

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Kati OVEN

**IZRAŽANJE *DsRed* IN *gfp* FLUORESCENTNIH
GENOV PRI TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Kati OVEN

**IZRAŽANJE *DsRed* IN *gfp* FLUORESCENTNIH GENOV PRI
TOBAKU (*Nicotiana tabacum* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EXPRESSION OF *DsRed* AND *gfp* FLUORESCENT GENES IN
TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Zlato Luthar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marijana Jakše
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Zlata Luthar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Jernej Jakše
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo 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 obliki, identična tiskani verziji.

Kati Oven

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 633.71: 577.2 (043.2)
KG *DsRed* gen/*gfp* gen/tobak/*Nicotiana tabacum*/*Agrobacterium tumefaciens*
KK AGRIS F30
AV OVEN, Kati
SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2012
IN IZRAŽANJE *DsRed* IN *gfp* FLUORESCENTNIH GENOV PRI TOBAKU
(*Nicotiana tabacum* L.)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 30 str., 6 pregl., 9 sl., 43 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z metodo posredne transformacije z vektorskim sistemom *A. t.* sev LBA4404 in dvema plazmidoma (pCAMBIA1390-*DsRed* in pART27 2mgfp5-ER) smo v listne izsečke tobaka (*Nicotiana tabacum* L.) vnesli fluorescentni markerski gen za rdečo (*DsRed*) oz. zeleno (*gfp*) fluorescenco ter selekcijski gen za odpornost na antibiotik higromicin (*hptII*) oz. kanamicin (*nptII*). Fenotipsko izražanje *DsRed* in *gfp* gena smo opazili v vseh izsečkih s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa. Z dupleks PCR reakcijo smo pri nastalih regenerantih preverili vključitev transgenov. Od 139 regenerantov, transformiranih z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed*, jih je 38 oz. 27,3 % uspešno rastlo le na gojišču brez selekcije, po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER pa je bilo takih regenerantov 9 oz. 5,9 % od skupno 152. Na gojišču s selekcijo je po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* uspešno rastlo 101 regenerant oz. 91,0 %, po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER je preživel 152 oz. 98,7 % regenerantov. Učinkovitost transformacije po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* je bila 95,0 %, po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER pa 98,8 %. Ugotovili smo, da sta oba fluorescentna gena primerna za vzpostavitev transformacijskega sistema. Netransformiranih regenerantov ali regenerantov z vključenim fluorescentnim genom in brez antibiotičnega gena nismo dobili. Antibiotika higromicin in kanamicin sta uspešno preprečila rast netransformiranih tkiv.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 633.71: 577.2 (043.2)
- CX *DsRed* gene/*gfp* gene/tobacco/*Nicotiana tabacum*/*Agrobacterium tumefaciens*
- CC AGRIS F30
- AU OVEN, Kati
- AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2012
- TI EXPRESSION OF *DsRed* AND *gfp* FLUORESCENT genes IN TOBACCO
(*Nicotiana tabacum* L.)
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 30 p., 6 tab., 9 fig., 43 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Indirect method of vector system of *A. t.* strain LBA4404 and two plasmids (pCAMBIA1390-*DsRed* and pART27 2mgfp5-ER) was used for introducing red fluorescent gene (*DsRed*), green fluorescent gene (*gfp*) and corresponding selection genes (*hptII* for resistance to antibiotic hygromycin and *nptII* for resistance to kanamycin) into leaf discs of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Emission of red (*DsRed*) and green (*gfp*) fluorescence was observed under an epifluorescence microscope and was confirmed in all leaf discs. Integration of fluorescent and selection genes was confirmed using molecular analysis by duplex PCR. One hundred thirtynine regenerants transformed using *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* from which 38 (27.3 %) were successfully growing only in non-selective media and 152 regenerants transformed using *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER of which 9 (5.9 %) were growing in non-selective media were tested. One hundred one (91.0 %) regenerants transformed using *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* and 152 (98.7 %) regenerants transformed using *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER were successfully growing in selective media. Transformation efficiencies achieved were 95.0 % after *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* and 98.8 % after *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER. Both fluorescent genes are suitable for transformation protocols. There were no observed untransformed regenerants or regenerants positive only on fluorescent genes and without antibiotic selection gene. Both used antibiotics hygromycin and kanamycin successfully prevented growth of untransformed tissue.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 TOBAK	2
2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE	2
2.2.1 Posredni vnos genov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3
2.2.1.1 Seleksijski geni	4
2.2.1.2 Markerski geni	4
3 MATERIAL IN METODE	6
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	6
3.2 SESTAVA GOJIŠČ	6
3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ	6
3.4 BAKTERIJA IN PLAZMIDI	7
3.5 TRANSFORMACIJA TOBAKA	9
3.6 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA	11
3.7 FENOTIPSKO IZRAŽANJE <i>DsRed</i> IN <i>gfp</i> GENA	11
3.8 ANALIZA PRISOTNOSTI <i>DsRed</i> IN <i>gfp</i> GENA S PCR METODO	11
3.8.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva	11
3.8.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom	12
3.8.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	12
3.8.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno gelsko elektroforezo	13
4 REZULTATI	14
4.1 FENOTIPSKO IZRAŽANJE <i>DsRed</i> IN <i>gfp</i> GENA	14
4.2 REGENERACIJA LISTNIH IZSEČKOV TOBAKA	15
4.3 MOLEKULSKA ANALIZA VKLJUČENOSTI <i>DsRed</i> in <i>hptII</i> TER <i>mgfp5-ER</i> in <i>nptII</i> GENOV S PCR METODO	16
4.4 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA	20
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	22
5.1 RAZPRAVA	22

5.2	SKLEPI	24
6	POVZETEK	26
7	VIRI	28
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava gojišč kontrolnega poskusa z neokuženimi listi tobaka	11
Preglednica 2: DNA zaporedja parov začetnih oligonukleotidov za posamezen transgen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta	13
Preglednica 3: Število preživelih in propadlih regenerantov tobaka na ustreznem selekcijskem oz. neselekcijskem MS gojišču po transformaciji z <i>A.t.</i> in plazmidom pCAMBIA1390-DsRed oz. plazmidom pART27 2mgfp5-ER	15
Preglednica 4: Odstotek preživelih regenerantov tobaka na ustreznem selekcijskem MS gojišču po transformaciji z <i>A.t.</i> in plazmidom pCAMBIA1390-DsRed oz. plazmidom pART27 2mgfp5-ER	15
Preglednica 5: Število in odstotek regenerantov tobaka po transformaciji z <i>A. t.</i> -pCAMBIA1390-DsRed	18
Preglednica 6: Število in odstotek regenerantov tobaka po transformaciji z <i>A. t.</i> -pART27 2mgfp5-ER	20

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Plazmid pCAMBIA1390 (Cambia, 1997)	8
Slika 2: Plazmid pART27 (Gleave, 1992)	9
Slika 3: Izsečki listov tobaka: A – v suspenziji <i>A. t.</i> ; B – na filtrskem papirju	10
Slika 4: Regeneracija in subkultivacija tobaka: A – regeneracija listnih izsečkov na selekcijskem <i>MSr</i> gojišču; B – subkultivirani regeneranti na selekcijskem <i>MS</i> gojišču	10
Slika 5: Izražanje rdeče fluorescence DsRED-EXPRESS proteina v transformiranih izsečkih tobaka opazovanih z epifluorescentnim mikroskopom: A - pod navadno svetlobo; B – s fluorescentno lučko in ustreznimi filtri za detekcijo rdeče fluorescence	14
Slika 6: Izražanje zelene fluorescence m-GFP5-ER proteina v transformiranih izsečkih tobaka opazovanih z epifluorescentnim mikroskopom: A - pod navadno svetlobo; B - s fluorescentno lučko in ustreznimi filtri za detekcijo zelene fluorescence	14
Slika 7: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za <i>DsRed</i> gen (211 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za <i>hptII</i> gen (641 bp). 1-101 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastli na selekcijskem gojišču, 102-139 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastli na neselekcijskem gojišču, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pCAMBIA1390-DsRed, S – slepi vzorec, M – velikostni standard	16
Slika 8: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za <i>mgfp5-ER</i> gen (422 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za <i>nptII</i> gen (650 bp). 140-291 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastli na selekcijskem gojišču, 292-300 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastli na neselekcijskem gojišču, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pART27 2mgfp5-ER, S – slepi vzorec, M – velikostni standard	19
Slika 9: Neokuženi izsečki listov tobaka po petih tednih inokulacije na ustreznem selekcijskem <i>MSr</i> gojišču: A – na gojišču brez dodatkov; B – na gojišču z acetosiringonom (100 µM); C – na gojišču s timentinom (150 mg/l); D – na gojišču s higromicinom (25 mg/l); E – na gojišču s kanamicinom (300 mg/l)	21

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-benzilamino purin – citokinin
bp	bazni par
CaMV	virus mozaika cvetače – cauliflower mosaic virus
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DsRED	rdeče fluorescentni protein – red fluorescent protein iz korale <i>Discosoma</i> sp.
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
GFP	zeleno fluorescentni protein – green fluorescent protein iz meduze <i>Aequorea victoria</i>
HPT	higromicin fosfotransferaza
MS	Murashige in Skoog gojišče
MSr	MS regeneracijsko gojišče
NAA	α -naftalen očetna kislina
NPT	neomicin fosfotransferaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo – polymerase chain reaction
T-DNA	del Ti-plazmida, ki se vključi v genom rastline – transfer DNA
Ti-plazmid	plazmid iz <i>A. t.</i> , ki povzroča novotvorbe pri rastlinah – tumour inducing-plazmid

1 UVOD

Klasično žlahtnjenje je dolgotrajen postopek, pri katerem v izbrano kmetijsko rastlino preko križanj vnesemo željene agronomsko pomembne lastnosti. V pomoč so nam genske transformacije, s pomočjo katerih lahko v rastline vnesemo točno določene lastnosti, mogoč je tudi prenos genov med različnimi vrstami. Prednost pred ostalimi postopki žlahtnjenja je tudi ta, da v relativno kratkem času dobimo rastline z vnesenimi točno določenimi željenimi geni in se izognemo postopku odstranitve neželenih genov s povratnimi križanji.

Za ločevanje transformiranih tkiv od netransformiranih uporabljamo selekcijske gene, za študije izražanja pa markerske gene. Selekcijski geni zagotavljajo transformiranim celicam prednost pri rasti, ali pa uničijo netransformirane celice. Zelo pogosti selekcijski geni so geni za odpornost na določen antibiotik, ki deluje toksično na netransformirane rastline. Markerski geni se uporabljajo za identifikacijo transformiranih celic, saj na enostaven način lahko spremljamo njihovo izražanje. Pogosto uporabljeni markerski geni so fluorescentni geni, katerih izražanje lahko spremljamo s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa in ustreznih filtrov. Prednost fluorescentnih genov za selekcijo je ta, da je metoda spremljanja nedestruktivna in lahko transformiran material uporabimo za nadaljnje raziskave.

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil vnos dveh markerskih *DsRed* in *gfp* genov za rdečo in zeleno fluorescenco v genom tobaka s pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (*A.t.*) in spremljati prisotnost transgenov in njihovo izražanje. V ta namen smo z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznimi filtri spremljali fenotipsko izražanje *DsRed* in *gfp* proteina. Iz listov smo nato izolirali DNA in s PCR metodo na molekularni ravni preverili prisotnost transgenov.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Poskušali smo ugotoviti, kateri od uporabljenih fluorescentnih genov je primernejši za vzpostavitev transformacijskega sistema pri tobaku.

