

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška POTOČNIK

**TRANSFORMACIJA KROMPIRJA SORTE
'DÉSIRÉE' Z GENI GLIV ZA POVEČANJE
ODPORNOSTI PROTI ŽUŽELKAM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**TRANSFORMATION OF 'DÉSIRÉE' POTATO WITH
FUNGAL GENES TO ACHIEVE INSECTS
RESISTANCE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

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 30. 11. 2009 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. Borut BOHANEC

Datum zagovora:

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.

Urška Potočnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 677.017.86:633.491(043.2)=163.6
KG	Krompir/ <i>Solanum tuberosum</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /PCR/kloniranje/transformacija rastilin
AV	POTOČNIK, Urška
SA	RAVNIKAR, Maja(mentorica)/ŽEL, Jana(somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	TRANSFORMACIJA KROMPIRJA SORTE 'DÉSIRÉE' Z GENI GLIV ZA POVEČANJE ODPORNOSTI PROTI ŽUŽELKAM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 16 pregl., 26 sl., 57 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Uporaba kemičnih insekticidov za preprečevanje napadov žuželk na kulturne rastline povzroča vse več negativnih učinkov tako na področju kmetovanja, kot tudi na celotnem ekosistemu. Raziskovanje in iskanje alternativnih načinov zatiranja škodljivcev, predvsem v biotehnoloških aplikacijah, je zato vse bolj pomembno. Namen diplomskega dela je bila transformacija krompirja (<i>Solanum tuberosum</i>) sorte Désirée z geni gliv, z namenom povečanja odpornosti proti žuželkam. S transformacijo smo želeli v rastline krompirja sorte Désirée vnesti gen <i>g1</i> . Uporabili smo dva različna konstrukta za vnos gena <i>g1</i> . Prvi je bil za povečano ekspresijo gena <i>g1</i> in drugi za ekspresijo gena <i>g1</i> v fuziji z genom za zeleni fluorescentni protein (GFP). Izsečke krompirja smo transformirali s suspenzijo bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Približno tri tedne po transformaciji so transformirani izsečki tvorili prve kaluse in poganjke. Odstotek transformacije za konstrukt z genom <i>g1</i> je bil 14 %, za konstrukt z genom <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP pa 1 %. Ekspresijo transformant na mRNA nivoju smo nato preverili z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja (RT – qPCR). Vse preverjene linije transformiranega krompirja so izražale visok nivo heterologne RNA v primerjavi z rezultati protokola, ki smo ga uporabili. Binarna plazmida pMDC32 in pMDC85 sta se izkazala kot zelo učinkovita za namnoževanje v bakterijah <i>Escherichia coli</i> in bakterijah <i>A. tumefaciens</i> ter primerna za prenos gena v transformirane linije krompirja. Transformacija po postopku Visser in sod., (1989) se je izkazala kot zelo primerna metoda za vnos konstrukta v rastlino krompirja, saj omogoča hitro regeneracijo izsečkov po transformaciji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 677.017.86:633.491(043.2)=163.6
CX	Potato/ <i>Solanum tuberosum</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /PCR/cloning/plant transformation
AU	POTOČNIK, Urška
AA	RAVNIKAR, Maja(supervisor)/ŽEL, Jana(co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biothechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2010
TI	TRANSFORMATION OF DESIREE POTATO WITH FUNGAL GENES TO ACHIEVE INSECTS RESISTANCE
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	X, 56 p., 16 tab., 26 fig., 57 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Application of chemical insecticides for crop protection against pests has numerous negative effects on agriculture and ecosystem. Biotechnology applications are therefore very important tool for protecting plants against crop pests. Transformation of Désirée potato (<i>Solanum tuberosum</i>) with fungal gene <i>g1</i> in order to achieve resistance against insects was our main aim in this graduation thesis. We used two different vectors, pMDC32 and pMDC85. First vector was used for induced expression of gene <i>g1</i>, second one was used for expression of gene <i>g1</i> in fusion with green fluorescent protein (GFP). Gene <i>g1</i> was inserted into potato cv. Désirée using <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. Potato explants were transformed with suspension of <i>A. tumefaciens</i>. After three weeks first calluses and shoots were observed. Transformation efficiency for gene <i>g1</i> was 14% and for gene <i>g1</i> with fusion of GFP gene 1%. Expression of transformed plants was observed with quantitative polymerase chain reaction in real time (RT – qPCR). We concluded that RNA expression level was high on all tested transformed potato lines. Binary plasmids pMDC32 and pMDC85 proved appropriate for multiplying in bacteria <i>Escherichia coli</i> and <i>A. tumefaciens</i> and for expression of genes in transformed plants as well. Transformation procedure (Visser et al., 1989) used in this graduation thesis is very convenient method for construct insertion in potato plant due to fast regeneration of potato explants after transformation.</p>

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VIII
Okrajšave in simboli	IX
Slovarček.....	X

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROMPIR	3
2.2 KOLORADSKI HROŠČ	4
2.2.1 Alternativni načini zatiranja koloradskega hrošča	5
2.3 NARAVNA OBRAMBA RASTLIN PROTI ŽUŽELKAM.....	6
2.3.1 Inducirana endogena obramba	6
2.4 RAZVOJ ODPORNIH RASTLINSKIH VRST	6
2.5 METODE VNOSA GENOV V RASTLINE.....	7
2.5.1 Neposreden vnos genov	7
2.5.2 Vnos genov z bakterijo <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7
2.6 Bt RASTLINE ODPORNE PROTI ŽUŽELKAM.....	12
2.7 POTENCIALNI DONORJI GENOV ZA POVEČANJE ODPORNOSTI RASTLIN PROTI ŽUŽELKAM.....	13
2.7.1 Druge rastlinske vrste.....	13
2.7.2 Bakterije	15
2.7.3 Glive	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Gojišča.....	17
3.1.2 Reagenti in barvila	19
3.1.3 Pufri in raztopine.....	19
3.1.4 Encimi	19
3.1.5 Testni kompleti	19
3.1.6 Rastlinski material.....	19
3.1.7 Bakterijski material in plazmidi	20
3.1.8 Laboratorijska oprema	21
3.2 METODE.....	21
3.2.1 Programska orodja za delo s sekvencami.....	21
3.2.2 PCR na osnovi kolonije.....	22
3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza	23
3.2.4 Priprava prekonočne kulture bakterijskih celic <i>E. coli</i>	24
3.2.5 Izolacija plazmidne DNA.....	24
3.2.6 Elektroporacija agrobakterije	25
3.2.7 Priprava trajnih kultur	25
3.2.8 Priprava bakterij <i>A. tumefaciens</i> za transformacijo rastlin.....	25

