

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
MEDODDELČNI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Barbara Mohorič

**POSTOPKI REGENERACIJE RASTLIN PRI GENSKI
TRANSFORMACIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**REGENERATION PROCEDURES OF PLANT GENE
TRANSFORMATION**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

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

Po sklepu komisije za dodiplomski študij oddelka za biotehnologijo z dne 12.9.2008 je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Maja Ravnikar, za somentorico diplomskega dela pa prof. dr. Jana Žel.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK

Član: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Član: prof. dr. Jana ŽEL

Član: prof. dr. Zlata LUTHAR

Datum zagovora: 20.5.2011

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

Barbara Mohorič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.1: 578: 632 (043.2)=163.6
KG	Transformacija/ krompir (<i>Solanum tuberosum L.</i>)/ krompirjev virus Y (PVY)/ β-glukanaza/ bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AV	MOHORIČ, Barbara
SA	RAVNIKAR, Maja(mentorica)/ŽEL, Jana(somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	POSTOPKI REGENERACIJE RASTLIN PRI GENSKI TRANSFORMACIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 77 s., 10 tab., 30 sl., 99 ref.
IJ	SL
JI	s/en
AI	Krompirjev virus Y (PVY) povzroča bolezen, imenovano obročkasta nekroza gomoljev (PTNRD), ki se kaže z različnimi bolezenskimi znamenji na rastlinah in gomoljih krompirja (<i>Solanum tuberosum L.</i>). Na okuženih rastlinah se opaža drastično zmanjšanje pridelka in zmanjšano kvaliteto gomoljev. Z biotehniološkimi orodji skušamo razumeti interakcije med patogenimi mikrobi in rastlinami, razložiti mehanizme, ki vodijo v odpornost rastlin in odpraviti občutljivost različnih rastlinskih vrst na povzročitelje bolezni. Namen diplomskega dela je bila transformacija in regeneracija rastlin krompirja, sort Désirée, Igor, Sante in Pentland, za kasnejšo funkcionalno analizo gena za β-glukanazo. β-glukanaze so encimi, za katere so ugotovili, da razgrajujejo kalozo, s tem povečajo propustnost celične stene in tako olajšajo širjenje virusa po rastlini. Transformacijo smo izvedli z vnosom genov za 1,3-β-glukanazo in promotorja 1,3-β-glukanaze, s pomočjo bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . S transformacijo sorte Sante, smo pridobili tri linije, ki so povisano izražale gen za 1,3-β-glukanazo razreda III. Pri transformaciji sorte Désirée smo pridobili 16 linij s povečanim izražanjem 1,3-β-glukanaze razreda III, 19 linij z vključenim promotorjem 1,3-β-glukanaze razreda III in 25 linij s povečanim izražanjem gena za 1,3-β-glukanazo razreda III v fuziji z GFP. Postopek regeneracije pri različnih sortah ni enako uspešen in je odvisen od mnogih dejavnikov, kot so: sorta krompirja, letni čas, v katerem se transformacija opravi, konstrukt, ki se ga vstavlja, selekcijski antibiotik.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC 581.1: 578: 632 (043.2)=163.6
CX Transformation/ potato (*Solanum tuberosum* L.)/ potato virus Y (PVY)/
β-glucanase/ bacterium *Agrobacterium tumefaciens*
AU MOHORIČ, Barbara
AA RAVNIKAR, Maja(supervisor)/ŽEL, Jana(co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biothechnical Faculty, Academic Study Program in
PY 2011
TI REGENERATION PROCEDURES OF PLANT GENE TRANSFORMATION
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 77 p., 10 tab., 30 fig., 99 ref.
LA sl
AL s/en
AB Potato virus Y (PVY) causes potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD), causing a variety of symptoms on plants and potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. As a consequence, a significant loss of crop and reduced quality of tubers are observed on the infected plants. Biotechnology tools can help us to understand interactions between pathogens and plants, to explain the mechanisms that provoke plant resistance, and to eliminate sensitivity of diverse plant species to disease causing agents. The purpose of this undergraduate thesis is transformation and regeneration of the potato plants, more precisely of potato cultivars Desirée, Igor, Sante and Pentland, for a subsequent functional analysis of the β-glucanase gene. It has been found that β-glucanase is an enzyme that randomly cleaves callose, thereby increases the permeability of a cell wall and thus facilitates virus spreading throughout the plant. The transformation was performed by inserting 1,3-β-glucanase gene and 1,3-β-glucanase promoter with bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. With the transformation of the Sante cultivar, we obtained three transgenic lines with the increased class III 1,3-β-glucanase activity. During the transformation of the Désirée cultivar, we obtained 16 transgenic lines with the increased class III 1,3-β-glucanase activity, 19 transgenic lines with the integrated class III 1,3-β-glucanase promoter and 25 transgenic lines with the increased class III 1,3-β-glucanase activity with GFP fusion. The regeneration process of various plants is not equally efficient and depends on several factors, such as potato cultivars, the season in which the transformation is done, the construct used, the selecting antibiotic etc.

KAZALA**STVARNO KAZALO**

KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO TABEL.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
SLOVARČEK.....	XII
1. UVOD	1
1.1. OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2. NAMEN DELA	2
1.3. HIPOTEZE	3
2. PREGLED OBJAV	4
2.1. KROMPIR.....	4
2.1.1. Sorta Igor	5
2.1.2. Sorta Désirée.....	5
2.1.3. Sorta Sante.....	6
2.2. KROMPIRJEV VIRUS Y	7
2.3. β -GLUKANAZA.....	11
2.4. TRANSFORMACIJA RASTLIN	16
2.4.1. Vnos genov z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.5. REGENERACIJA IN NAMNOŽITEV TRANSFORMIRANIH RASTLIN	21
2.5.1. Rastlinski rastni regulatorji	22
2.5.1.1. AVKSINI.....	23
2.5.1.2. CITOKININI	23
2.5.1.3. GIBERELINI	24
3. MATERIALI IN METODE	25
3.1. MATERIALI	25
3.1.1. Rastlinski material.....	25
3.1.2. Bakterije	26
3.1.3. Plazmidi	26
3.1.4. Gojišča.....	29
3.1.4.1. BAKTERIJSKA GOJIŠČA.....	29
3.1.4.2. RASTLINSKA GOJIŠČA	30
3.1.5. Rastni pogoji	32
3.2. METODE	32
3.2.1. Priprava gojišč	32
3.2.2. Namnoževanje rastlin	33
3.2.3. Transformacija	33
3.2.3.1. TRANSFORMACIJA 1: 29.8.2008.....	39
3.2.3.2. TRANSFORMACIJA 2: 5.12.2008.....	39
3.2.3.3. TRANSFORMACIJA 3: 21.1.2009	39

3.2.4. Gojenje (transformiranih) rastlin.....	40
3.2.5. Testiranje potencialno transgenih rastlin	41
3.2.5.1. PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA	41
3.2.5.2. IZOLACIJA DNA IZ RASTLINSKEGA TKIVA	41
3.2.5.3. DOLOČANJE PRISOTNOSTI 35S CaMV PROMOTORJA.....	43
4. REZULTATI.....	44
4.1. TRANSFORMACIJA IN REGENERACIJA RASTLIN KROMPIRJA	44
4.1.1. Kontrole.....	46
4.1.2. Transformacija 1: 29.8.2008.....	48
4.1.3. Transformacija 2: 5.12.2008.....	51
4.1.4. Transformacija 3: 21.1.2009.....	55
4.2. TESTIRANJE REGENERIRANIH RASTLIN	57
5. RAZPRAVA	58
6. SKLEPI.....	65
7. POVZETEK	66
8. LITERATURA	67

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Krompir (<i>Solanum tuberosum L.</i>) (VIR:</i>	
<i>http://www.kis.si/pls/kis!/kis.web?m=158&j=SI,</i>	
<i>http://www2.arnes.si/~oskrmv1s/ucilnica/galerijaslik/rastline.htm)</i>	4
<i>Slika 2: Gomolji krompirja sorte Igor.</i>	5
<i>Slika 3: Obročkasta nekroza gomoljev, ki jo povzroči virus PVY (vir:</i>	
<i>http://www.growingpotatos.org/potato-virus-y/)</i>	8
<i>Slika 4: Solanum stoloniferum (VIR:</i>	
<i>http://www.wnmu.edu/academic/nspages/gilaflora/solanum_stoloniferum.html)</i>	9
<i>Slika 5: Celoten postopek nastanka transgenih rastlin (VIR:</i>	
<i>http://www.scq.ubc.ca/transgenic-crops-how-genetics-is-providing-new-ways-to-envision-agriculture/)</i>	16
<i>Slika 6: Rastlinski material, v in vitro pogojih v rastni komori. (Avtor: David Dobnik)</i>	25
<i>Slika 7: Plazmidna karta vektorja pMDC32, v katerega je bil vnesen gen za 1,3-β-glukanazo razreda III.</i>	27
<i>Slika 8: Plazmidna karta vektorja pMDC85, v katerega je bil vnesen gen za 1,3-β-glukanazo v fuziji z GFP.....</i>	27
<i>Slika 9: Plazmidna karta vektorja pMDC 110, v katerega je bil vnesen promotor 1,3-β-glukanaze razreda III.</i>	28
<i>Slika 10: Prestavljanje izsečkov v brezprašni komori za delo z bakterijskimi kulturami.....</i>	37
<i>Slika 11: Orodje, ki ga potrebujemo za sterilno prestavljanje izsečkov. Gorilnik, ki služi za sterilizacijo pincete, s katero izsečke prestavimo, ter etanol v epruveti, v katerega namočimo pinceto preden jo ožgemo.</i>	37
<i>Slika 12: Shema poteka transformacije.....</i>	38
<i>Slika 13: Transformirane rastline v posodi za gojenje</i>	40
<i>Slika 14: Shema postopka za izolacijo DNA z DNeasy Plant Mini Kit (VIR:</i>	
<i>http://www.ebiotrade.com/buyf/products/qiagen/1015107HBDNY_0800WW.pdf).....</i>	42
<i>Slika 15: Propadel izseček</i>	44
<i>Slika 16:Izsečki, različnih sort krompirja, v fazi tvorbe prvih kalusov.</i>	44
<i>Slika 17: Izsečki, različnih sort krompirja, v fazi tvorbe kalusa, ko imajo značilno obliko drevesa.</i>	44
<i>Slika 18: Izsečki, v fazi tvorbe kalusa.</i>	45
<i>Slika 19 : Prvi, lepi poganjki.</i>	45
<i>Slika 20: Kasnejši, slabši poganjki, za katere nismo popolnoma prepričani, če so transformirani.</i>	45
<i>Slika 21: Izsečki Igorja, ki kljub slabem stanju, kažejo znake kalusiranja ozziroma v prvem primeru celo tvorbe poganjka.</i>	45
<i>Slika 22: Kontrole za Désirée. Sledijo si po vrstnem redu K1 (netransformirani izsečki in gojišče brez selekcije), K2 (transformirani izsečki in gojišče brez selekcije) in K3 (netransformirani izsečki in gojišče s selekcijo). Vidimo da sta prvi dve kontroli pozitivni, kot je potrebno in da je tretja negativna, kar nam pove, da je poizkus potekal pravilno.</i>	46

<i>Slika 23: Kontrole za Sante. Sledijo si po vrstnem redu K1, K2 in K3. Pri prvih dveh kontrolah so vidni znaki poganjkov, a so bili poganjki nekoliko slabši in manjši. Tretja kontrola nima poganjkov, a izsečki še niso čisto odmrli, kar pa se je zgodilo šele čez nekaj tednov.</i>	46
<i>Slika 24: Kontrole za Igor. Sledijo si po vrstnem redu K1, K2 in K3. Prvi kontroli kažeta znake kalusiranja in tvorbe poganjkov, medtem ko so izsečki iz tretje kontrole po nekaj tednih popolnoma porjaveli. V primerjavi s kontrolami Désirée in tudi Sante, lahko opazimo, da je Igor mnogo bolj zahtevna sorta, ki potrebuje dobro definirane pogoje za rast in razvoj.</i>	47
<i>Slika 25: Kalusiranje izsečkov, po poskusni transformaciji, prikazano v odstotkih. V modri barvi je odstotek kalusiranih izsečkov 42 dni po transformaciji, v zeleni pa 56 dni po transformaciji.</i>	49
<i>Slika 26: V odstotkih prikazana tvorba poganjkov pri transformiranih izsečkih krompirja. Modra barva prikazuje odstotek transformiranih izsečkov, na katerih so se 42 dni po transformaciji razvili poganjki. Zelena barva pa prikazuje pdstotek izsečkov, na katerih so se razvili poganjki 56 dni po transformaciji.</i>	50
<i>Slika 27: Število izsečkov transformiranega (z različnimi konstrukti) krompirja sorte Désirée, ki kalusirajo. Prvi stolpec ponazarja rezultate transformacije sorte Désirée z geni za promotor 1,3-β-glukanaze razreda III. Drugi stolpec predstavlja rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3-β-glukanazo razreda III, tretji stolpec pa rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3-β-glukanazo v fuziji z GFP.</i>	52
<i>Slika 28: Število izsečkov transformiranega krompirja sorte Désirée s poganjki. Prvi stolpec prikazuje rezultate transformacije sorte Désirée z geni za promotor 1,3-β-glukanaze razreda III. Drugi stolpec predstavlja rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3-β-glukanazo razreda III, tretji stolpec pa rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3-β-glukanazo v fuziji z GFP.</i>	53
<i>Slika 29: Število izsečkov transformiranega krompirja sorte Désirée, na katerih so do 119 dneva transformacije, zrasli dovolj veliki poganjki, primerni za ločitev od kalusa. V prvem stolpcu so prikazani rezultati transformacije sorte Désirée z geni za promotor 1,3-β-glukanaze razreda III. Drugi stolpec predstavlja rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3-β-glukanazo razreda III, tretji stolpec pa rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3-β-glukanazo v fuziji z GFP. z geni za 1,3-β-glukanazo v fuziji z GFP.</i>	54
<i>Slika 30: Uspešnost transformacije 3. Pod številko 1 so predstavljeni vsi izsečki. Pod številko 2 so predstavljeni izsečki, ki so kalusirali. Pod številko 3 pa so predstavljeni izsečki, ki so imeli poganjke. Z modro barvo so na grafu predstavljeni izsečki sorte Sante, ki so bili transformirani z genom za 1,3-β-glukanazo razreda III. Z zeleno barvo pa so predstavljeni izsečki sorte Igor, ki so bili transformirani z promotor 1,3-β-glukanaze razreda III.</i>	56

KAZALO TABEL

Tabela 1: Pregled lastnosti, v diplomi obravnavanih, sort krompirja (povzeto po:

http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/POL/Sel-center-krompir/SORTNI-IZB-2008.pdf) 6

Tabela 2: Sestava uporabljenih bakterijskih gojič. 29

Tabela 3: Sestava MS gojiča (Murashige in Skoog, 1962). 30

Tabela 4: Sestava uporabljenih rastlinskih gojič. 31

Tabela 5: Poskusi treh transformacij, z uporabljenimi sortami krompirja, plazmidi in geni 34

Tabela 6: Število transformiranih, kalusiranih izsečkov in izsečkov s poganjki po Transformaciji 1, sort Désirée, Igor, Pentland in Sante. 48

Tabela 7: Odstotek (število) izsečkov, ki so kalusirali sort Désirée, Igor in Pentland. 49

Tabela 8: Odstotek (število) izsečkov s poganjki sort Désirée, Igor in Pentland. 50

Tabela 9: Uspešnost transformacije 2 za sorto Désirée (1 – vsi nastavljeni izsečki na ploščah, 2 - št. kalusiranih izsečkov, 3 - št. izsečkov s poganjki, 4 - število poganjkov prestavljenih v posode)..... 51

Tabela 10: Uspešnost transformacije 3 (1 – vsi izsečki na plošči, 2 - št. kalusiranih izsečkov, 3 - št. izsečkov s poganjki)..... 55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	abscizinska kislina
<i>cox</i> gen	gen za citokrom oksidazo
CP	plaščni protein
DNA	deoskribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ER</i>	ekstremna odpornost
GFP	zeleni fluorescentni protein (green fluorescent protein)
GLU	gen za 1,3-β-glukanazo razreda III
GLU+GFP	gen za 1,3-β-glukanazo razreda III v fuziji z GFP
GLU PROM	promotor 1,3-β-glukanaze razreda III
HR	hipersenzitivni odgovor
IAA	indol-3-ocetna kislina
IBA	indolbutirična kislina
IPA	izopentenilzeatin
LB	Luria-Bertani gojišče
MCPA	2-metil-4-klorofenoksi acetna kislina
MP	gibalni protein
MS	Murashige in Skoog gojišče
NAA	α-naftalen acetna kislina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Ny</i>	geni odgovorni za HR

<i>onc</i> geni	geni za tvorbo rakastih celic
OR	osnovna raztopina za pripravo MS gojišča
PAA	fenilocetna kislina
PACM	osnovno MS gojišče z dodanimi avksini in citokinini
PCR	verižna reakcija s polimerazo
Pd	plazmodezme
pMDC	komercialni plazmid družbe Cambia
PTNRD	obročkasta nekroza gomoljev (ang. potato tuber necrotic ringspot disease)
PVA	krompirjev virus A
PVY	krompirjev virus Y
PVY ^C	različek virusa PVY
PVY ^O	različek virusa PVY
PVY ^N	različek virusa PVY
PVY ^{NTN}	različek virusa PVY
PVV	krompirjev virus V
R3B	osnovno MS gojišče z dodanimi avksini in citokinini
RNA	ribonukleinska kislina
<i>Ry</i>	geni odgovorni za ER
<i>Ry sto</i>	dominanten gen za ekstremno odpornost iz vrste <i>Solanum stoloniferum</i>
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SEL	faktor prepustnosti Pd
T-DNA	transfer DNA
Ti plazmid	tumor inducirajoči plazmid
TMV	virus mozaika tobaka

TNV	nekrotični virus tobaka
<i>vir</i> geni	geni za virulenco
Zcv(h) / (k)	gojišče z zeatin ribozidom, klaforanom, vankomicinom (in higromicinom ali kanamicinom)
YM	gojišče za rast kvasovk (angl. Yeast and mold broth)
2,4- D	2,4-diklorofenoksiocetna kislina

SLOVARČEK

BRASINOLIDI – Spadajo med rastlinske hormone, v skupino brasinosteroidov. Vplivajo na povečanje celične elongacije ter pospešujejo celične delitve, sodelujejo pri gravitropizmu in diferenciaciji ksilema, ter zavirajo rast korenin.

OPINI – So derivati aminokislin arginina in leucina, ki jih *A. tumefaciens* uporablja kot vir ogljika in dušika za svojo rast.

MAKROCEF – Cefotaksim, ki ga izdeluje in pakira Krka.

1. UVOD

1.1. OPREDELITEV PROBLEMA

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je ena najpomembnejših kulturnih rastlin. Nekateri viri navajajo, da ga človeštvo goji že pet tisočletij (Stabej, 1997). Zaradi razmeroma visoke odpornosti na vremenske spremembe ga je pogosto mogoče gojiti tudi, kjer pšenica in riž ne uspevata.

Nekateri kultivarji krompirja, pa so močno dovzetni za različne bolezni, med katerimi je tudi krompirjev virus Y (Glais in sod., 2005). Igor je slovenska sorta krompirja, ki ga je leta 1988 najhuje prizadela epidemija obročkaste nekroze gomoljev, ki jo povzroča krompirjev virus Y^{NTN}. Zaradi te bolezni je Igor hitro izginil iz slovenskih polj (Sluga, 1994).

β -glukanaze so encimi, za katere so ugotovili, da razgrajujejo kalozo, kar povzroči večjo prepustnost celične stene in s tem olajša širjenje virusa po rastlini (Beffa in Meins, 1996).

β -glukanaze se v večjih koncentracijah izražajo oziroma pojavljajo v rastlinah občutljivih na viruse in se slabše oziroma ne izražajo v rastlinah odpornih na viruse (Baebler in sod., 2009). Za proučevanje funkcije in lastnosti β -glukanaz pri okužbi rastlin z virusom, je potrebno spremeniti izražanje gena za β -glukanazo.

Genska transformacija rastlin je od poznih osemdesetih let postala pomembna tehnologija za izboljšanje kmetijskih rastlin. Eden od razlogov se skriva v tem, da lahko izboljšanje lastnosti s tradicionalnimi postopki (križanja, izzivanje naključnih mutacij s pomočjo kemikalij in žarčenja ter nadaljnja selekcija rastlin z izbranimi lastnostmi) traja tudi do 15 let. Izboljšanje lastnosti s pomočjo genskega inžiniringa in rastlinskih tkivnih kultur pa postopke skrajša, poleg tega je tudi natančna metoda (Bohanec, 2004).

Številne gensko spremenjene sorte, se že uporabljajo v komercialne namene, v Ameriki, Braziliji, Argentini, Indiji, Kanadi, Kitajski, Paragvaju, Pakistanu, Južni Afriki, Urugvaju in mnogih drugih državah po vsem svetu (ISAAA Brief 2010). Prve gensko spremenjene rastline so bile soja, koruza, oljna repica in bombaž. Temeljijo na toleranci na selektivne herbicide in odpornosti proti žuželkam. Danes je omogočeno gensko spremjanje velikega števila rastlinskih vrst, vključno z žiti. Skupaj z njimi je razvita tudi široka paleta lastnosti, ki z agronomskega stališča izboljšujejo pridelovalno kakovost rastlin.

V zadnjih letih je bilo veliko raziskav narejenih na interakciji virusa PVY in krompirja (Pompe-Novak in sod., 2006; Baebler in sod., 2009; Kogovšek in sod., 2010). Na Nacionalnem inštitutu za biologijo so iz različnih rezultatov pripravili izbor genov, ki so se zdeli primerni za nadaljnje študije, transformacija pa je bila izbrana, kot primeren pristop za potrditev vloge genov. V diplomskem delu smo se osredotočili na vzpostavitev optimalnega sistema transformacije z genom za izražanje β -glukanaze in regeneracije različnih sort krompirja po transformaciji.