Predvidevali smo, da se bo vgradila celotna T-DNA z obema, tako markerskim oz. fluorescentnim genom, kot selekcijskim genom za odpornost na antibiotik.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TOBAK

Navadni tobak (*Nicotiana tabacum* L.) je samoprašna enoletna zelnata rastlina, ki raste v subtropskem podnebjju. Rod tobak (*Nicotiana* sp.) obsega 60 vrst in spada v družino razhudnikovk (Solanaceae). Tobak vsebuje strupen alkaloid nikotin, zaradi katerega se uporablja tudi kot nadomestek za pesticide v biološki pridelavi hrane, nikotin je namreč učinkovit insekticid.

Tobak se je izkazal za zelo uspešno modelno rastlino pri genskih transformacijah, saj hitro in uspešno raste v tkivni kulturi. Regeneracija iz listnih izsečkov je hitra in uspešna (Stolarz in sod., 1991). Tobak je bil prva uspešno transformirana rastlina. Leta 1983 je bil v tobak vnešen gen za odpornost na antibiotik kanamicin (Horsch in sod., 1984) s posredno metodo transformacije s pomočjo talne fitopatogene bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.

Trenutno imata dovoljenje za tržno pridelavo tobak s toleranco na herbicid oksinil v Evropski uniji in tobak z zmanjšano vsebnostjo nikotina v Združenih državah Amerike (CERA, 2012).

2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE

Razvoj postopkov regeneracije rastlin in odkritje novih tehnik prenosa genov v rastlinske celice je zagotovilo možnosti za praktično uporabo genskega inženiringa za spreminjanje in izboljšavo pomembnih kmetijskih rastlin. Genske transformacije so postale uporabne pri izboljšanju lastnosti rastlin in za odkrivanje funkcij genov v rastlinah (Rao in sod., 2009). Osnovne metode genskega inženiringa so bile razvite najprej pri bakterijah v 60. letih prejšnjega stoletja in se še danes neprestano dopolnjujejo. Od sredine 80. let je metode z manjšimi modifikacijami možno uporabljati pri vseh živih organizmih (Bohanec, 2004).

Transgene poljščine so v komercialni pridelavi od leta 1996, pridelovalne površine pa se iz leta v leto povečujejo. Leta 2011 je bilo s transgenimi poljščinami posejanih že 160 milijonov hektarov površin. Največji del teh površin pripada ZDA (43 %), sledijo jim Brazilija (19 %), Argentina, Indija, Kanada, Kitajska, Paragvaj, Pakistan, Južna Afrika, Urugvaj ter ostale države. Najpogostejše transgene rastlinske vrste v tržni pridelavi so soja (47 %), koruza (32 %), bombaž (15 %) in oljna ogrščica (5 %). Najpogostejše lastnosti teh rastlin so toleranca na herbicide (59 %), izboljšanje kakovosti (26 %) ter odpornost na škodljivce (15 %) (ISAAA, 2011).

Postopke vnosa genov delimo na neposredni (vnos izolirane plazmidne DNA) in posredni način (vnos DNA s pomočjo vektorjev). Neposredni načini vnosa genov potekajo z

elektroporacijo, biolistiko (obstreljevanje rastlinskih tkiv), makro in mikro vbrizgavanjem DNA, ultrazvokom in kemično obdelavo s polietilen glikolom. Posredni način poteka predvsem s pomočjo bakterij *Agrobacterium tumefaciens* in *Agrobacterium rhizogenes*.

2.2.1 Posredni vnos genov z *Agrobacterium tumefaciens*

A. t. je talna bakterija, ki v naravi okuži rastline na ranjenem mestu in na njih izzove nastanek neke vrste tumorjev. Ta njena lastnost se nahaja na večjem plazmidu imenovanem Ti-plazmid. Bakterija vključi del plazmidne DNA ob pomoči več beljakovin, ki jih tudi kodira isti plazmid v rastlinske celice, kjer pride do vgraditve v genom. Vnese se z beljakovinami nekoliko zavarovana DNA, kar olajša prehod skozi citoplazmo in vstop v jedro. Za namene genskih transformacij je bil naravni plazmid povsem modificiran, tako da so ostale ohranjene le tiste regije, ki omogočajo replikacijo in vnos tarčne DNA na mesto, kjer so bili prej kodirani bakteriji koristni geni, pa vstavimo želen genski konstrukt (Bohanec, 2004). Naravni sev *A. t.* okužuje le dvokaličnice, bil pa je že uspešno spremenjen tako, da lahko okužuje tudi enokaličnice (Hiei in sod., 1994).

Leta 1907 sta Smith in Townsend definirala *A. t.* kot povzročiteljico rakaste tvorbe (ang. crown gall). V tem tkivu se tvorijo aminokislinam podobne snovi opini, ki jih *A. t.* uporablja kot vir ogljika in dušika za svojo rast. Geni za sintezo opinov se nahajajo na T-DNA, ki ga bakterija vključi v genom rastline. T-DNA je del bakterijske DNA, ki se nahaja na Ti-plazmidu, kateri vsebuje še gene za virulenco (*vir* geni), razgradnjo opinov in gene za tvorbo rakastih celic (*onc* geni) (Zupan in sod., 2000).

Kromosomski geni (*chv* geni) se nahajajo na bakterijskem kromosomu. Produkti *chvA* in *chvB* genov sodelujejo pri pritrjevanju bakterije na celično steno. *ChvB* kodira protein, ki sodeluje pri sintezi cikličnega glukana, ki sodeluje pri pritrditvi bakterije na rastlinsko celično steno, *chvA* pa kodira protein, ki prenese ciklični β -1,2 glukani v celično steno (Stiekema in Visser, 1991).

Prenos T-DNA uravnava *vir* regije. Ti geni se izražajo samo v območju poškodovanih rastlinskih celic. VirA protein zazna fenolne komponente, ki se sprostito ob poškodbi rastline. Posledica tega je avtofosforilacija virA proteina, ki nato fosforilira virG protein. Modificiran virG protein aktivira ostale *vir* gene. VirD1 in virD2 proteina prepoznata 25 bp dolge mejne sekvence T-DNA in omogočita endonukleazno cepitev enojne verige T-DNA v mejnih sekvencah. Po cepitvi se znotraj mejnih sekvenc sintetizira nova T-veriga. VirD2 se veže na 5' koncu T-verige. Na T-verigo se veže še virE2 protein in nastane T-kompleks, ki se transportira iz bakterijske v rastlinsko celico in se naključno vključi v rastlinski genom (Zupan in Zambryski, 1995).

Ti-plazmid se uporablja kot vektor za prenos želenih genov v rastlinske celice. Iz naravne T-DNA so odstranjeni geni za sintezo opinov in *onc* geni, katere se zamenja z želenimi geni, ostanejo samo mejne sekvence. Tako spremenjeni oz. razoroženi Ti-plazmid ne more inducirati rakaste tvorbe, obdrži pa sposobnost vključitve dela DNA v rastlinski genom (Zambryski in sod., 1983). Glavni napredek pri razvoju vektorjev za transformacije je bilo odkritje, da se lahko vir in T-DNA regije nahajajo ločeno (trans) na dveh plazmidih brez izgube sposobnosti prenosa T-DNA v rastlinsko celico (Hoekema in sod., 1983) in da so za prenos T-DNA pomembne mejne sekvence T-DNA (ki delujejo cis), kar je omogočilo razvoj binarnih vektorjev za prenos tujih genov v rastlinski genom.

2.2.1.1 Seleksijski geni

V večini primerov se transformira le majhen delež rastlinskih celic, zato je potrebno skupaj z želenim genom vnesti še seleksijski gen, s pomočjo katerega lahko ločimo transformirane celice od netransformiranih. Selekcija je lahko pozitivna ali negativna. Pozitivni seleksijski geni so tisti, ki kodirajo protein, običajno encim, ki zagotavlja odpornost na določen seleksijski agens, ki je toksičen za netransformirane celice ali pa spodbuja rast transformiranih celic. Seleksijski agens je lahko antibiotik, herbicid, zdravilo, analog metabolita, vir ogljika ali prekurzor fitohormonov. Primer najbolj pogosto uporabljenega gena je *nptII* za odpornost na antibiotik kanamicin, ki ovira sintezo proteinov in je toksičen za netransformirane celice. Negativni seleksijski geni povzročijo propad transformiranih celic (Miki in McHugh, 2004). Izbrati je potrebno koncentracijo antibiotika oz. seleksijskega agensa, ki popolnoma prepreči regeneracijo na neokuženih izsečkih in hkrati čim bolj zmanjša število netransformiranih regenerantov, ki se razvijejo na ko-kultiviranih izsečkih zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic (Park in sod., 1998).

Uporaba seleksijskih genov za odpornost na antibiotike in rezistenco na herbicide daje največ pomislekov za komercialno uporabo transgenih rastlin. Prenos DNA med transgenimi rastlinami in ostalimi organizmi je malo verjeten, *nptII* gen ne pomeni nobenega tveganja za zdravje ljudi in živali (Fuchs in sod., 1993), vseeno pa bi bila popolna odstranitev seleksijskega gena zaželjena, saj po končani selekciji seleksijskih genov ne potrebujemo več, verjetno bi pripomogla tudi k večji sprejemljivosti gensko spremenjenih rastlin. Obstaja že kar nekaj uspešnih metod odstranitve teh genov (Afolabi, 2007).

2.2.1.2 Markerski geni

Markerski ali testni geni so geni, pri katerih je možno genski produkt vizualno prepoznati in določiti kje se nahaja (Bohanec, 2004). Omogočajo nam hitrejšo identifikacijo transformiranih tkiv. Uporabni so lahko tudi markerski geni, katere je mogoče zaznati s

pomočjo drugih čutov, kot sta okus (Witty, 1989) ali vonj. Najpogosteje uporabljen markerski gen je *gusA* gen za β -glukuronidazo iz *Escherichia coli* (Miki in McHugh, 2004). Rastlinske celice ne kažejo endogene aktivnosti GUS encima, zato lahko njegovo aktivnost določimo histokemično z modrim obarvanjem, kvantitativno pa jo lahko merimo tudi fluorometrično (Jefferson in sod., 1987). Pomanjkljivost tega sistema pa je, da tkivo z analizo uničimo.

Zelo pogosto se uporabljajo geni za sintezo fluorescentnih proteinov, kot je na primer zeleno fluorescentni protein (GFP), ki imajo v primerjavi z ostalimi markerskimi geni več prednosti, saj jih lahko vizualno detektiramo v živih celicah brez uporabe invazivnih postopkov z uporabo substratov in produktov, ki bi lahko difundirali v ali med celice. Transformirane celice, v katerih se ti geni izražajo, je mogoče identificirati v kratkem času po transformaciji in določiti, ali se delijo (Harper in sod., 1999). Fluorescentni proteini v fuziji s katerikoli proteini omogočajo spremljanje lokacije, gibanja in aktivnosti proteinov v živih celicah. Uporabni so kot markerji za sledenje in določanje proteinov, ugotavljanje interakcij med proteini in spremljanje usode proteinov v celici (Lippincott-Schwartz in Patterson, 2003). Fluorescentne proteine bi lahko uporabljali tudi za spremljanje usode transgenov, vnešenih v kmetijske rastline in njihove vplive na okolje (Stewart, 2005).

Med fluorescentnimi proteini je najbolj znan zeleno fluorescentni protein (GFP) iz meduze *Aequorea victoria* (Haseloff in Amos, 1995), ki pod osvetlitvijo z dolgovalovno UV svetlobo oddaja zeleno fluorescenco. Divji tip *gfp* gena je bil modificiran tako, da se učinkovito izraža v rastlinah, ima spremenjene spektralne lastnosti in izboljšano fluorescenco (Haseloff in sod., 1997; Reichel in sod., 1996).

Rdeče fluorescentni protein DsRED je bil izoliran iz korale (*Discosoma* sp.) in ga je, v primerjavi z GFP, z uporabo ustreznih filtrov mogoče lažje ločiti od avtofluorescence klorofila (Matz in sod., 1999). *DsRed* gen je uporaben kot markerski gen za prehodno in stabilno transformacijo pri tobaku in je v kombinaciji z *gfp* genom primeren za hkratno spremljanje izražanja dveh genov (Jach in sod., 2001).