3.2.9	Transformacija rastlin	26
3.2.10	Preverjanje genske ekspresije na stopnji mRNA	27
4	REZULTATI	31
4.1	PREVERJANJE SEKVENCE Z KONSTRUKT Z GENOM <i>g1</i>	31
4.2	POTRDITEV GENA <i>g1</i> V TRANSFORMIRANIH BAKTERIJAH <i>E.coli</i>	32
4.3	IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA	33
4.4	POTRDITEV GENA <i>g1</i> V IZOLIRANIH PLAZMIDIH BAKTERIJE <i>E.coli</i>	34
4.5	POTRDITEV GENA <i>g1</i> V TRANSFORMIRANIH BAKTERIJAH <i>A. tumefaciens</i>	36
4.6	TRANSFORMACIJA RASTLIN.....	37
4.7	PREVERJANJE EKSPRESIJE GENA <i>g1</i> NA NIVOJU mRNA	42
4.7.1	Izolacija in potrditev izolirane RNA iz linij krompirja.....	42
4.7.2	Kvantifikacija celokupne RNA	42
4.7.3	RT - qPCR.....	43
5	RAZPRAVA	46
6	SKLEPI	50
7	POVZETEK.....	51
8	VIRI.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Svetovna proizvodnja krompirja med letoma 1991 in 2007	3
Preglednica 2: Sestava vseh uporabljenih gojišč	17
Preglednica 3: Priprava reakcijskih mešanic za PCR	22
Preglednica 4: Program podaljševanja zapisa za gen <i>g1</i>	22
Preglednica 5: Tretiranje vzorcev z DNazo	28
Preglednica 6: Priprava mešanice za RT – qPCR; gen <i>g1</i>	29
Preglednica 7: Priprava mešanice za RT - qPCR; Cox gen	30
Preglednica 8: Program pomnoževanja za RT - qPCR	30
Preglednica 9: Potek transformacije za konstrukt z genom <i>g1</i>	37
Preglednica 10: Potek transformacije za konstrukt z genom <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP	38
Preglednica 11: Potek transformacije za gen <i>g1</i> – kontrole.....	38
Preglednica 12: Potek transformacije za gen <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP – kontrole	39
Preglednica 13: Uspešnost transformacije za konstrukt z genom <i>g1</i> in za konstrukt z genom <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP	39
Preglednica 14: Količina izmerjene RNA, kontaminacija s proteini in prisotnost soli v vzorcih.....	43
Preglednica 15: Rezultati izražanja preiskovanega gena <i>g1</i> v primerjavi s Cox genom.....	44
Preglednica 16: Rezultati in izračuni izražanja preiskovanega gena <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP v primerjavi s Cox genom.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Rastlina krompirja <i>S. tuberosum</i>	4
Slika 2: Koloradski hrošč	5
Slika 3: Plazmidna karta vektorja pMDC32	9
Slika 4: Področje T-DNA med obema mejnima sekvencama v plazmidu pMDC32.....	9
Slika 5: Plazmidna karta vektorja pMDC85	10
Slika 6: Področje T-DNA med obema mejnima sekvencama v plazmidu pMDC85.....	10
Slika 7: Shema Gateway® tehnologije kloniranja gena.....	11
Slika 8: Tkivna kultura zdravega krompirja sorte Désirée.....	20
Slika 9: MassRuler™ DNA Ladder Mix z DNA segmenti velikosti od 80 do 10 000	23
Slika 10: 100 bp DNA Ladder Plus.....	24
Slika 11: Zaporedja Cox specifičnih začetnih oligonukleotidov in Cox sonde	29
Slika 12: Nukleotidni zapis za konstrukt z genom <i>g1</i>	32
Slika 13: Analiza PCR produktov na osnovi kolonije za določanje prisotnosti gena <i>g1</i>	32
Slika 14: Analiza PCR produktov na osnovi kolonije za določanje prisotnosti gena <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP.....	33
Slika 15: Izoliran plazmid pMDC32 iz bakterij <i>E. coli</i>	34
Slika 16: Izoliran plazmid pMDC85 iz bakterij <i>E. coli</i>	34
Slika 17: Analiza PCR produktov na osnovi plazmidne DNA pMDC32 z genom <i>g1</i>	35
Slika 18: Analiza PCR produktov na osnovi plazmidne DNA za konstrukt z genom <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP.....	35
Slika 19: Analiza PCR-produktov z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gen <i>g1</i> v agrobakteriji transformirani z genom <i>g1</i> v pMDC32.....	36
Slika 20: Analiza PCR-produktov z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gen <i>g1</i> v agrobakteriji transformirani z genom <i>g1</i> v pMDC85.....	37
Slika 21: Priprava izsečkov za transformacijo	40
Slika 22: Negativna kontrola (nestransformiran Désirée) na gojišču s selekcijo, 37. dan.....	40
Slika 23: Pozitivna kontrola (netransformiran Désirée) na gojišču brez selekcije, 37. dan....	40
Slika 24: Kontrola (transformiran Désirée z genom <i>g1</i>) na gojišču brez selekcije, 37. dan....	41
Slika 25: Transformirani izsečki na gojišču s selekcijo za gen <i>g1</i> v fuziji z genom za GFP... <td>41</td>	41
Slika 26: Potrditev izolirane RNA.	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
bp.....	bazni par
CaMV	virus cvetače (angl. cauliflower mosaic virus)
<i>Chv</i> geni.....	virulentni geni
Ct	mejni cikel pri qPCR (cycle of threshold)
2,4 D	2,4 diklorofenolocetna kislina
ddH ₂ O.....	dideionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etylendiamin tetraacetna kislina
FP	proti 3' koncu obrnjeni začetni oligonukleotid
GFP	zeleni fluorescentni protein (green fluorescent protein)
GSO	gensko spremenjeni organizmi
GSR	gensko spremenjene rastline
LB.....	Lauria-Bertani obogateno gojišče
MS	Murashige in Skoog gojišče
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Obr/min	obratov na minuto
Onkogeni	gen, ki povzroči nekontrolirano razmnoževanje celic
OR	osnovna raztopina za pripravo MS gojišča
PACM.....	osnovno MS gojišče z dodanimi avksini in citokinini
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PEG	polietilen glikol
pMDC.....	komercialni plazmid družbe Cambia
PLRV.....	virus zvijanja listov krompirja (potato leafroll virus)
RP.....	proti 5' koncu obrnjeni začetni oligonukleotid
R3B.....	osnovno MS gojišče z dodanimi avksini in citokinini
RNA	ribonukleinska kislina
SMS	Sequence Manipulation Suite
TAE	tris acetat EDTA
T-DNA.....	transfer DNA
Ti plazmid.....	tumor inducirajoči plazmid
Zcv(h)	gojišče z zeatin ribozidom, klaforonom, vankomicinom (in higromicinom)
YM	gojišče za rast kvasovk (angl. Yeast and mold broth)

SLOVARČEK

- cDNA Komplementarna DNA, ki nastane z reverznim prepisom mRNA.
- DNaza Encim, ki razgrajuje DNA.
- Reverzna transkripcija Sinteza DNA na podlagi RNA matrice.
- mRNA RNA, z vlogo posrednika za določanje zaporedja aminokislin pri translaciji in nastajanju polipeptidov.
- RNaza Encim, ki razgrajuje RNA.
- rpm Obratov na minuto (rotations per minute).
- Ct Cikel reakcije PCR v realnem času, kjer fluorescenza preseže prestavljen prag.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Škodljivci povzročajo velike izgube v pridelkih kmetijskih rastlin, zato zdravstveno varstvo kulturnih rastlin pred škodljivci predstavlja velik strošek v pridelavi posameznih poljščin. Biodiverziteta v naravi je močno ogrožena prav zaradi tradicionalnih metod kmetovanja, ki vključujejo uporabo pesticidov in kemičnih insekticidov (Ammann, 2005). Zaradi vse večje in pretirane uporabe le teh, lahko najdemo vsebnost pesticidov in njihovih metabolitov tudi v različnih živilih, vodi, okolju in v človeškem organizmu. Poleg tega so nekateri škodljivci sposobni izredno hitre prilagoditve na insekticide. Metode, ki bi zmanjšale uporabo pesticidov, med njimi tudi različne biotehnološke metode gojenja, so vse bolj v uporabi. (Cheng in sod., 1995).

Vzgoja kulturnih rastlin z odpornostjo proti različnim škodljivcem je zato eden pomembnejših ciljev žlahtniteljskih programov. V klasičnem žlahtnjenju se izkoriščajo naravni mehanizmi odpornosti rastlin na škodljive žuželke, ki jih lahko razdelimo v tri sklope: morfološke prepreke za žuželke (dlakavost listov), prisotnost repelantov (odvračanje insektov) in vsebnost strupenih snovi (Bohanec in sod., 2004).

Poleg produktov klasičnih žlahtnjiteljskih tehnik, pa se na trgu vse bolj uveljavljajo produkti novejših biotehnoloških metod žlahtnjenja. Gensko spremenjene rastline odporne proti žuželkam predstavljajo eno izmed najbolj uveljavljenih in razširjenih skupin gensko spremenjenih rastlin prisotnih na tržišču (Gatehouse, 2008). Leta 2008 so rastline odporne proti žuželkam rastle na 15 % (19,1 milijon hektarov) površin, na katerih rastejo gensko spremenjene rastline. Gensko spremenjene rastline, ki so hkrati odporne proti žuželkam in tolerantne na herbicide, pa so zasedale 22 % (26,9 milijonov hektarov) površin, na katerih rastejo gensko spremenjene rastline (Global status of..., 2008).

Krompir (*Solanum tuberosum*), kot pomembno poljščino, pestijo različne bolezni in škodljivci. Velik problem v kmetijstvu predstavljajo škodljivci, kot je koloradski hrošč, saj so sposobni hitre prilagoditve na insekticide. Biotehnološke metode žlahtnjenja omogočajo vnos genov iz sorodnih vrst ali drugih vrst rastlin, mikroorganizmov in vnos genov iz višjih gliv.