1.2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bila priprava različnih gensko spremenjenih rastlin krompirja, z različnimi konstruktmi, za kasnejšo funkcionalno analizo gena za β -glukanazo. S tem namenom smo želeli pridobiti čim več različnih transformant tako s povišanim, kot tudi utišanim izražanjem gena za β -glukanazo, poleg tega pa smo vstavili tudi gen za β -glukanazo v fuziji z GFP, za spremjanje lokalizacije, ter promotor gena za β -glukanazo.

Transformirali smo štiri različne sorte: Igor, Désirée, Sante in Pentland.

Po transformaciji smo poskušali najti najprimernejše pogoje za čim bolj uspešno regeneracijo.

1.3. HIPOTEZE

Izbran postopek transformacije je primerna metoda za vnos konstrukta v različne sorte rastlin krompirja *S. tuberosum*.

Binarni plazmidi pMDC so primerni za izražanje gena v transformiranih rastlinah.

Transformirali bomo sorte Désirée, Igor, Sante in Pentland, ter pridobili transformante, ki bodo primerne za nadaljne funkcijске analize vstavljenih genov.

Transformante bomo poskušali regenerirati in namnožiti, ter preverili če vsebujejo vnešeni gen.

2. PREGLED OBJAV

2.1. KROMPIR

Krompir (*Solanum tuberosum L.*) (slika 1) spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*) in izvira iz Južne Amerike. V Evropo je prišel v 16. stoletju. Sprva so ga gojili kot okrasno rastlino, šele veliko pozneje se je razširila uporaba gomoljev za krmo, predvsem prašičev. V Evropi so ga začeli uživati nekje v 17. ali 18. stoletju zaradi obdobjij hude lakote (Stabej, 1997; Kocjan, 1999 in 2002).

Po svetu je registriranih več tisoč sort krompirja. V slovenski Sortni listi poljščin, se je leta 2000, število sort krompirja povzpelo čez 60.



Slika 1: Krompir (*Solanum tuberosum L.*) (VIR: <http://www.kis.si/pls/kis/!kis.web?m=158&j=SI>, <http://www2.arnes.si/~oskrmv1s/ucilnica/galerijaslik/rastline.htm>)

Najbolj znana slovenska sorta krompirja je zagotovo Igor, ki je bil več kot 20 let nosilna slovenska sorta krompirja. Leta 1988 je bil umaknjen iz pridelave, zaradi velikega obsega okužb s krompirjevim virusom PVY^{NTN}, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (Kus, 1994).

2.1.1. Sorta Igor

Sorta Igor (slika 2) je srednje pozna sorta krompirja z belim mesom. Stebla so številna, močno olistana z velikimi listi. Cvete močno; cvetovi so veliki, rožnati z belimi konicami venčnih listov. Gomolji so podolgovato ovalni, nekoliko sploščeni. Kožica je svetlo rjava, meso je belo, očesca so plitva.

Zelo dobro prenaša skladiščenje in dolgo ohrani jedilno kakovost.

Občutljiv je za krompirjevega raka in navadno krastavost. Je srednje odporen proti krompirjevi plesni. Dokaj odporen je proti virusnim boleznim, a izredno občutljiv na virus PVY^{NTN}, zaradi katerega že v letu okužbe nastanejo velike nekroze na gomoljih (Sluga, 1994).



Slika 2: Gomolji krompirja sorte Igor.

2.1.2. Sorta Désirée

Hitro razvije srednje visok grm s srednje močnimi stebli, ki so rdeče vijolično obarvana. Je precej odporna sorta proti krompirjevi plesni, zelo občutljiva pa na navadno krastavost ter virusne bolezni. Je precej odporna na sušne razmere. Občutljiva je na rjavu pegavost. Désirée je močno razširjena kakovostna jedilna sorta za večnamensko uporabo. Pridelek je srednje velik. Primeren je za strojni izkop, se dobro skladišči in je primerna za ozimnico (Kmetijski inštitut Slovenije, 2010).

Sorta Désirée je dovzetna za PVY^{NTN} in srednje občutljiva na virus.

2.1.3. Sorta Sante

Je zelo razširjena sorta, odporna proti krompirjevemu virusu Y, srednje odporna proti plesni in odporna proti več vrstam rumene (Ro1 do Ro5) in bele krompirjeve čistotvorne ogorčice (Pa2).

Občutljiva je na rjavo pegavost gomoljev.

Sante je zelo rodovitna sorta z višjo vsebnostjo sušine. Primerna je za strojni izkop.

Skladišči se slabo, saj kmalu prične kaliti, zato je primerna le do marca.

Sorta ni primerna za lahka peščena tla, saj v stresnih razmerah močno izrašča in ponovno formira gomolje.

Zaradi odpornosti na bolezni je primerna tudi za biološko pridelovanje (Kmetijski inštitut Slovenije, 2010).

Primerjava lastnosti vseh treh sort je prikazana v tabeli 1.

Tabela 1: Pregled lastnosti, v diplomi obravnavanih, sort krompirja (povzeto po:

<http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/POL/Sel-center-krompir/SORTNI-IZB-2008.pdf>

Sorta	Gomolji	Barva Mesa	Barva Kožice	Uporabnost
IGOR	drobni, ovalni	bela	svetlo rjava	večnamenski krompir
DÉSIRÉE	srednji, podolgovati	rumena	rdeča	večnamenski krompir
SANTE	srednji, ovalni	rumena	svetlo rumena	kuhanje in pečenje

2.2. KROMPIRJEV VIRUS Y

Krompirjev virus Y (PVY) spada v rod Potivirusov (*Potyvirus* iz družine *Potyviridae*).

Potivirusi so ena največjih skupin rastlinskih virusov, ki povzročajo škodo na različnih poljščinah, saj lahko okužijo širok spekter enokaličnic, kot tudi dvokaličnic, v večini klimatskih razmer. Večinoma jih prenašajo listne uši, nekateri pa se lahko prenašajo celo s semenim, gomolji ali dotikom (Revers in sod., 1999; Kus, 1994).

Genom potivirusov sestavlja linearna, enoverižna, pozitivno usmerjena RNA. RNA se prevede v velik poliprotein, ki se med in po translaciji razreže na več manjših proteinov, ki sodelujejo pri cepitvi vezi v poliproteinu (P1, Hc-Pro, NIa), razmnoževanju virusa (P3, NIa), premikanju virusa (CI, Nia) ali vezavi na rastlinsko RNA (NIb). Protein CP tvori plašč virusne RNA in se ob okužbi veže na rastlinsko celico, vključen pa je tudi v premikanje virusa po rastlini. Hc-Pro zavira delovanje obrambnega sistema rastline, ter sodeluje pri prenosu iz rastline v rastlino z listnimi ušmi (Urcuqui-Ichima in sod., 2001).

Gospodarsko pomembni potivirusi za pridelavo krompirja *Solanum tuberosum* so: krompirjev virus Y (PVY), krompirjev virus A (PVA) in krompirjev virus V (PVV). PVY lahko okužuje tudi druge poljščine iz družine *Solanaceae*, med tem ko sta PVA in PVV načeloma omejena le na krompir (Valkonen, 1997).

Gospodarsko pomembnim virusom je skupno, da se okužba razširi po vsej rastlini in traja ves čas obstoja rastline. Še pomembnejše pa je to, da so rastline, ki smo jih pridobili z nespolnim razmnoževanjem iz okužene rastline, prav tako okužene.

Taki virusi, povzročajo izrojevanje oziroma degeneracijo krompirja in drugih poljščin. To pa pomeni, da lahko virusi povzročijo trajno škodo krompirju oziroma njegovi sorti (Acosta in sod., 1999; Arends in Kus, 1999).

PVY ima več različkov PVY^N (tobacco veinal necrosis), PVY^O (common) in PVY^C (potato stipple streak) (Singh in sod., 2008). PVY^{NTN} predstavlja skupino znotraj PVY^N. Predvideva se, da je njegov genom produkt večkratnih rekombinacij med virusnima skupinama PVY^N in PVY^O (Glais in sod., 2002). PVY^{NTN} povzroča bolezen krompirja

imenovano obročkasta nekroza gomoljev (PTNRD-potato tuber necrotic ringspot disease) (slika 3) (Singh in sod., 2008).



Slika 3: Obročkasta nekroza gomoljev, ki jo povzroči virus PVY (vir: <http://www.growingpotatos.org/potato-virus-v/>)

PTNRD se je prvič pojavila na Madžarskem leta 1979 in se hitro razširila praktično po vsem svetu. V Sloveniji se je pojavila leta 1988 (Kus, 1994). To je nedvomno ena od bolezni, ki so slovenskim pridelovalcem krompirja povzročile največjo škodo (Kus, 1995). Povzroči lahko drastično zmanjšanje pridelka (vse do 80%) in zmanjšanje kvalitete gomoljev. Poleg krompirja lahko PVY^{NTN} okuži tudi tobak, paradižnik, papiriko, por ter mnogo drugih rastlin predvsem iz družine razhudnikov (Kus, 1994). Epidemija krompirjevega virusa Y^{NTN} je na slovenskem najbolj prizadela sorto Igor, ki je takrat predstavljala 60% celotne pridelave jedilnega krompirja v Sloveniji. Tri leta po izbruhu bolezni so pri nas to sorto prenehali pridelovati (Kus, 1995).

Različne sorte krompirja so različno dovezne in občutljive na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Sorta Igor spada med zelo občutljive. Okužene rastline že nekaj dni po okužbi razvijejo primarna bolezenska znamenja in kasneje tudi sistematska. Bolezenska znamenja se pojavijo tako na nadzemnem delu rastline kot na gomoljih. Sorta Désirée je nekoliko manj občutljiva. Pri njej se pojavijo bolezenska znamenja na nadzemnem delu rastline in na manjšem številu gomoljev (Kus, 1994).

Sorta Sante vsebuje *Rysto* dominanten gen za ekstremno odpornost (ER) iz *Solanum stoloniferum* (slika 4) in je odporna na PVY^{NTN} (Hinrichs in sod., 1998). *Rysto* gen spada v skupino genov, katerih lastnost je izredno visoka odpornost na vse različke virusa PVY. Rastline krompirja, ki vsebujejo tak gen, načeloma ne kažejo simptomov okužbe (Jones 1990; Valkonen in sod., 1996; Vidal in sod., 2002; Flis in sod., 2005).

Sorta Pentland Squire spada k tolerantnim sortam krompirja. V teh rastlinah se virus lahko širi, vendar se na rastlini ne pojavi vidna bolezenska znamenja, posledica okužbe so lahko le nekoliko manjše rastline (Krečič-Stres in sod., 2005).

Primarne okužbe so bolezenska znamenja na sveže okuženih rastlinah in so na različnih kultivarjih različne. Primarna bolezenska znamenja na okuženih listih krompirja se običajno pojavijo v obliki kloroz in pikam podobnih nekroz. Kasneje se pojavijo sistemski bolezenski znamenji v obliki mozaika, zvijanja listov in obžilnih nekroz na mlajših listih nad okuženimi, medtem ko starejši listi odpadejo. Okužene rastline zaostajajo v rasti, hitreje rumenijo in lahko prej odmrejo, na gomoljih se pojavijo prstanasti obročki.



Slika 4: *Solanum stoloniferum* (VIR:

http://www.wnmu.edu/academic/nspages/gilaflora/solanum_stoloniferum.html)

Rastline, ki zrastejo iz okuženih gomoljev imajo sekundarno okužbo. Sekundarna bolezenska znamenja so podobna primarnim, vendar se v večini sort izrazijo v nekoliko milejši obliki. Najpogosteje se kažejo mozaično z nekrozami na poganjkih in okrog žil (Kus, 1994).

Pri nekaterih sortah se bolezenska znamenja pojavijo tudi na gomoljih: izbočeni obroči ali nabrekline temnejše barve, se čez nekaj časa posušijo, vdrejo in postanejo črne. Pri najbolj občutljivih sortah se plast rjavega tkiva pod površinskimi nekrozami širi v notranjost (Kus, 1994).

Bolezenska znamenja so odvisna od genotipa rastline, virusnega izolata in temperature (LeRomancer in Nedellec, 1997).

Mehanizmi naravne odpornosti proti PVY

Poznana sta dva tipa monogenske dedovane odpornosti proti okužbi s PVY in sicer:

- Hipersenzitivna rezistenca (HR)

Za HR so odgovorni geni *Ny*. HR je ponavadi specifična za posamezno skupino virusov PVY. Rastline po okužbi s PVY razvijejo simptome na okuženih listih ali nekroze na sistemsko okuženih delih (Jones, 1990).

- Ekstremna rezistenca (ER)

Za ER so odgovorni geni *Ry*. Učinkovita je za vse skupine PVY. Rastline po okužbi s PVY ne razvijejo simptomov. Do sedaj še ni poznan različek virusa iz skupine PVY, ki bi presegel to obliko rezistence. V žlahtniteljskih programih se uporablja vnos genov *Ry*. Predvideva se, da je razvoj PVY^{NTN} verjetno odgovor na selekcijske pritiske povzročene z vnosom rezistentnih genov v krompir (Valkonen, 1994, Valkonen, 1997).

2.3. β -GLUKANAZA

β -glukanaza spada v skupino glukanaz. Glukanaze so encimi, ki cepijo glukane. Glukani so pomembni strurni elementi celične stene rastlin ter tudi gliv. Kemijo glukani spadajo med ogljikove hidrate. Sestavljeni so iz enakih osnovnih gradnikov (monosaharidi), le da so te osnovne enote različno razporejene.

Geni za glukanaze se vključijo v različnih fizioloških in razvojnih procesih rastline, kot so mikrosporogeneza, kalitev cvetnega prahu, kalitev semen in pri obrambi pred patogeni (Ori, 1990; Meins, 1992; Leubner-Metzger, 1995).

Geni za 1,3- β -glukanaze spadajo v družino genov, ki so jih našli v mnogih različnih rastlinskih vrstah. Vpleteni so v rastlinske odgovore na okoljski stres in napad patogenih mikroorganizmov ter ostalih povzročiteljev bolezni, sodelujejo pa tudi v rastlinskih razvojnih procesih.

Primarna vloga 1,3- β -glukanaz je aktivna obramba proti glivam. Virusi pa jih lahko izkoristijo za olajšano širjenje po rastlini, saj lahko povečajo odprtine plazmodezm (Beffa in Meins, 1996).

Genska družina 1,3- β -glukanaz je razdeljena v štiri širše kategorije na podlagi več faktorjev: izoelektrične točke, izraženega vzorca in zaporedja beljakovin, fizikalnih lastnosti, aktivnosti encimov, celične delitve, primarne strukture (Ward in sod., 1991; van Eldik in sod., 1996; Payne in sod., 1990; Cheong in sod., 2000).

Razred I 1,3- β -glukanaznih genov kodirajo osnovne beljakovine. Kopičijo se pretežno v vakuolah (Keefe in sod., 1990), ki se nahajajo v povrhnjici spodnjih, starejših listov in koreninah, kot odgovor na napad patogenih organizmov (Linhorst in sod., 1990). Pri zdravih rastlinah, so izraženi predvsem v epidermalnih celicah, v visokih koncentracijah pa se kopijo v mezofilu, po tretiranju z etilenom. Glukanaze razreda I so izpostavljene močnim post-translacijskim modifikacijam, ki vključujejo odstranjevanje karboksilnih terminalnih skupin.

1,3- β -glukanazni geni razreda II, kodirajo kisle proteine, ki se izločajo v zunajcelični prostor. Ti proteini niso prisotni v zdravih listih, kopičijo se le kot odgovor na okužbo (Ward in sod., 1991). Razred II zajema tri podskupine: (a) kisle, zunajcelične glukanaze (PR-2a, 2b-,-2c), (b) z nevtralno ali bazično pI in karboksilnim koncem na terminalnem delu molekule, ki vpliva na lokalizacijo v vakuolo (GL 153, GL 161), in (c) posebne zunajcelične glukanaze sp41 (Payne in sod., 1990; Ward in sod., 1991).

1,3- β -glukanaze razreda III so kisle, a se od razreda I ločijo po značilnem, posebnem aminokislinskem zaporedju (Payne in sod., 1990). Kopičijo se v apoplastu celic okuženih z povzročitelji bolezni.

Nazadnje, ostaneta še dve kisli 1,3- β -glukanazi razreda IV, sp41a in sp41b, ki se nabirata v visokih koncentracijah v prevodnih elementih tobaka, vendar pa nista inducirani s strani patogenih organizmov (van Eldik in sod., 1996). Čeprav so proteini razreda II v 80% enaki proteinom razreda IV 1,3- β -glukanaz, sta bili postavljeni v drug razred (IV), saj je ekspresija teh genov neodvisna od patogeneze.

Najprej so ugotovili, da inducirano izražanje 1,3- β -glukanaznih genov med okužbo povzroči, da 1,3- β -glukanaze skupaj z drugimi hidrolitičnimi encimi, kot so na primer hitinaze, sodelujejo pri samoobrambi rastlin pred rastlinskimi povzročitelji bolezni (Tahiri-Alaoui in sod., 1990; Tornero in sod., 1994).

Kasneje je bilo dokazano, da so 1,3- β -glukanazni geni lahko izraženi tudi v razvojnih procesih pri zdravih rastlinah (Gruner in Pfitzner, 1994; Regolado in Ricardo, 1996), na primer v času kalivosti (Casacuberta in sod., 1992), ob staranju (Hanfrey in sod., 1996), v času cvetenja (Lotan in sod. 1989; Ori in sod., 1990; Cote in sod. 1991; van Eldik in sod., 1996). Te 1,3- β -glukanaze imajo lahko specifične funkcije v normalnem razvoju rastlin.

Različni razredi 1,3- β -glukanaz, lahko kažejo bistveno drugačno delovanje proti določenim substratom. Te razlike se lahko kažejo v različnih *in vivo* funkcijah in ne zgolj v različnih jakostih iste funkcije (Kauffmann in sod., 1987).

Virusne okužbe in širjenje le teh, so odvisne od uspešnosti prodiranja virusa v celico gostitelja. Rastlinski virusi so enostavni organizmi, ki ne morejo lizirati celične stene, zato morajo na drug način premagati oviro, ki jim jo predstavlja celična stena. Za vstop virusa v celico je potrebna poškodba, za širjenje po rastlini pa lahko izkoristijo plazmodezme, ki so neke vrste membranski kanalčki, ki povezujejo sosednje celice s citoplazmo, membrano in endoplazmatskim retikulumom (Epel, 2009).

Plazmodezme (Pd) niso statični organeli, ampak imajo visoko stopnjo plastičnosti in lahko spreminja prehodnost iz "zaprte" v "odprto". Dinamične lastnosti Pd igrajo pomembno vlogo pri urejanju neposrednega transporta molekul med celicami ter pri zagotavljanju prehoda med celicami za rastlinske viruse. Eden izmed mehanizmov sprememb v kanalih je odlaganje in hidroliza molekul kaloze. Reverzibilno odlaganje kaloze v Pd najdemo tako med razvojnimi procesi kot med odzivi na stres. Številne študije so pokazale, da kopičenje kaloze okoli Pd omeji prehod oziroma izmenjavo fluorescentnih barvil med sosednjima celicama, medtem, ko je ustavitev odlaganja kaloze povzročila podvojitev premera odprtih Pd in tako je lahko prišlo do izmenjave večjih molekul med celicama. 1,3-β-glukanaze, so encimi, ki razgrajujejo kaloze. V študijah z gensko spremenjenim tobakom, so dokazali, da je zmanjšana raven 1,3-β-glukanaz razreda I, ter posledično povečana raven kaloze, povzročila spremembe pri izmenjavi molekul med celicami, saj se je omejil prehod večjih molekul skozi Pd (Levy in sod., 2007).

Glukanaze razreda I so izražene v številnih tkivih in so regulirane tako s fitohormoni in salicilno kislino, kot tudi z različnimi stresi, kot so na primer poškodbe, mikrobiološke okužbe in UV sevanja. Ugotovili so, da so tobakove glukanaze razreda I, utišane ob tretiranju z abscizinsko kislino (ABA). Znano pa je tudi, da 1,3-β-glukanaze sodelujejo pri nadzoru velikosti poškodb in ob širjenju patogena (Cheong in sod., 2000).

Številni dokazi kažejo, da ima razred I (Glu I) 1,3-β-glukanaz pomembno vlogo pri odpornosti rastlin za okužbo. Na primer, Glu I ima protiglivno delovanje *in vitro* in pomaga pri zaščiti rastlin pred okužbo z nekaterimi patogenimi glivami (Kombrink in Somssich, 1997; Leubner-Metzger in Meins, 1999). Študije Glu I mutant, so pokazale, da

Glu lahko deluje tudi kot občutljiv dejavnik pri okužbi z virusom (Beffa in sod., 1996). Po okužbi z mozaičnim virusom tobaka (TMV) in tobačnim nekrotičnim virusom (TNV), Glu I mutante tobaka kažejo močno zmanjšanje simptomov virusne okužbe, tako na lokalnem, kot na sistemskem nivoju.

Virusi, kot so TMV se širijo od celice do celice preko plazmodezem, s procesi, ki jih pospešujejo virusni proteini gibanja (MP) (Deom in sod., 1992). V Glu-I mutantah se virusi, kot so TMV, virus krompirja X (PVX) in virus mozaika kumare (CMV) počasneje širijo po rastlini. To se zgodi zato, ker se ob zmanjšanem izločanju 1,3-β-glukanaz znatno zmanjša tudi faktor prepustnosti Pd (SEL). To so dokazali, tako da so pripravili fuzije MP virusa mozaika kumare in zelenega florescentnega proteina (GFP). MP je v Glu-I mutantah precej počasneje prehajal med celicami, kot pri nespremenjenih rastlinah. (Iglesias in Meins, 2000).