Odkritih je bilo že veliko fluorescentnih proteinov, ki so uporabni pri študijah genskih transformacij. Kot markerski geni so se zelo uspešno izkazali geni za sintezo oranžno fluorescentnih proteinov, še posebej TdTomato-ER, ki med vsemi fluorescentnimi proteini fluorescira najsvetleje, sledi pa mu mOrange-ER (Mann in sod., 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za transformacijo smo uporabili liste mikropropagirane sorte tobaka Havana 38.

3.2 SESTAVA GOJIŠČ

MS bazalno gojišče za rast in mikropropagacijo rastlin tobaka (Murashige in Skoog, 1962):

makro- in mikroelementi	4,3 g/l
tiamin	2 mg/l
piridoksin	1 mg/l
nikotinska kislina	1 mg/l
saharoza	30 g/l
agar	8 g/l
pH 5,8	

MSr gojišče za regeneracijo rastlin tobaka (Stolarz in sod., 1991):

makro- in mikroelementi	4,3 g/l
Fe-Na ₂ -EDTA	0,1 mg/l
saharoza	30 g/l
inozitol	0,1 g/l
tiamin	0,1 mg/l
BAP	1,0 mg/l
NAA	0,1 mg/l
agar	8 g/l
pH 5,8	

YEB gojišče za rast *A.t.* LBA4404:

saharoza	5 g/l
pepton	5 g/l
goveji ekstrakt	5 g/l
kvasni ekstrakt	1 g/l
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1 g/l
agar	15 g/l
pH 7,0	

3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ

Sestavine gojišč, razen agarja, smo zatehtali v čašo in jih prelili z bidestilirano vodo. Raztopili smo jih s pomočjo magnetnega mešalnika, nato smo dodali vitamine in hormone

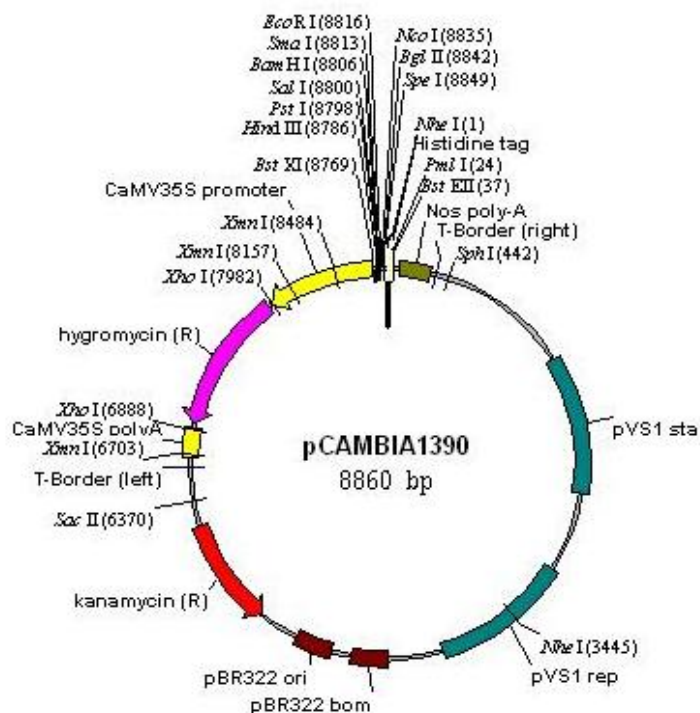
iz založnih raztopin. S pH metrom smo izmerili pH in ga uravnali na želeno vrednost z dodajanjem 1N KOH ali 1N HCl. Volumen smo umerili z merilno bučo in prelili v steklenice za avtoklaviranje, v katere smo predhodno zatehtali agar. Gojišča smo avtoklavirali 20 min pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po avtoklaviranju smo gojišča ohladili na približno 38 °C. V brezprašni komori smo jim filtrsko dodali antibiotike (25 mg/l higromicin oz. 300 mg/l kanamicin), jih temeljito premešali in razlili v sterilne petrijevke velikosti 90 × 15 mm in v sterilne steklenice s polipropilenskimi pokrovi velikosti 75 × 55 mm.

3.4 BAKTERIJA IN PLAZMIDI

Za vnos genov v tobak smo izbrali komercialno bakterijo *A. t.* sev LBA4404, v katero je bil z elektroporacijo vnesen modificiran plazmid pCAMBIA1390-DsRed (Cambia, 1997; Škof, 2008) oz. plazmid pART27 2mgfp5-ER.

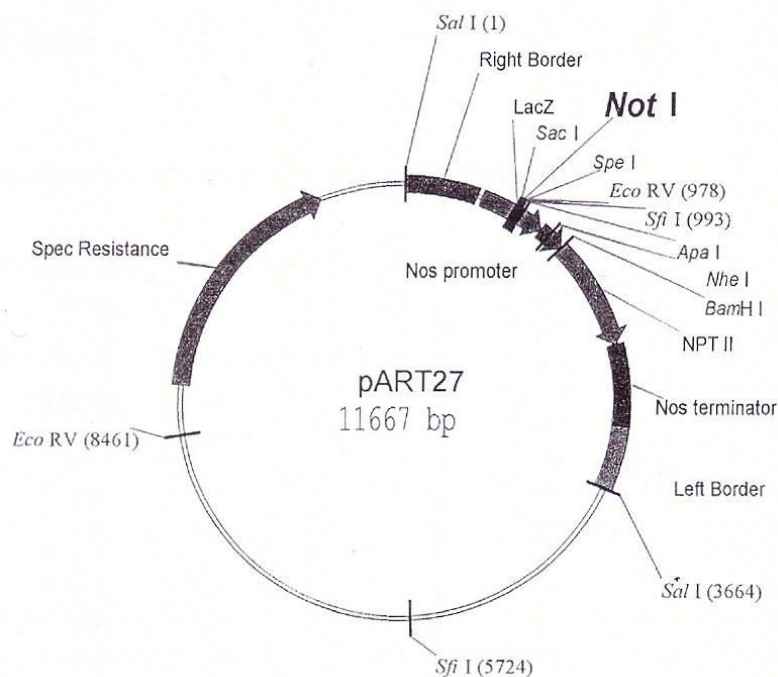
Za pripravo plazmidnega vektorja z *DsRed* markerskim genom je bil uporabiljen gen za DsRED-EXPRESS iz plazmida pDsRed-Express (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, ZDA), ki je bil opremljen s konstitutivnim CaMV35S promotorjem iz vektorja pBIN m-gfp5-ER in vključen v plazmidni vektor pCAMBIA1390 (Cambia, Canberra, Avstralija) (Škof, 2008) (slika 1). Plazmid pCAMBIA1390 vsebuje rastlinski selekcijski *hptII* gen za odpornost na antibiotik higromicin za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv in selekcijski *nptII* gen za odpornost na antibiotik kanamicin za selekcijo transformiranih bakterij. pUC18 polilinker z *lacZα* je nadomeščen z enostavnejšim pUC9 polilinkerjem, ki ne vsebuje start in stop kodona. V takšni obliki je plazmid primernejši za PCR analizo in izražanje gena oz. genov (Hajdukiewicz in sod., 1994; Cambia, 1997).

Plazmid pDsRed-Express vsebuje gen *DsRed-EXPRESS*, ki je oblika rdeče fluorescentnega proteina DsRED iz korale *Discoscoma* sp.



Slika 1: Plazmid pCambia1390 (Cambia, 1997)

Plazmid pART27 2mgfp5-ER je binarni vektor, ki so ga pripravili v laboratoriju prof. dr. C. C. Eady-ja (inštitut Crop and Food Research, Christchurch, Nova Zelandija) tako, da so v plazmidni vektor pART27 (slika 2) na mestu *Spe*I v multiplo mesto za kloniranje (MCS) vključili dve ponovitvi gena *mgfp5-ER* iz vektorja pBIN m-*gfp5-ER*. Vektor pART27 vsebuje selekcijski gen *spec* za odpornost na antibiotik spektinomycin za selekcijo transformiranih bakterij in gen *nptII* za odpornost na aminoglikozidne antibiotike geneticin in kanamicin za selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv (Gleave, 1992).

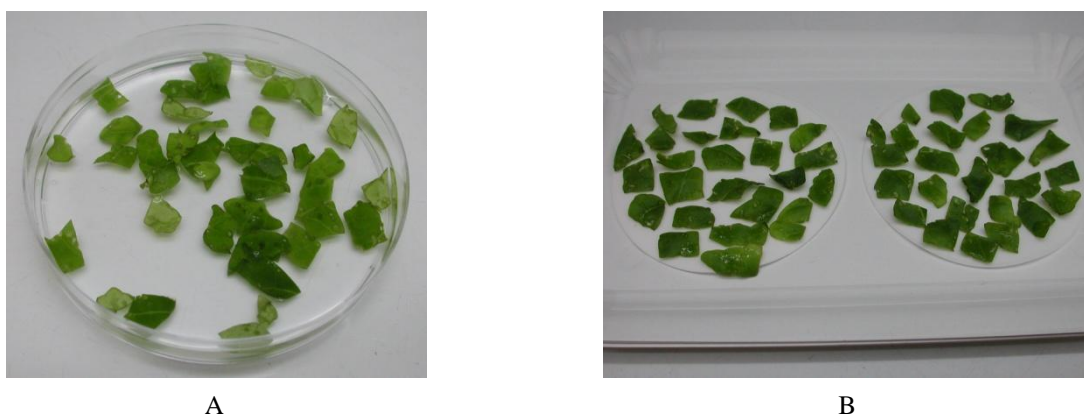


Slika 2: Plazmid pART27 (Gleave, 1992)

3.5 TRANSFORMACIJA TOBAKA

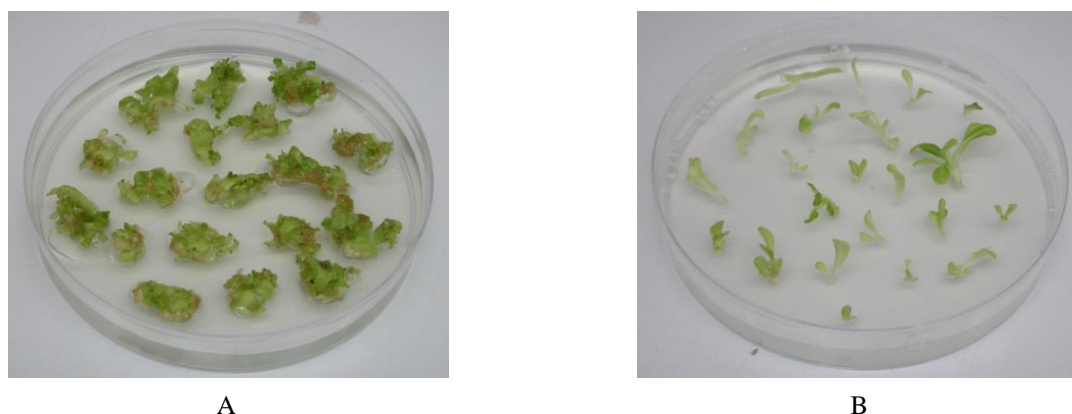
Transformacijo tobaka z *A. t.* smo izvedli po nekoliko modificirani metodi transformacije listov po Horsch in sod. (1985) ter Fisher in Guiltinan (1995). Liste tobaka smo s sterilnim skalpelom v brezprašni komori narezali na izsečke velikosti približno 1 cm². Za plazmid pCAMBIA1390-DsRed smo pripravili 105 izsečkov iz listov, za plazmid pART27 2mgfp5-ER pa 103 izsečke.

