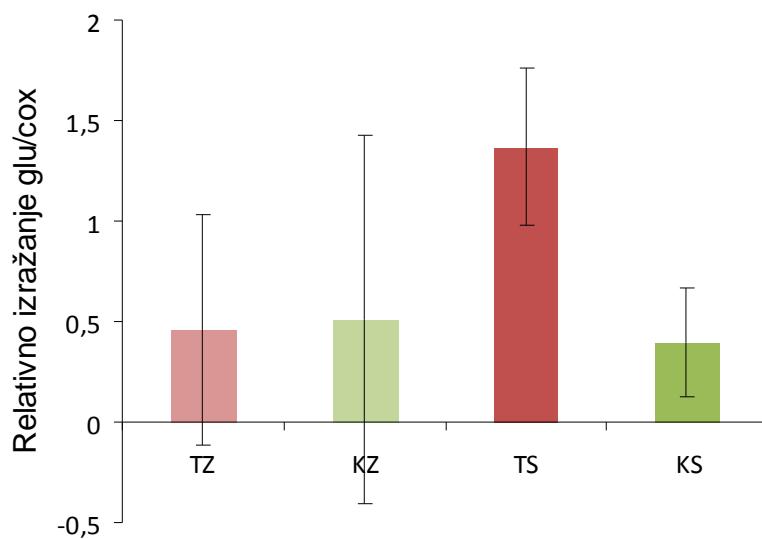
Slika 22: 35 dni stare tretirane rastline z dsRNA (14 dni stare rastline smo tretirali z dsRNA)



Slika 23: 35 dni stari a) rastlina kontrolne skupine in b) tretirana rastlina z dsRNA

#### 4.2.3.3 Poskus 3

Pri poskusu 3 so bile 32 dni stare rastline tretirane 7 dni. Pri poskusu je bilo relativno izražanje gena za glukanazo pri listih 0 3x višje pri skupini tretirani z dsRNA, kot pri kontrolni skupini. Izražanje glukanaze je bilo v 3. listih pri obeh skupinah enako (Slika 24, natančnejši podatki v Prilogi B3).



Slika 24: Relativno izražanje gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo za poskus 3

TZ – tretirana rastlina (3. list), KZ – kontrolna rastlina (3. list), TS – tretirana rastlina (list 0), KS – kontrolna rastlina (list 0)

Med rastlinami tretiranimi z dsRNA in kontrolnimi rastlinami pri poskusu 3 ni vidnih fenotipskih razlik (Slika 18, 19 in 20).



Slika 25: 39 dni stare kontrolne rastline netransformiranih krompirjev



Slika 26: 39 dni stare tretirane rastline transformiranih krompirjev



Slika 27: 39 dni stari a) kontrolna rastlina in b) transformirana rastlina Désirée



Slika 28: Primerjava tretiranih listov s slepim vzorcem in dsRNA 39 dni starih rastlin  
a) List 0 rastline za kontrolo smo tretirali s slepim vzorcem, ko je bila stara 32 dni. b) List 0 rastline za tretiranje z dsRNA smo tretirali po 32 dnevni rasti. Lista rastlin se na videz ne razlikujeta med seboj.

V treh poskusih smo varirali starost listov. Gen za glukanazo se je uspešno utišal v 3. listu nad tretiranim z dsRNA, in sicer je bilo izražanje glukanaze statistično značilno nižje (približno 4x) kot izražanje pri kontrolni skupini. Do uspešnega utišanja s sistemom dsRNA je prišlo pri 21 dnevnem tretiranju rastlin. Za sistemsko utišanje po celi rastlini je potrebno več kot 21 dni.

## 5 RAZPRAVA

Namen našega dela je bila primerjava uporabnosti različnih tehnik transformacije krompirja sorte Désirée. Transformirane rastline se bodo lahko kasneje uporabile za funkcionalno analizo genov za PCPI, MTD in glukanazo. Genska transformacija je postala uveljavljena tehnologija za izboljšanje kmetijskih rastlin, saj nam omogoča spreminjanje izražanja agronomsko pomembnih genov. Genski inženiring je bil izpopolnjen s postopki prenosa genov s pomočjo bakterije *A. tumefaciens*, z namenom ustvariti genotipe z izboljšanimi lastnostmi in s povečano odpornostjo na žuželke ter viruse (Sidorov in sod., 1999). Za spreminjanje izražanja genov uporabljam stabilno transformacijo oziroma prehodno transformacijo. Transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* je najprimernejša metoda transformacije za številne rastlinske vrste. Geni, ki jih prenesemo so klonirani med levim in desnim robnim zaporedjem binarnega T-DNA vektorja (Karimi in sod. 2002). Za transformacijo rastlin z bakterijo *A. tumefaciens* smo uporabili vektor pMDC32, ki ga uporabljam za Gateway kompatibilno rekombinacijo. Tak sistem binarnega vektorja omogoča hitro in zanesljivo kloniranje (Weems, 2006), kar predstavlja veliko prednost pred binarnimi vektorji, ki za kloniranje potrebujejo restriktivne encime in ligazo. Binarni vektorji so veliki in vsebujejo mnogo prepoznavnih mest za restriktivne encime, to pa lahko privede do dolgotrajnejših in pogosto težavnih postopkov (Nakagawa in sod., 2007). Naš vektor je vseboval dvojni 35S CaMV promotor, ki je zelo učinkovit v transgenih rastlinah (Weems, 2006) in selekcijske markerje, ki potrdijo odpornost na antibiotike (Karimi in sod. 2002). Agrobakterija, ki je transformirana, nosi odpornost proti higromicinu in lahko raste na selekcijskem gojišču. Da bi preprečili nadaljno prisotnost bakterije *A. tumefaciens* je potrebno po določenem času transformirane izsečke prestaviti na gojišče z antibiotiki, ki preprečujejo njeno rast. Zato smo v selekcijsko gojišče dodali antibiotika vankomicin in klaforan. Klaforan je antibiotik širokega spektra delovanja in sodi v skupino bakteriocidnih antibiotikov, ki jih imenujemo cefalosporini. Klaforan penetrira zunanjou celično steno bakterije in povzroči lizo celice (Christian in Christian, 1997). Po prestavitvi na selekcijsko gojišče so se prvi kalusi pri pozitivni kontroli in kontroli netransformiranih izsečkov pojavili že po 21 dneh. Kmalu smo opazili tudi prve poganjke. Po 40 dneh so kalusirali transformirani poganjki. Kalusirali so tudi izsečki negativne kontrole (netransformiran Désirée) na selekcijskem gojišču s higromicinom.