Lokalna odlaganja kaloze, ki je substrat za 1,3-β-glukanazo (Stone in Clarke, 1992), lahko povzročijo obložitev prehodov v regijah plazmodezem, s čimer se zmanjša transportni kanalček plazmodezem in s tem je omejeno širjenje virusa (Botha in Cross, 2000; Robards in Lucas, 1990). Glu I mutante kažejo močno povečano usedanje kaloze, ob odgovoru rastline na elicitorje, rane in ob okužbi z virusom (Beffa in sod. 1996; Iglesias in Meins, 2000). To je pripeljalo do hipoteze, da se virus lažje širi po rastlini, če le ta vsebuje višje koncentracije 1,3-β-glukanaz, ter posledično manj kaloze.

Prejšnje študije so pokazale, da so Glu I rastline, ki jim primanjkuje 1,3-β-glukanaz, manj dovzetne za okužbo z virusom, saj imajo zaradi povečane količine kaloze naložene v predelu plazmodezemskega kanalčka, močno zmanjšan pretok skozi plazmodezme in s tem onemogočen oziroma zelo zmanjšan prenos virusa med sosednjima celicama (Beffa in sod., 1996; Iglesias in Meins, 2000).

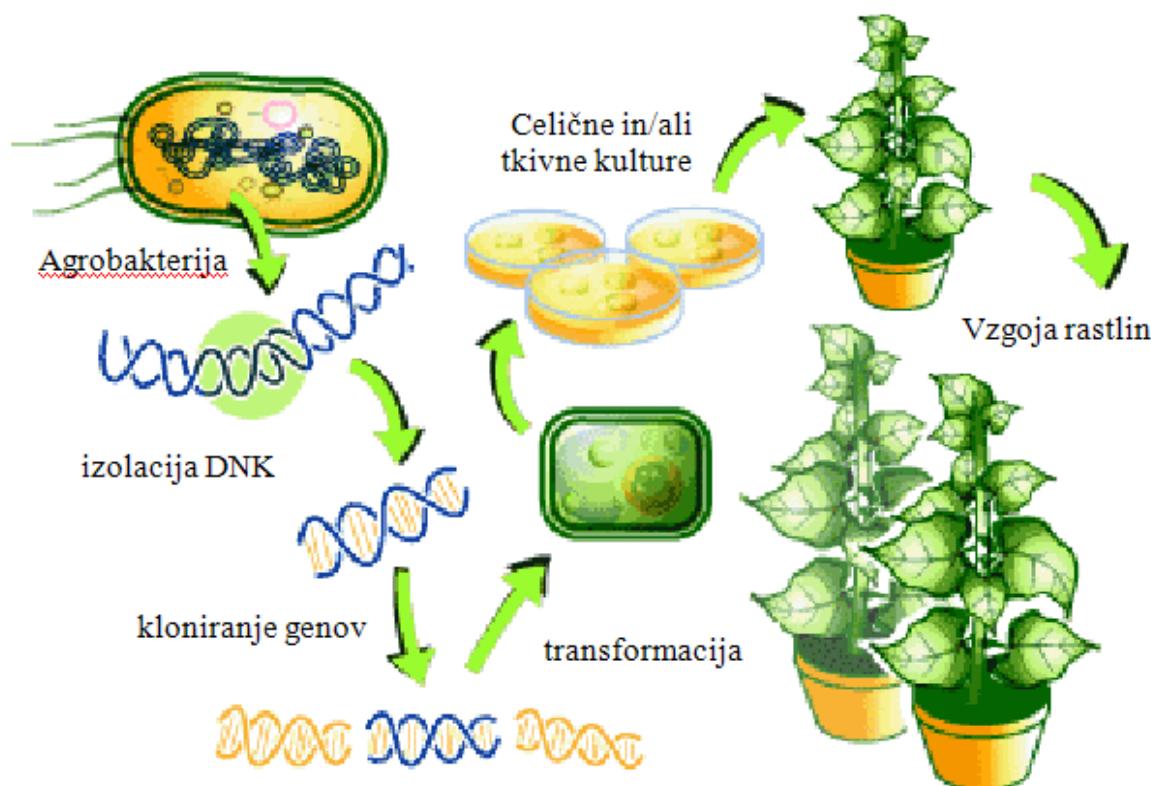
Izražanje 1,3-β-glukanaz razreda I v okuženih celicah pripelje do večje velikosti nekrotičnih poškodb na lokalni ravni, v primeru gostiteljske rastline tobaka. Velikost poškodb je odvisna od narave virusa, genotipa gostitelja in okoljskih dejavnikov, vključno s temperaturo, svetlobo in starostjo listov (Helms in McIntyre, 1962; Matthews, 1981).

Raziskave jasno nakazujejo, da povečano lokalno izražanje 1,3- β -glukanaz razreda I, v celicah, ki vsebujejo virus TMV, vodi v olajšano širjenje virusa med celicami (Beffa in sod., 1996).

Lokalno izražanje 1,3- β -glukanaz razreda I lahko poveča velikost lezij s spodbujanjem pretoka virusa med celicami ali s posrednimi učinki preobčutljivostnega odgovora, ali s kombinacijo obih mehanizmov (Bucher, 2001).

2.4. TRANSFORMACIJA RASTLIN

Genska transformacija rastlin (slika 5) je izraz za postopke s katerimi se vnaša eksogeno DNA nukleotidno zaporedje v genom rastlin. Osnovne metode genskega inženiringa pri bakterijah, so razvili že v 60. letih prejšnjega stoletja. Od sredine sedemdesetih let pa te metode niso več omejene na bakterije, temveč jih lahko uporabimo praktično na vseh živih organizmih (Bohanec, 2004).



Slika 5: Celoten postopek nastanka transgenih rastlin (VIR: <http://www.scq.ubc.ca/transgenic-crops-how-genetics-is-providing-new-ways-to-envision-agriculture/>)

Prednost genskih transformacij pred ostalimi metodami žlahtnjenja rastlin je, da v relativno kratkem času pridobimo željene lastnosti rastlin, poleg tega pa nam omogočajo tudi prenos genov med različnimi organizmi, brez filogenetskih omejitev (Javornik, 2000).

Vnos novih genov v rastlino, večinoma povzroči opazne spremembe pri eni ali več lastnostih rastline (Žel, 1996). Trenutno je največ gensko spremenjenih rastlin odpornih na herbicide. Obstajajo pa tudi rastline odporne proti žuželkam, tolerantne na stres, odporne

proti virusnim boleznim rastlin ter s spremenjenimi prehranskimi lastnostmi, kot so na primer: večja vsebnost nenasičenih maščobnih kislin pri rastlinah za pridelavo olja, spremenjena sestava aminokislin (Žel, 2004; Žel, 2007).

Prvi poskusi genskih transformacij rastlin so uspeli pred več kot dvema desetletjema. Leta 1983 so izvedli prvo transformacijo rastline, kjer so v tobak vnesli bakterijski gen za odpornost na antibiotik, in sicer s posredno metodo s pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Druga uspešna metoda je biolitska, ki se je razširila v prvi polovici devetdesetih let, posebno za transformacijo žit, ker za enokaličnice, metoda z bakterijo *A. tumefaciens* ni bila učinkovita. Večina današnjih sevov, ki se uporablja v laboratoriju za transformacije, pa uspešno okužuje tudi enokaličnice. Za gensko transformacijo rastlin se uporablja še nekatere druge, redkeje uporabljene metode, kot so elektroporacija, vnos s silikonskimi vlakni ipd.

Leta 1986 so izvedli prve poljske poskuse z gensko spremenjeno rastlino, in sicer tobakom (Bohanec, 2004; Javornik 2004). Prve gensko spremenjene rastline uporabljene v industrijske namene, so se pojavile na Kitajskem leta 1992. Tudi prva gensko spremenjena rastlina uporabljena za industrijske namene je bil tobak, odporen proti virusu (Žel, 2007).

Večina gensko spremenjenih rastlin na svetovnem tržišču, je namenjena prehrani in krmi. Najbolj razširjena je gensko spremenjena soja. Več kot polovica vse pridelane soje, je gensko spremenjene. Sledijo ji koruza, bombaž in oljna ogrščica. Nekatere gensko spremenjene rastline, kot so bombaž, tobak in okrasne rastline, pa se gojijo tudi iz drugih razlogov, ne le za prehrano in krmo (Žel, 2007).

2.4.1. Vnos genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*

Posredni oz. indirektni vnos genov z bakterijo *A. tumefaciens* je naravni prenos DNA iz bakterijskega plazmida v rastlinski genom. Znano je, da lahko pri dvokaličnicah, ob poškodbi rastline, na mestu poškodbe nastane rakasta tvorba, ki jo povzroči infekcija z bakterijo *A. tumefaciens*. Bakterija *A. tumefaciens* je patogena talna bakterija, ki okužuje poškodovano rastlinsko tkivo, tako da prenese del dedne informacije iz plazmida v rastlinski genom in povzroči delitev celic ter nastanek tumorja (Žel, 1996).

Odkrili so že seve bakterije *A. tumefaciens* z modificirano virulenco, ki uspešno okužuje tudi nekatere enokaličnice, kot sta na primer riž (Hiei in sod., 1997) in koruza (Galun in Breiman, 1998). Metoda ima prednost pred neposrednim vnosom, ker vnesemo manjše število kopij genov, ki so pogosto tudi manj poškodovani, poleg tega je manj poškodovano tudi rastlinsko tkivo, saj gre za naravni vnos genov (Bohanec, 2004).

Bakterija prisili rastlino v tvorbo celic, ki ji proizvajajo snovi za njeno uporabo. To spremembo povzroči vključitev majhnega dela DNA, imenovanega T-DNA, v genom rastline (Chilton in sod., 1977). Takšen prenos DNA iz bakterije v rastlinski genom je znan tudi pri bakteriji *A. rhizogenes*, ki tvori pospešeno rast koreninskih laskov.

Bakterija *A. tumefaciens* vsebuje Ti-plazmid (tumor- inducirajoči) z geni za virulenco (*vir* geni), sintezo in razgradnjo opinov ter geni za tvorbo rakastih celic (*onc* geni). T-DNA imenujemo del Ti-plazmida z *onc* geni in geni za sintezo opinov (Zupan in sod., 2000). *Onc* geni v bakterijski celici niso aktivni, njihovo izražanje v rastlini, pa povzroči višji nivo endogenih rastlinskih regulatorjev, kar pomeni sintezo avksinov in citokininov (Galun in Breiman, 1998).

Po pritrditvi bakterije na rastlinsko celico, se T- DNA vstavi v rastlinski genom in začnejo se izražati geni, ki so zapisani znotraj T-DNA. Geni za sintezo rastlinskih hormonov stimulirajo celično delitev rastlinskih celic in s tem posledično povzročijo tvorbo tumorja. Bakterija spremeni metabolizem rastlinskih celic, tako, da le te tvorijo opine, ki jih sama

rastlinska celica ne more metabolizirati, jih pa porabi bakterija, kot vir ogljika, dušika in energije (Galun in Breiman, 1998).

Za prenos T-DNA iz bakterijske v rastlinsko celico so potrebni geni *vir*, ki so na plazmidu in *geni chv*, ki so na bakterijskem kromosomu, kajti noben od genov, ki so na T-DNA, ni vključen v lastni transport (Galun in Breiman, 1998). Funkcije *vir* genov so: izrez T-DNA iz Ti-plazmida, prenos preko bakterijske membrane v rastlinsko celično citoplazmo, transport v jedro in integracija v gostiteljski genom (Hellens in sod., 2000).

Naravni transformacijski sistem bakterije *A. tumefaciens*, ki se danes uporablja, ima iz naravne T-DNA odstranjene gene za sintezo opinov in *onc* gene, tako da ostanejo samo mejne sekvene T-DNA. V tem primeru ne pride do tvorbe opinov in rakastih celic, kljub temu pa preostanek T-DNA obdrži sposobnost vključevati se v genom rastline. V območje *onc* genov pa se lahko vključi tuje gene. Take plazmide imenujejo razoroženi plazmidi in ne povzročajo tumorjev (Zambryski in sod., 1983; Žel, 1996).

Obstajata dve osnovni oblici vektorjev:

- Integrirana oz. *cis* vektorska oblika vsebuje T-DNA in regijo *vir* na enem plazmidu.
- Binarna oziroma trans vektorska oblika ima T-DNA in regijo *vir* na dveh ločenih plazmidih.

Najpogosteje uporabljen vektorski sistem je binarni vektor. Prednost tega sistema je, da se lahko binarni plazmid, ki vsebuje želene gene, namnožuje tako v bakteriji *E. coli* (*Escherichia coli*) kot tudi v bakteriji *A. tumefaciens* (Bevan, 1984). Zato lahko z njim enostavneje manipuliramo v bakteriji *E. coli* in ga šele nato konjugiramo v bakterijo *A. tumefaciens*. Bakterija *A. tumefaciens* pa vsebuje še drugi tako imenovani razoroženi Ti-plazmid z *vir* geni (Hellens in sod., 2000).

Ob transformaciji oziroma vnosi genov v rastlinska tkiva in celice se transformira le nizek odstotek celic, v ta namen je potrebno uporabiti posebne selekcijske markerje. Plazmidi vsebujejo takšen selekcijski marker skupaj z genom, ki ga transformiramo v rastlinsko celico. Selekcijski geni bakterijskih plazmidov so večinoma geni za odpornost na določene

antibiotike (kanamicin, higromicin, kloramfenikol). Z vnosom teh genov postanejo rastline odporne na doteden antibiotik, v nasprotnem primeru pa so občutljive in propadejo. Obstajajo tudi drugi selekcijski geni, ki sprožijo odpornost na določene herbicide, na visoke dušikove in aminokislinske nivoje in analoge aminokislin (Bohanec, 2004). Selekcijski geni omogočajo razvojno prednost celicam na gojišču s selekcijskim agensom, na katerem netransformirane celice propadejo.

2.5. REGENERACIJA IN NAMNOŽITEV TRANSFORMIRANIH RASTLIN

Po transformaciji rastlinskih izsečkov, je potrebno transformirane izsečke prestaviti na regeneracijsko gojišče in vzpodbudi rast poganjkov iz transformiranih delov rastlin. Pogosto je tako gojišče hkrati tudi selekcijsko, kajti le v tem primeru na njem zrastejo le transformirani poganjki, v nasprotnem primeru zrastejo vsi (tudi netransformirani) poganjki.

Regeneracija pomeni popolno funkcionalno obnovo nekega poškodovanega tliva. Potek regeneracije iz rastlinskih izsečkov se lahko razdeli v tri faze: iniciacija kalusa, iniciacija poganjkov na kalusu in razvoj poganjkov. Poteka lahko v eni, dveh ali treh stopnjah, glede na to koliko različnih gojišč se uporabi.

Po regeneraciji, ko se pokažejo prvi poganjki, sledi namnožitev transformiranih rastlin. Za razmnoževanje oziroma kloniranje velikega števila rastlin v *in vitro* pogojih, v kratkem času, je najbolj uporabljeni metoda mikropropagacije. To je ena izmed osnovnih tehnik rastlinske biotehnologije, ki predstavlja hitro vegetativno razmnoževanje rastlin in temelji na regeneraciji rastlin, ki jo omogoča totipotentnost rastlinskih celic (Bohanec in sod., 1992). Totipotentnost je sposobnost dediferenciacije in ponovne diferenciacije celic rastlinskega tkiva, saj vsaka rastlinska celica nosi genetsko informacijo za razvoj v celo rastlino. To pomeni, da se lahko že izdiferencirano rastlinsko tkivo, preneseno na ustrezeno gojišče, ob primernih pogojih razvije v novo rastlino (Taiz in Zeiger, 2002).

Kot osnovni razmnoževalni material uporabljajo majhne rastlinske dele, ki jih na posebnih, za to pripravljenih hranih raztopinah oziroma gojiščih, pripravimo do delitve v sterilnih pogojih (Jazbec in sod., 1995). Hitro razmnoževanje rastlin v pogojih tkivne kulture je smiselno za rastline pri katerih je razmnoževanje *in vitro* ekonomsko učinkovitejše (praproti, orhideje) oziroma v primeru eliminacije virusov z mikropropagacijo (krompir, jagode, pelargonije).

Mikropropagacija je edini način razmnoževanja v proizvodnji semenskega krompirja, nekaterih okrasnih rastlin, sadnega drevja in jagodičevja. Kot vsaka metoda ima tudi ta

svoje prednosti in slabosti. Prednosti mikropropagacije so: večja hitrost in število pri pridobivanju potomcev, genska izenačenost, zdrave in bujne rastline, neodvisnost rasti od zunanjih vplivov in shranjevanje dragocenih genotipov (genske banke kultivarjev, divjih vrst in starih sort), lahko jih gojimo neodvisno od sezone. Slabost je predvsem draga oprema laboratorijev ter možne spontane, genetske in epigenetske spremembe.

V praksi je najpogosteje uporabljena metoda gojenja rastlin iz zalistnih brstov. Ta metoda ima v primerjavi z organogenezo in embriogenezo nižjo stopnjo razmnoževanja, vendar pa ima končno višjo stopnjo genetske enotnosti (Ravnikar, 1996).

2.5.1. Rastlinski rastni regulatorji

Rastlinski rastni regulatorji ali drugače rastlinski hormoni, so organske molekule, ki so udeležene pri regulaciji rasti in razvoja rastlin.

Rastlinski rastni regulatorji so v rastlini prisotni v nizkih koncentracijah in ne služijo kot hranila. Sintetizirajo se v določenih delih rastline. Njihov učinek pa se, potem ko se transportirajo do tarčnega tkiva, izraža v drugih tkivih. Delujejo lahko kot stimulatorji ali zaviralci določenih procesov.

Odgovor tarčnega tkiva na prisotnost hormona je odvisen od občutljivosti tarčnega tkiva oziroma od količine razpoložljivih receptorskih molekul na membranah celic v tarčnem tkivu (Taiz in Zeiger, 2002).

Dolgo je veljalo, da je razvoj rastlin reguliran s petimi skupinami hormonov: avksini, citokinini, giberelini, abscizinska kislina in etilen. Kasneje so odkrili še druge hormonom podobne spojine, ki so prav tako rastlinski rastni regulatorji: jasmonati, brasinolidi, salicilna kislina, sistemini in poliamini (Taiz in Zeiger, 2002).

Avksini, citokinini in giberelini pospešujejo rast, med tem ko abscizinska kislina in etilen veljata za zaviralca rasti rastlin. Hormoni, ki se uporabljajo v rastlinskih tkivnih kulturah, na primer pri regeneraciji rastlin morajo biti dozirani v pravih količinah in razmerjih, saj v nasprotnem primeru lahko dosežejo neželene ali celo nasprotne učinke.

2.5.1.1. AVKSINI

Avksini so enostavne organske spojine, lahko so naravnega ali sintetičnega izvora, ki v zelo nizkih koncentracijah, stimulirajo elongacijo koleoptil in stebelnih izsečkov. Sprva so avksinom pripisovali le vpliv na rast rastlin, do danes pa so ugotovili, da opravljajo še mnogo drugih funkcij, predvsem skupaj z drugimi hormoni. Avksini, tako lahko vplivajo na mnoge razvojne procese, kot je indukcija celičnih delitev v kalusu (ob prisotnosti citokininov), pospešena tvorba korenin na prerezanih steblih, indukcija tvorbe etilena, uravnavanje apikalne dominance, diferenciacija cvetov,... Ob povečani koncentraciji avksinov v tkivu se zelo podaljšajo poganjki, med tem ko se upočasni rast korenin v dolžino.

Najpomembnejši med avksini je indol-3-ocetna kislina (IAA). IAA nastaja v asimilacijskih in embrionalnih tkivih. Med naravne avksine prištevajo tudi 4-kloroindolocetno kislino (4-kloroIAA), indolbutirično kislino (IBA) in fenilocetno kislino (PAA). Poleg tega pa obstajajo tudi sintetični avksini, med katerimi so najbolj poznani α -naftalen ocetna kislina (NAA), 2,4-diklorofenoksiocetna kislina (2,4-D) in 2-metil-4-klorofeoksi ocetna kislina (MCPA) (Taiz in Zeiger, 2002).

Avksine se pogosto dodaja v hranilna gojišča. V tkivnih kulturah avksini povzročajo: elongacijo celic, celične delitve, tvorbo korenin, a le v nižjih koncentracijah. Pri višjih koncentracijah zavirajo tvorbo korenin, inhibirajo pa tudi tvorbo adventivnih in aksilarnih poganjkov in povzročajo nastajanje kalusa (Pierik, 1998).

2.5.1.2. CITOKININI

Citokinini so snovi, ki pospešujejo delitev celic. Njihove funkcije so: uravnavajo apikalno dominanco in razvoj stranskih korenin, inducirajo celične delitve v kalusu (skupaj z avksini), zavirajo senescenco listov in pospešujejo rast kličnih listov pri dvokaličnicah. V nekaterih primerih so opazili, da je pri uporabi avksinov brez dodatka citokinina prišlo do podaljševanja celic brez razraščanja tkiva (Taiz in Zeiger, 2002). V nasprotju z avksini in

giberelini, ki večinoma nastajajo v nadzemnih delih, pa sinteza citokinov poteka predvsem v koreninah.

Najpomembnejši citokinini so zeatin, dihidrozeatin, izopentenilzeatin (IPA) ter zeatin ribozid (Salisbury in Ross, 1991).

Citokinine v tkivnih kulturah skupaj z avksini uravnavajo razmerje med rastjo poganjkov in korenin ter zavirajo staranje.