Bakterijsko suspenzijo *A. t.* z vključenim plazmidom smo centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/min, nato smo odlili supernatant, pelet pa prelili s tekočim ½ *MS* gojiščem za tobak. Izsečke listov tobaka smo v petrijevkah inkubirali približno 20 min v suspenziji *A. t.*, nato smo jih na sterilnem filtrskem papirju v brezprašni komori rahlo osušili in jih ko-kultivirali na *MSr* gojišče z dodatkom 100 µM acetosiringona. Po treh dneh ko-kultivacije smo jih dvakrat sprali v raztopini antibiotika timentin 200 mg/l [100:1 (w/w) tikarcilin : klavulonska kislina] in jih zračno osušili (slika 3).



Slika 3: Izsečki listov tobaka: A – v suspenziji *A. t.*; B – na filtrskem papirju

Nato smo izsečke listov prestavili na selekcijsko *MSr* gojišče z dodatkom ustreznega antibiotika. Izbrali smo najmanjšo še učinkovito koncentracijo selekcijskih antibiotikov, t.j. 25 mg/l antibiotika higromicin za selekcijo transformantov tobaka po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-DsRed ter 300 mg/l antibiotika kanamicin po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER. Izsečke smo gojili v rastni komori pri 16/8 urni fotoperiodi in temperaturi 24 ± 1 °C ter osvetlitvi $40 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Po petih tednih smo izsečke prestavili oz. subkultivirali na ustrezno sveže selekcijsko *MSr* gojišče. Nastale regenerante smo prestavili na *MS* gojišče z dodanim ustreznim selekcijskim antibiotikom (slika 4A in 4B). Po desetih tednih smo regenerante, ki so uspešno rastle, prestavili na ustrezno selekcijsko *MS* gojišče v steklenice s pokrovom, velikosti 75×55 mm. Regenerante, ki so slabo rastle, pa smo prestavili na *MS* gojišče brez selekcijskih antibiotikov.



Slika 4: Regeneracija in subkultivacija tobaka: A – regeneracija listnih izsečkov na selekcijskem *MSr* gojišču; B – subkultivirani regeneranti na selekcijskem *MS* gojišču

3.6 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA

Za kontrolni poskus z neokuženimi listi tobaka smo pripravili po štiri petrijevke z desetimi izsečki listov velikosti približno 1 cm². Gojili smo jih na *MSr* gojišču brez oz. z dodatkom različnih antibiotikov (preglednica 1), pri enakih pogojih kot transformirane izsečke in regenerante.

Preglednica 1: Sestava gojišč kontrolnega poskusa z neokuženimi listi tobaka

Oznaka:	Gojišče:
K1	<i>MSr</i>
K2	<i>MSr</i> , acetosiringon 100 µM
K3	<i>MSr</i> , higromicin 25 mg/l
K4	<i>MSr</i> , kanamicin 300 mg/l
K5	<i>MSr</i> , timentin 150 mg/l

3.7 FENOTIPSKO IZRAŽANJE *DsRed* IN *gfp* GENA

Izražanje fluorescentnih markerskih genov smo po okužbi opazovali na začetku oblikovanja globul (zametkov). Transformirane izsečke tobaka smo pregledali z epifluorescentnim mikroskopom (Nikon SMZ 1000) pri 20 kratni povečavi in ustreznimi filtri za detekcijo rdeče fluorescence *DsRed* gena in zelene fluorescence *gfp* gena. Za detekcijo rdeče fluorescentnega proteina DsRED-EXPRESS (plazmid pCAMBIA1390-*DsRed*), ki ima ekscitacijski maksimum pri 557 nm in emisijski maksimum pri 579 nm, smo uporabili set filtrov z EX 546/10 nm, DM 575 nm in BA 620 nm. Za detekcijo zelene fluorescentnega proteina m-GFP5-ER (plazmida pART27 2mgfp5-ER), ki ima ekscitacijski maksimum pri 484 in emisijski maksimum pri 510 nm, smo uporabili set filtrov z EX 480/40 nm, DM 505 nm in BA 535/50 nm.

3.8 ANALIZA PRISOTNOSTI *DsRed* IN *gfp* GENA S PCR METODO

Za DNA analizo prisotnosti transgenov v regenerantih tobaka smo izolirali celokupno DNA, izmerili koncentracijo izolirane DNA, pripravili redčitve na 20 ng/µl, naredili verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in analizo namnoženih fragmentov z agarozno gelsko elektroforezo.

3.8.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva

Celokupno genomsko DNA smo izolirali iz listov transformiranih regenerantov tobaka in regenerantov, ki so dobro uspevali le na gojiščih brez selekcijskih antibiotikov, po metodi

Kump in sod. (1992). V terilnico smo položili ustrezno količino listov, jih prelili z 800 μ l na 68 °C segretega CTAB pufra in zdrobili v terilnici. Nastalo suspenzijo smo prelili v označeno mikrocentrifugirko in inkubirali 1,5 ure pri 68 °C. Suspenziji smo dodali 700 μ l topila kloroform : izoamilalkohol (24:1), močno premešali in centrifugirali 10 min pri 11000 obratih/min. Supernatant smo odpipetirali v svežo označeno mikrocentrifugirko, dodali 70 μ l 3 M Na-acetata pH 5,2 in 700 μ l ledeno mrzlega izopropanola ter dobro premešali. Vzorce smo inkubirali 20 min v zamrzovalniku pri -20 °C. Ponovno smo jih centrifugirali 10 min pri 11000 obratih/min. Nato smo odlili supernatant, dodali 500 μ l 70% etanola in premešali. Po 20-ih min smo odlili in s pipeto odstranili ves etanol in pelet DNA posušili pri sobni temperaturi. Dodali smo 40 μ l pufra TE in vzorce čez noč shranili v hladilniku pri 4 °C, nato pa v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.8.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom

Koncentracijo izolirane DNA v raztopini smo izmerili s pomočjo DNA fluorometra DyNA Quant™ 200 (GE Healthcare). Delovno raztopino smo pripravili iz 10 \times TNE pufra [0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 7)] in ji dodali barvilo Hoechts 33258 v končni koncentraciji 0,1 μ g/ml. Za kalibracijo fluorometra smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 \times TNE pufri). Za vsak vzorec DNA smo v kiveto dodali 2 ml pripravljene delovne raztopine in 2 μ l DNA vzorca, premešali ter izmerili koncentracijo DNA. DNA vzorcev smo redčili na 20 ng/ μ l.

3.8.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Specifično namnoževanje *DsRed* in *gfp* gena je potekalo v dupleks PCR reakciji z uporabo dveh parov začetnih oligonukleotidov (preglednica 2). Za analizo vključitve *DsRed* in *hptII* gena v rastlinski genom po transformaciji z *A. t.* s plazmidom pCAMBIA1390-*DsRed* smo uporabili kombinacijo REDfor/RED2right in HPTII-for/HPTII-rev1 začetnih oligonukleotidov. Kombinacijo GFP1a/GFP1b in NPTII1a/NPTII1b začetnih oligonukleotidov pa smo uporabili za analizo vključitve *mgfp5-ER* in *nptII* gena po transformaciji z *A. t.* s plazmidom pART27 2mgfp5-ER.

PCR reakcijske mešanice smo pripravljali v brezprašni komori. V PCR mikrocentrifugirke smo odpipetirali 5 μ l DNA vzorca. Vzorce smo centrifugirali do 1000 obratov/min in dodali 1 \times PCR puffer [10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,08 % Nonidet P40] (Fermentas), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM vsakega deoksinukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 4 \times 0,5 μ M ustreznega začetnega oligonukleotida in 0,5 enote encima Taq DNA polimeraza (Fermentas). Končni volumen reakcijske mešanice, v katerem je potekalo namnoževanje DNA, je bil 25 μ l. PCR reakcija je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, ZDA) po modificiranem temperaturnem vzorcu (Lakshmi in sod., 1998):

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

Pred nadaljnjo analizo smo vzorce hranili pri 12 °C.

Preglednica 2: DNA zaporedja začetnih oligonukleotidov za posamezen transgen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta

Začetni oligonukleotid	Zaporedje 5' - 3'	Pričakovana dolžina fragmenta
GFP1a	AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT G	422 bp
GFP1b	TTG TGG CGG GTC TTG AAG TTG G	
REDfor	AGG ACG TCA TCA AGG AGT TCA T	211 bp
RED2right	GTG CTT CAC GTA CAC CTT GGA G	
HPTII-for	ATG ACC GCT GTT ATG CGG CCA TTG	641 bp
HPTII-rev1	AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG ACG	
NPTIIIa	GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG	650 bp
NPTIIIb	ATG GGG AGC GGC GAT ACC GTA	

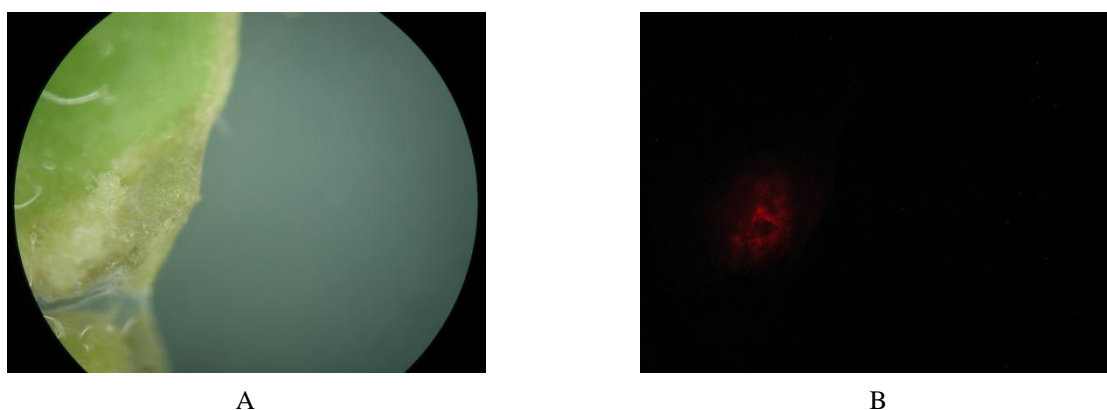
3.8.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno gelsko elektroforezo

Za ločevanje fragmentov DNA smo uporabili horizontalno elektroforezo v 1,4 % gelu [1,4 % SeaKem LE agaroz (Cambrex, ZDA), 1 × TBE pufer, etidijev bromid 0,5 µg/ml], ki smo ga namestili v elektroforetsko posodo (Bio Rad Sub-Cell, model 192) in prelili z 1 × TBE pufrom [890 mM Tris, 890 mM borna kislina, 10 mM EDTA]. Vzorcem smo dodali 5 µl nanašalnega barvila BPB [12,5 % (w/v) ficol 400, 0,2 % (w/v) bromfenol modro, 6,7 % (v/v) 10 × TBE], premešali in 17 µl vzorca nanесли na agarozni gel. Na gel smo poleg vzorcev nanесли še DNA izolirano iz kontrole (netransformiran tobak), ustrezní čistí plazmid (izoliran iz *E. coli*), slepi vzorec (vse komponente reakcijske mešanice razen DNA, namesto katere smo dodali 5 µl vode) in velikostni standard (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) s 14 fragmenti: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 bp). Elektroforeza je potekala pri 140 V v anodni smeri približno 1 uro in 30 min. Gel je vseboval 0,5 µg/ml etidijev bromid, ki je v kompleksu z dvovertžnimi DNA molekulami omogočal njihovo detekcijo pod UV svetlobo (302 nm). Gele smo opazovali s pomočjo transiluminatorja TMF-30 (UVP Inc., Velika Britanija) in jih fotografirali z digitalnim fotoaparatom.