1.2 NAMEN DELA

Diplomska naloga se osredotoča na protein iz gliv, ki ima močno insekticidno aktivnost. Gen iz gliv, uporabljen v tej diplomski nalogi smo poimenovali gen *g1*, saj zaradi patentnega varstva imena še ni mogoče navesti. Zanimalo nas je, ali bi lahko protein proizvajale tudi rastline, zato smo gen *g1* vnesli v krompir sorte Désirée. Izvedli smo posredovano transformacijo z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* in selekcionirali transformante na gojišču z antibiotikom. Ko smo pridobili dovoljšje število transformant, smo preverili ekspresijo na mRNA nivoju in izbrali najprimernejše linije za nadaljnje testiranje.

1.3 HIPOTEZE

Binarni plazmidi pMDC so primerni tako za namnoževanje v bakterijah *Escherichia coli* in *A. tumefaciens*, kot za izražanje gena v transformiranih rastlinah.

Transformacija po postopku Visser in sod. (1989), uporabljena v diplomski nalogi, je primerna metoda za vnos konstrukta v rastlino *S. tuberosum*.

Predvajamo, da bo transformacija z obema uporabljenima konstruktoma enako uspešna, da bo ekspresija na mRNA nivoju primerljiva in da bomo pridobili zadostno število rastlin z vnesenimi geni za nadaljnje analize.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR

Krompir (*Solanum tuberosum*) je gomoljnica iz družine razhudnikov (*Solanaceae*) (Slika 1). Je zel s stebli, ki zrastejo do 1 meter visoko. Listi so liho pernati, socvetja pa nosijo bele do vijolične cvetove, katerih premer doseže do 2,5 centrimetrov. Užitni del rastline je gomolj. Gomolj pokriva rjava do vijolična kožica, meso je ponavadi belo ali rahlo rumeno. Gomolj ima zunanje kaliče iz katerih poženejo nove rastline. Za razmnoževanje uporabljajo predvsem gomolje (Arends in Kus, 1999).

Domovina krompirja je Južna Amerika, kjer se je kultivacija krompirja začela pred približno 7000 leti. V Evropo so ga prinesli leta 1570, kjer so ga sprva gojili kot okrasno rastlino, veliko pozneje, v zadnjih treh stoletjih, pa ga za hrano gojijo po vsem svetu (Stabej, 1997). V Ameriki, v naravi, obstaja 235 vrst krompirja (*Solanum spp.*, *Solanaceae*) (Hawkes, 1997).

Krompir je poljščina, ki je zelo dovezeta za različne virusne, bakterijske in glivne bolezni, ter škodljivce. Količina uporabljenih pesticidov v pridelavi krompirja presega količino, ki jo uporabijo za ostale poljščine, zato je pridelava krompirja draga in okolju neprizazna (Sasson, 1998). Po drugi svetovni vojni je bil krompir pri nas razširjen še na 60000 hektarjih njiv, današnja krompirišča pa zavzemajo le 5764 hektarjev površin v Sloveniji (Zgodnja napoved pridelkov..., 2008).

Danes obstaja več tisoč sort krompirja. Pridelovalci vsako leto nekaj sort opustijo, prav tako se vsako leto pojavijo nove sorte, ki so rezultat dela žlahtnjiteljev (Arends in Kus, 1999). Žlahtjenje krompirja se je pričelo razvijati v Evropi in Ameriki v 19. stoletju. Resnejše žlahtnjitelsko delo pri vzgoji odpornih sort krompirja, se je pričelo v začetku 20. stoletja z vnosom genov za odpornost proti različnim boleznim iz divjih sort v sorodne kultivirane sorte (Žel, 1996). Svetovna produkcija krompirja je v času velikih sprememb. Do zgodnjih 90. let je bilo večino krompirja proizvedenega in porabljenega v Evropi, Severni Ameriki in državah bivše Sovjetske unije. Od takrat, je prišlo v svetu do velikega povečanja gojenja in tudi potrebe po krompirju, predvsem v Aziji, Afriki in Latinski Ameriki (Preglednica 1) (Potato world, 2008).

Preglednica 1: Svetovna proizvodnja krompirja med letoma 1991 in 2007 (povzeto po: <http://www.potato2008.org/en/world/index.html>, vir FAOSTAT)

	1991	1993	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2007
Države	Milijoni ton proizvedenega krompirja								
Razvite države	183	199	177	175	166	167	161	160	160
Države v razvoju	85	102	108	129	135	146	152	160	165
Svet	268	301	285	304	301	313	313	320	325

Slika 1: Rastlina krompirja *S. tuberosum* (povzeto po www.uniprot.org/taxonomy/4113)

Klasifikacija krompirja (Barrett, 1995):

- Kraljestvo: Plantae (rastline),
- Deblo: Magnoliophyta (kritosemenke),
- Razred: Magnoliopsida (dvokaličnice),
- Podrazred: Asteridae (štiriobročne zraslovenčnice),
- Red: Solanales (razhudnikovci),
- Družina: Solanaceae (razhudnikovke),
- Rod: *Solanum* (razhudnik),
- Vrsta: *S. tuberosum* (krompir).

2.2 KOLORADSKI HROŠČ

Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*) povzroča največ škode ravno na krompirju in tako predstavlja največjo nevarnost za to kulturno rastlino v Evropi in Severni Ameriki (Slika 2). Koloradski hrošč spada v red Coleoptera (hrošči) in družino Chrysomelidae (listni hrošči) (*Leptinotarsa...*, 1824). Hrani se z listi zelo sorodnih rastlin kmetijsko pomembnih vrst družine razhudnikovk (Solanaceae), predvsem s krompirjem (*S. tuberosum*), jajčevcem (*S. melongena*) in paradižnikom (*Lycopersicon esculentum*). Škodo povzročajo hroščki in ličinke oranžno rdeče barve z izjedanjem listov krompirja. Pri nas ima koloradski hrošč tudi do tri generacije letno. Najpomembnejše je dosledno zatirati prvo generacijo, ki zaradi manjše listne površine naredi največjo škodo. Brez zatiranja tega škodljivca proizvodnja krompirja ni možna (Koloradski hrošč..., 2000). Ličinka lahko dnevno poje približno 40 cm^2 krompirjevih listov, odrasla žuželka pa 10 cm^2 (Ferro, 1985). Zaradi tako obsežnega prehranjevanja povzroča veliko kmetijsko škodo, saj lahko popolnoma uniči vse liste na rastlini in prepreči nastanek gomoljev (Hare, 1980). Življenjski cikel tega hrošča, prehranjevalne navade in njegova sposobnost izjemno hitre prilagoditve na številne sintetične kemične insekticide

predstavljajo glavni problem kmetovalcev pri zaščiti krompirja (Perlak in sod., 1993). Vse te problematične lastnosti koloradskega hrošča povzročajo potrebo po učinkovitejšem iskanju alternativnih načinov zatiranja (Sabotič, 2007). Naravni sovražniki koloradskega hrošča so nekatere ptice, ki se z njimi hranijo, pa tudi manjši sesalci. Med žuželkami jih plenijo predvsem hrošči brzci, plenilske stenice in strigalice. V telesu koloradskega hrošča živijo tudi nekatere entomopatogene ogorčice, jajčeca hroščev pa parazitirajo najezdnice. Hrošče v tleh, zlasti prek zime okužujejo entomopatogene glive kot npr. *Beauveria bassiana*. Veliko raziskav je bilo že narejenih tudi v zvezi z vnašanjem naravnih sovražnikov iz hroščeve pradomovine (Severna Amerika), ki pa v novem okolju niso najbolj učinkoviti.



Slika 2: Koloradski hrošč (vir: <http://www.potato2008.org/en/potato/pests.html>, FAO 2008)

2.2.1 Alternativni načini zatiranja koloradskega hrošča

Na osnovi toksina bakterije *Bacillus thuringiensis* je na trgu na voljo bioinsekticidni pripravek za zatiranje koloradskega hrošča Novodor, ki pa v Sloveniji nima registracije. Na področju genetskih transformacij je že vzgojen transgeni kultivar krompirja, ki proizvaja toksin bakterije *B. thuringiensis* in prizadene koloradskega hrošča, če se hrani na takšnem krompirju (Lacey in sod., 2001). Podjetje Monsanto proizvaja v tržne namene transgen krompir z genom cryIIIA pod imenom NewLeaf® in transgen krompir pod imenom NewLeafPlus®, ki vključuje poleg zapisa za toksin Bt tudi replikazni gen, ki posreduje odpornost proti virusu zvijanja listov krompirja (PLRV), ki ga prenašajo listne uši. Za obe sorti transgenega krompirja so potrdili, da nimata škodljivih vplivov na ljudi, živali in rastline (Mullins in sod., 2006). Zaradi izjemno hitre prilagoditve in razvijajoče se odpornosti proti tovrstnim izdelkom, postaja potreba po iskanju novih proteinov, ki bi nudili enako zaščito, vse večja.