Petti in sod. (2009) so za transformacijo krompirja sorte Désirée uporabili stebelne internodije. Za selekcijo transformiranih izsečkov so uporabili antibiotik kanamicin v zelo nizki koncentraciji (0,05 mg/l). Uporaba tako nizke koncentracije kanamicina je zmanjšala selekcijski pritisk in povečala obnovitev transgenih rastlin in prav tako znatno povečala stopnjo lažno pozitivnih transformant oziroma 'pobeglih' poganjkov. Ishige (1995) je preučeval uspešnost selekcije transformant pri krompirju z antibiotikoma higromicinom in kanamicinom. Ugotovil je, da so se poganjki uspešno regenerirali na selekcijskem gojišču, ki je vsebovalo 10 mg/l higromicina, medtem ko je bilo potrebno za enako uspešnost selekcije transformant v gojišče dodati 10-krat višjo koncentracijo kanamicina (100 mg/l). Higromicin je drugi najpogosteje uporabljen selekcijski antibiotik, takoj za kanamicinom (Micki in McHuhg, 2004). Franklin in sod. (2007) so testirali različne koncentracije antibiotika higromicina (0,0, 5,0, 15,0, 20,0, 30,0 in 50,0 mg/l) za selekcijo transformant. Izsečke so prestavljali na svež selekcijski medij na 10 dni. Ugotovili so, da so se izsečki posušili pri koncentracijah higromicina višjih od 15 mg/l, zato so za optimalno koncentracijo določili 20 mg/l higromicina. Higromicin se je sprva uporabljal za selekcijo transformant pri enokaličnicah, vendar so ugotovili, da uspešno deluje tudi pri dvokaličnicah. Učinkovitost selekcije s higromicinom je odvisna tudi od časa. Ko so izsečke prenesli na selekcijsko gojišče s higromicinom dva dni po transformaciji, je 25% izsečkov kalusiralo na vsaki petrijevi plošči šele po 10-ih tednih. Poganjki so se razvili iz kalusov šele po 6-9-ih mesecih z zelo nizko frekvenco (3,0 poganjkov/kalus) (Franklin in sod., 2007). V naši diplomske nalogi smo uporabili higromicin s koncentracijo 20 mg/l. Glede na to, da so Franklin in sod. (2007) za optimalno koncentracijo higromicina določili enako koncentracijo, lahko sklepamo, da v našem primeru za 'pobeg' izsečkov ni bila odgovorna napačna koncentracija selekcijskega antibiotika. Za transformacijo internodijev smo se odločili, ker je enostavnejša od transformacije z listnimi izsečki, saj so manj občutljivi na poškodbe med postopki manipulacije, katere lahko zmanjšajo frekvenco transformacije (Beaujean in sod., 1998). Saker (2003) navaja 5% frekvenco transformacije internodijev krompirja sorte Désirée. Druge raziskave navajajo 2,3% frekvenco transformacije (Visser, 1991; Saker, 2003) in 15% frekvenco transformacije (Trujillo in sod., 2001; Saker, 2003). V našem primeru je bila uspešnost transformacije za konstrukt z genom MTD 1,25%, medtem ko je bila uspešnost transformacije za konstrukt PCPI manj uspešna. Dosegli smo le 0,25% uspešnost transformacije. Ibrahim in sod. (2002) so navedli

56% regeneracijo poganjkov na selekcijskem antibiotiku kanamicinu, vendar so nadaljnje molekularne analize pokazale, da je bila uspešnost transformacije le 5%. Sklepali so, da je bilo med regeneriranimi poganjki precejšen delež 'pobeglih'. Integracija *nptll* gena je bila nestabilna oziroma se je gen izklopil zaradi notranjih delecij (Saker, 2003). Saker (2003) poroča, da je prišlo do pojava 'pobeglih' poganjkov tudi pri letalni dozi kanamicina. 'Pobeg' izsečkov je pri transformaciji rastlin zelo velik problem. Regeneracijo 'pobeglih' izsečkov je mogoče razložiti z neuspešnim izražanjem tujega gena ali z neučinkovito selekcijo, kjer so netransformirane celice zaščitene pred selekcijskim antibiotikom s transformiranimi celicami, ki jih obkrožajo (Zhan in sod., 1997).

Za tesnenje petrijevk smo na podlagi izkušenj iz laboratorija v tujini namesto parafilma uporabili mikropor trak. Tako smo žeeli preprečiti pojav kapljic vode, ki so se nabirale na pokrovu petrijevk. Z uporabo mikropor traka smo dosegli manjšo vsebnost vlage na stenah petrijevke, vendar se je samo gojišče zaradi zračnosti precej bolj izsuševalo. Izsušitev gojišča je najverjetneje privedla do spremembe koncentracije antibiotika. Le – ta je bila previsoka zaradi zmanjšane količine vlage v gojišču. Antibiotik higromicin je škodljiv za rastline v že zelo nizkih koncentracijah (Miki in McHugh, 2004). To je bil najverjetnejši dejavnik, ki je povzročil, da je večina kalusov in poganjkov porjavela in se posušila. Drugi morebitni razlog, da so se poganjki začeli sušiti, je bil majhen stik s površino gojišča. Poganjke transformiranih krompirjev smo prenesli na selekcijsko gojišče MS30 cvh. V gojišče nismo dali zeatin ribosida, saj je bil naš cilj razvoj le enega poganjka. Pri negativni kontroli rasti nismo pričakovali, saj poganjkom nismo vnesli ekspresijskega vektorja pMDC32, kateri nosi zapis za odpornost proti antibiotiku higromicinu. Na selekcijsko gojišče MS30 cvh smo prenesli tudi poganjke negativne kontrole (netransformiran krompir). Poganjki negativne kontrole so se po nekaj dnevni rasti na selekcijskem gojišču posušili. Tako lahko za zrasle poganjke sklepamo, da so 'pobegli'. Možen razlog za 'pobegle' poganjke je majhen stik s površino, kjer poganjek ni bil izpostavljen zadostni selekciji.

Transformacija bi bila morda uspešnejša, če bi izsečke pogosteje prestavljali na sveže selekcijsko gojišče Zcvh, ali pa za celoten poskus uporabili parafilm za tesnenje petrijevk. Prav tako bi bila transformacija morda uspešnejša, če bi izsečkom omogočili večji stik z

gojiščem. Glede na težave, ki smo jih imeli pri transformaciji, bi lahko sklepali, da bi bila v primeru optimalnih pogojev pri obeh konstruktih uspešnost precej večja.

Pri vseh linijah, ki so zrasle na selekcijskem gojišču MS30 cvh smo preverili prisotnost promotorja 35S. Če je bil promotor prisoten, to pomeni, da je bil konstrukt uspešno vstavljen v genom in je bila rastlina uspešno transformirana. Konstrukt z genom MTD smo dokazali v petih od sedmih rastlin. Konstrukt z genom PCPI pa smo dokazali le v eni rastlini izmed treh. Teoretično naj bi se v rastlino vstavila regija T-DNA med levo in desno robno sekvenco na vektorju. V nekaterih primerih se v genom rastline vgradi del zaporedja izven mejnih sekvenc na T-DNA. Integracija je uspešna, če se vgradi DNA v nespremenjeni obliki v en lokus (Conner in Jacobs, 1999).

Uspešnost transformacije je odvisna predvsem od pravilne integracije tuje DNA v genom, pravilnega izražanja vstavljenih genov in prenosa informacije na potomce (Bhat in Srinivasan, 2002). Pri stabilno transformiranih linijah rastline med posameznimi linijami niso fenotipsko popolnoma enakovredne zaradi naključne vstavitve v genom. DNA se med transformacijo vgradi v enojni kopiji ali kot ponavljajoči del, do integracije pa lahko pride na enem ali večih mestih. V nekaterih primerih lahko produkti izražanja RNA ali beljakovine transgena, ki se je vgradil, vplivajo na izražanje že obstoječih genov v rastlini. Prav tako ima lahko vpliv na rastlinske gene insercijska mutageneza, ki nastane ob naključni vgraditvi transgena (Conner in Jacobs, 1999). Na spremembo fenotipa vplivajo tudi pozicijski efekti (Bhat in Srinivasan, 2002). Pri rastlinah, ki rastejo v tkivnih kulturah, lahko pride do somaklonske variabilnosti kar pomeni, da so rastline znotraj iste linije raznolike. Pri tkivnih kulturah lahko pride do kromosomskih sprememb, ki so ponavadi nepovratne ali pa do epigenetskih sprememb, ki so povratne (Hsu in sod., 2008)