4 REZULTATI

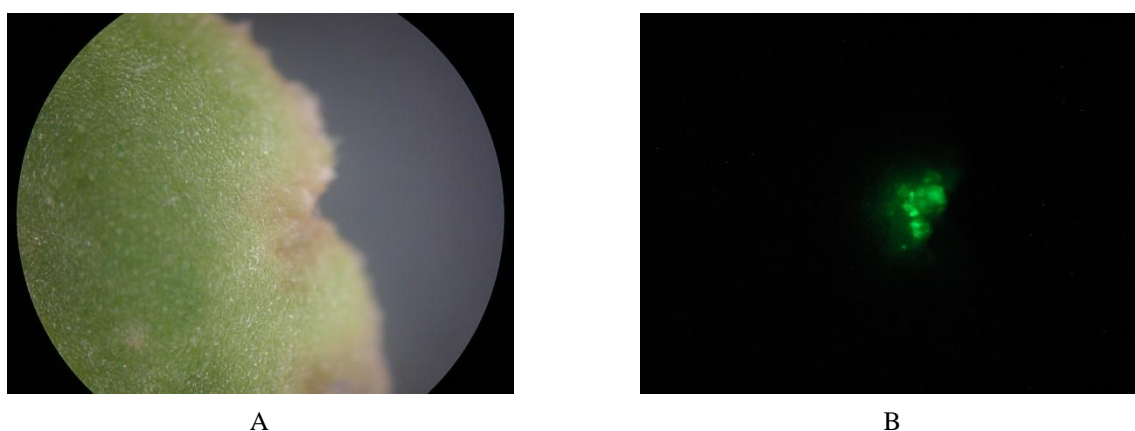
4.1 FENOTIPSKO IZRAŽANJE *DsRed* IN *gfp* GENA

Z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznimi filtri za detekcijo rdeče fluorescence *DsRed* gena smo pregledali 105 izsečkov tobaka po transformaciji z *A. t.*-pCAMBIA1390-DsRed. Pri vseh smo opazili izražanje rdeče fluorescence DsRED-EXPRESS proteina (slika 5).



Slika 5: Izražanje rdeče fluorescence DsRED-EXPRESS proteina v transformiranih izsečkih tobaka opazovanih z epifluorescentnim mikroskopom: A - pod navadno svetlobo; B - s fluorescentno lučko in ustreznimi filtri za detekcijo rdeče fluorescence

Z epifluorescentnim mikroskopom in ustreznimi filtri za detekcijo zelene fluorescence *gfp* gena smo pregledali 103 izsečke tobaka po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER. Prav tako smo pri vseh opazili izražanje zelene fluorescence m-GFP5-ER proteina (slika 6).



Slika 6: Izražanje zelene fluorescence m-GFP5-ER proteina v transformiranih izsečkih tobaka opazovanih z epifluorescentnim mikroskopom: A - pod navadno svetlobo; B - s fluorescentno lučko in ustreznimi s filtri za detekcijo zelene fluorescence

4.2 REGENERACIJA LISTNIH IZSEČKOV TOBAKA

Po petih tednih smo opazili že veliko število regenerantov. Regenerante z listnih izsečkov, pri katerih smo opazili fenotipsko izražanje vnešenih fluorescentnih genov, smo predstavili na *MS* gojišče z dodanim ustreznim selekcijskim antibiotikom. Po desetih tednih smo regenerante, ki so slabo rastle, predstavili na *MS* gojišče brez dodanih antibiotikov, ostale pa na sveže ustrezno *MS* selekcijsko gojišče. Število preživelih in propadlih regenerantov je podano v preglednici 3.

Preglednica 3: Število preživelih in propadlih regenerantov tobaka na ustreznem selekcijskem oz. neselekcijskem *MS* gojišču po transformaciji z *A.t.* in plazmidom pCAMBIA1390-DsRed oz. plazmidom pART27 2mgfp5-ER

Regeneranti	Število regenerantov			
	na selekcijskem gojišču		na gojišču brez selekcije	
	pCAMBIA1390- DsRed	pART27 2mgfp5- ER	pCAMBIA1390- DsRed	pART27 2mgfp5- ER
Preživeli	101	152	38	9
Propadli	10	2	0	5

Preglednica 4: Odstotek preživelih regenerantov tobaka na ustreznem selekcijskem *MS* gojišču po transformaciji z *A.t.* in plazmidom pCAMBIA1390DsRed oz. plazmidom pART27 2mgfp5-ER

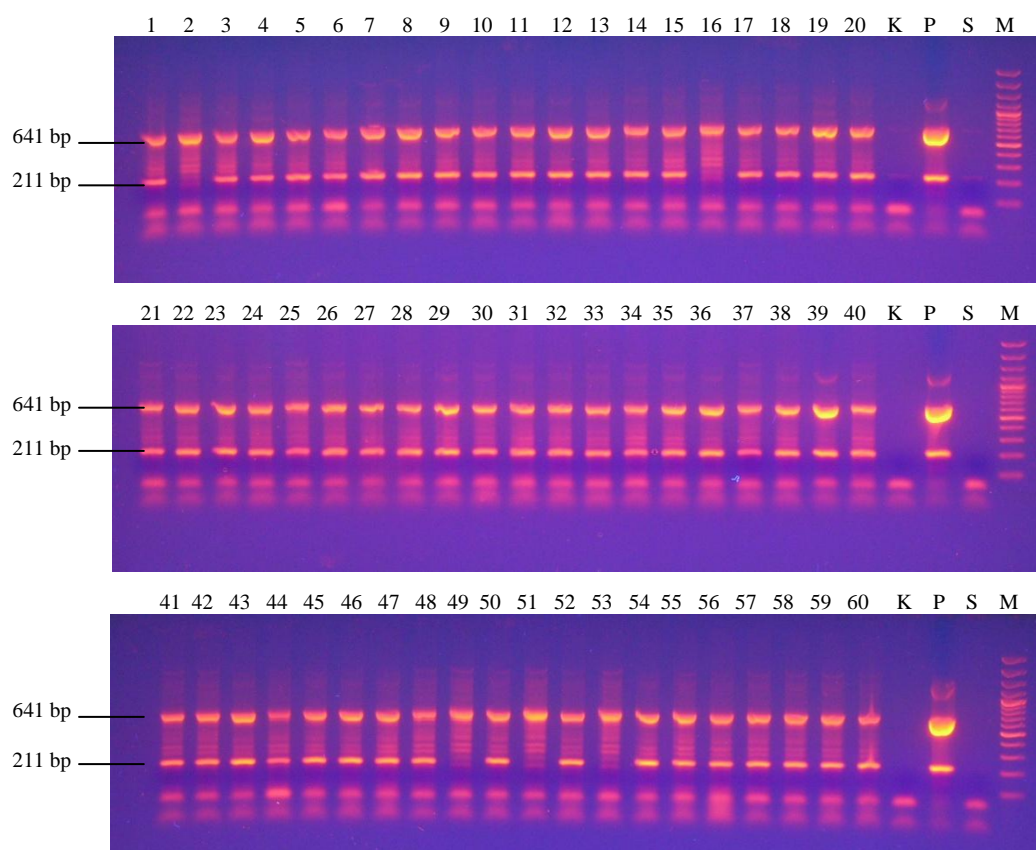
Plazmid	Število regenerantov		Odstotek preživelih regenerantov
	nastalih	preživelih	
pCAMBIA1390- DsRed	111	101	91,0
pART27 2mgfp5-ER	154	152	98,7

Na 105 izsečkih smo po transformaciji z *A. t.*-pCAMBIA1390-DsRed dobili 148 regenerantov. Po subkultivaciji na selekcijsko *MS* gojišče s 25 mg/l higromicina, je uspešno rastle 91,0 % regenerantov (preglednica 4). Na gojišču brez selekcije je uspešno rastle 38 regenerantov, propadel ni noben (preglednica 3). Z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER transformiranih 103 izsečkov tobaka smo dobili 169 regenerantov. Na selekcijskem *MS* gojišču s 300 mg/l kanamacina jih je uspešno rastle kar 152 (98,7 %), 2 sta propadla. Na gojišču brez selekcije jih je uspešno rastle 9, propadlo jih je 5 (preglednica 3 in 4).

4.3 MOLEKULSKA ANALIZA VKLJUČENOSTI *DsRed* in *hptIII* TER *mgfp5-ER* in *nptII* GENOV S PCR METODO

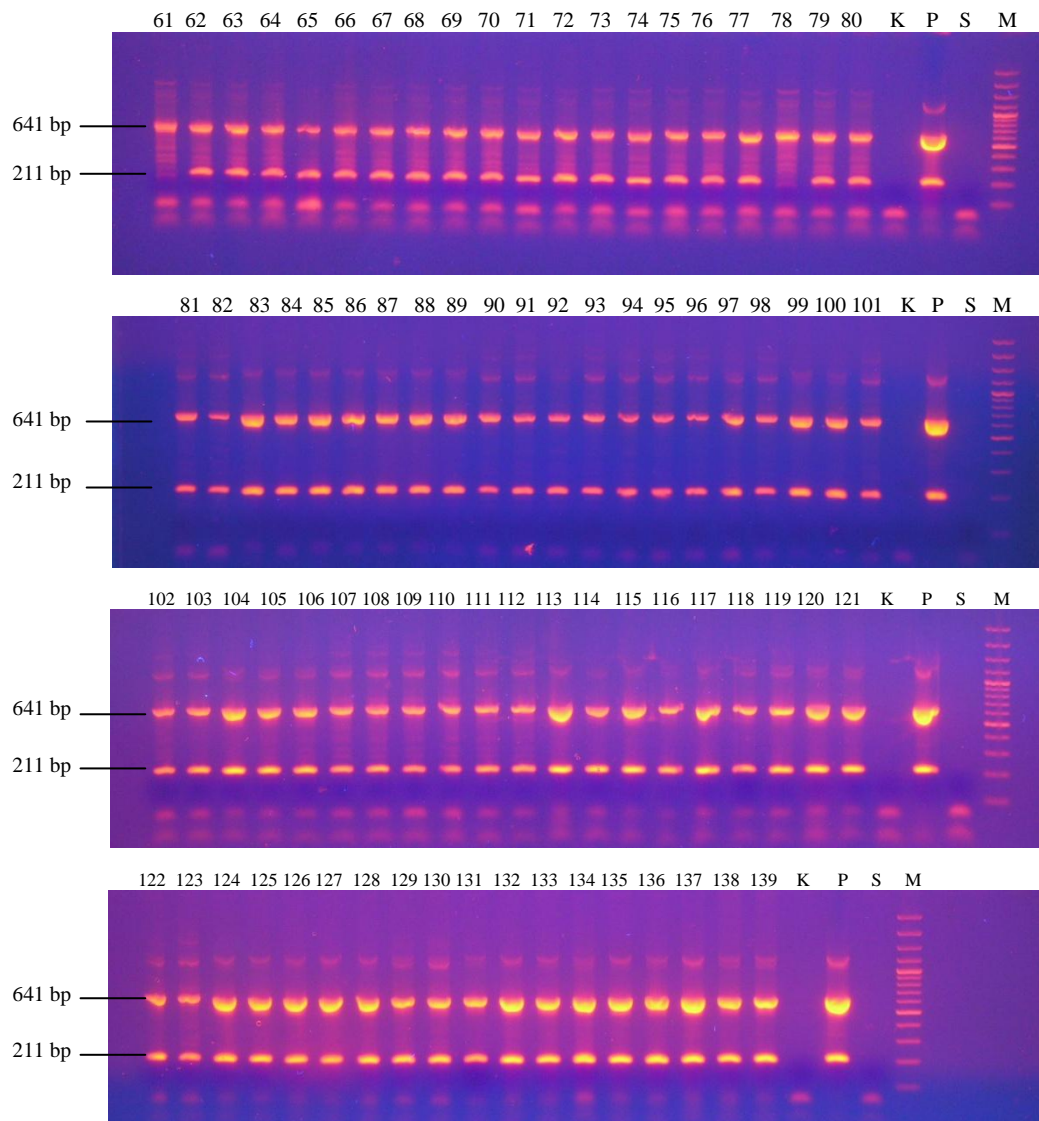
Genomsko DNA smo izolirali iz listov regenerantov tobaka, ki so uspešno rastle na ustreznem selekcijskem MS gojišču. Izolirali smo tudi DNA iz listov regenerantov, ki niso uspešno rastle na selekcijskem gojišču, so pa rastle na gojišču brez dodanih selekcijskih antibiotikov. Pri regenerantih, ki so bili zelo majhni, smo DNA izolirali iz cele rastline. DNA analizo smo opravili na vseh 300 preživelih regenerantih (preglednica 3).