2.5.1.3. GIBERELINI

Giberelini so skupina hormonov, ki vzpodbujujo rast v smislu raztezanja celic. Najdemo jih v vseh višjih rastlinskih vrstah. Proizvajajo jih mladi listi, nezrela semena in celo korenine. Giberelini stimulirajo rast stebla rozetastih in pritlikavih rastlin, uravnavajo potek diferenciacije v kambiju (skupaj z IAA), pospešujejo nastanek plodov in kalitev, ter sodelujejo pri prehodu iz juvenilne v odraslo fazo, vplivajo na indukcijo tvorbe cvetov in sodelujejo pri diferenciaciji cvetnih organov (moških spolnih organov - prašnikov), lahko prekinejo dormanco semen, saj lahko nadomestijo nizke temperature, dolg dan ali rdečo svetlobo in v nekaterih primerih lahko sprožijo tudi partenokarpijo (paradižnik, hruške, kumare) (Taiz in Zeiger, 2002).

Zanimivo je, da tretiranje z giberelini vpliva na rast pritlikavih rastlin, na normalno rastoče rastline, pa ima neznaten vpliv ali pa ga celo nima.

Gibereline se pogosto uporablja pri proizvodnji sadja za podaljševanje plodov in daljšanje pecljev vinskih jagod, pri proizvodnji slada iz ječmena, za povečevanje pridelka sladkornega trsa ter pri indukciji cvetenja za proizvodnjo semena (Taiz in Zeiger, 2002).

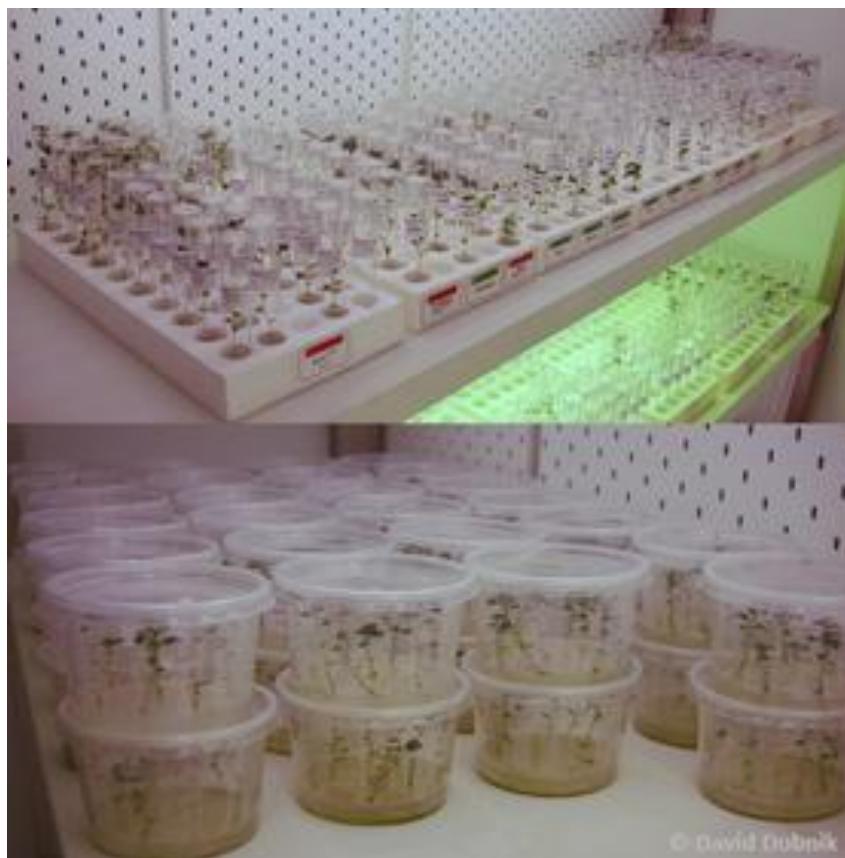
3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Rastlinski material

- Krompir *Solanum tuberosum* L. sorte Désirée,
- Krompir *Solanum tuberosum* L. sorte Sante,
- Krompir *Solanum tuberosum* L. sorte Igor in
- Krompir *Solanum tuberosum* L. sorte Pentland.

Rastline izhajajo iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani in so bile gojene v *in vitro* pogojih, kot nodijska kultura (slika 6).



Slika 6: Rastlinski material, v *in vitro* pogojih v rastni komori. (Avtor: David Dobnik)

3.1.2. Bakterije

Bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Invitrogen), smo uporabili za transformacijo rastlin. Ta sev vsebuje kromosom TiAch5 in razoroženi Ti plazmid pAL4404.

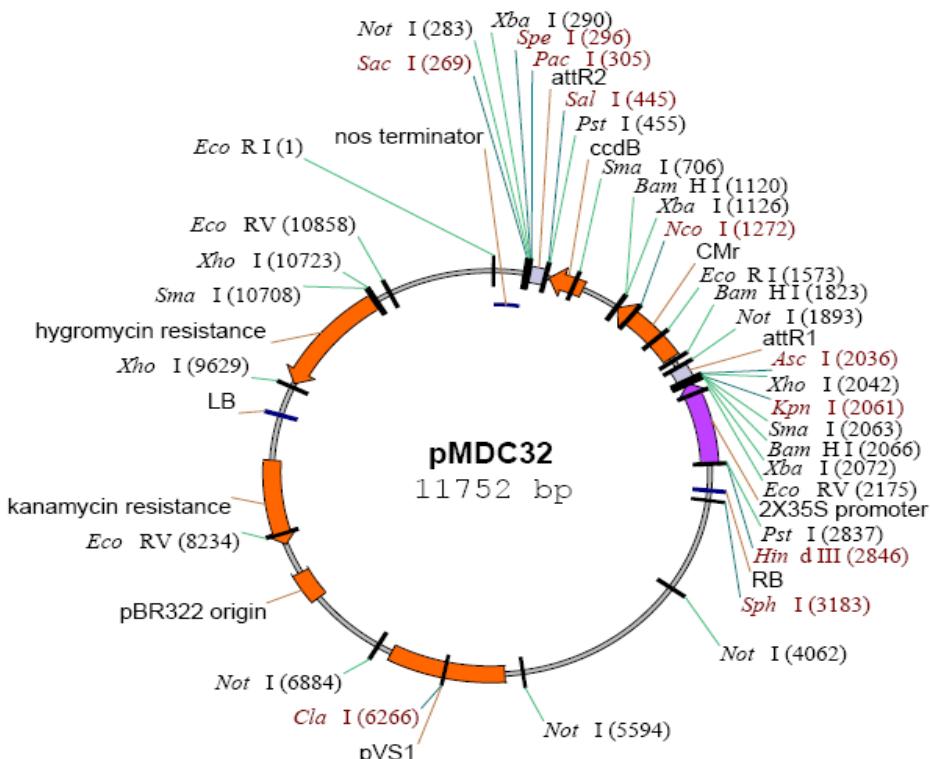
V poskusni transformaciji (transformaciji 1), smo prav tako uporabili bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, vendar drug sev, in sicer GV3101.

3.1.3. Plazmidi

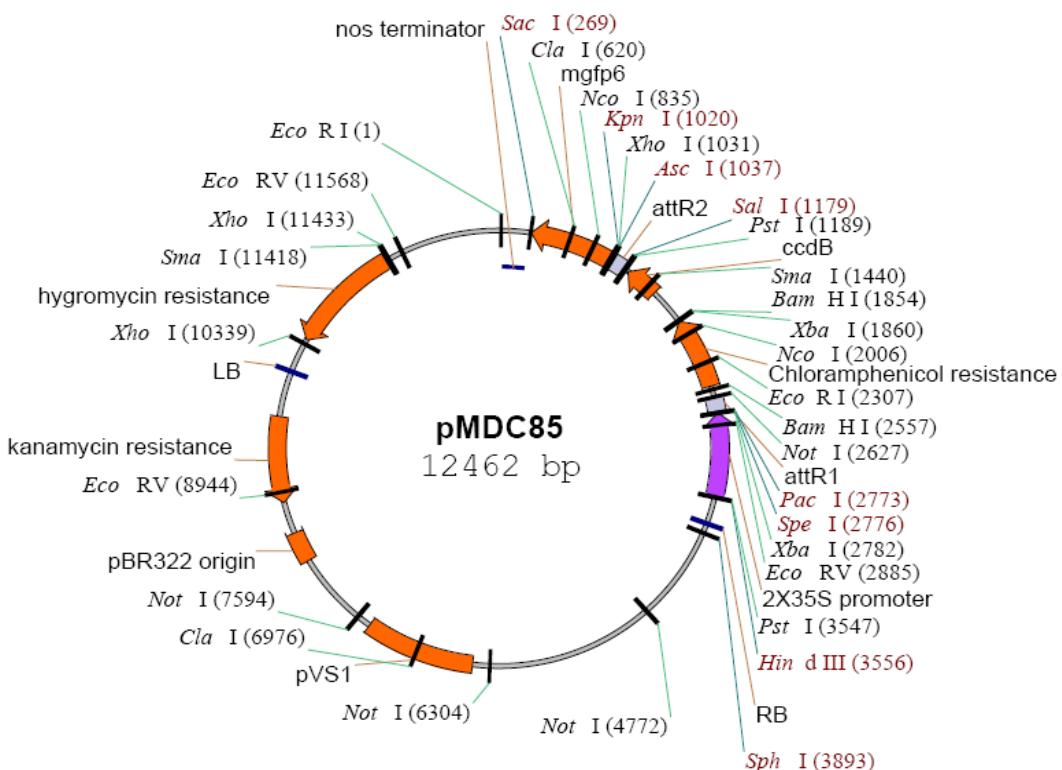
Za naš poskus smo uporabili več plazmidnih vektorjev: pMDC32 (slika 7), pMDC85 (slika 8) in pMDC110 (slika 9). Plazmide so na Nacionalnem inštitutu za biologijo vnesli v bakterije *A. tumefaciens* LBA4404.

V plazmid pMDC32 je bil vnesen gen za 1,3- β -glukanazo razreda III, plazmid pMDC85 je vseboval gen za 1,3- β -glukanazo razreda III v fuziji z zelenim fluorescentnim proteinom (GFP), plazmid pMDC110, pa je vseboval promotor 1,3- β -glukanaze razreda III.

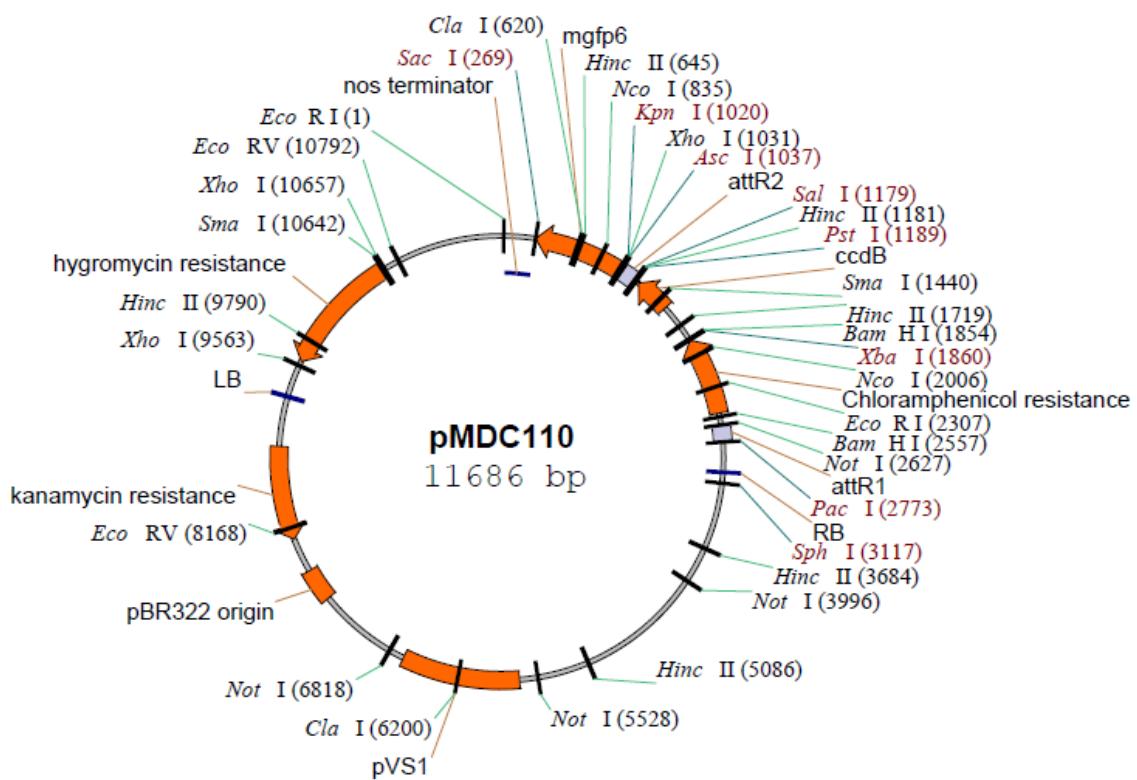
V poskusni transformaciji (transformaciji 1) smo uporabili plazmid pCyt60 za izražanje gena za GFP protein.



Slika 7: Plazmidna karta vektorja pMDC32, v katerega je bil vnesen gen za 1,3- β -glukanazo razreda III.



Slika 8: Plazmidna karta vektorja pMDC85, v katerega je bil vnesen gen za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP.



Slika 9: Plazmidna karta vektorja pMDC 110, v katerega je bil vnesen promotor 1,3- β -glukanaze razreda III.

3.1.4. Gojišča

3.1.4.1. BAKTERIJSKA GOJIŠČA

Tabela 2: Sestava uporabljenih bakterijskih gojišč.

Gojišče	Sestavine	Proizvajalec	Končna koncentracija	pH vrednost
LB	tripton	Bacto	10 g/L	7
	kvasni ekstrakt	Oxoid	5 g/L	
	NaCl	Merck	5 g/L	
YEB	kvasni ekstrakt	Oxoid	1 g/L	7,5
	goveji ekstrakt	Difco	5 g/L	
	pepton	BD	5 g/L	
	saharoza	Kemika	5 g/L	
	MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck	0,5 g/L	
YM	kvasni ekstrakt	Oxoid	0,4 g/L	7
	manitol	Kemika	10 g/L	
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	Merck	0,2 g/L	
	K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	Kemika	0,5 g/L	
	NaCl	Merck	0,1 g/L	
	agar	Bacto	15 g/L	

3.1.4.2. RASTLINSKA GOJIŠČA

Tabela 3: Sestava MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962).

Osnovna raztopina (OR)	Sestavine	Proizvajalec	Končna koncentracija		pH vrednost
OR1	NH ₄ NO ₃	Sigma	1650 mg/L	20,60 mM	5,8
	KNO ₃	Merck	1900 mg/L	18,80 mM	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Merck	440 mg/L	2,99 mM	
	KH ₂ PO ₄	Kemika	170 mg/L	1,25 mM	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck	370 mg/L	1,50 mM	
	mioinozitol	Sigma	100 mg/ L	555,00 µM	
OR2	H ₃ BO ₃	Merck	1,9 mg/L	100,00 µM	5,8
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	Sigma	22,3 mg/L	100,00 µM	
OR3	CoCl ₂ · 6H ₂ O	Merck	0,025 mg/L	0,11 µM	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	Merck	0,025 mg/L	0,10 µM	
	KI	Merck	0,83 mg/L	5,00 µM	
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Sigma	0,25 mg/L	0,10 µM	
OR4	FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma	27,8 mg/L	29,29 µM	5,8
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	Kemika	37,3 mg/L	163,00 µM	
	glicin	Merck	2 mg/L	26,60 µM	
OR5	nikotinska kislina	Kemika	0,5 mg/L	4,06 µM	
	piridoksin - HCl	Sigma	0,5 mg/L	2,43 µM	
	tiamin - HCl	Caldiochem	0,5 mg/L	1,1 µM	
gojišče MS 30	saharoza	Kemika	30 g/L		
gojišče MS 20	saharoza	Kemika	20 g/L		
Trdno gojišče	agar	Bacto	8 g/L		

Tabela 4: Sestava uporabljenih rastlinskih gojišč.

Gojišče	Sestavine	Proizvajalec	Založna konc.	Končna konc.	pH vrednost
R3B	MS gojišče saharoza agar NAA BAP	Kemika Bacto Sigma Sigma		30 g/L 8 g/L 180 mg/L 220 mg/L	5,8
PACM	MS gojišče saharoza kazein hidrolizat 2,4-D kinetin	Kemika Kemika Sigma Sigma		30 g/L 2 g/L 220 mg/L 220 mg/L	6,5
Zcvk	MS gojišče saharoza agar makrocef zeatin ribozid vankomicin kanamicin	Kemika Bacto Krka Sigma Sigma Duchefa		20 g/L 8 g/L 250 mg/mL 220 mg/L 100 mg/mL 10 mg/mL	5,8
Za Zcvk I	kanamicin	Duchefa	10 mg/mL	20 mg/L	
Zcvh	MS gojišče saharoza agar makrocef zeatin ribozid vankomicin higromicin	Kemika Bacto Krka Sigma Sigma Invivo Gen		20 g/L 8 g/L 250 mg/mL 220 mg/L 100 mg/mL 100 mg/mL	5,8
Za Zcvh I(20)*	higromicin	Invivo Gen	100 mg/mL	2 mg/L	
Za Zcvh I(40)*	higromicin	Invivo Gen	100 mg/mL	4 mg/L	

*V primeru Igorja, ki je zelo občutljiv na antibiotike, smo uporabili nižjo koncentracijo kanamicina (glej Zcvk I) in dve različni nižji koncentraciji higromicina (glej Zcvh I (20) in Zcvh I (40)).

3.1.5. Rastni pogoji

Rastna komora za tkivne kulture (»*in vitro*« rastline)

- Temperatura: 19 ± 1 °C (tema) in 21 ± 1 °C (svetloba)
- Fotoperioda: 16 ur svetlobe / 8 ur teme (Osram L58 W/77)
- Relativna zračna vlaga $94 \pm 2\%$,

3.2. METODE

3.2.1. Priprava gojišč

Postopek priprave MS gojišča:

- V posodo za kuhanje smo z merilnim valjem odmerili želeno količino destilirane vode
- Na stekleni palčki smo označili, do kje sega nivo vode
- Del vode smo nato odlili iz posode nazaj v merilni valj
- V posodo z destilirano vodo smo dodali osnovne raztopine: OR1, OR2, OR3, OR4 in OR5. Osnovne raztopine so mešanice založnih raztopin in nam olajšajo delo, saj nam ni potrebno vedno znova tehtati zelo majhnih količin snovi.
- V posodo smo nato odtehtali še potrebno količino saharoze in prilili destilirano vodo do oznake na palčki.
- pH vrednost smo umerili na 5,8.
- V primeru ko smo gojišče razlivali v petrijeve plošče ali posebne posodice za gojenje rastlin, smo odtehtali primerno količino agarja v steklenice, dolili želeno količino raztopine in avtoklavirali, po avtoklaviranju pa smo gojišče razlili v sterilne petrijeve plošče ali posodice. Razlivali smo v sterilnih pogojih, v brezprašni komori.
- V primeru, da smo razlivali gojišče v epruvete, smo gojišče segreli na gorilniku, ko je zavrelo, smo vmešali agar, ga dobro raztopili in nato s pomočjo dispenzorja v vsako epruveto nalili približno 10 ml gojišča. Epruvete smo nato zaprli s pokrovčki, zavili v papir in avtoklavirali.

- Gojišča smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C in 103,4 kPa.
- Če smo v gojišče dodali antibiotike ali hormone, smo po avtoklaviranju gojišče ohladili na približno 50 °C in dodali ustrezeno količino sterilnih antibiotikov ali hormonov. Še toplo gojišče smo razdelili v sterilne petrijeve plošče.

3.2.2. Namnoževanje rastlin

Rastlinski material smo razrezali na izsečke v brezprašni komori, v sterilnih pogojih. Rastlino smo s pinceto vzeli iz epruvete in s skalpelom izrezali nodje iz krepkejšega dela rastline. Osem nodjev smo prenesli skupaj v eno posodico s hraniščem MS30. Po transformaciji smo transformirane pogananke prestavili vsakega v svojo epruveto.

Rastline krompirja smo gojili približno 4 tedne v rastni komori. Čas gojenja in hitrost rasti, se je tekom leta močno spremenjal, tako da so včasih rastline potrebovale več časa, da so dosegle željeno velikost.

3.2.3. Transformacija

Izvedli smo tri sklope transformacij. Prvo transformacijo smo izvedli poizkusno, da smo ugotovili uspešnost metode. Drugo transformacijo smo izvedli s sorto Désirée. Vzporedno z drugo transformacijo smo izvedli tudi poizkusno transformacijo s sorto Igor, ki je izredno občutljiva sorta in smo poskušali ugotoviti, katero izmed gojišč je optimalnejše. Pri tretji transformaciji pa smo transformirali sorti Igor in Sante.

Kot osnovo za transformacijo smo uporabili členek Visser in sod. (1989).

Tabela 5: Poskusi treh transformacij, z uporabljenimi sortami krompirja, plazmidi in geni

<i>Transformacija</i>	<i>Transformirane sorte krompirja</i>	<i>Vstavljeni plazmid</i>	<i>Vstavljeni gen</i>
1	Pentland	pCyt60	GFP
	Désirée		
	Igor		
2	Désirée	pMDC32	gen za 1,3-β-glukanazo razreda III
		pMDC110	promotor 1,3-β-glukanaze razreda III v fuziji z GFP
		pMDC85	gen za 1,3-β-glukanazo razreda III v fuziji z GFP
3	Igor	pMDC110	promotor 1,3-β-glukanaze razreda III v fuziji z GFP
	Sante	pMDC32	gen za 1,3-β-glukanazo razreda III

POTEK TRANSFORMACIJE (slika 12):

Priprava bakterijske kulture:

Z ezo smo prenesli kolonijo bakterij *A. tumefaciens* z vnesenimi plazmidi v LB gojišče s selekcijskim antibiotikom (higromicin oziroma kanamicin) na stresalniku pri 30 °C in pustili rasti v čez noč. Če bi čez noč zrasla pregosta, bi jo bilo potrebno precepiti. V našem primeru pa to ni bilo potrebno.