Stabilna transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* se je v našem primeru izkazala za težavno metodo, saj rezultati kažejo, da je bila uspešnost metode slaba. Uspešnost bi najverjetneje lahko izboljšali z nekaj optimizacije. Zato smo se v nadaljevanju odločili za testiranje prehodne transformacije s sistemom dsRNA. dsRNA je pomemben regulator izražanja genov pri evkariontih (Meister in Tuschl, 2004). Najprej smo pomnožili del gena za glukanazo v verižni reakciji s polimerazo, pripravili dsRNA ter spektrofotometrično določili celokupno koncentracijo RNA z napravo Nanodrop. Na podlagi razmerij absorbanc 260/280 in 260/230 smo preverili čistost izolirane RNA. Za uspešno izolacijo

mora biti razmerje večje od 1,8. Če je to razmerje manjše pomeni, da imamo v vzorcu prisotne proteine, fenole ali druge snovi, ki močno absorbirajo blizu ali pri 280 nm. Razmerje absorbanc pri 260 nm in 230 nm se uporablja kot sekundarno merjenje čistosti nukleinskih kislin. Iz rezultatov razmerij absorbanc pri 260/280 lahko razberemo, da smo se izognili kontaminaciji s proteini.

Pri vseh rastlinah smo tretirali prvi spodnji list. Pri kontrolni skupini smo list tretirali s slepim vzorcem (voda), medtem ko smo poskusne rastline tretirali z dsRNA. Naredili smo tri poskuse v katerih smo varirali starost rastlin (14 ali 32 dni), število dni tretiranja (7 ali 21 dni) ter liste, ki smo jih izbrali za analizo (list 0, 3. list, 6. list). Pri poskusu 1 in 2 smo rastline, ki so rasle v zemlji, tretirali po 14 dnevni rasti v zemlji. Pri poskusu 1 smo spodnji tretiran list (list 0) in tretjega od njega pobrali po 7 dneh. Tretji list po vrsti na steblu smo vzeli, ker smo predvidevali, da se bo zaradi spiralne povezanosti žil signal utišanja najprej prenesel do tja. Vsak list je običajno povezan preko žilnega sistema z ostalimi listi, ki je direktno nad njim ali pod njim na steblu (Hopkins in Hüner, 2004). Medtem ko smo pri poskusu 2 vzorčne liste pobrali šele po 21 dneh. Pri tem tretmaju so spodnji listi kontrolne skupine in skupine tretirane z dsRNA odpadli. Zato smo pobrali vsak tretji list po vrsti za tretiranim (kateri je odpadel) in še vse liste, ki so bili šesti po vrsti od spodnjih tretiranih. Prav zaradi spiralne povezanosti žil, smo predvidevali, da bo signal utišanja prispel tudi do 6. lista po vrsti. Med kontrolnimi skupinami in skupinami tretiranimi z dsRNA znotraj posameznih poskusov fenotipskih razlik nismo opazili. Prav tako nismo opazili fenotipskih razlik med posameznimi poskusi. Rastline se po videzu niso razlikovale med seboj. V primeru poskusa 3 smo rastline tretirali po 32 dnevni rasti. Vzorčne liste smo pobrali 7. dan po tretiranju. V tem primeru spodnji tretirani listi niso odpadli, zato smo vzorčili spodnji tretiran list (list 0) in 3. list nad tretiranim.

Iz pobranih listov krompirja smo izolirali RNA. Nato smo z reakcijo reverzne transkripcije in qPCR žeeli preveriti izražanje gena za glukanazo na transformiranih in kontrolnih rastlinah krompirja. Za merjenje izražanja genov se najpogosteje uporablja relativna kvantifikacija. Tu določamo razmerje izražanja gena, ki nas zanima, in referenčnega gena (Arko, 2004). Idealni referenčni gen se vedno enako izraža (Klein, 2002). Relativno izražanje glukanaze smo izračunali kot razmerje števila kopij glukanaze in citokrom oksidaze. Relativno število kopij smo določili s pomočjo umeritvene krivulje. Relativno

Izražanje glukanaze smo primerjali v treh časovnih točkah in po posameznih skupinah. Razlike med skupinami smo statistično ovrednotili z uporabo t-testa. Pri poskusu 1 je bilo relativno izražanje gena za glukanazo pri listih 0 statistično značilno višje (približno 2x) pri skupini tretirani z dsRNA, kot pri kontrolni skupini. Izražanje glukanaze je bilo v zgornjih listih (3. listi) pri obeh skupinah enako. Pri poskusu 2 so prikazani rezultati le za zgornje liste, in sicer za 3. ter 6. list nad tretiranim. Pri 3. listu je bilo izražanje glukanaze v listih tretiranih z dsRNA statistično značilno nižje (približno 4x) kot izražanje pri kontrolni skupini. Pri 6. listu je bilo izražanje glukanaze polovico nižje pri listih tretiranih z dsRNA, kot pri kontrolni skupini. Razlika pri teh dveh skupinah sicer ni bila statistično značilna (izbrana meja  $p<0,05$ ), vendar je trend nižjega izražanja vseeno opazen. Pri poskusu 3 je bilo relativno izražanje gena za glukanazo pri tretiranih listih (list 0) statistično značilno višje (približno 2x) pri skupini tretirani z dsRNA, kot pri kontrolni skupini. Izražanje glukanaze je bilo v zgornjih listih (3. listi) pri obeh skupinah enako. Statistično značilne razlike med skupinama (tretma z dsRNA in slepi vzorec) smo opazili pri spodnjih listih (list 0) pri poskusu 1 in poskusu 3 ter pri 3. listu pri poskusu 2. Pri poskusu 1 in 3 smo vzorčili liste (list 0), na katere smo direktno tretirali dsRNA. Obstaja verjetnost, da je bila dodana dsRNA po enem tednu še vedno prisotna na tretiranem listu saj za dsRNA velja, da je dokaj stabilna in se verjetno ni razgradila (Kuwabara in Coulson, 2000). Predvidevamo, da je to najverjetnejši razlog, da smo zaznali povečano izražanje. Izražanje gena za glukanazo je bilo pri poskusu 2 pri kontrolni skupini in skupini tretirani z dsRNA v 6. listih praktično enako. Izražanje je bilo na splošno nižje, saj so bili bolj zgornji listi manj razviti, v manj razvitih listih pa je metabolizem drugačen (Nguyen-Quoc, 1990). Morda bi dosegli večje znižanje izražanja gena za glukanazo, če bi vzorce pobirali kasneje, saj vzorci pri poskusu 2 jasno kažejo na uspešno utišanje izražanja gena glukanaze. Zanimivo bi bilo ponoviti poskus, kjer bi vzorce pobirali po daljšem času po tretiranju.

Do sedaj je veliko analiz potekalo s pomočjo stabilne transformacije rastlin, vendar pa ta pristop ni vedno dovolj učinkovit. Za večino aplikacij funkcijске genomike je dovolj, če se vnešen genetski material le začasno izrazi. DNA, ki se vgradi v celico v procesu transfekcije, ponavadi ni integrirana v jedrni genom. Če do integracije ne pride, se DNA skozi mitozo oslabi oz. se uniči. Če hočemo, da transficiran gen ostane v genomu celice in njenih hčerinskih celicah, pa mora priti do stabilne transfekcije.