Pri vseh regenerantih tobaka, transformiranih z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed*, ki so rastle na selekcijskem gojišču (vzorci 1-101) in regenerantih, ki so rastle na neselekcijskem gojišču (vzorci 102-139) smo ugotovili prisotnost fragmenta dolžine 641 bp (selekcijski *hptIII* gen). Pri vzorcih 2, 16, 49, 51, 53, 61 in 78 smo ugotovili samo prisotnost fragmenta dolžine 641 bp, ne pa tudi prisotnost fragmenta dolžine 211 bp, kateri bi potrdil prisotnost markerskega *DsRed* gena. Pri vseh ostalih vzorcih (95,0 %) sta se namnožila oba transgena (slika 7 in preglednica 5).



se nadaljuje

nadaljevanje

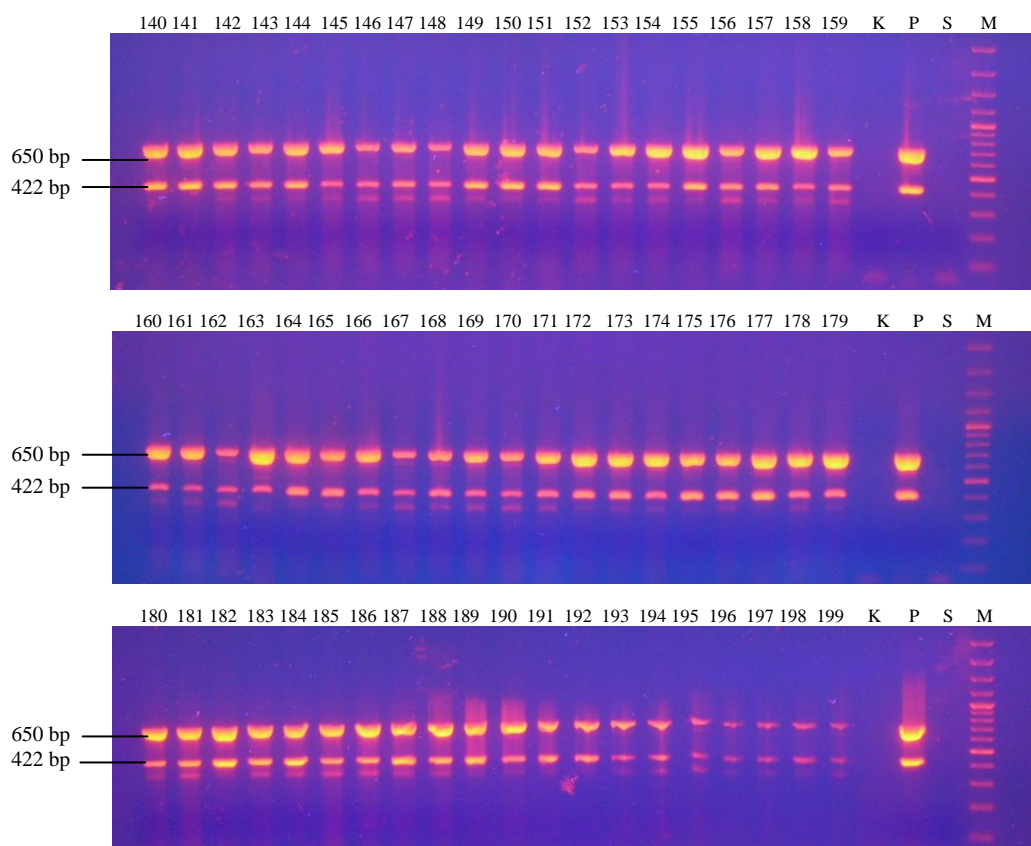


Slika 7: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za *DsRed* gen (211 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za *hptII* gen (641 bp). 1-101 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastli na selekcijskem gojišču, 102-139 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastli na neselekcijskem gojišču, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pCAMBIA1390-DsRed, S – slepi vzorec, M – velikostni standard

Preglednica 5: Število in odstotek regenerantov tobaka po transformaciji z *A. t.*-pCAMBIA1390-DsRed

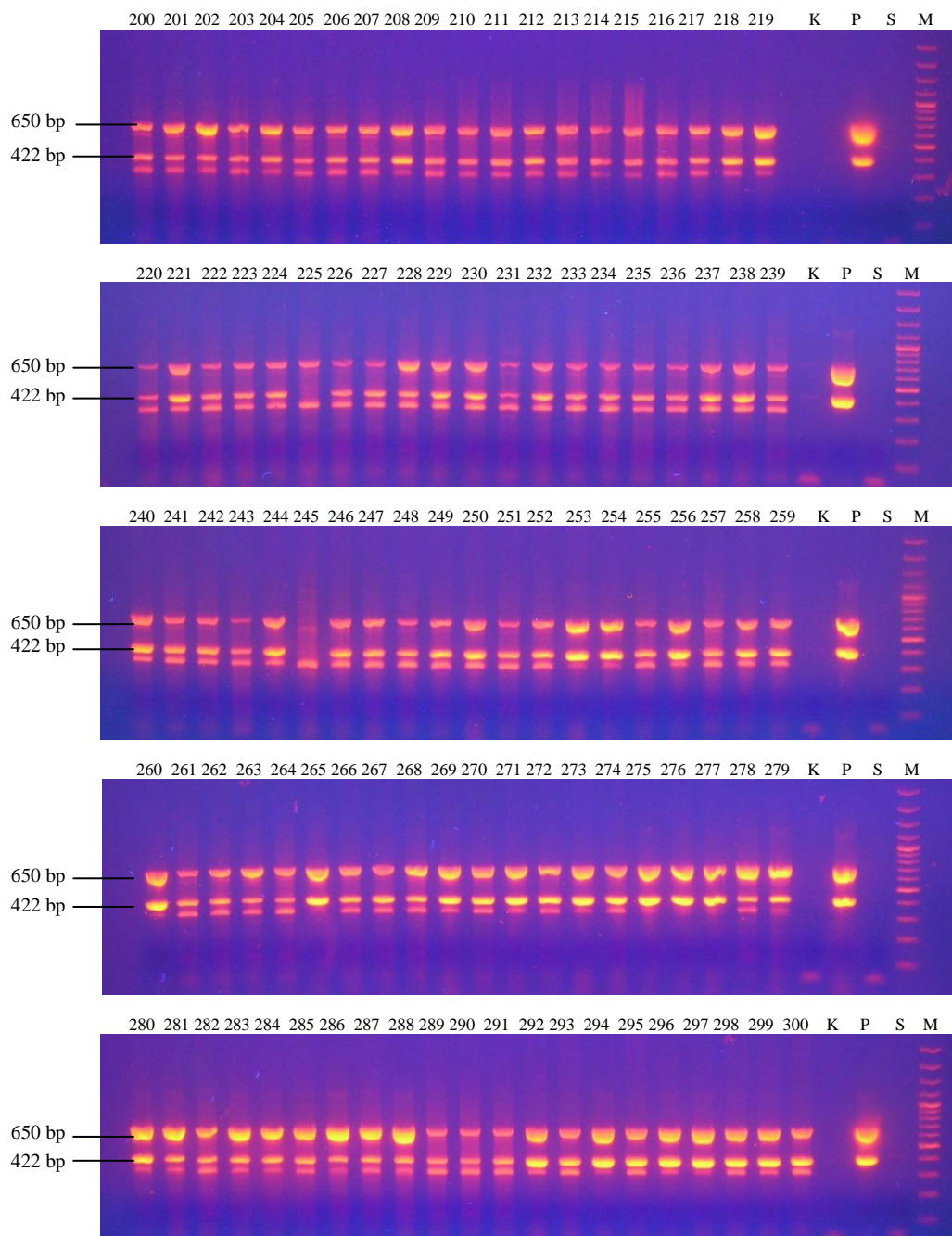
Število regenerantov na <i>MS</i> gojišču	Število oz. odstotek transgenov							
	<i>DsRed</i> in <i>hptII</i>		<i>DsRed</i>		<i>hptII</i>		brez	
	število	odstotek	število	odstotek	število	odstotek	število	odstotek
101 na selekciji	94	93,1	0	0,0	7	6,9	0	0,0
38 brez selekcije	38	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
139 skupaj	132	95,0	0	0,0	7	5,0	0	0,0

Pri vseh regenerantih tobaka, transformiranih z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, ki so rastle na neseleksijskem gojišču (vzorci 292-300), smo ugotovili prisotnost fragmenta dolžine 422 bp (markerski *m-gfp5-ER* gen) in 650 bp (seleksijski *nptII* gen). Pri vseh regenerantih, ki so rastle na seleksijskem gojišču (vzorci 140-291), razen pri vzorcu 225 in 245, katera sta imela namnožen le fragment dolžine 650 bp, smo prav tako potrdili prisotnost obeh transgenov. Pri vzorcu 245 se je namnožil fragment nekoliko manjši od 650 bp značilen za *gfp* gen. Tu je verjetno prišlo do delecije posameznega nukleotida oz. nukleotidov. Uspešnost transformacije za oba transgena skupaj je bila 98,8 % (slika 8 in preglednica 6).



se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 8: Namnoženi fragmenti DNA v dupleks PCR reakciji s parom začetnih oligonukleotidov za *mgfp5-ER* gen (422 bp) in parom začetnih oligonukleotidov za *nptII* gen (650 bp). 140-291 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastle na selekcijskem gojišču, 292-300 - transformirani regeneranti tobaka, ki so rastle na neselekcijskem gojišču, K – kontrola – netransformiran tobak, P – plazmid pART27 2mgfp5-ER, S – slepi vzorec, M – velikostni standard

Preglednica 6: Število in odstotek regenerantov tobaka po transformaciji z *A. t.*- pART27 2mgfp5-ER

Število regenerantov na MS gojišču	Število oz. odstotek transgenov							
	<i>gfp</i> in <i>nptII</i>		<i>gfp</i>		<i>nptII</i>		brez	
	število	odstotek	število	odstotek	število	odstotek	število	odstotek
152 na selekciji	150	98,7	0	0,0	2	1,3	0	0,0
9 brez selekcije	9	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
161 skupaj	159	98,8	0	0,0	2	1,2	0	0,0

4.4 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTI TOBAKA

Izsečke listov tobaka smo pregledali pet tednov po inokulaciji (slika 9).

K1 - MSr gojišče brez dodatkov:

Izsečki so se povečali, opazili smo veliko število regenerantov, nekateri so že imeli po dva do tri liste. Izsečki in regeneranti so bili zeleni.

K2 – MSr gojišče z dodatkom acetosiringona 100 µM:

Izsečki in regeneranti so bili enako veliki kot pri K1, bili so zeleni. Regenerantov je bilo veliko.