Priprava gojišč za transformacijo: PACM, R3B in MS20 (MS, ki vsebuje le 2% (20 g/l) saharoze) ter sterilne filter papirje za petrijevo ploščo.

Dan pred transformacijo smo pripravili rastlinske izsečke za transformacijo:

Internodije rastlin krompirja (gojene *in vitro* iz nodijske kulture) smo v sterilnih pogojih narezali na 2–5 mm dolge izsečke. Pri tem je bilo potrebno paziti, da se odstrani vse zalistne brste.

Narezane izsečke smo, kakor hitro je mogoče, prestavili na petrijeve plošče z R3B gojiščem (vsebuje NAA in BAP), na katere smo predhodno položili tudi 2 sterilna filter papirja, ki smo jih navlažili s PACM gojiščem, ki vsebuje 2,4-D in kinetin. Uporabili smo približno 2 ml PACM gojišča, oziroma toliko, da sta bila filter papirja dobro navlažena, a ne preveč (izsečki ne smejo plavati na njem).

dodatno smo pripravili še petrijevki za kontroli, v kateri smo dodali le en sterilni listič filter papirja.

V vsako petrijevo ploščo smo naložili približno 100 izsečkov, v kontrolni petrijevki smo položili v vsako po 20 (kontrolnih) izsečkov.

DAN 0

Bakterije na stresalniku, so bile pripravljene za transformacijo. Kulturo smo pred transformacijo centrifugirati 10 min pri 2500 obr./min. oziroma rpm. Po centrifugiranju, smo gojišče odlili in peletu dodali 1,5X več LB gojišča kot je bil začetni volumen (to pomeni 75 ml). Uporabili smo LB gojišče brez dodanih antibiotikov. Suspenzijo smo prelili v petrijeve plošče in tako je bila pripravljena za sam postopek transformacije.

Transformacija

Izsečke smo stresli iz zgornjega filter papirja v raztopino bakterijske kulture. Namakati smo jih pustili med 5 in 10 minut. Po namakanju, smo izsečke in raztopino precedili, izsečke iz cedila prestavili na sterilni filter papir, kjer smo jih rahlo osušili in nato prestavili nazaj v iste petrijeve plošče z gojiščem R3B. Pazili smo, da smo izsečke pri sušenju na filter papirju dovolj hitro prestavili nazaj na gojišče. Po ponovni napolnitvi petrijevih plošč, smo jih oblepili s parafilmom.

Izsečkov iz kontrolnih petrijevk nismo namakali v bakterijski kulturi, zato smo jih pustili v rastni komori.

DAN 2 = Prestavitev izsečkov na selekcijsko gojišče (slika 10 in 11)

Izsečke smo prestavili na selekcijsko gojišče s kanamicinom in higromicinom, odvisno od konstrukta in selekcijskega gena, ki ga vsebuje ta konstrukt.

Prestavljanje izsečkov smo opravili v brezprašni komori za delo z bakterijskimi kulturami.

Na vsako petrijevo ploščo s selekcijskim gojiščem smo položili 20 izsečkov. Poleg tega pa smo pripravili tudi tri kontrolne plošče, ki so prav tako vsebovale vsaka po 20 izsečkov:

- K1: netransformirani izsečki na gojišču brez selekcije (Zcv)
- K2: transformirani izsečki na gojišču brez selekcije (Zcv)
- K3: netransformirani izsečki na gojišču s selekcijo (Zcvk ali Zcvh)

Pri prestavljanju izsečkov je potrebno paziti, da se najprej prestavi izsečke, ki služijo kot kontrola in niso prišli v stik z bakterijami, in šele nato se prestavi vse ostale. S tem lahko preprečimo okužbo s transformacijskimi bakterijami, ki bi jo lahko prenesli na kontrolne netransformirane izsečke.

DAN 16

Po 14 dneh je potrebno izsečke prestaviti na sveže selekcijsko gojišče.

DAN 37

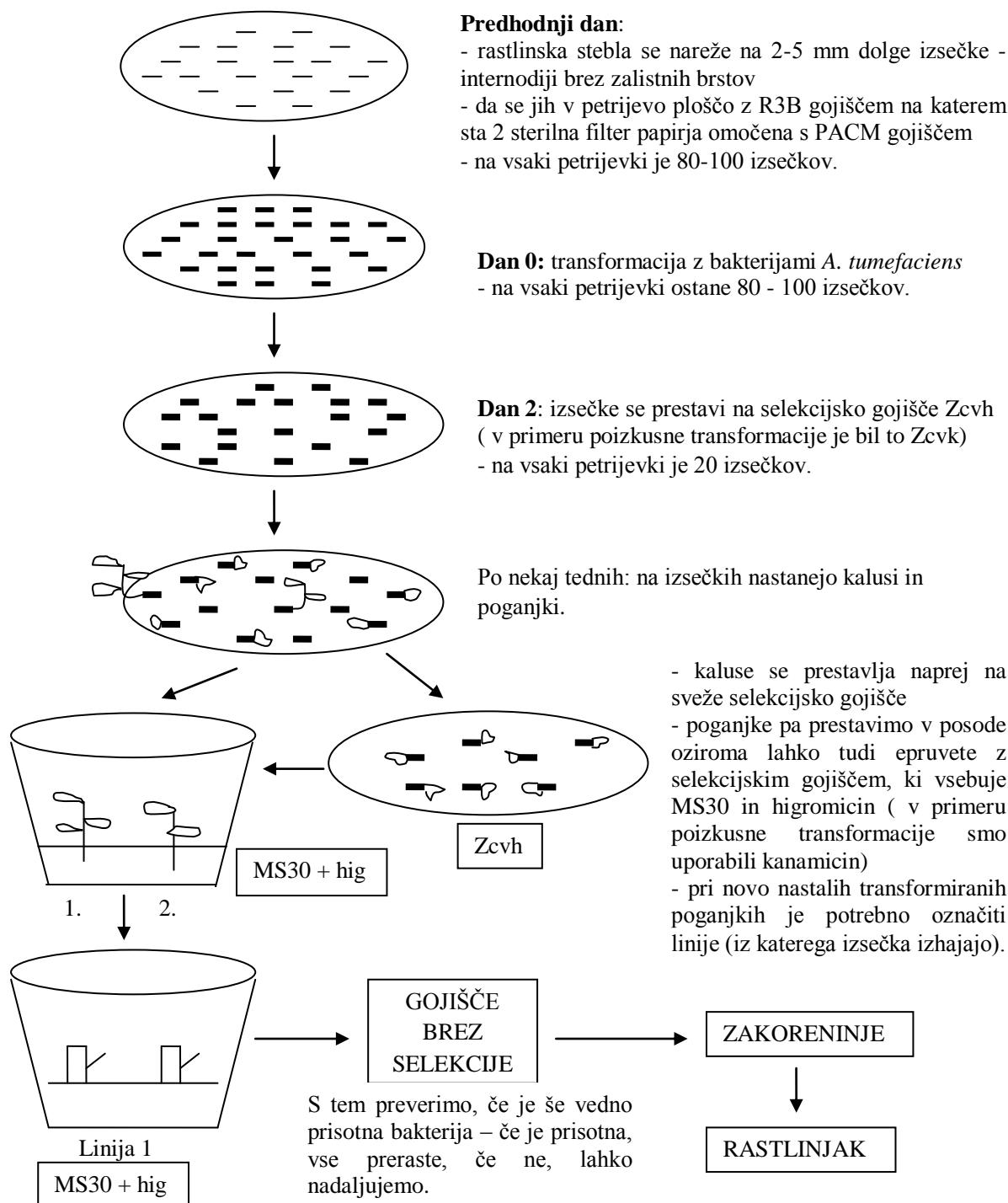
Nadaljnje prestavljanje izsečkov na sveže gojišče se nato opravi vsakih 21 dni. Ta postopek smo ponavljali, dokler niso bile transformirane rastline primerne za ločitev od kalusa (poganjki morajo biti dovolj veliki, da jih lahko odrežemo in prestavimo v posodo ali epruveto – zadostno velikost prestavlja že okrog centimeter velik poganjek) - smo prestavili na MS 30 gojišče s selekcijo.



Slika 10: Prestavljanje izsečkov v brezprašni komori za delo z bakterijskimi kulturami.



Slika 11: Orodje, ki ga potrebujemo za sterilno prestavljanje izsečkov. Gorilnik, ki služi za sterilizacijo pincete, s katero izsečke prestavimo, ter etanol v epruveti, v katerega namočimo pincete preden jo ožgemo.



Slika 12: Shema poteka transformacije

3.2.3.1. TRANSFORMACIJA 1: 29.8.2008

Transformacija 1 je poskusna transformacija, ki smo jo opravili, da preverimo ali zgoraj opisani transformacijski postopek deluje oziroma ali je učinkovit.

V poskusni transformaciji smo uporabili bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* sev GV3101, ki je vsebovala plazmid pCyt60. Celoten postopek smo opravili enako, kot je opisano v poglavju 3.2.3. Za selekcijski antibiotik smo uporabili kanamicin. Transformirali smo rastline krompirja Désirée, Igor in Pentland. Le v tej prvi poizkusni seriji, smo kot selekcijski antibiotik uporabili kanamicin, v ostalih pa higromicin.

3.2.3.2. TRANSFORMACIJA 2: 5.12.2008

Za transformacijo 2, smo uporabili rastline krompirja (vzgojene *in vitro* iz nodijske kulture) sorte Désirée.

Serto Désirée smo transformirali po istem postopku, kot je opisan v poglavju 3.2.3. V sorto Désirée smo vstavili gen za 1,3-β-glukanazo razreda III, promotor 1,3-β-glukanaze razreda III, ter gen za 1,3-β-glukanazo razreda III v fuziji z GFP.

3.2.3.3. TRANSFORMACIJA 3: 21.1.2009

Rastline krompirja (gojene *in vitro* iz nodijske kulture) sort Sante in Igor smo transformirali, po istem postopku kot je opisano v poglavju 3.2.3. Vstavili smo gene za 1,3-β-glukanazo razreda III v sorto Sante, ter promotor 1,3-β-glukanaze razreda III v sorto Igor.

3.2.4. Gojenje (transformiranih) rastlin

Ko so poganjki na gojišču v petrijevih ploščah dosegli velikost vsaj 1 cm ali več, smo jih prestavili v večje posode oziroma v epruvete, ki so vsebovale MS30 gojišče ter selekcijski antibiotik. V našem primeru sta bila selekcijska antibiotika kanamicin in v nekaterih primerih tudi higromicin.

Prestavitev izsečkov smo opravili v brezprašni komori v sterilnih pogojih. S skalpelom smo odrezali poganjek in ga prestavili v novo gojišče.

Nato smo počakali 4 - 6 tednov, da je poganjek zrasel do določene velikosti (slika 13) in ga nato namnožili.



Slika 13: Transformirane rastline v posodi za gojenje

Ob namnoževanju, smo nekaj nodijev prestavili tudi na gojišče za koreninjenje. Za koreninjenje smo uporabili gojišče MS30, ki smo ga razlili v petrijeve plošče. Nodiji so po 10 - 14 dneh imeli razvitih že dovolj korenin, zato smo jih presadili v zemljo, ter prestavili v rastlinjak.

Po približno 1 mesecu smo lahko rastlinam odvzeli material za analizo DNA in RNA.

3.2.5. Testiranje potencialno transgenih rastlin

3.2.5.1. PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

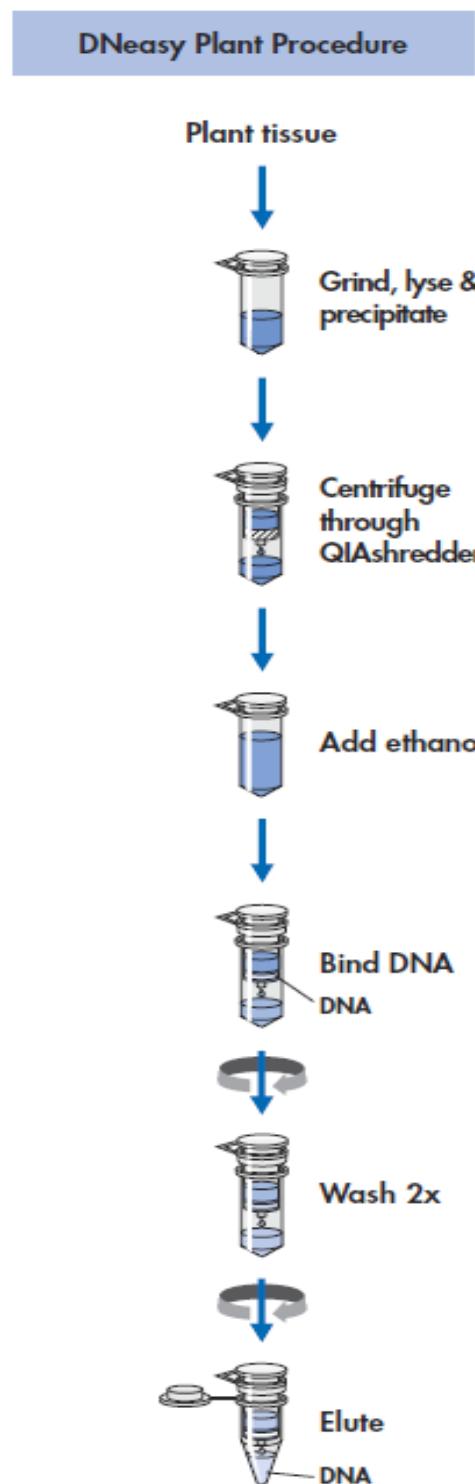
Rastlinski material za analizo DNA potencialno transgenih rastlin, smo pridobili iz ukoreninjenih rastlin, ki so bile približno en mesec v zemlji in v rastlinjaku.

- Rastlini smo odtrgali list in sicer drugi polno razviti list.
- List smo položili v 2 ml epruveto.
- Poleg rastlinskega materiala smo v epruveto dodali tudi kroglico za homogenizacijo
- Epruveto smo nato zamrznili v tekočem dušiku in vzorec shranili na -80 °C.

3.2.5.2. IZOLACIJA DNA IZ RASTLINSKEGA TKIVA

Postopke izolacije DNA iz rastlinskega tkiva (slika 14) so izvedli zaposleni na Nacionalnem inštitutu za biologijo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

DNA so izolirali iz listov krompirja s pomočjo DNeasy Plant Mini Kit, proizvajalca Quiagen. Postopek so izvedli natančno po navodilih proizvajalca.



Slika 14: Shema postopka za izolacijo DNA z DNeasy Plant Mini Kit (VIR:
http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1015107HBDNY_0800WW.pdf)

3.2.5.3. DOLOČANJE PRISOTNOSTI 35S CaMV PROMOTORJA

Postopek so izvedli zaposleni na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo. Uporabili so metodo za določanje 35S CaMV pomotorja, za potrditev transformiranih rastlin (Alary in sod., 2002).

4. REZULTATI

4.1. TRANSFORMACIJA IN REGENERACIJA RASTLIN KROMPIRJA

Pri transformiranih izsečkih so se prvi kalusi pri transformaciji 1 pojavili po približno enem mesecu. Na slikah 16, 17 in 18, so prikazani poganjki v različnih fazah tvorbe kalusov. Nekaj isečkov pa je propadlo (slika 15).

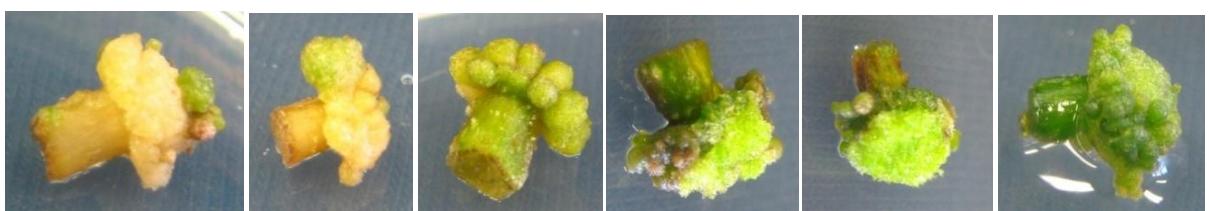
Prvi poganjki, so se pojavili po približno 6 tednih pri transformaciji 1, medtem ko so se pri transformaciji 2 in 3 pojavili šele po dveh mesecih, v nekaterih primerih pa še mnogo kasneje. Slike 19, 20 in 21 prikazujejo izsečke s poganjki. Na sliki 19 so prikazani lepi, vitalni primerki, medtem ko so na slikah 20 in 21 prikazani poganjki, ki so nastali kasneje in so bili v nekoliko manjši in slabše razviti.



Slika 15: Propadel izseček



Slika 16: Izsečki, različnih sort krompirja, v fazi tvorbe prvih kalusov.



Slika 17: Izsečki, različnih sort krompirja, v fazi tvorbe kalusa, ko imajo značilno obliko drevesa.



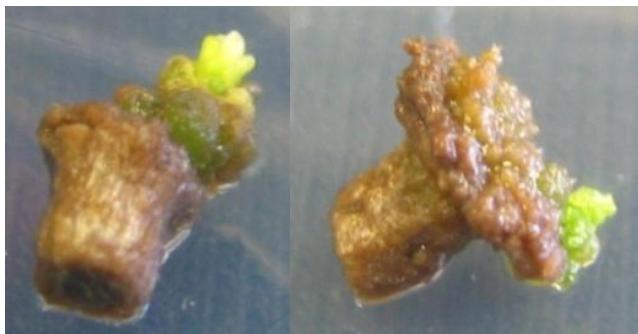
Slika 18: Izsečki, v fazi tvorbe kalusa.



Slika 19 : Prvi, lepi poganjki.



Slika 20: Kasnejši, slabši poganjki, za katere nismo popolnoma prepričani, če so transformirani.



Slika 21: Izsečki Igorja, ki kljub slabem stanju, kažejo znake kalusiranja oziroma v prvem primeru celo tvorbe poganjka.

4.1.1. Kontrole

Na slikah 22, 23 in 24, so prikazane kontrole za vse tri sorte krompirja, ki smo jih transformirali. Vse kontrole so v skladu s pričakovanji. Na sliki 22 je prikazana kontrola sorte Désirée, na sliki 23 kontrola sorte Sante, ki kaže nekoliko slabšo rast v primerjavi z sorto Désirée. Na sliki 24 pa je kontrola sorte Igor, pri kateri se opazi precej počasnejša rast v primerjavi s kontrolami Désirée -ja in tudi Santeja, kar je v skladu z pričakovanji, saj je sorta Igor zelo občutljiva in veliko bolj zahtevna sorta, ki potrebuje specifične pogoje za rast.



Slika 22: Kontrole sorte Désirée. Sledijo si po vrstnem redu K1 (netransformirani izsečki in gojišče brez selekcije), K2 (transformirani izsečki in gojišče brez selekcije) in K3 (netransformirani izsečki in gojišče s selekcijo). Vidimo da sta prvi dve kontroli pozitivni, kot je potrebno in da je tretja negativna, kar nam pove, da je poizkus potekal pravilno.



Slika 23: Kontrole sorte Sante. Sledijo si po vrstnem redu K1, K2 in K3. Pri prvih dveh kontrolah so vidni znaki poganjkov, a so bili poganjki nekoliko slabši in manjši. Tretja kontrola nima poganjkov, a izsečki še niso čisto odmrli, kar pa se je zgodilo šele čez nekaj tednov.



Slika 24: Kontrole sorte Igor. Sledijo si po vrstnem redu K1, K2 in K3. Prvi kontroli kažeta znake kalusiranja in tvorbe poganjkov, medtem ko so izsečki iz tretje kontrole po nekaj tednih popolnoma porjaveli. V primerjavi s kontrolami Désirée in tudi Sante, lahko opazimo, da je Igor mnogo bolj zahtevna sorta, ki potrebuje dobro definirane pogoje za rast in razvoj.

4.1.2. Transformacija 1: 29.8.2008

Transformacija 1, je bila le poskusna transformacija, s katero smo želeli preveriti v poglavju 3.2.3. opisan postopek transformacije.

Tabele 6, 7 in 8 prikazujejo rezultate poskusne transformacije, ki smo jo izvedli z agrobakterijo *Agrobacterium tumefaciens* sev GV3101, ki je vsebovala plazmid pCyt60. Za selekcijski antibiotik smo uporabili kanamicin. V različne sorte krompirja (Désirée, Igor in Pentland) smo vstavili gen za GFP protein.