2.3 NARAVNA OBRAMBA RASTLIN PROTI ŽUŽELKAM

2.3.1 Inducirana endogena obramba

Ena izmed možnih alternativ za zaščito kulturnih rastlin pred žuželkami je endogeni obrambni mehanizem. Obrambni mehanizem se sproži ob poškodbi rastline, in prvi znak je lokalna in sistemski sinteza visokega deleža proteinaznih inhibitorjev, ki blokirajo prebavo v žuželkah (Ferry in sod., 2004; Gruden in sod., 1998). Ta obrambni mehanizem rastlin lahko negativno vpliva na prebavo beljakovin v žuželkah, s čimer se zmanjša rast, razvoj in zniža plodnost (Gruden in sod., 2004).

Že dolgo je znan mehanizem delovanja odpornosti proti žuželkam, molekularni mehanizmi teh kompleksnih odzivov pa so še vedno težko opredeljivi. Raziskave na tem področju z uporabo mikromrež, pa so ponudile nov vpogled v rastlinsko insekticidne interakcije. Kaskada reakcij jasmonske kisline ima centralno vlogo v rastlinah, ki so izpostavljene žuželkam (Ferry in sod., 2004; Gruden in sod., 1998).

Nekateri rastlinski metaboliti (aldehydi, alkoholi, estri, terpenoidi, indoli) so skupni mnogim različnim rastlinskim vrstam, medtem, ko so nekateri, specifični za določeno rastlinsko vrsto. Veliko teh metabolitov je vključenih v odgovor rastline na poškodbo s sintezo teh. Nadzor nad škodljivci se tako doseže s tako imenovanimi hlapnimi molekulami VOC (volatile organic compounds). Manipulacija teh molekul lahko torej vpliva na odpornost rastline proti žuželkam (Ferry in sod., 2004).

2.4 RAZVOJ ODPORNIH RASTLINSKIH VRST

Nove tehnologije kmetovanja omogočajo vzgojo gensko spremenjenih rastlin, ki bi uspešno nadomestile uporabo insekticidov, hkrati pa omogočile bolj ciljno uravnavanje škodljivcev na polju (Ammann, 2005). Vzgoja sort kulturnih rastlin z odpornostjo proti različnim škodljivcem je zato eden pomembnejših ciljev žlahtniteljskih programov.

Novejše biotehnološke metode žlahtnjenja nam omogočajo vključevanje genov v rastline za odpornost rastlin proti škodljivcem. Rastlinski geni za lektine (rastlinski peptidi hormoni) ali za proteazne inhibitorje (za kimotripsin in tripsin) so bili transformirani v nekatere vrste za namen vzgoje rastlin z odpornostjo na določene škodljivce, vendar se tovrstni rezistentni geni niso uveljavili širše, večinoma zaradi preširokega spektra njihovega delovanja na različne žuželke. V iskanju učinkovitih mehanizmov za obrambo pred škodljivci se proučujejo tudi različni naravni strupi za žuželke ali sintetični proteini, dobljeni s proteinskim inženiringom. Vendar se je do sedaj najbolj široko in uspešno uveljavila le strategija za odpornost rastlin na škodljivce z vnosom genov izoliranih iz različnih podvrst bakterije *B. thuringiensis* (Bohanec in sod., 2004). Večina vključenih genov v rastline, je pridobljena iz drugih rastlinskih vrst, zelo malo pa je raziskanega o glivah kot donorskih organizmih.

2.5 METODE VNOSA GENOV V RASTLINE

Vnos genov lahko poteka na različne načine. Gene je možno vključiti v vektor ter jih tako vnesti v rastlino. Najpogosteje se kot prenašalec uporablja bakterija *A. tumefaciens*. Včasih je možen vnos tudi z virusi. Gene se lahko vnaša tudi neposredno v rastlinsko tkivo, brez posrednika. To lahko poteka prek posameznih izoliranih celic s pomočjo kemičnih agensov ali z električnim tokom, lahko pa je vnos neposreden v različna rastlinska tkiva z biolistično tehniko (Žel, 2004).

2.5.1 Neposreden vnos genov

Osnovni princip neposrednega vnosa genov v rastlinsko celico ali tkivo je povečanje propustnosti membrane z različnimi postopki kot so elektroporacija, uporaba polietilenglikola (PEG), ultrazvok ali obstreljevanje tkiv in s tem omogočen vnos tujje DNA v celico, kjer se nato lahko integrira v genom. Obstreljevanje z gensko pištolo je najbolj uporabljana in uspešna tehnika neposrednega vnosa genov. Postopek temelji na nanosu DNA na drobne delce zlata ali volframa. Delce nanesemo na membrane, jih nato s pomočjo potisnega plina (helij ali dušik) močno pospešimo in ustrelimo v tarčno tkivo. Delci zlata predrejo celične stene in omogočijo vnos DNA. Ta metoda je trenutno najbolj konkurenčna metoda posrednemu vnosu s pomočjo vektorjev in se uporablja tam, kjer drugi načini (predvsem transformacija z bakterijo *A. tumefaciens*) še niso uspeli (Galun in Breiman, 1997; Bohanec in sod., 2004).

2.5.2 Vnos genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterija *A. tumefaciens* živi v tleh v rastlinski rizosferi. Da lahko okuži rastlino, je nujno, da je le ta ranjena. Ranitev rastlinskega tkiva v rastlini povzroči tvorbo in sproščanje fenolnih snovi (acetosiringon), ki jih zazna bakterija in v njej povzročijo aktivacijo vir genov. To so geni, ki se nahajajo na kromosomski in plazmidni DNA bakterije in so odgovorni za približanje bakterije k ranjenemu rastlinskemu genu ter za prenos dela plazmidne DNA iz bakterije v rastlino. Del prenesene plazmidne DNA, ki se naključno vključi v DNA rastline, se imenuje T-DNA in nosi gene, ki v rastlini sprožijo tvorbo avksinov in citokininov. Ti povzročijo nenormalno rast celic, kar je vidno kot tumorska tvorba na rastlini. Gene, ki povzročajo tvorbo tumorjev imenujemo onkogeni (onc). Poleg teh pa so na T-DNA tudi geni, ki v rastlini povzročijo tvorbo opinov. Opini so snovi, ki za rastlino nimajo koristi, so pa vir dušika in ogljika za *A. tumefaciens*, in jih ne more izkoristi nobena druga vrsta bakterij. Z vnosom lastne DNA v rastlino si tako *A. tumefaciens* zagotovi hrano (Galun in Breiman, 1997; Ülker in sod., 2008).

Po odkritju naravne sposobnosti bakterije *A. tumefaciens* za prenos tujih genov v genom rastline, se je napredek usmeril v razvoj različnih sistemov Ti-plazmidnih vektorjev. Razoroženi naravni Ti-plazmid ima odstranjene onc gene in gene za sintezo opinov, zato ne more inducirati rakaste tvorbe. Glavna težava razoroženega Ti-plazmida, kot vektorja pri transformaciji rastlin, je njegova velikost (približno 100 kbp), saj so s tako velikim plazmidom molekulske in genetske manipulacije zelo zahtevne. Zato je bil glavni napredek pri razvoju uporabnih vektorjev za transformacijo odkritje, da se lahko T-DNA in vir regije nahajajo ločeno na dveh plazmidih brez izgube sposobnosti prenosa T-DNA v rastlinsko

celico. Najpogosteji vektorski sistem je tako binarni tip, kjer bakterija vsebuje dva plazmida. Eden se imenuje pomožni vektor, ki je sestavljen iz skoraj celotnega Ti plazmida brez T-DNA, drugi je binarni vektor, ki je manjši plazmid z vključenimi T-DNA mejnimi regijami (Bevan, 1984). Ker smo v diplomski nalogi uporabili binarni vektorski sistem, se je plazmid lahko pomnoževal tako v bakteriji *E. coli* kot v *A. tumefaciens*.