Odpor javnosti do gensko spremenjene hrane v nekaterih delih sveta, je privedel do razvoja ne-transgenih pristopov v funkcionalni genomiki. Fenotipe ustvarjene z ne-transgenim pristopom lahko uporabimo za vzgojo poljščin po postopkih za katere ne veljajo ureditveni postopki, ki se uporablajo pri vzgoji gensko spremenjenih organizmov (Leader, 2005). Po floemu potujejo različni signali, ki vključujejo poleg običajnih signalnih faktorjev, kot so proteini in molekule, ki regulirajo rast, tudi RNA. Različni tipi RNA molekul so sposobni prepotovati dolge razdalje od mesta sinteze do drugih delov rastline (Citovsky in Zambryski, 2000). Utišanje genov s sistemom dsRNA postaja vedno bolj popularno zaradi izboljšane učinkovitosti pri inaktivaciji endogenih genov (povzeto v Li in Zhang, 2005). Utišanje z dsRNA je zanimivo predvsem zaradi sposobnosti razširitve po celotnem rastlinskem sistemu. Utišanje se lahko razširi iz celice v celico na dolge razdalje po žilnem sistemu (Voinnet, 2005). Razširitev signala utišanja po sistemu ima lahko prednosti in škodljive posledice pri uporabi tehnologije utišanja genov. Sistemsko širjenje signala utišanja v oddaljene dele rastlin, ki smo ga lokalno aplicirali z dsRNA, bi bilo lahko zelo uporabno v hortikulti npr. pri vinski trti ali sadnem drevju. Pri slednjih zelo težko vzgojimo transgene rastline, drugi razlog pa je njihovo heterozigotno stanje. Po drugi strani predstavlja sistemsko širjenje signala oviro pri izvršitvi specifičnega signala utišanja npr. v specifičnem tkivu oz. organu (Eamens in sod., 2006).

Prehodna transformacija ima nekaj prednosti pred stabilno transformacijo. Stabila transformacija je pogosto manj učinkovita od prehodne. Prehodno izražanje genov se pogosto uporablja, saj lahko izražanje genov izmerimo v relativno kratkem času po transformaciji, prenos genov lahko analiziramo neodvisno od regeneracije transformant, kar je zelo pomembno za vrste, ki se težko regenerirajo. Na splošno je postopek prehodne transformacije krajši postopek pridobivanja transformantov in ima prednost pred stabilno, ko želimo hitro pridobiti rezultate, saj je postopek pridobivanja stabilnih transformant zelo zamuden (Kapila in sod., 1997). Pri prehodni transformaciji dosežemo visok nivo heterolognih proteinov (Lacorte in sod., 2010) in uspešno utišanje genov (Roth in sod., 2004). Po drugi strani je stabilna transformacija bolj primerna za študije, ki se večkrat ponavljajo, ker lahko dalj časa vzdržujemo enake linije transgenih rastlin.

Za nekatere funkcionalne analize je prehodno izražanje genov učinkovita alternativna (Yasmin in Debener, 2010). Funkcionalna genomika ponuja nove priložnosti za hitro

identifikacijo genov, ki so pomembni v kmetijstvu in predstavlja nove strategije manipulacije določenih lastnosti. Če bi uspešno združili sekvenciranje genoma, funkcionalno genomiko in bioinformatiko, bi gotovo povečali pridelek poljščin oziroma zmanjšali izgube (Leader, 2005). Pri dvokaličnicah je transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* najpogostejša tehnika, saj ustvarja transgene rastline z razmeroma visoko učinkovitostjo. Na splošno je frekvenca enojne kopije gena, ki se vgradi, relativno visoka. Prehodno izražanje genov je nujno potrebno analitično orodje za proučevanje funkcije genov. Bakterijo *A. tumefaciens* lahko uporabljam tudi za prehodno transformacijo. Infiltracija z agrobakterijo v rastlinske organe je hiter in zelo učinkovit postopek in ne zahteva drage opreme (Yasmin in Debener, 2010). Prehodno transformacijo lahko uporabljam za študije izražanja tujega gena, utišanje gena, medsebojno delovanje genov in analizo nativnih rastlinskih promotorjev, medtem ko je za študije tkivno specifičnih promotorjev in promotorjev, ki regulirajo razvoj, potrebna stabilna transformacija (Yang in sod., 2000). Utišanje genov z RNAi je sekvenčno specifična tehnika, hitra in enostavna za uporabo. Uporabimo jo lahko pri mnogih vrstah, medtem ko je uporaba bakterije *A. tumefaciens* omejena (Small, 2007).

## 6 SKLEPI

S stabilno transformacijo z bakterijo *A. tumefaciens* smo uspeli pridobiti 5 transgenih rastlin z vstavljenim genom MTD (1,25% uspešnost transformacije) in eno transgeno rastlino z vstavljenim genom PCPI (0,25% uspešnost transformacije). Stabilna transformacija z bakterijo *A. tumefaciens* se je v našem primeru izkazala za slabo metodo, saj rezultati kažejo, da je bila uspešnost metode nizka. Nekaj optimizacije bi lahko uspešnost povečalo.

Prehodna transformacija z dsRNA se je izkazala za uspešno pri poskusu 2, kjer smo 14 dni stare rastline tretirali z dsRNA 21 dni. Gen za glukanazo se je uspešno utišal v 3. listu nad tretiranim, in sicer je bilo izražanje glukanaze statistično značilno nižje (približno 4x) kot izražanje pri kontrolni skupini. Pri ostalih dveh poskusih (poskus 1 in 3), kjer smo rastline tretirali le 7 dni, utišanja glukanaze ni bilo opaziti. Pri teh dveh poskusih smo zaznali navidezno povečano izražanje glukanaze v tretiranih listih (list 0), saj smo s PCR v realnem času zaznali tudi ostanke dsRNA v tretiranem listu. Do uspešnega utišanja s sistemom dsRNA torej ne pride v času krajšem od 7 dni, prav tako pa za sistemsko utišanje po celi rastlini ni dovolj le 21 dni.

Pri prehodni transformaciji z dsRNA nismo opazili fenotipskih razlik med kontrolno skupino in skupino tretirano z dsRNA.

Tako stabilna transformacija z bakterijo *A. tumefaciens*, kot tudi prehodna transformacija z dsRNA, sta primerni metodi za spremicanje izražanja genov v krompirju. Za izbiro ene ali druge je potrebno upoštevati, za kakšne študije se bodo transformirane rastline uporabile.

## 7 POVZETEK

Namen našega dela je bila uporaba različnih tehnik transformacije krompirja sorte Désirée. Za spremjanje izražanja genov v rastlinah smo se poslužili dveh različnih metod transformacij. Stabilno transformacijo krompirja sorte Désirée smo izvedli s pomočjo posrednega vnosa genov MTD in PCPI z bakterijo *A. tumefaciens*. Za izhodiščni material smo uporabili zdrave rastline krompirja sorte Désirée. Po treh tednih so se pojavili prvi poganjki pri pozitivni kontroli. Po šestih tednih so se pojavili prvi transformirani poganjki. Pognali so tudi poganjki negativne kontrole (netransformiran krompir), na selekcijskem gojišču s higromicinom, ki pa so kmalu propadli. Uspešnost transformacije za konstrukt z genom MTD je bila 1,25%, medtem ko je bila uspešnost transformacije za konstrukt PCPI 0,25%.