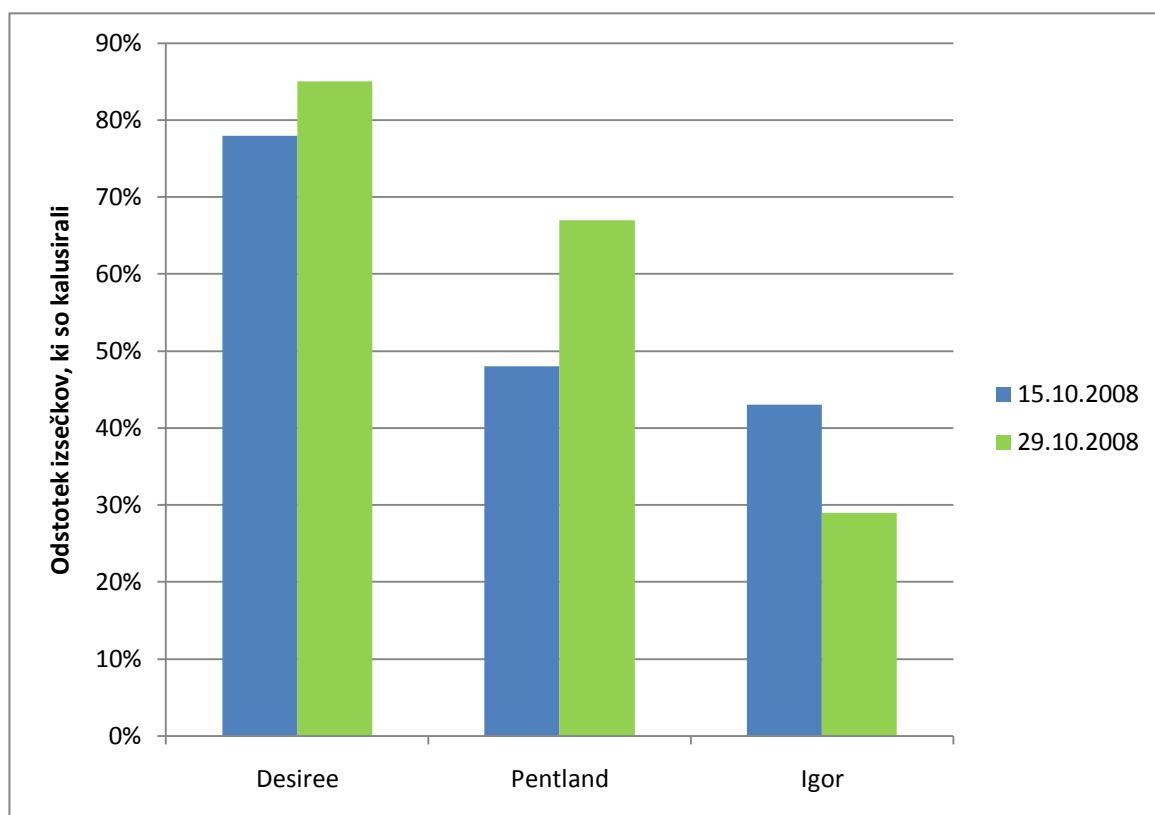
Tabela 6: Število transformiranih, kalusiranih izsečkov in izsečkov s poganjki po Transformaciji 1, sort Désirée, Igor, Pentland in Sante.

Datum oz. število dni po transformaciji	Sorta krompirja	Skupno št. vseh transformiranih izsečkov	Št. kalusiranih izsečkov	Št. izsečkov s poganjki
15.10.2008 47 dni	Désirée	27	21	6
	Igor	7	3	0
	Pentland	325	156	16
23.10.2008 55 dni	Désirée	27	22	17
	Igor	7	2	0
	Pentland	325	200	17
29.10.2008 61 dni	Désirée	27	23	17
	Igor	7	2	0
	Pentland	325	217	53

Tabela 7: Odstotek (število) izsečkov, ki so kalusirali sort Désirée, Igor in Pentland.

SORTA	Datum oziroma število dni po transformaciji	
	15.10.2008 = 47dni	29.10.2008 = 61 dni
Désirée	78% (21 od 27)	85% (23 od 27)
Pentland	48% (156 od 325)	67% (217 od 325)
Igor	43% (3 od 7)	29% (2 od 7)

Slika 25 prikazuje odstotek izsečkov, ki so kalusirali 42 dni po transformaciji in 56 dni po transformaciji. Pri sortah Désirée in Pentland se je število kalusov povečevalo, medtem ko je pri sorti Igor eden izmed kalusov v tem času propadel.

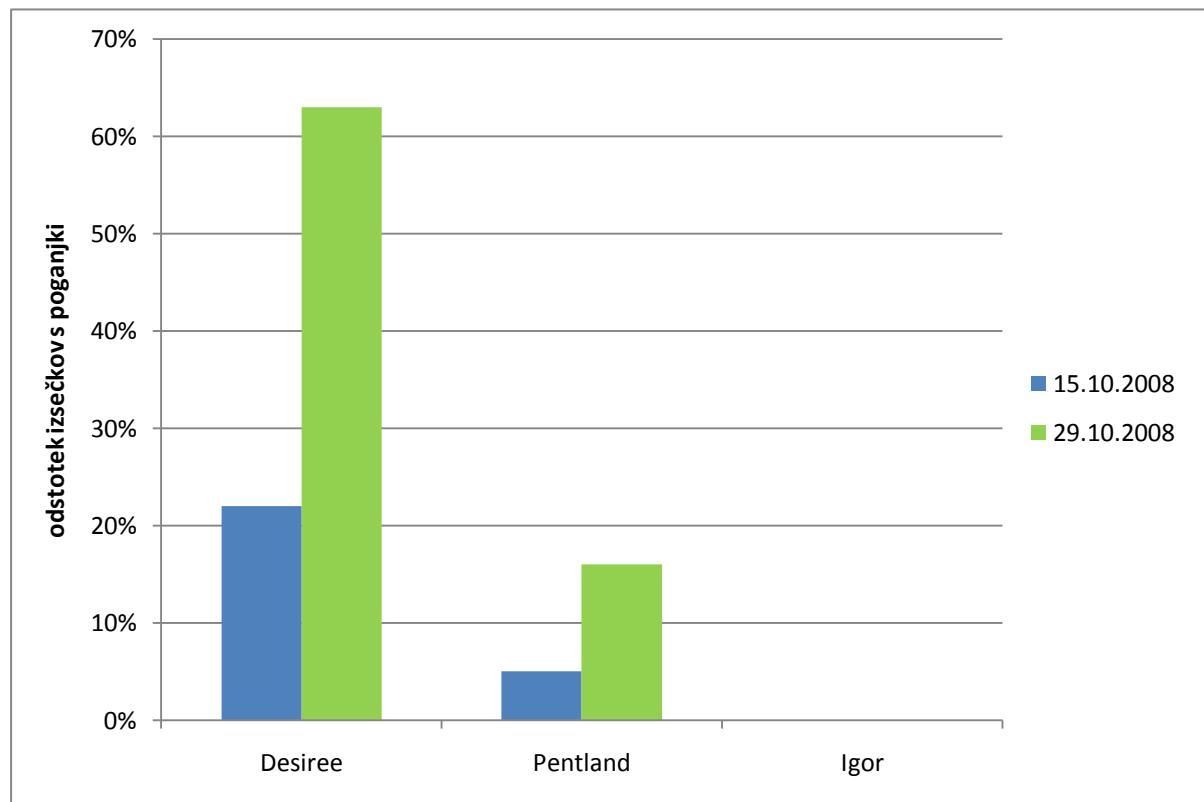


Slika 25: Kalusiranje izsečkov, po poskusni transformaciji, prikazano v odstotkih. V modri barvi je odstotek kalusiranih izsečkov 42 dni po transformaciji, v zeleni pa 56 dni po transformaciji.

Tabela 8: Odstotek (število) izsečkov s poganjki sort Désirée, Igor in Pentland.

SORTA	Datum oziroma število dni po transformaciji	
	15.10.2008 = 47 dni	29.10.2008 = 61 dni
Désirée	22% (6 od 27)	63% (17 od 27)
Pentland	5% (16 od 325)	16% (53 od 325)
Igor	0%	0%

Uspešnost transformacije 1 je prikazana na sliki 26 (odstotek transformiranih izsečkov, iz katerih so se razvili poganjki). Najuspešnejša je bila transformacija sorte Désirée, saj je po 56 dneh, pognalo poganjke 63% vseh transformiranih izsečkov. Pri sorti Pentland je bila transformacija manj uspešna 16%, medtem ko po 56 dneh, pri sorti Igor nismo dobili niti enega poganjka. Vzrok za tako slab rezultat transformacije sorte Igor je lahko v zelo majhnem številu transformiranih izsečkov, ter verjetno v neprimerenem postopku za to sorto.



Slika 26: V odstotkih prikazana tvorba poganjkov pri transformiranih izsečki krompirja. Modra barva prikazuje odstotek transformiranih izsečkov, na katerih so se 42 dni po transformaciji razvili poganjki. Zelena barva pa prikazuje odstotek izsečkov, na katerih so se razvili poganjki 56 dni po transformaciji.

4.1.3. Transformacija 2: 5.12.2008

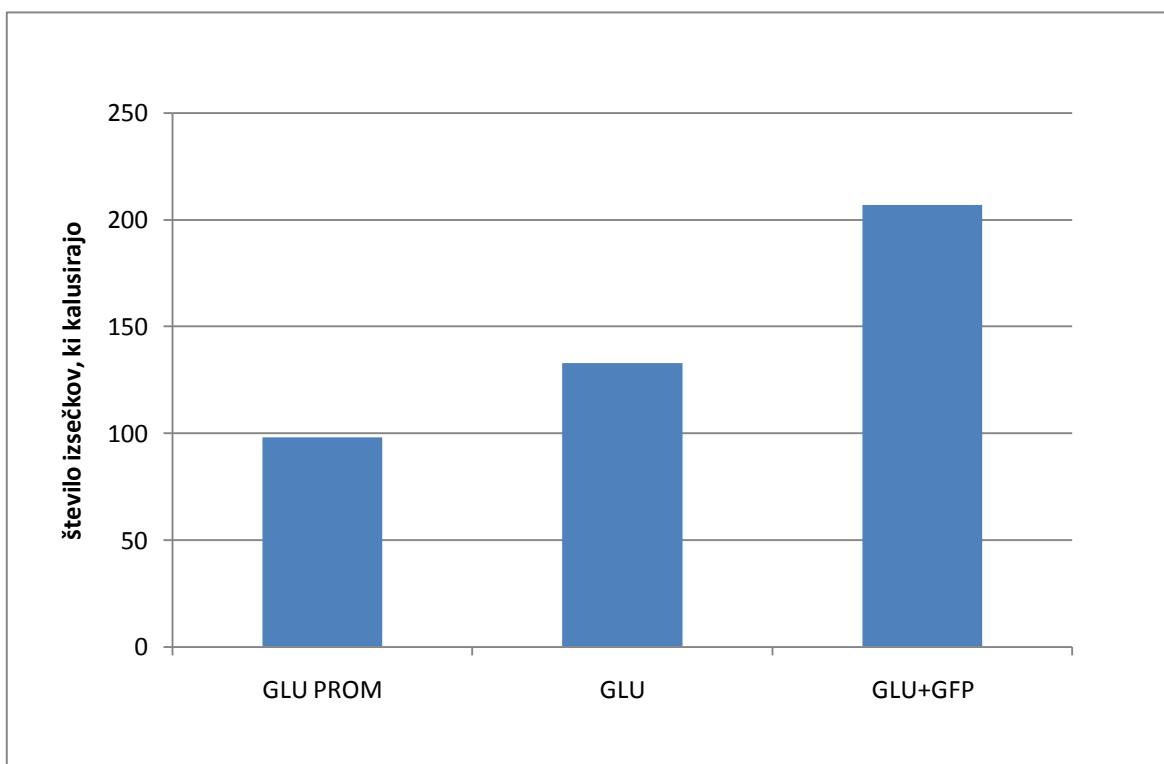
Transformacijo 2 smo izvedli na krompirju sorte Désirée. Za transformacijo smo uporabili bakterijo *A. tumefaciens* sev LBA4404 s tremi različnimi plazmidnimi vektorji: pMDC32 (slika 7), pMDC85 (slika 8) in pMDC110 (slika 9). Plazmid pMDC32 je vseboval gen za 1,3- β -glukanazo razreda III, plazmid pMDC85 gene za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP in plazmid pMDC110 promotor 1,3- β -glukanaze razreda III.

Tabela 9 prikazuje rezultate transformacije 2, na slikah 24, 25 in 26, pa so rezultati predstavljeni tudi grafično.

Tabela 9: Uspešnost transformacije 2 za sorto Désirée (1 – vsi nastavljeni izsečki na ploščah, 2 - št. kalusiranih izsečkov, 3 - št. izsečkov s poganjki, 4 - število poganjkov prestavljenih v posode).

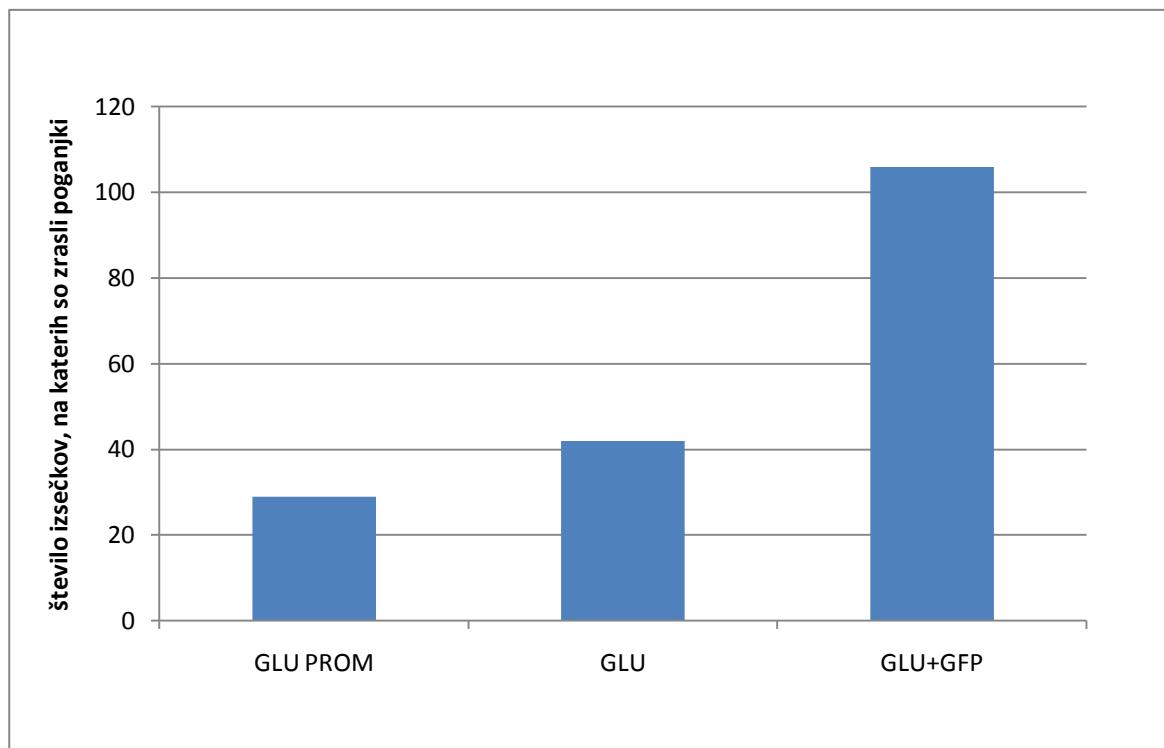
GEN		Število dni po transformaciji					
		77		98		119	
		število	%	število	%	število	%
GLU PROM	1	590		590		590	
	2	74	12,5	98	16,6	98	16,6
	3	0	0	29	4,9	29	4,9
	4			8	1,4	8	1,4
GLU	1	639		639		639	
	2	99	15,5	133	20,8	133	20,8
	3	0	0	42	6,6	42	6,6
	4			18	2,8	18	2,8
GLU + GFP	1	621		621		621	
	2	182	29,3	207	33,3	207	33,3
	3	0	0	106	17,1	106	17,1
	4			77	12,4	77	12,4

Na sliki 27 je prikazano število izsečkov sorte Désirée, ki so imeli kaluse. Rezultat je enak tako po 98, kot tudi po 119 dneh po transformaciji. Najvišji odstotek (33,3%) in hkrati tudi največje število izsečkov (207), ki so kalusirali smo opazili pri transformaciji z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC85 in na njem gene za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP. Srednje dobro so kalusirali izsečki transformirani z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC23 in na njem gene za 1,3- β -glukanazo razreda III. V tem primeru je kalusiralo 133 izsečkov od skupaj 639 izsečkov, kar predstavlja 20,8 odstotka vseh transformiranih izsečkov. Najslabši rezultat je bil pri transformaciji z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC110 in na njem gene za promotor 1,3- β -glukanaze razreda III, kar pomeni, da je kalusiralo 16,6 odstotka vseh transformiranih izsečkov, to pomeni 98 izsečkov od skupno 590.



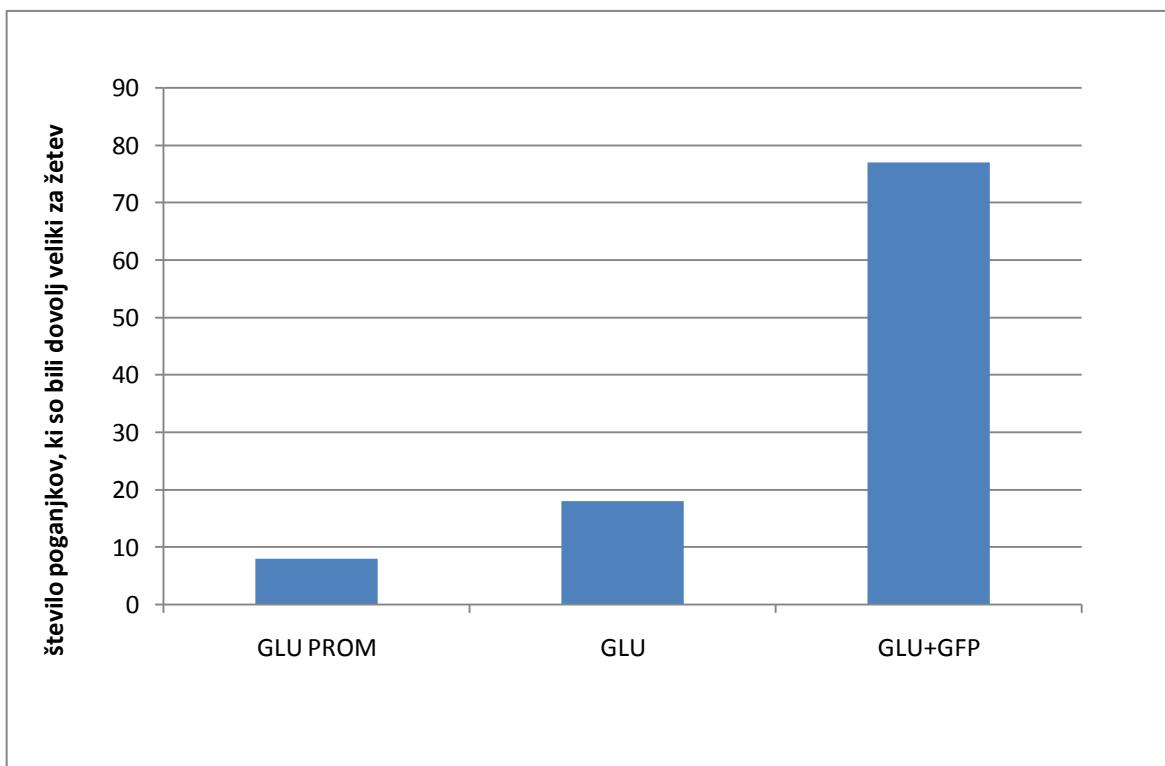
Slika 27: Število izsečkov transformiranega (z različnimi konstrukti) krompirja sorte Désirée, ki kalusirajo. Prvi stolpec ponazarja rezultate transformacije sorte Désirée z geni za promotor 1,3- β -glukanaze razreda III. Drugi stolpec predstavlja rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3- β -glukanazo razreda III, tretji stolpec pa rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP.

Na sliki 28 je prikazano število izsečkov sorte Désirée, iz katerih so zrasli poganjki po 98 dneh, rezultat pa je bil enak tudi po 119 dneh. Največ poganjkov, in sicer kar 106, smo našeli pri izsečkih, ki so bili transformirani z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC85 in na njem gene za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP. Mnogo manj poganjkov (42) smo opazili pri izsečkih transformiranih z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC23 in na njem gene za 1,3- β -glukanazo razreda III. Najmanj poganjkov pa smo zabeležili pri izsečkih transformiranih z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC110 in na njem gene za promotor 1,3- β -glukanaze razreda III, in sicer je imelo poganjke le 29 izsečkov, kar predstavlja le 4,9 odstotka vseh transformiranih izsečkov.



Slika 28: Število izsečkov transformiranega krompirja sorte Désirée s poganjki. Prvi stolpec prikazuje rezultate transformacije sorte Désirée z geni za promotor 1,3- β -glukanaze razreda III. Drugi stolpec predstavlja rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3- β -glukanazo razreda III, tretji stolpec pa rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP.

Slika 29 prikazuje število izsečkov transformiranega krompirja sorte Désirée, na katerih so do dne 3.4.2009 (119 dan po transformaciji), zrasli dovolj veliki poganjki, primerni za ločitev od kalusa oziroma za prestavitev v novo gojišče. Največ poganjkov primernih za ločitev od kalusa smo dobili pri transformaciji z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC85 in na njem gene za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP in sicer 12 odstotkov vseh transformiranih izsečkov, kar pomeni 77 novih transformiranih rastlin. 18 poganjkov smo dobili s transformacijo z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC23 in na njem gene za 1,3- β -glukanazo razreda III. Najmanj poganjkov primernih za ločitev od kalusa (8) pa smo dobili pri transformaciji z bakterijo, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC110 in na njem gene za promotor 1,3- β -glukanaze razreda III.



Slika 29: Število izsečkov transformiranega krompirja sorte Désirée, na katerih so do 119 dneva transformacije, zrasli dovolj veliki poganjki, primerni za ločitev od kalusa. V prvem stolpcu so prikazani rezultati transformacije sorte Désirée z geni za promotor 1,3- β -glukanaze razreda III. Drugi stolpec predstavlja rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3- β -glukanazo razreda III, tretji stolpec pa rezultati transformacije sorte Désirée z geni za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP.z geni za 1,3- β -glukanazo v fuziji z GFP.

4.1.4. Transformacija 3: 21.1.2009

Transformacijo 3 smo izvedli na krompirju sort Sante in Igor.

Sorto Sante smo transformirali z bakterijo *A. tumefaciens* sev LBA4404, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC 32 in gen za 1,3-β-glukanazo razreda III.

Sorto Igor pa smo transformirali z *A. tumefaciens* sev LBA4404, ki je vsebovala plazmidni vektor pMDC110 in promotor 1,3-β-glukanaze razreda III.