K3 – MSr gojišče z dodatkom antibiotika timentin 150 mg/l:

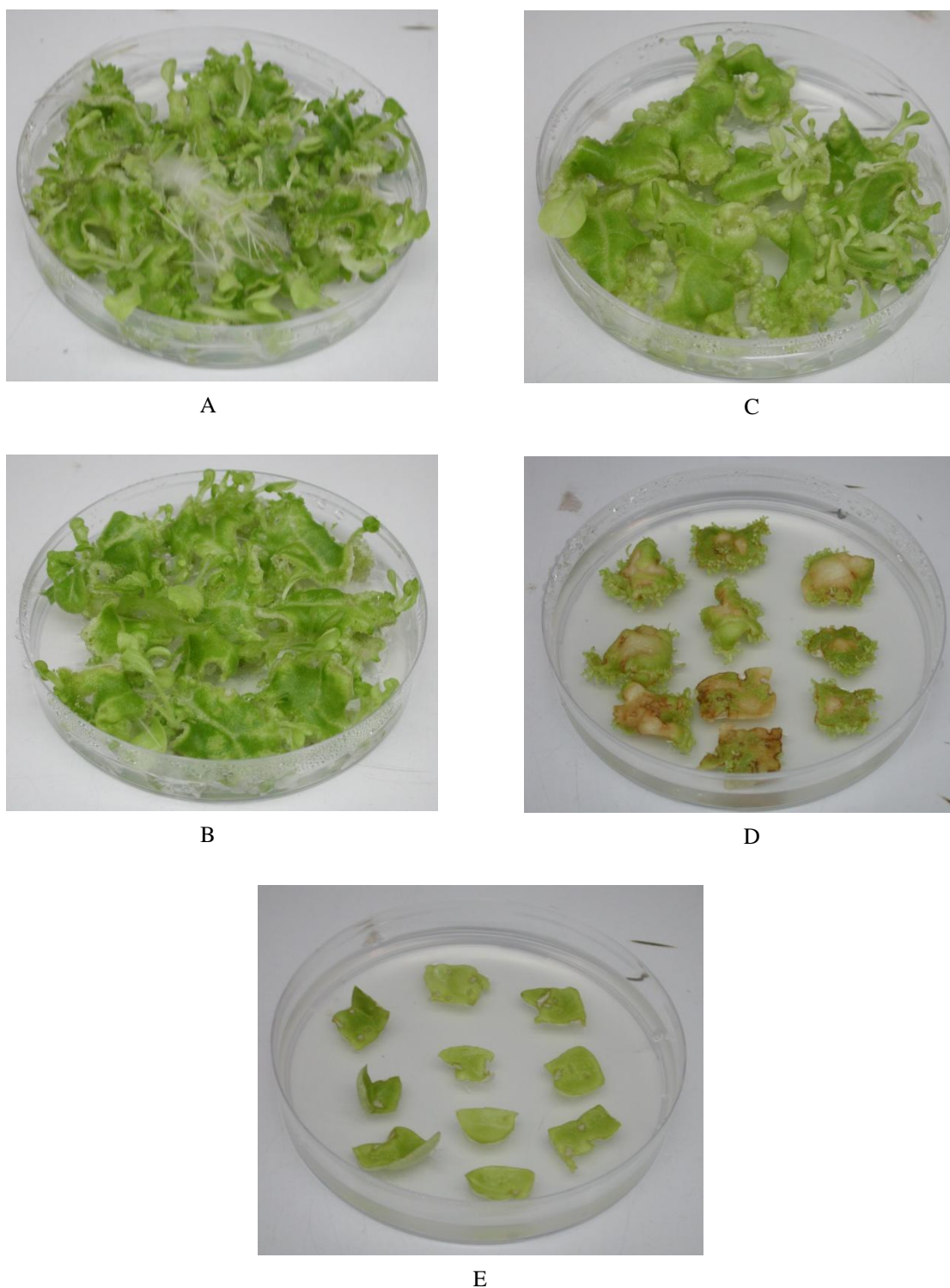
Izsečki so bili povečani in zelene barve kot pri K1. Imeli so veliko regenerantov, kateri so že imeli po dva do tri liste.

K4 – MSr gojišče z dodatkom antibiotika higromicin 25 mg/l:

Izsečki so slabo rastle, postali so svetlo zeleni, pojavile so se nekroze. Opazili smo manjše število zametkov za regenerante, ki so propadali.

K5 – MSr gojišče z dodatkom antibiotika kanamicin 300 mg/l:

Izsečki so se le malo povečali, bili so svetlo zeleni in brez zametkov za regenerante.



Slika 9: Neokuženi izsečki listov tobaka po petih tednih inokulacije na ustreznem selekcijskem *MSr* gojišču: A – na gojišču brez dodatkov; B – na gojišču z acetosiringonom (100 μ M); C – na gojišču s timentinom (150 mg/l); D – na gojišču s higromicinom (25 mg/l); E – na gojišču s kanamicinom (300 mg/l)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z metodo posredne transformacije z *Agrobacterium tumefaciens* in plazmidoma pCAMBIA1390-DsRed ter pART27 2mgfp-ER smo v tobak sorte Havana 38 vnesli markerske gene za rdečo (*DsRed*) oz. zeleno (*gfp*) fluorescenco. Želeli smo primerjati uspešnost regeneracije rastlin po okužbi in izražanje vnesenih genov.

Tobak smo izbrali kot modelno rastlino, saj so zametki za prve regenerante nastali že po 10-12 dneh, regeneracija je bila večinoma direktna, brez vmesnega kalusa, podobno navajajo Stolarz in sod. (1991). Prednost uporabe tobaka kot modelne rastline pri genskih transformacijah je pridobitev velikega števila regenerantov v kratkem času.

Liste mikropropagiranega tobaka smo narezali na izsečke in jih okužili s sevom *A. t.* LBA4404 z vnesenim plazmidom pCAMBIA1390-DsRed oz. pART27 2mgfp5-ER po nekoliko modificirani metodi transformacije po Horsch in sod. (1985) in Fisher in Guiltinan (1995). Izsečke smo ko-kultivirali na *MSr* gojišču z dodatkom acetosiringona, ki uspešno vpliva učinkovitost transformacije z *Agrobacterium* tako, da aktivira gene za virulenco (*vir* geni) (Sunilkumar in sod., 1999). Po treh dneh ko-kultivacije smo izsečke predstavili na selekcijsko *MSr* gojišče z dodatkom selekcijskega antibiotika higromicina 25 mg/l za selekcijo transformantov po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-DsRed in selekcijskega antibiotika kanamicina 300 mg/l po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp-ER. Gojiščem smo dodali tudi 150 mg/l antibiotika timentina, ki je uspešno preprečil rast bakterije. Dokazano je, da timentin v tej koncentraciji popolnoma prepreči namnoževanje *A. t.* in pozitivno vpliva na regeneracijo listnih izsečkov (Nauerby in sod., 1996), kar se je pokazalo tudi v našem kontrolnem poskusu.

En teden po okužbi, na začetku oblikovanja globul oz. embrioidov, smo z epifluorescentnim mikroskopom preverili izražanje fluorescentnih *DsRed* in *gfp* markerskih genov. Fluorescenco smo ugotovili pri vseh izsečkih, zato smo vse nastale regenerante po petih tednih inokulacije na selekcijskem *MSr* gojišču predstavili na ustrezno selekcijsko *MS* gojišče.

Regeneracija iz izsečkov listov je potekala hitro, večinoma z direktno regeneracijo. Prvi zametki za regenerante so nastali že po dveh tednih, po petih tednih pa smo dobili že veliko število regenerantov.

Nekoliko več regenerantov (169) smo dobili z izsečkov po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-DsRed pa 148, čeprav smo s slednjim okužili 2 izsečka več. Razlog bi lahko bil v izbiri selekcijskega antibiotika, saj je higromicin za

rastline bolj toksičen kot kanamicin. Regenerante, ki so dobro uspevali, smo po desetih tednih prestavili na ustrezno sveže selekcijsko *MS* gojišče, ostale pa na *MS* gojišče brez dodanih selekcijskih antibiotikov. Po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* je na selekcijskem gojišču preživel 91 % regenerantov, po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER pa 98,7 %. Regeneranti, ki so propadli, najverjetneje niso imeli vključenega selekcijskega gena ali pa je prišlo do utišanja le tega. Na gojišču brez selekcije je propadlo 5 regenerantov, okuženih z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER. Možen vzrok za propad je lahko nevklučitev *nptII* gena ali njegovo utišanje in predolga izpostavljenost kanamicinu na predhodnem selekcijskem gojišču.

S kontrolnim poskusom smo dokazali, da smo uporabili primerno koncentracijo selekcijskih antibiotikov, t.j. 300 mg/l kanamacina in 25 mg/l higromicina, saj je preprečila rast in regeneracijo netransformiranih izsečkov tobaka. Izbira pravilne koncentracije selekcijskega antibiotika je zelo pomembna pri transformacijah, saj lahko prenizka koncentracija povzroči preživetje tudi netransformiranih rastlin, previsoka pa lahko poškoduje transformirane rastline (Parveez in sod., 2007). Na gojišču s higromicinom se je sicer pojavilo nekaj zametkov za regenerante, ki pa so kasneje popolnoma propadli. Higromicin je za kanamicinom drugi najbolj pogosto uporabljen antibiotik posebno takrat, ko selekcija s kanamicinom ni dovolj učinkovita, saj je bolj toksičen za rastlinska tkiva (Wilmink in Dons, 1993). Kanamicin se uporablja kot selekcijski antibiotik predvsem pri dvokaličnicah, saj je veliko enokaličnic, kot so trave in žita nanj odpornih (Hauptmann in sod., 1988).

Da sta higromicin in kanamicin kot selekcijska antibiotika zelo učinkovita pri regeneraciji tobaka potrjuje tudi odstotnost transformiranih regenerantov z vključenim samo markerskim *DsRed* ali *gfp* genom oz. netransformiranih regenerantov.

Za uspešno transformirane regenerante smo šteli tiste, kateri so imeli v dupleks PCR reakciji namnožena tako markerski (*DsRed* ali *gfp*) kot selekcijski gen (*hptII* ali *nptII*). Po transformaciji z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* sta se pri 95 % vzorcev namnožila tako fragment dolžine 641 bp (selekcijski *hptII* gen), kot fragment dolžine 211 bp (markerski *DsRed* gen). Po transformaciji z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER sta se oba fragmenta, tako dolžine 650 bp (selekcijski *nptII* gen), kot dolžine 422 bp (markerski *gfp* gen) namnožila pri 98,8 % vzorcev. Transformacija je bila pri obeh uporabljenih plazmidih zelo uspešna, kar pomeni, da sta tako pCAMBIA1390-*DsRed*, kot pART27 2mgfp5-ER zelo primerna plazmida za genske transformacije tobaka.

Prisotnost samo dela genskega konstrukta smo ugotovili pri 7 regenerantih, okuženih z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* in pri 2 regenerantih, okuženih z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, ki so rastle na selekcijskem gojišču. Ti regeneranti so imeli vključen samo selekcijski *hptII* oz. *nptII* gen, ne pa tudi markerski *DsRed* oz. *gfp* gen, kljub temu, da smo potrdili

fenotipsko izražanje fluorescentnih genov pri vseh listnih izsečkih in smo pričakovali, da bodo imeli vsi prisoten tudi markerski gen. Izsečke smo z epifluorescentnim mikroskopom pregledali samo enkrat, deset dni po inokulaciji na selekcijsko *MSr* gojišče za regeneracijo. Verjetno se *DsRed* in *gfp* nista vgradila v vse celice izsečkov, iz katerih so nastali regeneranti in bi bilo potrebno fenotipsko izražanje markerskih genov spremljati tudi kasneje pri nastalih regenerantih. Opaženo izražanje fluorescence bi lahko bila posledica prehodne ekspresije.