Za večino aplikacij transfekcije je dovolj, če se vnešen genetski material le začasno izrazi. Zato smo se v nadaljevanju odločili za prehodno transformacijo. S PCR reakcijo smo pomnožili gen za glukanazo in DNA pretvorili v dsRNA. Po 14 dneh rasti v zemlji, smo rastline tretirali. Pri vseh rastlinah smo tretirali prvi spodnji list (list 0). Pri kontrolni skupini smo list tretirali s slepim vzorcem (voda), medtem ko smo poskusne rastline tretirali z dsRNA. Izbrali smo tri različne poskuse, znotraj katerih smo varirali starost rastlin, število dni tretiranja in liste, ki smo jih analizirali. Statistično značilno utišanje gena za glukanazo smo dosegli pri poskusu 2, kjer smo 14 dni stare rastline tretirali z dsRNA 21 dni. Izražanje glukanaze je bilo v 3. listih 4x nižje pri rastlinah tretiranih z dsRNA v primerjavi s kontrolno skupino. Med kontrolnimi skupinami in skupinami tretiranimi z dsRNA fenotipskih razlik nismo opazili.

Če primerjamo obe tehniki ima prehodna transformacija nekaj prednosti pred stabilno transformacijo. Za izbiro stabilne transformacije ali prehodne pa je potrebno upoštevati, za kakšne študije se bodo transformirane rastline uporabile.

Transformirane rastline se bodo lahko kasneje uporabile za funkcionalno analizo genov za PCPI, MTD in glukanazo.

## 8 VIRI

- Alary R., Serin A., Maury D., Jouira H. B., Sirven J., Gautier M., Joudrier P. 2002.  
Comparison of simplex and duplex real-time RCR for the quantification of GMO in maize and soybean. *Food Control*, 13, 4-5: 235-244.
- Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn*. 2004, 55: 215-220.
- Azorsa D. O., Mousses S., Caplen J. N. 2003. Gene silencing RNA interference: Potential for therapeutics and functional genomics. *Letters in Peptide Science*, 10, 3: 361-372.
- Baebler Š., Krečič-Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok E. J., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe-Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY<sup>NTN</sup> elicits a diverse gene expression in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology* 10, 2: 263-275.
- Bhat S. R., Srinivasan S. 2002. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science*, 163, 4: 673-681.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167str.
- Bouchez D., Höfte H. 1998. Functional Genomics in Plants. *Plant Physiology*, 118, 191: 725-732.
- Carthew W. R. 2001. Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 244-248.
- Christian S. S., Christian S. J. 1997. The cephalosporin antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 4, 5: 168-174.
- Chung-Pin C., Jyh-Ching C., Betty Revon L., Microsugar C., Han-Jung L. 2007. Transfection and expression of plasmid DNA in plant cells by an arginine-rich

- intracellular delivery peptide without protoplast preparation. FEBS Letters, 581, 9: 1891-1897.
- Chung, S.M., Vaidya, M. and Tzfira, T. 2006. Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. Trends in Plant Science, 11, 1: 1-4.
- Citovsky V., Zambryski P. 2000. Systemic transport of RNA in plants. Trends in Plant Science, 5, 2: 52-54.
- Conner A. J., Jacobs J. M. E. 1999. Genetic engineering of crops as potential source of genetic hazard in the human diet. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 443, 1-2: 223-234.
- Curtis M. D., Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. Plant Physiology, 133: 462-469.
- Dafny-Yelin M., Tovkach A., Tzfira T. 2009. Integration of *Agrobacterium* T-DNA in Plant Cells. Functional organization of the plant nucleus (Plant Cell Monographs), 14: 157-186.
- Dougherty W.G., Parks, T.D. 1995. Transgenes and gene suppression: telling us something new? Current Opinion in Cell Biology, 7: 399-405.
- Eamens A., Wang M., Smith N. A., Waterhouse M. P. 2008. RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. Plant Physiology, 147: 456-468.
- Escobar A. M., Dandekar M. A. 2003. Agrobacterium tumefaciens as an agent of disease TRENDS in Plant Science, 8, 8: 380-386.
- Franklin G., Oliveira M., Dias A. C. P. 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. Plant Science, 172, 6: 1193-1203.
- Guo S., Kemphues K. J. 1995. *par-1* a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell, 81, 4: 611-620.

- Grotewold E. 2003. Plant functional genomics. Methods in Molecular Biology. Totowa, Humana Press, Inc.: 449 str.
- Hannon J. G. 2002. RNA interference. Nature, 418: 244-251.
- Heller K. J. 2003. Genetically engineered food: methods and detection. Weinheim, Wiley-VCH: 276 str.
- Hopkins W. G., Hüner N. P. 2004. Introduction to plant physiology. 3rd edition. Hoboken, Wiley: 560 str.
- Hsu T., Tsai W., Wang D., Lin S., Hsiao Y., Chen W., Chen H. 2008. Differential gene expression analysis by cDNA-AFLP between flower buds of *Phalaenopsis* Hsiang Fei cv. H. F. and its somaclonal variant. Plant Science, 175, 3: 415-422.
- Kalantidis K., Schumacher H. T., Alexiadis T., Helm J. M. 2008. RNA silencing movement in plants. Biology of the Cell, 100: 13-26.
- Käppeli O., Auberson L. 1998. How safe is safe enough in plant genetic engineerin? Trends in Plant Science, 3, 7: 276-281.
- Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. 1997. An *Agrobacterium* -mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Science, 122: 101-108.
- Karimi M., Inzé D., Depicker A. 2002. GATEWAY vector for *Agrobacterium* –mediated plant transformation. Trends in Plant Science, 7, 5: 193-195.
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. TRENDS in Molecular Medicine, 8, 6: 257-260.
- Kogovšek P., Pompe-Novak M., Baebler Š., Rotter A., Gow L., Gruden K., Foster D. G., Boonham N., Ravnikar M. 2010. Aggressive and mild *Potato virus Y* isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. Plant Pathology [v tisku].
- Kreuzer H., Massey A. 2008. Molecular biology and biotechnology: a guide for teachers. 3 rd edition. Washington, D.C., ASM Press: 704 str.

- Kusaba M. 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 2: 139-143.
- Kuwabara P. E., Coulson A. 2000. RNAi – Prospects for a General Technique for Determining Gene Function. *Parasitology Today*, 16, 8: 347-349.
- Lacorte C., Ribeiroa G. S., Lohuisa D., Goldbacha R., Prinsa M. 2010. Potato virus X and Tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway cloning system. *Journal of Virological Methods*, 164, 1-2: 7-13.
- Leader J. D. 2005. Transcriptional analysis and functional genomics in wheat. *Journal of Cereal Science*, 41, 2: 149-163.
- Leister D. 2005. Plant functional genomics. Binghamton, The Haworth Press, Inc.: 677 str.
- Li X., Zhang Y. 2005. Novel Reverse Genetics Tools in Plant Functional Genomics. V: Plant functional genomics. Leister D. (ed.). Binghamton, The Haworth Press, Inc.: 37-54.
- Matthew L. 2004. RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Functional Genomics*, 5, 3: 240-244.
- Michielse C. B., Hooykaas P. J. J., van den Hondel C.A.M.J.J., Ram A. F. J. 2005. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48, 1: 1-17.
- Meister G., Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349.
- Mullins E., Milbourne D., Petti C., Doyle-Prestwich M. B., Meade C. 2006. Potato in the age of biotechnology. *TRENDS in Plant Science*, 11, 5: 254-260.
- Nguyen-Quoc B., Krivitzky M., Huber S. C., Lecharny A. 1990. Sucrose synthase in developing maize leaves. *Plant Physiology*, 94: 516-523
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. 2007. Development of Series of Gateway Binary