2.5.2.1 Mehanizem prenosa T-DNA v rastlinsko celico

Za prenos T-DNA so potrebni geni za virulenco (vir geni), ki so na Ti-plazmidu in kromosomski virulentni geni (chv geni), ki so na bakterijskem kromosому. Fenolne komponente, nastale ob poškodbi rastline, se vežejo z virA proteinom in ta kompleks nato fosforilira virG protein, ki je v bakterijski citoplazmi. Modificiran virG protein ima vlogo transkripcijskega aktivatorja za ostale vir gene. Proces integracije T-DNA v rastlinsko DNA poteka s pomočjo rekombinacije in vključevanje T-DNA je pogostejše v območja rastlinske DNA, ki se prepisuje. Pri procesu integracije sodelujejo rastlinski encimi in proteini vezani na T-DNA. Ko se T-DNA vključi, ostane stabilna v genomu. Vključi se lahko ena ali več kopij T-DNA na genom (Bohanec in sod., 2004; Ülker in sod., 2008).

2.5.2.2 Plazmida pMDC32 in pMDC85

Vektorje pMDC, ki izvirajo iz pCambia T-DNA uporabljam za Gateway kompatibilno rekombinacijo (Slika 7). Za naš poskus smo uporabili dva klonirna vektorja pMDC32 (Slika 3) in pMDC85 (Slika 5). Regijo, ki se bo vnesla v rastlino, omejujeta področji RB (right border) in LB (left border), tako imenovani mejni sekvenci, ohranjeni iz naravne T-DNA. V to regijo so vključeni mesto za rekombinacijo (att), regulatorni elementi in gen za odpornost proti antibiotiku higromicinu, ki služi za selekcijo transformant (Slika 4 in Slika 6).

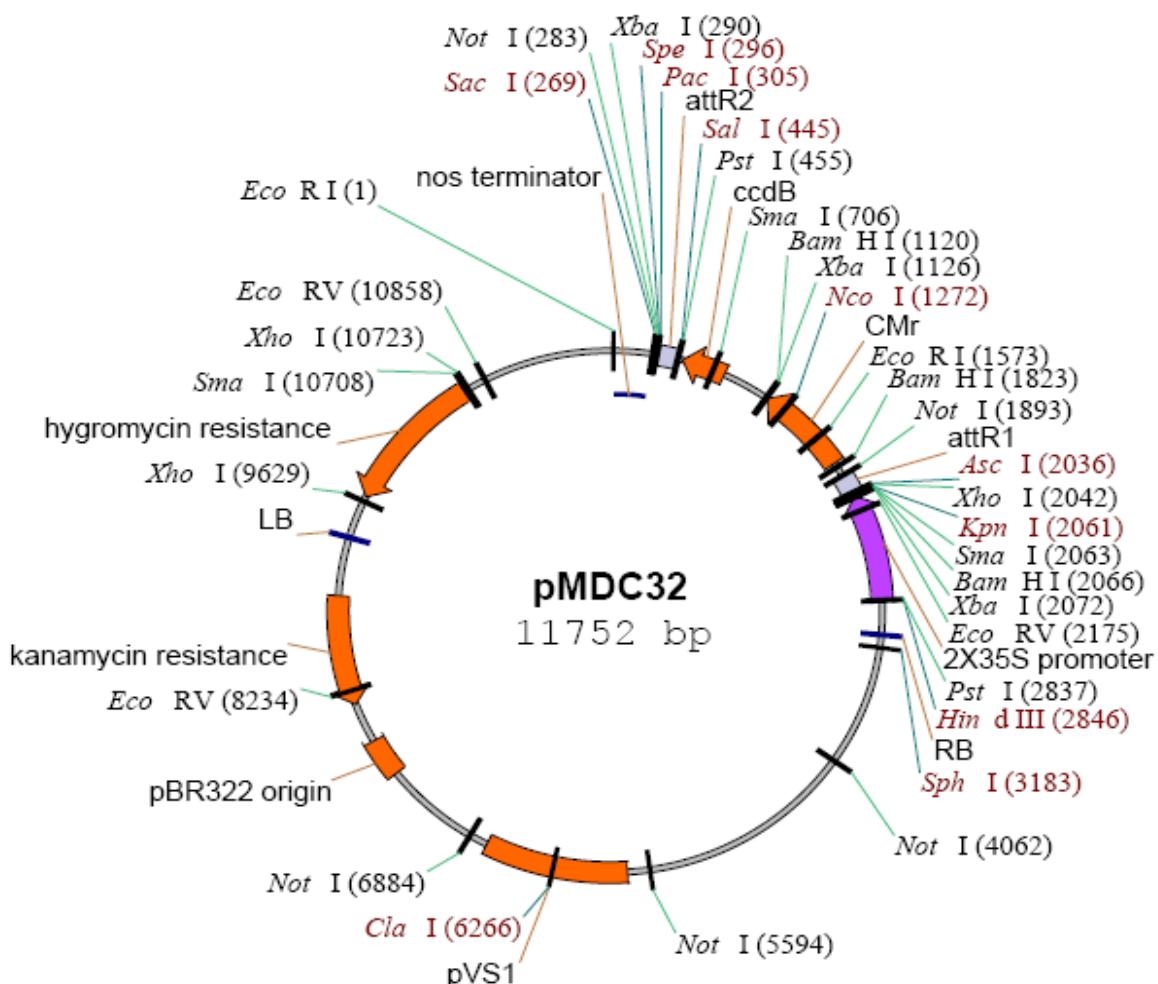
AttR1 in attR2 sta značilni mestci za Gateway rekombinacijsko kloniranje. Pred rekombinacijo se med tem dve mestoma nahaja gen *ccdB*, ki s toksičnimi produkti omogoča negativno selekcijo nezrekombiniranih vektorjev. Ob rekombinaciji z drugim vektorjem, se na to mesto vstavi gen, ki ga želimo vstaviti, in zamenja *ccdB* gen. Dokazano je tudi, da att mestci ne vplivata na nivo ekspresije transgena v rastlinski celici.

Regulatorni element za izražanje vstavljenega gena je dvojni 35S promotor, iz virusa mozaika cvetače CaMV-35S, ki je visoko aktiven v večini rastlinskih celic. S terminatorjem tNOS predstavljata klasično kombinacijo v pripravi konstrukta za transformacijo.

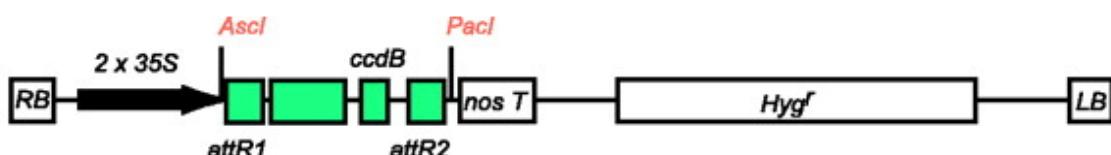
Plazmid pMDC85 je enak pMDC32 plazmidu, le da ima za attR2 mestom dodan mgfp6 gen. Po prepisu gena v protein tako dobimo C-terminalno fuzijo našega proteina z reporterskim genom GFP6 (zeleno fluorescentni protein). Ta omogoča sledenje izražanja vstavljenih genov s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa.

Zunaj regije, ki se vnese v rastlino, oba plazmida vsebujejo zapis za odpornost proti antibiotiku kanamicinu (Kn). Pomembni področji sta še dve ori mestci pBR322 za replikacijo v *E.coli* in pVS1 za *A. tumefaciens*.