Pri enem regenerantu, transformiranem z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER, ki je rasel na selekcijskem gojišču (vzorec 245), smo potrdili prisotnost selekcijskega *nptIII* gena, vendar pa so bili namnoženi fragmenti zelo slabo vidni in nekoliko krajši od 650 bp. Tu je verjetno prišlo do manjše mutacije, delecije posameznega nukleotida oz. nukleotidov *nptIII* gena. Gen je bil le delno aktiven, kar se je pokazalo tudi fenotipsko, saj je ta rastlina sicer rasla na selekcijskem gojišču in imela korenine, vendar pa je bila zelo majhna in slabotna. Da bi natančno ugotovili, kaj se je v tem primeru zgodilo, bi bile potrebne nadaljnje analize regeneranta.

Pri vseh regenerantih, ki so rasli na gojišču brez selekcijskih antibiotikov, smo potrdili prisotnost selekcijskega in markerskega gena. Ti regeneranti so propadali na selekcijskem gojišču, čeprav so imeli vgrajen selekcijski gen, ki pa se ni izrazil in posledično rastline niso bile sposobne razgraditi higromicina oz. kanamicina. V teh primerih je verjetno prišlo do utišanja transgenov. Do utišanja lahko pride na primer zaradi vgraditve večjega števila kopij transgena v genom rastline (transkripcijsko utišanje gena), ali zaradi aktivacije naravnih rastlinskih antiviralnih obrambnih mehanizmov (posttranskripcijsko utišanje gena) (Vaucheret in sod., 1998). Pri petuniji so ugotovili slabše fenotipsko izražanje GFP proteina v primerih vgraditve večjega števila kopij, medtem ko je bilo izražanje intenzivno v primeru vgraditve samo ene kopije (Mußmann in sod., 2011).

5.2 SKLEPI

Za vzpostavitev transformacijskega sistema tobaka sta primerna oba v naši nalogi uporabljena fluorescentna gena, *DsRed* in *gfp*.

Uspeh transformacije tobaka z *A. t.* LBA4404 je bil podoben za oba uporabljena plazmida pCAMBIA1390-*DsRed* (95,0 %) in pART27 2mgfp-ER (98,8 %). Nekoliko več, za 3,8 %, transformiranih regenerantov z vgrajenim tako markerskim kot selekcijskim genom smo dobili po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp-ER.

Regeneranti, ki so propadali na selekcijskem gojišču, na gojišču brez selekcije pa so uspešno rasli, so imeli vgrajena oba transgena, tako markerskega kot selekcijskega. Ti regeneranti so imeli verjetno utišan *hptII* oz. *nptII* gen.

Nekaj regenerantov ni imelo vključenega markerskega *DsRed* oz. *gfp* gena, saj jih z DNA analizo nismo zasledili. S tem smo potrdili, da se lahko vgradi le del genskega konstrukta oz. T-DNA.

Na selekcijskem gojišču je propadlo več regenerantov (10), okuženih z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed*, po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp-ER sta propadla le 2 regeneranta.

Antibiotik timentin je uspešno preprečil rast *A. t.* in ni vplival na regeneracijo tobaka.

Izbrana koncentracija selekcijskih antibiotikov higromicina in kanamicina je v kontrolnih poskusih popolnoma preprečila regeneracijo netransformiranih listnih izsečkov. Prav tako je popolnoma preprečila rast netransformiranih regenerantov na selekcijskem gojišču, saj so imeli vsi regeneranti vključen selekcijski *hptII* oz. *nptII* gen.

6 POVZETEK

Metode genskih transformacij rastlin omogočajo vnos točno določenih zelenih genov iz kateregakoli organizma. V pomoč pri prepoznavanju transformiranih tkiv od netransformiranih so markerski geni, katere je v transformiranem tkivu mogoče vizualno spremljati. Fluorescentni markerski geni imajo prednost pred ostalimi v tem, da lahko njihovo izražanje spremljamo z nedestruktivno metodo s pomočjo ustreznega fluorescentnega stereomikroskopa in setom filtrov. Namen našega dela je bil spremljati izražanje dveh fluorescentnih genov (*DsRed* in *gfp*), katera smo s pomočjo posredne metode transformacije z *Agrobacterium tumefaciens* vnesli v tobak.

Liste sorte tobaka Havana 38 smo narezali na izsečke, v katere smo vnesli markerski *DsRed* oz. *gfp* gen ter selekcijski *hptII* oz. *nptII*. Listne izsečke smo po okužbi s sevom *A. t.* LBA4404 tri dni kokultivirali na *MSr* gojišču za regeneracijo z dodatkom 100 μ M acetosiringona. Nato smo jih sprali z raztopino antibiotika timentin 200 mg/l, jih zračno osušili in prestavili na selekcijsko *MSr* gojišče z dodanim ustreznim selekcijskim antibiotikom (25 mg/ higromicin po okužbi z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* in 300 mg/l kanamicin po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER) in antibiotikom timentin 150 mg/l, za preprečitev rasti *A. t.*.

S kontrolnim poskusom smo preverili, kako selekcijska antibiotika higromicin in kanamacin vplivata na netransformirane listne izsečke tobaka. Na selekcijskem gojišču s higromicinom so se na neokuženih izsečkih začele pojavljati nekroze, bili so svetle barve, nastali zametki za regenerante so propadali. Na gojišču s kanamicinom so bili netransformirani izsečki prav tako svetlo zeleni in so propadali, zametkov za regenerante ni bilo. Na selekcijskem gojišču lahko rastejo samo regeneranti z vključenim in aktivnim ustreznim selekcijskim genom.

Po enem tednu smo ugotovili fenotipsko izražanje vnešenih fluorescentnih genov z epifluorescentnim mikroskopom pri vseh izsečkih. Po petih tednih smo nastale regenerante prestavili na sveže selekcijsko gojišče. Po transformaciji je na selekcijskem gojišču dobro uspevalo 101 regenerantov, okuženih z *A. t.*-pCAMBIA1390-*DsRed* in 152 regenerantov, okuženih z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER. Regenerante, ki so po desetih tednih propadali, smo prestavili na gojišče brez selekcijskih antibiotikov.

S PCR metodo smo potrdili vključitev tako markerskega kot selekcijskega gena pri 132 (95,0 %) regenerantih, okuženih z *A. t.*-pCAMBIA1390, od tega pri 38 (100 %) tistih, ki so rastle na gojišču brez selekcije, 94 (93,1 %) pa je rastlo na selekcijskem gojišču. 7 regenerantov na selekcijskem gojišču je imelo vgrajen samo selekcijski *hptII* gen. Regenerantov brez vgrajenega transgena nismo dobili.

Po okužbi z *A. t.*-pART27 2mgfp5-ER je nastalo 161 regenerantov, od teh je bilo 159 (98,8 %) takih, ki so imeli vgrajen cel genski konstrukt (*gfp* in *nptII* gen). Vseh 9 regenerantov, ki so rastle na gojišču brez selekcije, je imelo vključena oba transgena. Med 152 regeneranti, ki so rastle na selekcijskem gojišču, sta imela dva regeneranta vgrajen samo selekcijski *nptII* gen.

7 VIRI

- Afolabi A.S. 2007. Status of clean gene (selection marker-free) technology. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2910-2923
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 1-28
- Cambia. 1997. pCAMBIA vector release manual version 3.05. Camberra, Center for the application of molecular biology to international agriculture: 6 str.
- CERA. 2012. GM crop database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA). Washington D.C. ILSI Research Foundation
http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database (5.mar.2012)
- Gleave A.P. 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 20: 1203-1207
- Fisher D.K., Guiltinan M.J. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 3: 278-289
- Fuchs R.L., Ream J.E., Hammond B.G., Naylor M.W., Leimgruber R.M., Berberich S.A. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferaseII (NPTII) protein. *Bio/Technology* 11: 1543-1547
- Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25, 6: 989-994
- Harper B.K., Mabon S.A., Leffel S.M., Halfhill M.D., Richards H.A., Moyer K.A., Stewart Jr., C.N. 1999. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 17: 1125-1129
- Hauptmann R.M., Vasil V., Ozias-Akins P., Tabaeizadeh Z., Rogers S.G., Fraley R.T., Horsch R.B., Vasil I.K. 1988. Evaluation of Selectable Markers for Obtaining Stable Transformants in the Gramineae. *Plant Physiology* 86: 602-606
- Haseloff J., Amos B. 1995. GFP in plants. *Trends in Genetics* 11: 328-329
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94: 2122-2127
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6: 271-282
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180

- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223: 496-498
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231
- ISAAA Brief – 43. 2011. Executive summary.
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>
(februar, 2012)
- Jach G., Binot E., Frings S., Luxa K., Schell J. 2001. Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal*, 28: 483-491
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W., 1987. Gus fusions – beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo, 59: 63-66
- Lakshmi Sita G., Sreenivas G.L., Bhattacharya A. 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4, 3-4: 189-195
- Lippincott-Scgwartz J., Patterson G.H. 2003. Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells. *Science*, 300, 5616: 87-91
- Mann D.G.J., Abercrombie L.L., Rudis M.R., Millwood R.J., Dunlap J.R., Stewart C.N. Jr. 2012. Very bright orange fluorescent plants: endoplasmic reticulum targeting of orange fluorescent proteins as visual reporters in transgenic plants. *BMC Biotechnology*, 12: 17
- Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. 1999. Fluorescent proteins from nonbiluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology*, 17: 969-973
- Miki B., McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107: 193-232
- Murashige T., Skoog H. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479
- Mußmann V., Serek M., Winkelmann T. 2011. Selection of transgenic *Petunia* plants using the green fluorescent protein (GFP). *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 107, 3: 483-492
- Nauerby B., Billing K., Wyndaele R. 1996. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 123: 169-177
- Park S.H., Rose S.C., Zapata C., Srivatanakul M., Smith R.H. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 34, 2: 117-121

- Parveez G.K.A., Majid N.A., Zainal A., Rasid O.A. 2007. Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for selecting transformed immature embryos of oil palm. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 15: 133-146
- Rao A.Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A.A., Husnain T., Riazuddin S. 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27: 753-763
- Reichel C., Mathur J., Ecke P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B., Maas C. 1996. Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 93: 5888-5893
- Stewart C.N. Jr. 2005. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. *Trends in Plant Science*, 10: 390-396
- Stiekema W.J., Visser L. 1991. Gene transfer and genes to be transferred. V: *Biotechnological innovations in crop improvement*. Jones L. (ed.) Oxford, Butterworth – Heinemann: 184-199
- Stolarz A., Macewicz J., Lörz H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 137: 347-357
- Sunilkumar G., Vijayachandra K., Veluthambi K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. *Plant Science*, 141: 51-58
- Škof S. 2008. Izražanje markerskih genov pri hmelju (*Humulus lupulus* L.) in tobaku (*Nicotiana tabacum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 119 str.
- Vaucheret H., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.-B., Mourrain P., Palauqui J.-C., Vernhettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 16, 6: 651-659
- Wilmink A., Dons J.J.M. 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 2: 165-185
- Witty M., 1989. ThaumatinII: a simple marker gene for use in plants. *Nucleic Acids Research*, 17: 3312
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 2: 2143-2150
- Zupan J.R., Zambryski P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiology*, 107: 1041-1047
- 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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Zlati Luthar za pomoč pri delu in izdelavi diplomske naloge in za vse, kar je omogočilo, da je naloga tako hitro dobila končno obliko.

Hvala Nataši Hren za pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala tudi doc. dr. Jerneju Jakšetu in prof. dr. Marijani Jakše za hiter pregled diplomske naloge.

Hvala vsem sošolcem in prijateljem, ki so mi kakorkoli pomagali v času študija, še posebej Andreji in Maši za vse kavice, pogovore in nasvete. Teja, hvala za nepozabne žure in dobro voljo.

Največja zahvala pa gre mojim domačim. Mami in oči, hvala, ker sta vedno verjela vame in me spodbujala. Aleš, dragi bratec, hvala za vsa posojila in ostalo pomoč. Hvala tudi vsem ostalim, ki so mi stali ob strani.