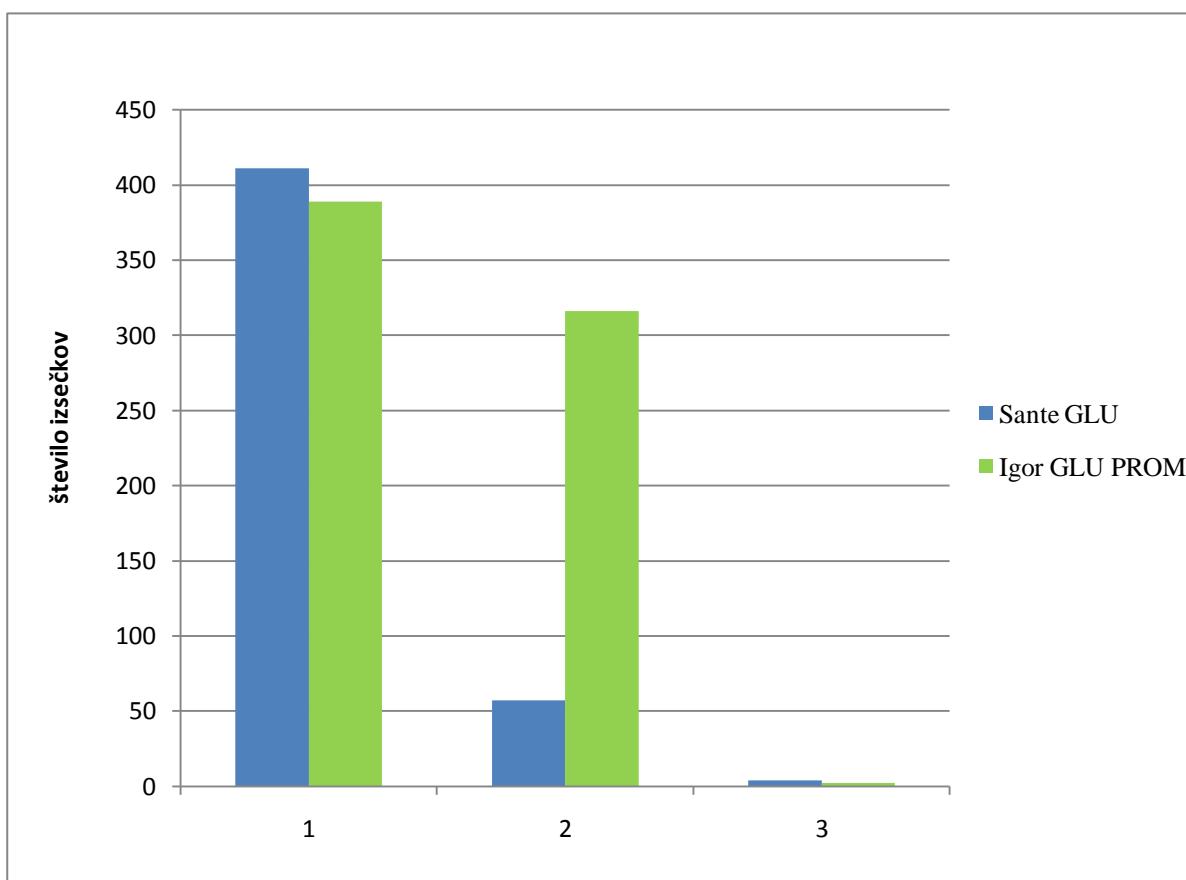
V preglednici 10 so prikazani rezultati transformacije 3. 58 dni po transformaciji 411 izsečkov sorte Sante, smo dobili le en poganjek, med tem ko smo po 79 dneh dobili 4, kar predstavlja manj, kot en odstotek. Pri transformaciji sorte Igor, pa je bila uspešnost še slabša, saj smo od 389 transformiranih izsečkov, po 79 dneh dobili le 2 poganjka, ki pa sta ob ločitvi od kalusa in prestavitvi v epruveti propadla.

Tabela 10: Uspešnost transformacije 3 (1 – vsi izsečki na plošči, 2 - št. kalusiranih izsečkov, 3 - št. izsečkov s poganjki).

Sorta krompirja / GEN		Število dni po transformaciji					
		37		58		79	
		število	%	število	%	število	%
Sante / GLU	1	411		411		411	
	2	109	26,5	111	27	57	13,9
	3	0	0	1	0,2	4	1
Igor / GLU PROM	1	389		389		389	
	2	383	98,5	389	100	316	81,2
	3	0	0	1	0,3	2	0,5

Na sliki 30 je prikazano število izsečkov, ki kalusira oziroma ima poganjke. Jasno se vidi, da kalusira zelo velik delež izsečkov sorte Igor in precej manj izsečkov sorte Sante. 37 dni po transformaciji, so zasnove kalusov kazali prav vsi izsečki sorte Igor, vendar pa je nato nekaj izsečkov propadlo. V 79 dnevu po transformaciji je kalusiralo še 316 od skupno 389 izsečkov. Presenetljivo je nizko kalusiranje sorte Sante. 79 dni po transformaciji je kalusiralo le še 57 od skupno 411 izsečkov.

Slika 30 prikazuje tudi število izsečkov s poganjki. Poganjkov je bilo pri obeh sortah izredno malo. Pri Igorju smo 79 dni po transformaciji opazili le dva poganjka, pri sorti Sante, pa skromne 4 poganjke.



Slika 30: Uspešnost transformacije 3. Pod številko 1 so predstavljeni vsi izsečki. Pod številko 2 so predstavljeni izsečki, ki so kalusirali. Pod številko 3 pa so predstavljeni izsečki, ki so imeli poganjke. Z modro barvo so na grafu predstavljeni izsečki sorte Sante, ki so bili transformirani z genom za $1,3\text{-}\beta$ -glukanazo razreda III. Z zeleno barvo pa so predstavljeni izsečki sorte Igor, ki so bili transformirani z promotor $1,3\text{-}\beta$ -glukanaze razreda III.

4.2. TESTIRANJE REGENERIRANIH RASTLIN

Za testiranje potencialno transgenih rastlin smo uporabili metodo s katero smo preverili, če so rastline transformirane na DNA nivoju. Uporabila se je analiza qPCR za 35S promotor. S tem smo hitro potrdili, da so rastline transformirane, kajti vse testirane rastline so vsebovale 35S promotor.

Analizo qPCR za 35S promotor so izvedli na Inštitutu za biologijo na oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Analizirali smo 60 domnevno transformiranih rastlin. Vsi testirani vzorci so bili pozitivni na DNA nivoju.

5. RAZPRAVA

Namen našega dela je bila transformacija in regeneracija krompirja sort Désirée, Igor, Sante in Pentland, s poudarkom na sorti Désirée. V omenjene sorte krompirja smo vnašali gene za β -glukanazo. β -glukanaze imajo pomembno vlogo pri širjenju virusa PVY po rastlini (Beffa in Meins, 1996). Rastline smo transformirali z namenom, da se kasneje uporabijo za funkcionalno analizo vstavljenih genov, saj so te tri sorte različno odporne na virus.

Krompir ima visoko hranilno vrednost in je enostaven za proizvodnjo, zato je eden izmed prvih in glavnih kandidatov za izboljšanje pridelka s pomočjo tehnik rastlinske biotehnologije (Banerjee in sod., 2006). Désirée je sorta krompirja, ki je zelo pogosto uporabljena v rastlinski biotehnologiji in najpogosteje uporabljena sorta krompirja za transformacijo, saj je zelo odzivna v *in vitro* sistemih (Beaujean in sod., 1998). Sante je sorta, ki je odporna na virus PVY. Igor pa je slovenska sorta krompirja, ki je izredno občutljiva na virus PVY. Virus PVY^{NTN} je tudi glavni vzrok, da je bila izjemno priljubljena sorta Igor, leta 1988 umaknjena iz pridelave (Sluga, 1994).

Za transformacijo krompirja smo uporabili stebelne internodije. Iz večine objavljenih postopkov za transformacijo na stebelnih internodijih je razvidno, da so uporabljali cele internodije, medtem ko so Beaujean in sod. (1998) internodije vzdolžno prerezali, uspešnost transformacije pa je bila tako pri sorti Désirée kar 88,7%, pri sorti Bintje pa celo še višja (95,2%). V našem primeru smo uporabili cele internodije. Nekatere izmed naših rastlin so imele tako drobna stebla, da bi bilo rezanje na polovico praktično nemogoče. Sklepamo lahko, da k uspešnosti transformacije pripomorejo prav prerezani internodiji, zaradi večje izpostavljenosti površine in zmožnosti infiltracije genov. Za transformacijo rastlin se poleg stebelnih internodijev pogosto uporablja tudi listne izsečke.

Visser in sod. (1989) so za transformacijo krompirja uporabili tako stebelne internodije, kot tudi listne izsečke, transformacijo pa so v obeh primerih izvedli pod enakimi pogoji. V začetku (po enem mesecu) je kazalo, da bo uspešnejša transformacija listnih izsečkov, vendar pa se je kasneje izkazalo, da je bila transformacija internodijev celo uspešnejša od

transformacije listnih izsečkov. Za transformacijo s stebelnimi internodiji smo se odločili, ker je v primerjavi s transformacijo z listnimi izsečki enostavnejša, poleg tega pa so stebelni internodiji manj občutljivi na poškodbe med postopki manipulacije, te poškodbe pa lahko vplivajo na uspešnost transformacije oziroma zmanjšajo njen frekvenco (Beaujean in sod., 1998). Mlakar Medved (2002) v svojem diplomskem delu navaja, da so za transformacijo sorte Désirée primerni tako izsečki internodijev, kot tudi listov, medtem ko so ugotovili, da so za transformacijo sorte Igor primernejši izsečki listov. Štrucl (2000) pa v svojem diplomskem delu opisuje, da je bila transformacija krompirja sorte Igor, izvedena na izsečkih internodijev uspešnejša od transformacije izvedene na izsečkih srednjih delov lista. Te trditve so v nasprotju s trditvami Mlakar Medvedove (2002). Vzroke za to lahko iščemo v različnih gojiščih, kajti uporabili in preizkušali sta različna gojišča, ki lahko zelo različno vplivajo na izsečke.

Za gensko transformacijo rastlin in rastlinskih celic je bilo uporabljenih že mnogo različnih postopkov, najpogosteje uporabljena tehnika pa je metoda z agrobakterijo (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*) (Fraley in sod., 1986). Transformacija z agrobakterijo je pogosto označena, kot najprimernejša metoda za transformacijo številnih rastlinskih vrst. V primerih, ko sistem z agrobakterijo ni učinkovit, pa se uporabijo biolistične tehnike. Romano in sod. (2001) so razvili postopek za transformacijo krompirja z obstreljevanjem z gensko pištolo, vendar pa je bil premalo učinkovit v primerjavi s postopki z agrobakterijo. Ob tem pa se pojavljajo namigovanja, da bodo biolistične metode oziroma metode z obstreljevanjem z gensko pištolo pogosteje uporabljane v prihodnosti, ko bo v rastline krompirja potrebno vnesti več genov hkrati, kar pa je v sistemih z agrobakterijo zelo težko izvedljivo.

Za transformacijo rastlin krompirja, smo se odločili za postopek z bakterijo *A. tumefaciens*, ki je najpogosteje uporabljena vrsta agrobakterije pri transformacijah, čeprav so bile v preteklosti uspešno uporabljene tudi *A. rhizogenes* in *A. rubi* (Ooms in sod., 1983). *A. tumefaciens* se je že leta 1988 izkazala kot učinkovita pri transformaciji krompirja sorte Désirée (Tavazza in sod., 1988).

Postopek transformacije z bakterijo *A. tumefaciens* je sestavljen iz več stopenj, kot so priprava vektorskega konstrukta, priprava bakterijske suspenzije za transformacijo, gojenje rastlin – krompirja, transformacija, prestavljanje izsečkov na sveže gojišče, selekcija transformiranih rastlin, fenotipsko in genotipsko spremeljanje transgena.

Kot vektorje smo uporabili binarne vektorje: pMDC32, pMDC85 in pMDC110. Ti binarni vektorji omogočajo hitro in zanesljivo kloniranje. Omenjeni vektorji vsebujejo 35S CaMV promotor, ki je zelo učinkovit v transgenih rastlinah (Weems, 2006). Poleg tega nosijo vektorji tudi zapis za odpornost na antibiotika higromicin in kanamicin. Kanamicin je bil na plazmidu, v regiji, ki se ne vključi v rastlino, zato smo za selekcijo transformant uporabljali le higromicin. Agrobakterija, ki je bila transformirana je prav tako nosila odpornost proti higromicinu ali kanamicinu, kar je njena prednost, da lahko raste na selekcijskem gojišču. Pri tem pa je potrebno paziti na okužbe s transformiranimi bakterijami, zato smo izsečke prestavliali na gojišče z antibiotiki, ki preprečujejo njeno rast. Uporabili smo antibiotika vankomicin in klaforan. Klaforan sodi v skupino baktericidnih antibiotikov in je antibiotik širokega spektra, ki penetrira celično steno bakterije in s tem povzroči lizo celice (Christian in Christian, 1997). Klaforan že v nižjih koncentracijah deluje proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam, medtem ko vankomicin deluje le proti po Gramu negativnim bakterijam (Da Silva in Fukai, 2001).

Visser in sod. (1989) so preverili tudi, kako se spremeni frekvenca transformacije, če se izsečke takoj po namakanju v suspenziji bakterijske kulture prestavi na selekcijsko gojišče. Ugotovili so, da je frekvenca transformacije tudi do 9-krat nižja, kot v primeru, ko so izsečke še nekaj dni pustili na gojišču brez selekcije. Tudi v našem primeru, smo izsečke 2 dni pustili na gojišču brez selekcije in jih šele nato prestavili na gojišče s selekcijo. S tem smo predvidoma izboljšali frekvenco transformacije.

Za transformacijo različnih sort krompirja, smo uporabili bakterijo *A. tumefaciens*, sev LBA4404 (Invitrogen), ki je najpogosteje uporabljan sev za transformacijo krompirja, vendar pa so Banerjee in sod. (2006), v poskusu uporabili sev GV2260, za katerega so dokazali večjo učinkovitost transformacije.

Tavazza in sod. (1988) so izvedli transformacijo z bakterijo *A. tumefaciens* seva LBA4404, na listnih izsečkih krompirja sorte Désirée. Ugotovili so, da so pogoji v katerih raste kultura zelo pomembni za učinkovitost transformacije. Glavne ugotovitve so bile, da različna sestava gojišč vpliva na čas v katerem si transformirana tkiva opomorejo in se regenerirajo, opazili so tudi učinek različnega inkubacijskega časa, saj je podaljšanje le tega, zelo zmanjšalo frekvenco transformacije, poleg tega pa so zaključili tudi, da naj gostota in starost bakterij ne bi bistveno vplivala na potek transformacije. Na stopnjo transformacije so v omenjenem poizkusu vplivali tudi fizikalni pogoji v katerih so bile rastline gojene ter tudi starost izhodnih rastlin. Pri rastlinah starejših od 3 tednov in pri temperaturah višjih od 19 °C, so opazili precej slabšo regeneracijo. Po dveh tednih gojenja na gojišču z rastnimi regulatorji in antibiotiki so pri 52% izsečkov opazili kalusiranje, po 3-4 tednih pa so približno pri 23% vseh listnih izsečkov opazili prve poganjke. V povprečju je vsak izseček imel 3-4 poganjke. Mi smo pri transformaciji 2 uporabili poganjke sorte Désirée, stare 17 dni, med tem, ko mo pri transformaciji 3 uporabili precej starejše poganjke. Pri transformaciji 3 smo uporabili 27 dni stare poganjke sorte Sante in Igorja. Tako stare poganjke smo morali uporabiti zaradi mnogo počasnejše rasti rastlin v zimskih mesecih. V starosti teh poganjkov, pa lahko najdemo dadaten vzrok, za slabše uspelo transformacijo 3.

Ishige (1995) je proučeval uspešnost transformacije pri krompirju ob uporabi selekcijskih antibiotikov kanamicina in higromicina. Ugotovil je, da so se transformante uspešno regenerirale na selekcijskem gojišču, ki je vsebovalo 100 mg/L kanamicina in le 10 mg/L higromicina. Poleg tega ni zaznal lažno pozitivnih oziroma »pobeglih« mutant. V našem primeru smo uporabili enako koncentracijo kanamicina (pri transformaciji 1) in 2 krat višjo koncentracijo higromicina (20 mg/L) (pri transformaciji 2 in 3), ki so jo kot optimalno navedli Franklin in sod. (2007).

Franklin in sod. (2007) so testirali različne koncentracije (0, 15, 20, 30, 50 mg/L) higromicina za selekcijo transformiranih rastlin. Ugotovili so, da so netransformirani izsečki propadli pri koncentracijah nad 15 mg/L. Posledično so za optimalno koncentracijo določili 20 mg/L higromicina. Poleg tega so ugotovili tudi, da higromicin uspešno deluje

tudi pri dvokaličnicah, kajti pred tem so ga uporabljali le za selekcijo transformant pri enokaličnicah. Franklin in sod. (2007) so dokazali tudi, da je učinkovitost selekcije s higromicinom odvisna tudi od časa prestavitve izsečkov na selekcijsko gojišče. V primeru, ko so izsečke prenesli na selekcijsko gojišče s higromicinom 2 dni po transformaciji je kalusiralo 15% izsečkov šele po 10-ih tednih, poganjki pa so se iz kalusov razvili šele po 6-9-ih mesecih, uspešnost je bila zelo nizka, kar nakazuje, da je higromicin v primerjavi s kanamicinom mnogo bolj uničujoč antibiotik za rastline.

Glede na rezultate, ki so jih dobili Franklin in sod. (2007) in Ishige (1995), bi lahko uporabili nekoliko nižjo koncentracijo higromicina, s tem bi verjetno dobili večje število rastlin, vendar pa bi se verjetno povišalo tudi število netransformiranih poganjkov. V našem primeru smo se odločili za višjo koncentracijo antibiotika in si s tem prihranili nekaj časa, kajti naš cilj ni bil pridobiti večje količine transformant, temveč le nekaj transformant, ki bi jih kasneje lahko uporabili za študij vstavljenih genov.

Petti in sod. (2009) so izvedli transformacijo sorte Désirée na stebelnih internodijih. Za selekcijo so uporabili antibiotik kanamicin v ekstremno nizki koncentraciji (0,05 mg/L), kar je vodilo do zmanjšanega selekcijskega pritiska in posledično se je zelo povečalo število netransformiranih poganjkov. V našem primeru pa smo uporabili kar 200-krat višjo koncentracijo kanamicina. Mogoče bi bilo smiselno preizkusiti nekoliko manjše koncentracije, saj bi s tem lahko dosegli višjo frekvenco transformacije.

Ibrahim in sod. (2002) so najprej poročali o 56% regeneraciji poganjkov pri transformaciji krompirja, ob regeneraciji na selekcijskem gojišču z antibiotikom kanamicin. Kasnejše analize pa so pokazale, da je bila dejanska uspešnost te transformacije le 5%, saj so bili poganjki večinoma netransformirani. Vzrok za tako velik odstotek netransformiranih poganjkov pa so pripisali nestabilni integraciji *nptII* gena ali pa je bilo izražanje gena onemogočeno zaradi notranjih delečij.

Saker (2003) je poročal o lažno pozitivnih mutantah, tudi v primeru, ko so uporabili letalne doze kanamicina. V istem članku, navaja 5% frekvenco transformacije internodijev

krompirja Désirée. Nekatere druge raziskave navajajo nekoliko nižjo (2,3%) (Visser, 1991), druge spet precej višjo (15%) frekvenco transformacije (Trujillo in sod., 2001).

V našem primeru, smo dosegli zelo visoko uspešnost transformacije pri transformaciji 1, ki je bila po dveh mesecih kar 63%. Pri tem moramo upoštevati, da poganjkov nismo ločili od kalusa ter jih prestavili na novo gojišče, kar bi verjetno nekoliko znižalo odstotek uspešnosti. Kajti pri naših kasnejših transformacijah smo ugotovili, da nekateri poganjki lepo uspevajo na kalusu, kasneje pa ločitvi od kalusa in prestavitvi v novo gojišče pa propadejo. Uspešnosti prav tako nismo preverili na genomskem nivoju.

Glede na rezultate, ki smo jih dobili ob transformaciji sorte Désirée, lahko ugotovimo, da na uspešnost transformacije vpliva mnogo dejavnikov, ki imajo skupaj zelo močan vpliv. Eden izmed teh dejavnikov je zagotovo tudi genski konstrukt, ki ga vnašamo. To nam nakazujejo rezultati transformacije 2 (slika 25, 26 in 27), kjer lahko opazimo razmeroma veliko razliko med rastlinskimi izsečki, ki so bili pripravljeni hkrati in tudi transformirani isti dan, z bakterijami *A. tumefaciens*, s selekcijo na isti antibiotik – higromicin, torej z enakim selekcijskim gojiščem, ki smo ga pripravili istočasno, razlika je le v različnih genskih konstruktih. Iz rezultatov lahko razberemo, da se je v našem primeru najbolje izkazal plazmid pMDC85, ki je vseboval gen za 1,3- β glukanazo razreda III v fuziji z GFP, srednje dobro se je transformiral plazmid pMDC32 z genom za 1,3- β glukanazo razreda III in najslabše plazmid pMDC110 s promotorjem 1,3- β glukanaze razreda III.