- Vectors, pGWBs,for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104, 1: 34-41.
- Oliver J. D., Nikolau B., Wurtele E. S. 2002. Functional Genomics: High-Throughput mRNA, Protein, and Metabolite Analyses. *Metabolic Engineering*, 4, 1: 98-106.
- Pauls K. P. 1995. Plant biotechnology for crop improvement. *Biotechnology Advances*, 13, 4: 673-693.
- Purkayastha A., Dasgupta I. 2009. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 11-12: 967-976.
- Rahman M., Ali I., Husnain T., Riazuddin S. 2008. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnology Advances*, 26, 3: 202-209.
- Rao A.Q, Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A. A., Husnain T., Riazuddin S. 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27: 753–763.
- Roth M. B., Pruss J. G., Vance V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, 102: 97-108.
- Saker M. M. 2003. Production of biosafe transgenic potato plants with coat protein gene for potato virus Y. *Arab Journal of Biotechnology* 6, 1: 125-138.
- Sessions A. 2005. T-DNA Mutagenesis: From Tagging to Insertion Sequence Databases. V: Plant functional genomics. Leister D. (ed.). Binghamton, The Haworth Press, Inc.: 23-36.
- Shepherd N. D., Martin P. D., Thomson A. J. 2009. Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Plant Science*, 176, 1: 1-11.
- Sidorov V. A., Kasten D., Pang S., Hajdukiewicz P .T. J., Staub J. M., Nehra N. 1999. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *The Plant Journal*, 19, 2: 209-216.

- Small I. 2007. RNAi for revealing and engineering plant gene function. Current Opinion in Biotechnology, 18, 2: 148-153.
- Stanley A. S. 2008. Cell Biology for Biotechnologists. Oxford, Alpha Science International: 182 str.
- Suarez C. E., McElwain T. F. 2010. Transfection systems for Babesia bovis: A review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. Veterinary Parasitology, 167: 205-215.
- Trujillo C., Rodriguez-Arango E., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S., Arango R. 2001. One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*). Plant Cell Reports, 20: 637-641.
- Tzfira T., Citovsky V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 17, 2: 147-154.
- Voinnet O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. TRENDS in Genetics, 17, 8: 449-459.
- Watson M. J., Fusaro F. A., Wang M., Waterhouse M. P. 2005. RNA silencing platforms in plants. FEBS Letters, 579: 5982-5987.
- Weems C. *Encephalomyocarditis* (EMCV) Viral Internal Ribosome Entry Site Mediated Expression of Multiple Transgenes in Tobacco and *Arabidopsis thaliana*. 2006. Tennessee Research and Creative Exchange.  
[http://trace.tennessee.edu/utk\\_interstp3/71](http://trace.tennessee.edu/utk_interstp3/71) (15. avg. 2010)
- Yasmin A., Debener T. 2010. Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. Journal of Plant Biotechnology, 102, 2: 245-250.
- Yang Y., Li R., Qi M. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. The Plant Journal, 22, 6: 543–551.

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Maji Ravnikar in somentorici prof. dr. Jani Žel se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Prof. dr. Borutu Bohancu gre zahvala za recenzijo diplomske naloge.

Za pomoč, potrpežljivost in koristne napotke pri eksperimentalnem delu se zahvaljujem Davidu Dobniku.

Zahvaljujem se tudi celotni ekipi laboratorija Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Iskrena hvala tudi dragima mami in očetu za vso podporo in potrpežljivost ter finančno pomoč pri študiju.

Posebna zahvala gre tudi prijateljem in fantu Igor-ju, ki so me vselej podpirali, ter po potrebi tudi pomagali in svetovali.

## PRILOGE

Priloga A1:

### Koncentracije celokupne RNA pobranih vzorcev poskusa 1

Oznake pomenijo: 14+7 (pri starosti 14 dni so bile tretirane 7 dni), S (je list 0), Z (je 3. list)

Vzorec	Količina [ng/µl]	A [260/280]	A [260/230]
K 14+7 S1	12,3	1,93	0,19
K 14+7 Z1	1831,4	2,19	2,23
K 14+7 S2	74,2	2,13	1,94
K 14+7 Z2	1014,4	2,17	2,14
K 14+7 S3	116,4	2,09	1,73
K 14+7 Z3	2332,1	2,16	2,29
K 14+7 S4	143,63	2,19	1,18
K 14+7 Z4	967,96	2,21	1,78
K 14+7 S5	112,6	2,15	1,66
K 14+7 Z5	1140,8	2,17	2,16
T 14+7 S1	78,9	2,1	0,64
T 14+7 Z1	1016,6	2,16	1,96
T 14+7 S2	223,4	2,15	1,94
T 14+7 Z2	3338,7	2,09	2,21
T 14+7 S3	122,4	2,19	2
T 14+7 Z3	1638,7	2,2	1,49
T 14+7 S4	92,12	2,16	1
T 14+7 Z4	3108,22	2,12	2,2
T 14+7 S5	278,7	2,19	0,98
T 14+7 Z5	2029,6	2,18	2,32
T 14+7 S6	44,3	2,05	0,87
T 14+7 Z6	812,8	2,25	2,25
T 14+7 S7	49,5	2,06	0,2
T 14+7 Z7	820,7	2,17	2,23
T 14+7 S8	160,7	2,14	0,79
T 14+7 Z8	1746,9	2,19	2,23
T 14+7 S9	277,8	2,15	0,53
T 14+7 Z9	1767,1	2,21	2,18
T 14+7 S10	162,2	2,14	1,46
T 14+7 Z10	847	2,26	2,19

Priloga A2:

Koncentracije celokupne RNA pobranih vzorcev poskusa 2

Oznake pomenijo: 14+21 (pri starosti 14 dni so bile tretirane 21 dni), Z (je 3. list), Za (je 6. list)

Vzorec	Količina [ng/µl]	A [260/280]	A [260/230]
K 14+21 Z1	42,3	2,3	0,51
K 14+21 Z2	28,3	2,24	0,86
K 14+21 Z3	98,3	2,13	1,11
K 14+21 Z4	649,1	2,22	1,96
K 14+21 Z5	117,7	2,23	1,94
K 14+21 Z1a	65	2,2	1,12
K 14+21 Z2a	190,5	2,22	1,33
K 14+21 Z3a	746,5	2,23	1,86
K 14+21 Z4a	2935,1	2,19	2,26
K 14+21 Z5a	540,2	2,18	1,7
T 14+21 Z1	187,5	2,11	1,54
T 14+21 Z2	80,3	2,12	1,38
T 14+21 Z3	279,4	2,17	1,61
T 14+21 Z4	342	2,07	1,49
T 14+21 Z5	622,9	2,14	2,01
T 14+21 Z6	316,7	2,12	1,62
T 14+21 Z7	156,5	2,17	1,23
T 14+21 Z8	89,7	2,12	1,05
T 14+21 Z9	134,2	2,13	1,45
T 14+21 Z10	123	2,14	1,43
T 14+21 Z1a	157,2	2,13	1,33
T 14+21 Z2a	692,5	2,14	1,95
T 14+21 Z3a	943,4	2,16	1,99
T 14+21 Z4a	1044,7	2,15	2,01
T 14+21 Z5a	707,5	2,13	2
T 14+21 Z6a	1000,4	2,16	2,21
T 14+21 Z7a	330,6	2,14	1,89
T 14+21 Z8a	299,8	2,11	1,34
T 14+21 Z9a	1622,8	2,13	2,05
T 14+21 Z10a	961,2	2,18	2,06

Priloga A3:

Koncentracije celokupne RNA pobranih vzorcev poskusa 3

Oznake pomenijo: 32+7 (pri starosti 32 dni so bile tretirane 7 dni, Z (je list 0), Z (je 3. list)

Vzorec	Količina [ng/ $\mu$ l]	A [260/280]	A [260/230]
K 32+7 Z1	127,9	2,1	2,07
K 32+7 Z2	134,7	2,12	1,58
K 32+7 Z3	227,6	2,14	1,8
K 32+7 Z4	1169,8	2,17	2,3
K 32+7 Z5	247,7	2,16	1,61
K 32+7 S1	53,2	2,16	1,21
K 32+7 S2	27,2	2,1	0,55
K 32+7 S3	24,7	2,08	1,53
K 32+7 S4	69,4	2,16	0,89
K 32+7 S5	128	2,13	1,3
T 32+7 Z1	136,2	2,15	2,13
T 32+7 Z2	43,2	2,33	0,25
T 32+7 Z3	392	2,1	1,87
T 32+7 Z4	84,1	2,16	1,27
T 32+7 Z5	137	2,12	1,12
T 32+7 Z6	65,5	2,13	1,39
T 32+7 Z7	97,5	2,15	1,31
T 32+7 Z8	295,5	2,17	2,26
T 32+7 Z9	136,5	2,12	0,94
T 32+7 Z10	126,2	2,08	1,18
T 32+7 S1	85,2	2,12	1,96
T 32+7 S2	26,6	2,03	1,5
T 32+7 S3	435,1	2,13	1,91
T 32+7 S4	178,1	2,14	0,98
T 32+7 S5	139,7	2,16	1,42
T 32+7 S6	86,5	2,08	1,77
T 32+7 S7	33	2,37	1,82
T 32+7 S8	38,8	2,3	1,96
T 32+7 S9	71	2,16	2,04
T 32+7 S10	88,5	2,15	1,05

Priloga B1:

Relativno število kopij gena za glukanazo in citokrom oksidazo upoštevajoč redčitve vzorcev,  
število kopij gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo in povprečje za poskus 1

Ime vzorca	Rel. št. kopij <i>glu</i>	Rel. št. kopij <i>cox</i>	<i>glu/cox</i>	Relativno izražanje glukanaze
				(povprečje obeh redčitev)
K 14+7 S1 10x	65	241	0,272	0,306
K 14+7 S1 100x	80	235	0,340	
K 14+7 Z1 10x	328	325	1,010	0,891
K 14+7 Z1 100x	313	406	0,772	
K 14+7 S2 10x	434	546	0,795	0,888
K 14+7 S2 100x	620	632	0,981	
K 14+7 Z2 10x	19	193	0,099	0,101
K 14+7 Z2 100x	25	243	0,103	
K 14+7 S3 10x	425	562	0,756	0,722
K 14+7 S3 100x	493	715	0,689	
K 14+7 Z3 10x	40	267	0,148	0,325
K 14+7 Z3 100x	167	332	0,502	
K 14+7 S4 10x	72	510	0,142	0,522
K 14+7 S4 100x	547	605	0,903	
K 14+7 Z4 10x	176	242	0,728	0,705
K 14+7 Z4 100x	213	313	0,682	
K 14+7 S5 10x	208	512	0,406	0,505
K 14+7 S5 100x	350	579	0,604	
K 14+7 Z5 10x	252	263	0,959	1,090
K 14+7 Z5 100x	417	341	1,221	
T 14+7 S1 10x	651	453	1,436	1,437
T 14+7 S1 100x	874	608	1,437	
T 14+7 Z1 10x	208	282	0,739	0,721
T 14+7 Z1 100x	306	437	0,702	
T 14+7 S2 10x	965	519	1,858	1,912
T 14+7 S2 100x	2308	1174	1,966	
T 14+7 Z2 10x	40	331	0,121	0,152
T 14+7 Z2 100x	123	670	0,184	
T 14+7 S3 10x	779	544	1,432	1,651
T 14+7 S3 100x	1789	956	1,871	
T 14+7 Z3 10x	278	227	1,225	1,274
T 14+7 Z3 100x	554	419	1,322	
T 14+7 S4 10x	786	615	1,279	1,405
T 14+7 S4 100x	1364	891	1,530	
T 14+7 Z4 10x	297	258	1,153	1,225
T 14+7 Z4 100x	620	479	1,296	
T 14+7 S5 10x	807	452	1,785	1,812
T 14+7 S5 100x	1436	781	1,839	
T 14+7 Z5 10x	74	209	0,354	0,420
T 14+7 Z5 100x	155	319	0,485	
T 14+7 S6 10x	237	475	0,498	0,512
T 14+7 S6 100x	398	757	0,526	
T 14+7 Z6 10x	223	308	0,724	1,015

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Ime vzorca	Rel. št. kopij		<i>glu/cox</i>	Relativno izražanje glukanaze (povprečje obeh redčitev)
	<i>glu</i>	<i>cox</i>		
T 14+7 Z6 100x	539	413	1,306	
T 14+7 S7 10x	303	518	0,585	0,596
T 14+7 S7 100x	325	535	0,608	
T 14+7 Z7 10x	59	310	0,191	0,208
T 14+7 Z7 100x	92	412	0,224	
T 14+7 S8 10x	737	556	1,326	1,610
T 14+7 S8 100x	1300	687	1,893	
T 14+7 Z8 10x	177	241	0,733	0,736
T 14+7 Z8 100x	251	339	0,739	
T 14+7 S9 10x	772	618	1,249	1,323
T 14+7 S9 100x	1089	780	1,396	
T 14+7 Z9 10x	146	321	0,453	0,471
T 14+7 Z9 100x	187	381	0,489	
T 14+7 S10 10x	325	464	0,701	0,824
T 14+7 S10 100x	497	525	0,947	
T 14+7 Z10 10x	206	326	0,632	0,648
T 14+7 Z10 100x	264	397	0,664	

\*Z rdečo barvo so označene vrednosti, kjer reakcija PCR v realnem času ni potekala z optimalno učinkovitostjo

Priloga B2:

Relativno število kopij gena za glukanazo in citokrom oksidazo upoštevajoč redčitve vzorcev,  
število kopij gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo in povprečje za poskus 2

Ime vzorca	Rel. št. kopij	Rel. št. kopij	glu/cox	Relativno izražanje glukanaze
				(povprečje obeh redčitev)
K 14+21 Z1 10x	29434	18980	1,551	1,362
K 14+21 Z1 100x	20796	17733	1,173	
K 14+21 Z2 10x	5549	13797	0,402	0,357
K 14+21 Z2 100x	3875	12457	0,311	
K 14+21 Z3 10x	16648	35453	0,470	0,418
K 14+21 Z3 100x	12551	34262	0,366	
K 14+21 Z4 10x	30187	32596	0,926	0,966
K 14+21 Z4 100x	32986	32814	1,005	
K 14+21 Z5 10x	34252	40924	0,837	0,794
K 14+21 Z5 100x	30377	40440	0,751	
K 14+21 Z1a 10x	2862	14456	0,198	0,186
K 14+21 Z1a 100x	2957	17015	0,174	
K 14+21 Z2a 10x	3242	33820	0,096	0,101
K 14+21 Z2a 100x	3565	33709	0,106	
K 14+21 Z3a 10x	2320	34118	0,068	0,074
K 14+21 Z3a 100x	2659	33553	0,079	
K 14+21 Z4a 10x	241	26028	0,009	0,008
K 14+21 Z4a 100x	178	25885	0,007	
K 14+21 Z5a 10x	5601	35484	0,158	0,159
K 14+21 Z5a 100x	5588	34988	0,160	
T 14+21 TZ1 10x	10079	32882	0,307	0,272
T 14+21 TZ1 100x	7426	31360	0,237	
T 14+21 TZ2 10x	1655	11512	0,144	0,139
T 14+21 TZ2 100x	1308	9792	0,134	
T 14+21 TZ3 10x	4349	45489	0,096	0,095
T 14+21 TZ3 100x	3982	42547	0,094	
T 14+21 TZ4 10x	2067	35510	0,058	0,049
T 14+21 TZ4 100x	1268	31624	0,040	
T 14+21 TZ5 10x	19060	36225	0,526	0,504
T 14+21 TZ5 100x	15084	31323	0,482	
T 14+21 TZ6 10x	9104	37439	0,243	0,243
T 14+21 TZ6 100x	8521	35033	0,243	
T 14+21 TZ7 10x	8273	34452	0,240	0,230
T 14+21 TZ7 100x	6570	29897	0,220	
T 14+21 TZ8 10x	6883	35808	0,192	0,197
T 14+21 TZ8 100x	6082	30161	0,202	
T 14+21 TZ9 10x	8301	32414	0,256	0,269