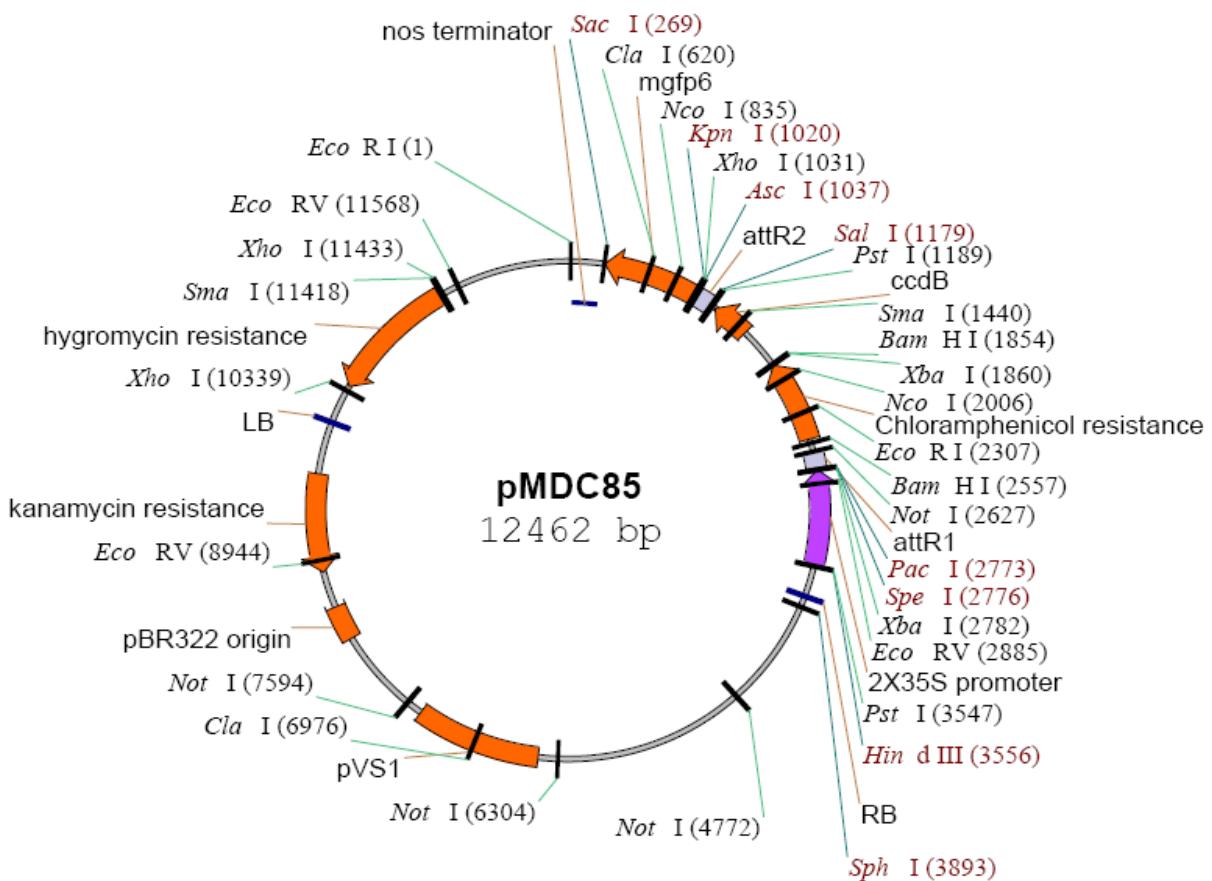
Gateway® System predstavlja strnjen protokol za kloniranje tarčnega gena od prvega koraka z metodo verižne reakcije s polimerazo do zadnjega v *A. tumefaciens* brez uporabe restriktijskih encimov (Slika 8). Metoda temelji na osnovi mestno specifične rekombinacije bakteriofaga λ in je uporabna tudi za doseganje transformiranih rastlinskih linij s posrednim vnosom T-DNA z *A. tumefaciens*, ko je ponavadi potrebno gen klonirati v večje plazmide (od 5 do 12 kb). Izdelanih je veliko Gateway kompatibilnih vektorskih sistemov, kot so na primer pMDC binarni vektorski sistemi.



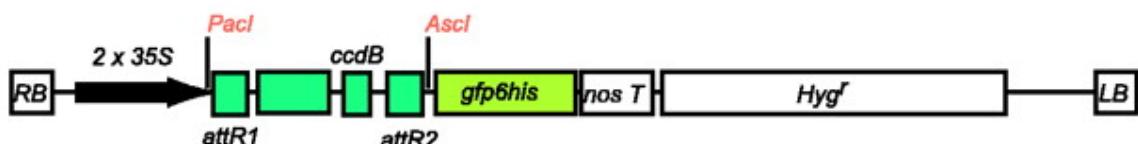
Slika 3: Plazmidna karta vektorja pMDC32 (povzeto po Curtis in Grossniklaus, 2003)

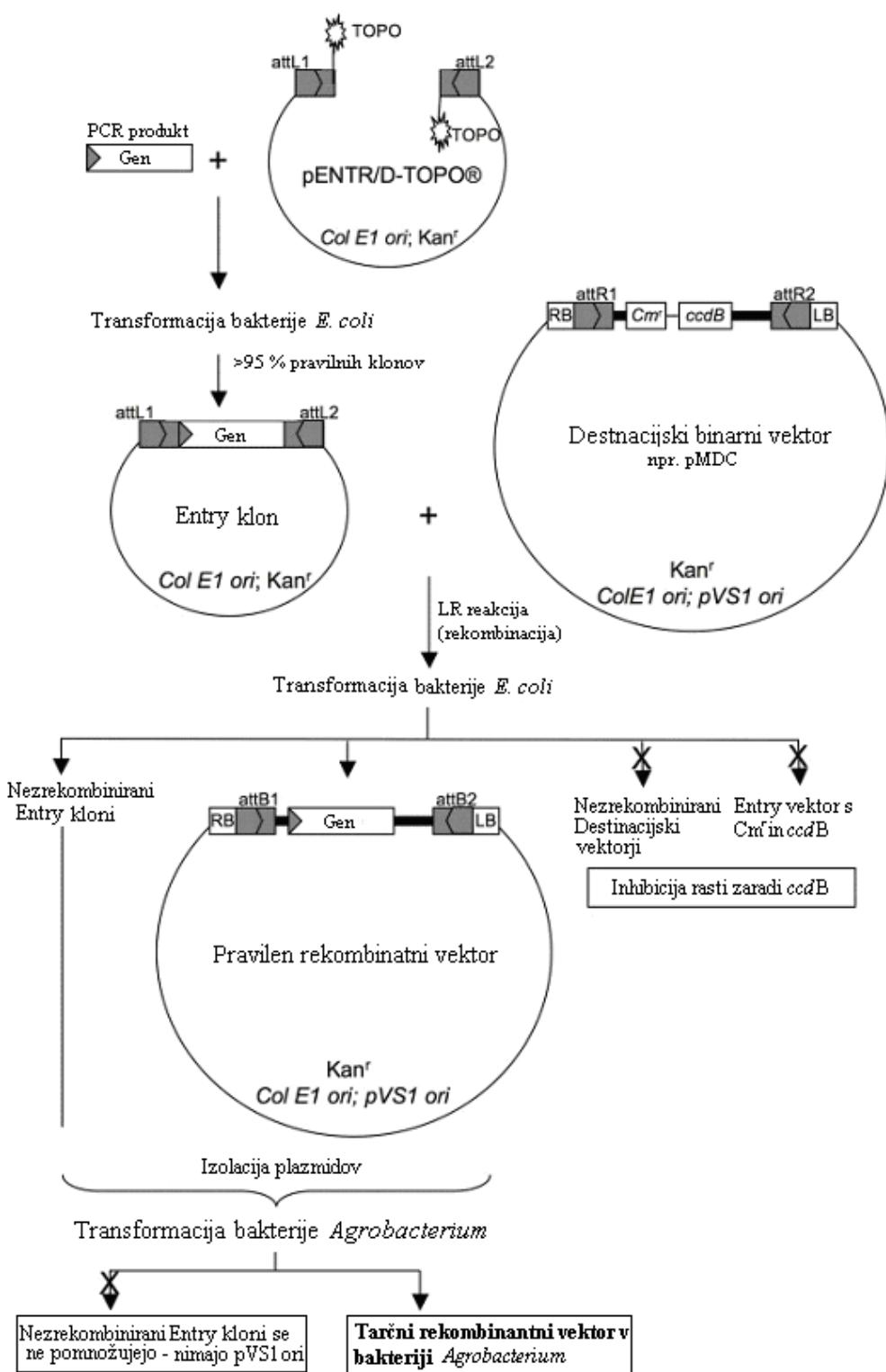


Slika 4: Področje T-DNA med obema mejnima sekvencama v plazmidu pMDC32, z označenima mestoma attR1 in attR2 za Gateway rekombinacijsko kloniranje gena (povzeto po Curtis in Grossniklaus, 2003). Oznaki RB (angl. right border) in LB (angl. left border) sta tako imenovani mejni sekvenci, ohranjeni iz naravne T-DNA. ccdB gen: onemogoča rast bakteriji *E. coli*. seva *Omnimax*. Hygr: odpornost proti antibiotiku higromicinu



Slika 5: Plazmidna karta vektorja pMDC85 (povzeto po Curtis in Grossniklaus, 2003)