Visser in sod. (1989) navajajo, da ima tudi letni čas zelo velik vpliv na transformacijo. Dokazali so, da so frekvence transformacij v času pomladi mnogo višje, kot tiste v času jeseni ali zime. Zanimivo pa je tudi to, da je na kontrolnih izsčkih na gojiču (brez antibiotika) v vsakem letnjem času nastalo enako število poganjkov. Iz tega se lahko sklepa, da je slabši rezultat v jesenskih in zimskih mesecih posledica fiziološkega stanja rastline v kombinaciji s stresom, ki ga povzroči antibiotik. V našem primeru je razvidno, da je poizkusna transformacija, ki smo jo izvedli pozno poleti (29.8.2008), dala mnogo boljše rezultate, kot naslednji dve transformaciji, ki sta bili izvedeni sredi zime (5.12.2008 in 21.1.2009). Iz tega lahko zaključimo, da je v našem primeru k precej slabšemu rezultatu transformacije v zimskih mesecih, prav gotovo pripomogel tudi vpliv letnega časa.

Igor je Slovenska sorta krompirja, ki je izjemno občutljiva na virus PVY in jo zaradi visoke občutljivosti že od leta 1988 ni več na naših poljih. O transformaciji sorte Igor je zelo malo informacij. Stanič Racman in sod. (2001) so v rastline sorte Igor vnesli gene, ki so vsebovali plaščni protein virusa PVY^{NTN} in pridobili več transgenih linij, ki so bile različno dovzetne za okužbo z virusom PVY^{NTN}. Vendar so uporabili drug postopek transformacije, ter drugačno gojišče.

Znano je, da zaradi svoje izredne občutljivosti sorte Igor ne prenese tako velikih koncentracij antibiotika, kot ostale sorte krompirja. Štrucl (2000) v svojem diplomskem delu navaja, da je najboljša regeneracija uspela na gojišču z nižjo koncentracijo kanamicina (20 mg/l).

Znano je, da je higromicin agresivnejši antibiotik od kanamicina. Za določitev koncentracije higromicina v selekcijskem gojišču, za transformirane izsečke krompirja sorte Igor, smo določili s pomočjo razmerja, ki ga navaja Štrucl (2000) v svoji diplomi. Zaradi agresivnosti higromicina, pa smo poskusno poleg osnovne koncentracije higromicina, ki je znašala 4 mg/l, pripravili polovico gojišča še z dvakrat nižjo koncentracijo higromicina (2 mg/l). Med izsečki na obeh gojiščih Zvh I nismo opazili večjih razlik.

Pri vseh treh transformacijah smo dobili preko 250 poganjkov, od tega smo jih preko 100 ločili od kalusa in prestavili na sveže gojišče, jih zakoreninili in nato 60 najboljših testirali ter potrdili prisotnost vstavljenih genov na DNA nivoju. Nekatere izmed njih, se bodo lahko uporabile za nadaljnje študije.

6. SKLEPI

Binarni plazmidi pMDC32, pMDC85 in pMDC110 so se izkazali za primerne za uporabo pri transformaciji in za izražanje želenega gena v transformiranih rastlinah.

Izbran postopek transformacije, se je izkazal, kot primern za transformacijo rastlin krompirja *S. tuberosum*, predvsem za sorto Désirée.

Transformacija sorte Igor s promotorjem 1,3- β -glukanaze razreda III, ni uspela, saj smo le iz dveh transformiranih izsečkov dobili poganjka, ki pa sta kasneje propadla.

S transformacijo sorte Sante, smo pridobili tri (od petih) linij, ki povisano izražajo gen za 1,3- β -glukanazo razreda III.

Rezultat transformacije sorte Désirée, je 16 linij s povečanim izražanjem 1,3- β -glukanaze razreda III, 19 linij z vključenim promotorjem 1,3- β -glukanaze razreda III in 25 linij s povečanim izražanjem gena za 1,3- β glukanazo razreda III v fuziji z GFP.

Zaključimo lahko, da je transformacija sorte Désirée in Sante uspela, vendar pa bi bilo v prihodnje potrebno paziti na letni čas, v katerem se dela transformacija. Za sorto Igor pa bi bilo mogoče smiselno metodo transformacije nekoliko optimizirati ali uporabiti drug postopek. Igor je zelo občutljiva sorta krompirja, zaradi česar je transformacija in kasnejša regeneracija zelo zahtevna in dolgotrajna.

7. POVZETEK

Krompir je pomembna kulturna rastlina, ki jo gojijo po vsem svetu.

PVY^{NTN} virus, povzroča bolezen krompirja imenovano obročasta nekroza gomoljev (PTNRD). PTNRD se je prvič pojavila v Evropi leta 1979 in se hitro razširila praktično po vsem svetu. V Sloveniji se je pojavila leta 1988. To je bolezen, ki je pridelovalcem krompirja po vsem svetu povzročila zelo veliko škode. Na okuženih rastlinah se opaža drastično zmanjšanje pridelka in zmanjšano kvaliteto gomoljev.

β -glukanaze, so encimi, ki cepijo glukane. Dokazano je bilo, da imajo 1,3- β -glukanaze pomembno vlogo pri širjenju virusa po rastlini. Rastline, ki imajo povečano izražanje za gene 1,3- β -glukanaze, vsebujejo višje koncentracije 1,3- β -glukanaz, ki olajšajo prehod virusa preko plazmodezem in tako se virus lažje in hitreje razširi po rastlini.

S pomočjo transformacije rastlin krompirja, različnih sort, smo želeli pridobiti rastline, v katerih bi se povisano izražali geni za 1,3- β -glukanaze in v katerih bi lahko spremljali aktivnost promotorja 1,3- β -glukanaze. Poleg tega smo želeli vzpostaviti učinkovit sistem za transformacijo in regeneracijo tako sorte Désirée, kot tudi sort Igor in Sante.

Rastline krompirja sort Désirée, Igor in Sante smo transformirali z bakterijo *A. tumefaciens* z različnimi konstrukti.

Ugotovili smo, da je uspešnost transformacije in regeneracije odvisna od mnogih dejavnikov, kot so: sorta krompirja, letni čas, v katerem se transformacija opravi, konstrukt, ki se ga vstavlja, seleksijski antibiotik.

Končni rezultat našega dela so tri transgene linije sorte Sante, ki povečano izražajo 1,3- β -glukanaze razreda III, 16 rastlin sorte Désirée s povečanim izražanjem 1,3- β -glukanaze razreda III, 19 rastlin sorte Désirée z vstavljenim promotorjem 1,3- β -glukanaze in 25 rastlin sorte Désirée s povečanim izražanjem gena 1,3- β -glukanaze razreda III v fuziji z GFP.

Transformacija sorte Igor s promotorjem 1,3- β -glukanaze, ni uspela, saj sta obe rastlini, po prestavitevi v epruvete propadli.

Rastline, ki smo jih uspešno gensko spremenili, bodo lahko služile za nadaljnje študije, kot je na primer funkcionalna analiza genov za 1,3- β -glukanazo.

8. LITERATURA

1. Acosta O., Barker H., Mayo M.A. 1999. Prospect for improving virus resistance of potato crops in Columbia by transgenic technology. *Fitopatología Colombiana*, 18(1): 66-77.
2. Alary R., Serin A., Maury D., Jouira H.B., Sirven J.P., Gautier M.F. et al. 2002. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for quantification of GMO in maize and soybean. *Food Control* 13, 235-244.
3. Arends P., Kus M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj. Mercator- KŽK Kmetijstvo Kranj d.o.o.: 121-130.
4. Banerjee A. K., Prat S., Hannapel D.J. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science*, 170: 732–738.
5. Baebler Š., Krečič –Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok J.E., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe- Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY NTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, 10(2): 263–275.
6. Beaujean A., Sangwan R. S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B. S. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *Journal of Experimental Botany*, 49 (326): 1589–1595.
7. Beffa, M. and Meins, F. Jr. 1996. Pathogenesis-related functions of plant beta-1,3-glucanases investigated by antisense transformation. *Gene*, 179: 97-103.
8. Beffa R.S., Hofer R.-M., Thomas M. and Meins F. Jr. 1996. Decreased susceptibility to viral disease of β -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell*, 8: 1001- 1011.

9. Bevan M. 1984. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 22: 8711-8721.
10. Bohanec B, Gogala N, Žel J, Ravnikar M. 1992: Tehnike rastlinskih tkivnih kultur, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtjenje, Ljubljana, Slovenija.
11. Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: Gensko spremenjena hrana. Javornik B., Strel B., Bohanec B. (ur) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
12. Botha, C.E.J. and Cross, R.H.M. 2000. Toward reconciliation of structure with function in plasmodesmata: Who is the gatekeeper?. *Micron*, 31: 713- 721.
13. Bucher G. L., Tarina C., Heinlein M., Di Serio F., Meins F., Iglesias V. A. Jr. 2001. Local expression of enzymatically active class I b-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *The Plant Journal*, 28(3): 361-369.
14. Casacuberta J.M., Raventos D., Puigdomènech P., San Segundo B. 1992. Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol. Gen. Genet.*, 234: 97–104.
15. Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263-271.
16. Cheong Y.H., Kim C.Y., Chun H. J., Moon B. C., Park H. C., Kim J. K., Lee S.-H., Han C.-d., Lee S.Y., Cho M. J. 2000. Molecular cloning of a soybean class III b-1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science*. 154: 71–81.
17. Christian S. S., Christian S. J. 1997. The cephalosporin antibiotics. Primary Care Update for OB/GYNS, 4, 5: 168-174.

18. Cote F., Cutt J.R., Asselin A., Klessig D.F. 1991. Pathogenesis-related acidic β -1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 173–181.
19. Da Silva T. J. A., Fukai S. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and Agrobacterium growth. *J. Appl. Hort.*, 3: 3-12.
20. Deom C.M., Lapidot M., Beachy R. N. 1992. Plant virus movement proteins. *Cell*, 69: 221-224.
21. Epel B. L., 2009. Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host β -1,3-glucanases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9):1074-81.
22. Flis B., Henning J., Strzelczyk- Zыта D., Gebhardt C., Marczewski W. 2005. The Ry-fsto gene from Solanum stoloniferum for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding*, 15: 95-101.
23. Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B. 1986. Genetic transformation in higher plants. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 4: 1-46.
24. 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.
25. Galun E., Breiman A. 1998. Transgenic plants. With an appendix on intellectual properties & commercialisation of transgenic plants by John Barton. London, Imperial College Press: 376 str.
26. Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2002. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. *Archives of Virology*, 147: 363- 378.

27. Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2005. Specific detection of the PVY^N-W variant of Potato virus Y. *Journal of Virological Methods*, 125: 131-136.
28. Gruner R., Pfitzner U.M. 1994. The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.*, 220: 247–255.
29. Hanfrey C., Fife M., Buchanan-Wollaston V. 1996. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.*, 30: 597–609.
30. Helms K., McIntyre G.A. 1962. Studies on size of lesions of tobacco mosaic virus on pinto bean. *Virol.*, 18: 535- 545.
31. Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5 (10): 446-451.
32. Hiei Y., Komari T., Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Molecular Biology*, 35: 205-218.
33. Hinrichs J., Berger S., Shaw J.G. 1998. A hypersensitive response – like mechanism is involved in resistance of potato virus Y and tobacco etch virus. *Journal General Virology*; 79: 167-176 .
34. Ibrahim M., Metry E., Osman Y., Nas El- Din T. and Madkour M. 2002. Genetically modified potato (*Solanum tuberosum* L.) resistant to potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*). *Arab J. Biotech.*, 5 (1): 1-10.
35. Iglesias V.A., Meins F. Jr. 2000. Movement of plant viruses is delayed in a b-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J.*, 21: 157- 166.
36. Ishige T. 1995. Somatic cell fusion between diploid potato (*Solanum tuberosum*) lines using transformed antibiotic selection markers. *Plant Science*, 112: 231-238.

37. ISAAA Brief 42-2010: Executive Summary,
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>
(januar, 2011).
38. Javornik B. 2000. Gensko spremenjene rastline. Sodobno kmetijstvo, 33 (6): 290-294.
39. Javornik B. 2004. Tržna pridelalava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Javornik B., Strel B., Bohanec B. (ur) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167str.
40. Jazbec M., Vrabl S., Juvanc J., Babnik M., Koron D. 1995. Sadni vrt. Ljubljana, Kmečki glas: 373 str.
41. Jones R.A.C. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. Annals of Applied Biology, 117: 93- 105.
42. Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P., Fritig B. 1987. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1 ,3- β -glucanase activity. EMBO J., 6: 3209-3212.
43. Keefe D., Hinz U., Meins F. 1990. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intercellular localization of the β -1,3- glucanase and chitinase in tobacco leaves. Planta, 182: 43–51.
44. Kmetijski inštitut Slovenije, Poskusni center za krompir, Svetovanje kmetom in strokovni javnosti, Sortni izbor krompirja v letu 2008: 8 str.
<http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/POL/Sel-center-krompir/SORTNI-IZB-2008.pdf>
(maj, junij, julij, 2010).
45. Kocjan Ačko D. 1999. Pomen krompirja v pridelavi Slovencev. V prilogi Kmečki glas: Krompir. Kmečki glas, 5: 2.
46. Kocjan Ačko D. 2002. Sorte krompirja glede na uporabo gomoljev. Krompir – nekoč hudičev sad. Naša žena, 9: 66-67.

47. Kogovšek P., Pompe-Novak M., Baebler Š., Rotter A., Gow L., Gruden K., Foster G. D., Boonham N., Ravnikar M. 2010. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. *Plant Pathology*, 59: 1121–1132.
48. Kombrink E., Somssich I.E. 1997. Pathogenesis-related proteins and plant defense. V: *The Mycota V, Part A* (Carroll, G. and Tudzynski, P. eds). Berlin-Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 107- 128.
49. Krečič-Stres H., Vučak C., Ravnikar M., Kovač M. 2005. Systemic Potato virus Y_{NTN} infection and levels of salicylic and gentisic acids in diffrent potato genotypes. *Plant Pathology*, 54 (4): 441-447.
50. Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 107-115 .
51. Kus M. 1995. The epidemic of tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVYNTN) and its effect on potato crops in Slovenia. V: *Proceedings of the European Potato Research Conference*, Bled, Slovenia: 18-22 June 1995. Ljubljana, European Association of Potato Research: 151-154.
52. LeRomancer M., Nedellec M., 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ring disease (PTNRD). *Plant Pathology*, 46 (1): 104–111.
53. Leubner-Metzger G., Frundt C., Vogeli-Lange R., Meins F. Jr. 1995. Class I b-1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol*, 109: 751–759.
54. Leubner-Metzger G., Meins F. Jr. 1999. Function and regulation of plant b-1,3-glucanases (PR-2). V: *Pathogenesis Related Proteins in Plants* (Datta, S.K. and Muthukrishnan, S. eds). Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 49-76.
55. Levy A., Guenoune-Gelbart D., Epel B.L. 2007. β -1,3-Glucanases Plasmodesmal Gate Keepers for Intercellular Communication. *Plant Signal Behav*, 2(5): 404–407.

56. Linthorst H., Melchers M., Mayer A., van Roekel J., Cornelissen B., Bol J. 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87: 8756–8760.
57. Lotan T., Ori N., Fluhr R. 1989. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. Plant Cell, 1: 881–887.
58. Matthews R.E.F. 1981. Plant Virology. New York, USA: Academic Press.
59. Meins F. Jr, Neuhaus J.-M., Sperisen C., Ryals J. Jr. 1992. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. V: T. Boller, F. Meins Jr (Eds.), Genes Involved in Plant Defense. Springer-Verlag, 245–282.
60. Mlakar Medved M. 2002. Diplomska naloga: Regeneracija in transformacija Krompirja *Solanum tuberosum* L. *in vitro*, 75str.
61. Ooms G., Karp A., Roberts J. 1983. From tumour to tuber: tumour cell characteristics and chromosome numbers of crown gall-derived tetraploid potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). Theor Appl Genet, 66:169–172.
62. Ori N., Sessa G., Lotan T., Himmelhoch S., Fluhr R. 1990. A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. EMBO J. 9: 3429–3426.
63. Payne G., Ward E., Gaffney T., Goy P. A., Moyer M., Harper A., Meins F. Jr, Ryals J. 1990. Evidence for a third structural class of b-1,3-glucanase in tobacco. Plant Mol. Biol., 15: 797–808.
64. Petti C., Wendt T., Meade C., Mullins E. 2009. Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic Phytophthora infestans-tolerant potato. Journal of Bioscience and Bioengineering, 107 (3): 301–306.
65. Pierik L.R.M. 1998. In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, 348.

66. Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar, M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physio. and Mol. Pl Path.*, 67: 237-247.
67. Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: Biotehnologija Osnovna znanja. uredil Raspor P. BIA, Ljubljana, 149-164.
68. Regalado A.P., Ricardo C.P. 1996. Study of the intercellular fluid of healthy *Lupinus albus* organs. Presence of a chitinase and a thaumatin-like protein. *Plant Physiol*, 110: 227–232.
69. Revers F., Le Gall O., Candresse T., Maule A. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 12: 367-376.
70. Robards A., Lucas W. 1990. Plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 369- 419.
71. Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. 2001. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 20:198–204.
72. 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.
73. Salisbury F.B., Ross C.W. 1992. *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont, Calif. pp. 329–407.
74. Singh R.P., Valkonen P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones5 R.A.C., Schubert J. 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Archives of virology*, 153: 1-13.
75. Sluga T. 1994 . Kompirjeve sorte za pridelavo v Sloveniji. Ljubljana. ČZP Kmečki glas, 6-11, 25 str.

76. Stabej, J. 1997. Kruh ubogih. Kulturno zgodovinski in in jezikovni začrt zgodovine krompirja na Slovenskem. Slovenska akademija znanosti in umetnosti. Ljubljana, 94 str.
77. Stanič Racman D., McGeachy K., Reavy B., Štrukelj B., Žel J., Barker H. 2001. Strong resistance to potato tuber necrotic ringspot disease in potato induced by transformation with coat protein gene sequences from an NTN isolate of Potato virus Y. *Annals of Applied Biology*, 139: 269- 275.
78. Stone B.A., Clarke A.E. 1992. Chemistry and Biology of (1- 3) - β -Glucans. Victoria, Australia: La Trobe University Press.
79. Štruc R. 2000. Diplomska naloga: Transformacija Tobaka (*Nicotiana tabacum*) cv. Samsun in krompirja (*Solanum tuberosum L.*) cv Igor.
80. Tahiri-Alaoui A., Dumas E., Gianinazzi S. 1990. Detection of PR-b proteins in tobacco roots infected with *Chalara elegans*. *Plant Mol. Biol.*, 14: 869–871.
81. Taiz L, Zeiger E. 2002. Plant physiology. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 423–558.
82. Tavazza R., Tavazza M., Ordas R. J., Ancora G., Benvenuto E. 1988. Genetic Transformation of Potato (*Solanum tuberosum*): An Efficient Method to Obtain Transgenic Plant. *Plant Science*, 59: 175-181.
83. Tornero P., Conejero V., Vera P. 1994. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol. Gen. Genet.*, 243: 47-53.
84. 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*, 2: 637-641.
85. Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157-175.

86. Valkonen J.P.T. 1994. Natural genes and mechanism for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). *Plant Breeding*, 112: 1-16.
87. Valkonen J.P.T., Jones R.A.C., Slack S.A., Watanabe K.N. 1996. Resistance specificities to viruses in potato: Standardization of nomenclature. *Plant Breed*, 115: 433-438.
88. Valkonen J.P.T. 1997. Novel resistances to four potyviruses in tuber- bearing potato species and temperature- sensitive expression of hypersensitive resistance to potato virus Y. *Annals of Applied Biology*, 130: 91- 104.
89. van Eldik G.J., Wingens M., Ruiter R.K., Van Herpen M.M., Schrauwen J.A., Wullems G.J. 1996. Molecular analysis of a pistil-specific gene expressed in the stigma and cortex of *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.*, 30: 171–176.
90. Vidal S., Cabrera H., Andersson R.A., Ferdiksson A., Valkonen J.P.T. 2002. Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with Potato virus Y. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 15: 717- 727.
91. Visser R. G. F., Jacobsen E., Hesseling- Meinders A., Schans M. J., Witholt B., Feenstra W. J. 1989. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology*, 12: 329- 337.
92. Visser R.G. 1991. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Lindsey K (ed) *Plant tissue culture manual supplement 2*. Kluwer, Dordrecht, B5: 1–9.
93. Ward E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F.M., Ryals J.A. 1991. Differential regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 15: 797–808.
94. Weems C. 2006. Encephalomyocarditis (EMCV) Viral Internal Ribosome Entry Site Mediated Expression of Multiple Transgenes in Tobacco and *Arabidopsis thaliana*. Tennessee Research and Creative Exchange.

95. Zambryski P., Crawford K. 2000. Plasmodesmata: Gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:393-421.
96. Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23 (1): 11-28.
97. Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah – vnos genov. V: Biotehnologija Osnovna znanja. uredil Raspot P. BIA, Ljubljana, str. 299-308.
98. Žel J. 2004. Gensko spremenjene rastline: sedanjost in prihodnost. V: Raspot P. (Ur.). Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil, (Biotehnologija in mikrobiologija za prihodnost, 03). Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 165–170.
99. Žel J. 2007. Gensko spremenjene rastline – tukaj in zdaj. *Gea*, 17(4): 8–10.

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Maji Ravnikar, ker mi je omogočila opravljanje diplomskega dela ter za pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi somentorici prof. dr. Jani Žel, ki je usmerjala moje delo in si vzela čas zame in za vsa moja vprašanja.

Za koristne nasvete, uvod v delo v laboratoriju, ter za izčrpno pomoč in nasvete pri pisanju diplomskega dela se zahvaljujem Davidu Dobniku.

Zahvaljujem se tudi Meti Buh Gašparič za koristne nasvete in vso pomoč pri delu v laboratoriju.

Za prijaznost se zahvaljujem vsem zaposlenim na Nacionalnem inštitutu za biologijo, ki so mi pogosto priskočili na pomoč in me znali usmeriti.

Za razumevanje in pregled dela se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Zlati Luthar.

Za podporo se iskreno zahvaljujem tudi staršem in fantu Blažu za potrpežljivost, vzpodbudo, oporo in vso računalniško pomoč.