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Ime vzorca	Rel. št. kopij <i>glu</i>	Rel. št. kopij <i>cox</i>	<i>glu/cox</i>	Relativno izražanje glukanaze
				(povprečje oben redčitev)
T 14+21 TZ9 100x	9299	33101	0,281	
T 14+21 TZ10 10x	3410	34337	0,099	0,109
T 14+21 TZ10 100x	3856	32743	0,118	
T 14+21 TZ1a 10x	2075	35176	0,059	0,064
T 14+21 TZ1a 100x	2186	32135	0,068	
T 14+21 TZ2a 10x	705	23864	0,030	0,028
T 14+21 TZ2a 100x	609	22783	0,027	
T 14+21 TZ3a 10x	1280	28523	0,045	0,043
T 14+21 TZ3a 100x	1274	31117	0,041	
T 14+21 TZ4a 10x	2439	22712	0,107	0,105
T 14+21 TZ4a 100x	2214	21760	0,102	
T 14+21 TZ5a 10x	2177	12138	0,179	0,171
T 14+21 TZ5a 100x	1682	10359	0,162	
T 14+21 TZ6a 10x	540	24399	0,022	0,023
T 14+21 TZ6a 100x	560	23669	0,024	
T 14+21 TZ7a 10x	744	28888	0,026	0,025
T 14+21 TZ7a 100x	721	30307	0,024	
T 14+21 TZ8a 10x	1770	39637	0,045	0,056
T 14+21 TZ8a 10x	2705	40369	0,067	
T 14+21 TZ9a 10x	176	2226	0,079	0,084
T 14+21 TZ9a 100x	195	2214	0,088	
T 14+21 TZ10a 10x	326	13330	0,024	0,019
T 14+21 TZ10a 100x	185	13792	0,013	

\*Z rdečo barvo so označene vrednosti, kjer reakcija PCR v realnem času ni potekala z optimalno učinkovitostjo

Priloga B3:

Relativno število kopij gena za glukanazo in citokrom oksidazo upoštevajoč redčitve vzorcev, število kopij gena za glukanazo glede na gen za citokrom oksidazo in povprečje za poskus 3

Ime vzorca	Rel. št. kopij	Rel. št. kopij	<i>glu/cox</i>	Relativno izražanje glukanaze
				(povprečje obeh redčitev)
K 32+7 Z1 10x	1589	12337	0,129	0,152
K 32+7 Z1 100x	2530	14395	0,176	
K 32+7 Z2 10x	1135	15043	0,075	0,083
K 32+7 Z2 100x	1671	18375	0,091	
K 32+7 Z3 10x	1526	19299	0,079	0,095
K 32+7 Z3 100x	2422	21916	0,111	
K 32+7 Z4 10x	645	10107	0,064	0,087
K 32+7 Z4 100x	1309	11961	0,109	
K 32+7 Z5 10x	23687	13667	1,733	2,151
K 32+7 Z5 100x	39593	15408	2,570	
K 32+7 S1 10x	4684	14210	0,330	0,460
K 32+7 S1 100x	8975	15223	0,590	
K 32+7 S2 10x	801	7992	0,100	0,203
K 32+7 S2 100x	1636	8070	0,075	
K 32+7 S3 10x	4650	7315	0,636	0,763
K 32+7 S3 100x	6825	7666	0,890	
K 32+7 S4 10x	1109	16936	0,065	0,105
K 32+7 S4 100x	2455	16890	0,145	
K 32+7 S5 10x	10018	24961	0,401	0,482
K 32+7 S5 100x	15729	27952	0,563	
T 32+7 Z1 10x	2063	16200	0,127	0,144
T 32+7 Z1 100x	3007	18676	0,161	
T 32+7 Z2 10x	1553	12847	0,121	0,136
T 32+7 Z2 100x	1968	13047	0,151	
T 32+7 Z3 10x	1436	18163	0,079	0,099
T 32+7 Z3 100x	2201	18463	0,119	
T 32+7 Z4 10x	6400	16152	0,396	0,431
T 32+7 Z4 100x	7826	16811	0,466	
T 32+7 Z5 10x	25945	22517	1,152	1,307
T 32+7 Z5 100x	35888	24544	1,462	
T 32+7 Z6 10x	40399	25003	1,616	1,713
T 32+7 Z6 100x	48608	26857	1,810	
T 32+7 Z7 10x	3264	19479	0,168	0,177
T 32+7 Z7 100x	3993	21370	0,187	
T 32+7 Z8 10x	1167	21824	0,053	0,064
T 32+7 Z8 100x	1883	24979	0,075	
T 32+7 Z9 10x	3817	19453	0,196	0,207

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Ime vzorca	Rel. št. kopij	Rel. št. kopij	<i>glu/cox</i>	Relativno izražanje glukanaze
				(povprečje obeh redčitev)
T 32+7 Z9 100x	5311	24431	0,217	
T 32+7 Z10 10x	4906	18115	0,271	0,293
T 32+7 Z10 100x	6844	21782	0,314	
T 32+7 S1 10x	35371	25589	1,382	1,443
T 32+7 S1 100x	43777	29107	1,504	
T 32+7 S2 10x	13622	10751	1,267	1,319
T 32+7 S2 100x	16395	11953	1,372	
T 32+7 S3 10x	69490	34807	1,996	2,062
T 32+7 S3 100x	93459	43911	2,128	
T 32+7 S4 10x	33591	40725	0,825	1,064
T 32+7 S4 100x	60987	46791	1,303	
T 32+7 S5 10x	47240	34211	1,381	1,487
T 32+7 S5 100x	60809	38190	1,592	
T 32+7 S6 10x	45950	33053	1,390	1,708
T 32+7 S6 100x	68987	34042	2,027	
T 32+7 S7 10x	18254	15992	1,141	1,682
T 32+7 S7 100x	22183	9981	2,222	
T 32+7 S8 10x	10457	15120	0,692	0,768
T 32+7 S8 100x	12015	14220	0,845	
T 32+7 S9 10x	30137	28449	1,059	1,127
T 32+7 S9 100x	38844	32497	1,195	
T 32+7 S10 10x	17169	19587	0,877	1,010
T 32+7 S10 100x	22975	20089	1,144	

\*Z rdečo barvo so označene vrednosti, kjer reakcija PCR v realnem času ni potekala z optimalno učinkovitostjo