Slika 6: Področje T-DNA med obema mejnima sekvencama v plazmidu pMDC85, z označenima mestoma attR1 in attR2 za Gateway rekombinacijsko kloniranje gena (povzeto po Curtis in Grossniklaus, 2003). Oznaki RB (angl. right border) in LB (angl. left border) sta tako imenovani mejni sekvenki, ohranjeni iz naravne T-DNA. *ccdB* gen: onemogoča rast bakteriji *E. coli* seva *Omnimax*. Hygr: odpornost proti antibiotiku higromicinu. *gfp6his*: gen za reporterski protein GFP (zeleno fluorescentni protein)



Slika 7: Shema Gateway® tehnologije kloniranja gena od PCR produkta do transformacije v bakterijo *Agrobacterium*. Col E1 ori: mesto replikacije v bakteriji *E. coli*. pVS1 ori: mesto replikacije v bakteriji *Agrobacterium*. Kan^r: kanamicinska rezistenca. Cm^r: kloramfenikolna rezistenca. RB: desna mejna sekvenca T-DNA. LB: leva mejna sekvenca T-DNA. attL, attR, attB: prepoznavna mesta rekombinacije. ccdB: ccdB gen v bakteriji *E. coli* (povzeto po Xu in Li, 2008)

2.6 BT RASTLINE ODPORNE PROTI ŽUŽELKAM

Bakterija *B. thuringiensis* je bila odkrita v sviloprejki na Japonskem leta 1902 (Jouain, 1998). *B. thuringiensis* je po Gramu pozitivna bakterija, ki živi v različnih življenjskih okoljih, kot je prst, površina rastlin ali v shranjenih žitih. Bakterija *B. thuringiensis* lahko preide v vegetativno stanje in proizvaja spore. V obdobju sporulacije bakterija *B. thuringiensis* tvori insekticidni kristalni protein. Kristalni protein je sestavljen iz ene ali več proteinskih podenot, ki jih imenujemo protoksini, delta-toksini, Cry proteini ali Bt proteini (Bohanec in sod., 2004). Spora kot taka lahko preživi mnogo let, medtem, ko je preživetje kristalnih proteinov zelo variabilno, glede na okoliške pogoje. Večina Bt sevov izraža različne kristalne proteine, z različno aktivnostjo, kar poveča verjetnost, da bo gostitelj občutljiv vsaj na enega izmed teh proteinov (Peferoen, 1997).

Pri hranjenju ličink žuželk s sporami *B. thuringiensis* kristalni protein v tankem črevesju razpade na protoksine pod vplivom alkalnega pH prebavnih sokov in črevesnih proteaz. V tankem črevesju ta kristalni protein cepi tudi posebna proteaza na več proteinskih podenot in tako se generirajo toksični fragmenti, ki so specifični za žuželke različnih vrst. Bt toksin se veže na epitelne receptorje v prebavilu ličink in od tam prodira v apikalno membrano epitelnih celic črevesja, kjer toksin omogoči formacijo manjših por v membrani. Poškodovana membrana vodi v lizo celic in posledično v smrt ličnike zaradi stradanja (Bohanec in sod., 2004; De Maagd in sod., 1999).

Do danes je bilo izoliranih in sekveniranih vsaj 90 protoksinov iz bakterije *B. thuringiensis*. Gene so sprva klasificirali v različne razrede (cryI, cryII, cryIII), glede na homologijo proteinske strukture in vrsto gostitelja. CryI toksini so aktivni proti redu Lepidoptera, medtem ko CryIII delujejo proti redu Coleoptera. Vendar pa so nadaljnje raziskave na tem področju pokazale, da takšna klasifikacija ni nujno pravilna, zato so bile predlagane nove nomenklature (Peferoen, 1997).

Leta 1985 so v Plant Genetic System, Ghent v Belgiji kot prvo podjetje proizvedli transgeno rastlino tobak, odporno proti določenim žuželkam, ki so občutljive na Bt toksin. Gensko spremenjene rastline z ekspresijo genov iz bakterije *B. thuringiensis* so danes že v komercialni uporabi. Prve transgene rastline, koruza z ekspresijo CryIA(b) toksina (MaximizerTM iz Novartisa), bombaž z ekspresijo CryIA(c) (BollgardTM, Monsanto), ter krompir z vstavljenim CryIIIA (NewleafTM, Monsanto) so bile leta 1995 v ZDA odobrene za prodajo na trgu.

Bakterija *B. thuringiensis* je bila sprva uporabljana kot bioinsekticid in glavna prednost take uporabe je neškodljivost za sesalce in netarčne organizme, vendar pa je trajanje učinka glavna pomanjkljivost. Tehnologije genskega inženiringa ponujajo možnosti vstavljanja genov drugih vrst v kulturne rastline. Obstajajo različne tehnike pridobitve rastlin odpornih proti žuželkam. Najbolj uporabljan pristop, δ-endotoksin kodirajoča sekvenca, izvira iz bakterije *B. thuringiensis* in je v uporabi vse od leta 1995, ko se je na trgu pojavila prva generacija rastlin odpornih proti žuželkam. Vendar pa so poskusi na polju z geni iz bakterije in sintetično pridobljenimi geni pokazali, da je ekspresija proteinov iz sintetično pridobljenih genov višja, kot ekspresija cry genov. Kopičenje ali piramidenje genov je metoda, ki omogoča bolj učinkovito nadzorovanje insektov. Dober primer te strategije so linije koruze z ekspresijo

dveh Bt toksinov proti koruznemu hrošču. Ekspresija insekticidnih proteinov iz drugih virov, kot je bakterija *B. thuringiensis* bi preprečevala, da bi žuželke postale odporne na te toksine (Ferry in sod., 2004).

2.7 POTENCIJALNI DONORJI GENOV ZA POVEČANJE ODPORNOSTI RASTLIN PROTI ŽUŽELKAM

Poleg že omenjenih Bt rastlin obstaja še veliko alternativnih možnosti za doseganje odpornosti proti škodljivcem, prav tako tudi z različnimi donorskimi organizmi.

2.7.1 Druge rastlinske vrste

2.7.1.1 Proteinazni inhibitorji

Rastlinski proteinazni inhibitorji so majhni proteini, ki se v naravi pojavljajo v mnogih rastlinskih vrstah in znano je, da imajo vlogo pri naravnem obrambnem mehanizmu proti žuželkam. Proteinazni inhibitorji rastlin imajo sposobnost vezave in inhibicije prebavnih proteinaz pri žuželkah. Vendar pa je potrebna karakterizacija proteolitske aktivnosti pri posameznih vrstah žuželk, če želimo nadzirati le določeno vrsto škodljivca, saj obstaja mnogo različic in tipov endo- in eksoproteinaz (Wilhite in sod., 2000). Glede na specifičnost proteinazne inhibitorje lahko razdelimo v štiri skupine, serin-, cistein-, metalo- in aspartil-proteazni inhibitorji. Žuželke z nevtralno ali alkalno črevesno floro povezujemo s serinskimi proteazami, kot so tripsin ali kimotripsin. V nasprotju pa žuželke s kislo črevesno floro koristijo cisteinske proteaze, kot je katepsin B, H in L, ali aspartil proteinaze, kot je katepsin D in pepsin (Terra in Ferreira, 1994).

Sinteza proteinov, ki sodelujejo pri metabolnih procesih v žuželkah, je široko uporabljana obrambna strategija pri rastlinah. Ti proteini se lahko sintetizirajo v tkivih, ki so še posebej občutljiva na napade žuželk, npr. semena, ali pa je sinteza inducirana z nastankom mehanske poškodbe, kot v primeru, ko se žuželka prehranjuje z listom. Izolirani proteazni inhibitorji iz različnih rastlin so v *in vivo* umetno narejenih prehranskih sistemih in *in vitro* testih z insekticidnimi proteazami pokazali škodljive učinke za žuželke. Ti učinki povzročajo motnje pri rasti in razvoju ličink, v nekaterih primerih pa povzročijo smrt žuželk. Poznavanje različnih družin proteinaznih inhibitorjev in njihove vloge pri prebavi žuželk je omogočilo vnašanje genov za proteinazne inhibitorje iz ene rastlinske vrste v druge, npr. kulturno pomembne rastline (Habib in Khalid, 2007).

Prvi gen, ki je bil uspešno prenesen v drugo rastlinsko vrsto je bil izoliran iz črnega fižola (*Vigna unguiculata*). Ta protein, CpTI, je učinkovit metabolit proti mnogim škodljivcem (Jouanin, 1997). Raziskave in podatki na področju cisteinskih proteinaznih inhibitorjev so pokazale da imajo interakcije med cisteinskimi encimi in cisteinskimi inhibitorji ključno vlogo pri rastlinski obrambi. To odkritje je povzročilo mnoge nove raziskave na področju vzgoje rastlin, ki bi proizvajale proteinazne inhibitorje (Oliveira in sod., 2003).

Žuželke lahko postanejo odporne na rastlinsko obrambo, kar je rezultat evolucije in nenehnih mutacij. Kljub temu, da so nekatere žuželke sposobne prilagoditve na proteinazne inhibitorje,

se razvoj transgenih rastlin s to vrsto odpornosti nadaljuje, saj je sposobnost adaptacije na določen proteinazni inhibitor vrstno specifična (Ferry in sod., 2004, Gruden in sod., 2004).

2.7.1.2 α -amilazni inhibitorji

Pri nekaterih stročnicah, ki so odporne proti hroščem so pokazali, da so za to odgovorni inhibitorji α -amilaz v semenih. Gen za inhibitor α -amilaz so prenesli v grah in zaradi tkivno specifičnega promotorja se je gen izražal le v semenih transgenega graha. Semena graha so vsebovala do 3 % vnesenega tujega gena iz fižola. Semena graha so bila odporna tako proti škodljivcem, ki uničujejo shranjene pridelke, kot tudi proti poljskim škodljivcem. Ta strategija pridobivanja transgenih rastlin odpornim proti škodljivcem ni bila uporabljena v komercialne namene, saj so v poskusu hrانjenja miši ugotovili, da le ta povzroči sistemski imunski odgovor (Gatehouse, 2008).

2.7.1.3 Hitinaze, triptofan dekarboksilaze

Hitin je v žuželkah prisoten ne le kot material za ogrodje, temeč tudi kot sestavina peritrofne membrane, ki varuje sluznico črevesja pri žuželkah. Hitinazna aktivnost lahko torej moti prebavo pri žuželkah. Ekspresija hitinaze v transgenih rastlinah povzroča večjo umrljivost ličink hroščev.

Alkaloidi prisotni v rastlinah žuželke odvračajo, da bi se prehranjevale z njimi. Ekspresija triptofan dekarboksilaze iz rastlin *Catharanthus roseus* v rastlini tobaka povzroča sintezo triptamina, katerega tobak sicer ne vsebuje. Producija triptamina v transgeni rastlini tobaka deluje proti ščitkarjem (*Bemisia tabaci*). Mehanizem delovanja s katerim triptamin povzroča motnje pri žuželkah še ni znan (Gatehouse, 2008).

2.7.1.4 Lektini

Lektini so (gliko)proteini, ki se vežejo na ogljikove hidrate. Prisotni so v vseh kraljestvih (živali, rastline, glice, bakterije in virusi). V rastlini jih najdemo v različnih tkivih, še posebej so zastopani v semenih in tkivih za shranjevanje. Večina rastlinskih lektinov ima potencialno vlogo v obrambi rastlin pred škodljivimi žuželkami (Gatehouse in sod. 2004). Ena pomembnejših lastnosti lektinov, kot molekul prisotnih v prehrani živali je, da jih encimi prisotni v gastrointestinalnem traktu ne morejo razgraditi. Lektini v prehrani živali predstavljajo snovi brez hranilne vrednosti, še več, lahko so toksični za žuželke (Gatehouse, 2008). Mehanizem verjetno povzroča specifično vezavo lektina na glikozilirane skupine prisotne na membranah celic prebavnega trakta. Posledica tega so lahko številni škodljivi lokalni in sistemski učinki. Lokalni učinki lektinov so inhibicija delitve ali izguba črevesnih epitelijskih celic, poškodovanje luminalne membrane črevesnega epitelija, motnje prebave in absorbcije hranil, vplivi na spremembe v bakterijski flori in vpliv na imunske stanje v prebavnem traktu. Sistemski učinki predstavljajo prekinitev metabolizma ogljikovih hidratov, lipidov in proteinov, povečanje in atrofijo notranjih tkiv in organov, ter spremembo hormonalnega in imunskega stanja (Jouanin, 1997). Čeprav podrobnosti insekticidnega

delovanja lektinov še niso poznane, se je izkazalo, da sta odpornost na proteolitično razgradnjo z encimi žuželk in vezava na strukture črevesja dve osnovni dejstvi, ki kažeta na škodljiv vpliv lektinov na žuželke. Kljub temu, da je poznano veliko število rastlinskih lektinov, so le nekatere izmed njih uporabili za prenos v rastline z namenom povečanja odpornosti proti žuželkam. Lektin GNA iz zvončka (*Galanthus* sp.) so izrazili v floemu riža, ki je postal delno odporen proti žuželki *Nilaparvata lugens* in še nekaterim drugim žuželkam iz družine polkrilcev, vendar pa je povzročil škodljive učinke na sesalcih, zato je pomembno pri izbiri lektinov, kot tarčnih genov to, da le ti niso škodljivi za netarčne organizme (koristne žuželke, ptice, ljudje). Takšen pristop bi lahko povečal pridelek in zmanjšal uporabo pesticidov (Vasconcelos in Oliveira, 2004).

2.7.1.5 Sekundarni metaboliti

Mnoge rastline tvorijo poleg snovi, ki jih potrebujejo za gradnjo organizma ali za založna hranila, tudi snovi, ki niso neposredno potrebne za njihov obstoj, temveč imajo lahko različne funkcije, največkrat povezane z odvračanjem škodljivcev ali patogenih gliv, lahko pa so namenjene tudi privabljanju opravevalcev. Takim snovem pravimo sekundarni metaboliti (Bohanec in sod., 2004).

Nove tehnologije omogočajo vnos celotnih metabolnih poti iz ene rastlinske vrste v drugo. Primer take rastline je sirek (*Sorghum bicolor*), kamor so vnesli dva gena, ki kodirata Cyt P4P oksidazo in UDP glikoziltransferazo iz repnjakovca (*Arabidopsis* sp.). Takšne rastline so postale odpornejše proti hrošču *Phyllotreta nemorum*, ki je pogost škodljivec na križnicah (Kristensen in sod. 2005)

2.7.1.6 Sinteza hlapnih spojin

Zaščito rastlin pred škodljivimi žuželkami predstavljajo hlapne snovi, ki jih oddajajo rastline. Sestavo hlapnih snovi v tobaku so spremenili s pomočjo interferenčne RNA (RNAi), ki je preprečila izražanje gena cytP450 oksidaze. Transgene rastline so sicer odvračale listne uši, vendar niso bile v celoti odporne. Hlapne snovi, ki jih izločajo rastline ob poškodbah, lahko tudi privabljajo naravne sovražnike škodljivcev in s tem povečajo odpornost proti škodljivcem (Wang in sod. 2001).

2.7.2 Bakterije

2.7.2.1 Holesterol oksidaze

Bakterijske holesterol oksidaze imajo insekticidni učinek, ki je podoben delovanju Bt toksina, saj povzročijo destabilizacijo membran v črevesju žuželk. Listi transgenega tobaka, ki je sintetiziral aktivno obliko encima, so bili toksični za žuželke vrste *Anthonomus grandis*, ki so pogost škodljivec bombaža. Pri tej strategiji odpornosti rastlin proti žuželkam so naleteli na oviro, saj so pri transgenih rastlinah opazili fenotipske anomalije, ki so bile najverjetneje posledica vpliva holesterol oksidaz na steroidno signalno pot. Anomalije se niso pojavile le v

rastlinah, ki so imele encim prisoten v kloroplastih. Takšna metoda je zato uporabna le pod pogojem, da se gen, ki kodira holesterol oksidazo, vključi v genom kloroplasta (Gatehouse, 2008).

2.7.2.2 Insekticidni protein iz bakterije *Photorhabdus luminescens*

Za biološko kontrolo škodljivih žuželk uporablajo ogrčice nematode vrste *Heterorhabditis*, ki vsebuje simbiotske enterobakterije. Ob vstopu nematodov v gostiteljsko žuželko, se bakterijske celice iz ogorčic sprostijo v krvni obtok žuželke. Bakterije izločajo toksine, ki povzročajo propad žuželke. Najbolj poznane so bakterije vrste *P. luminescens*, za katere je znano, da izločajo mnogo insekticidnih komponent. Ena izmed njih je toksin A, ki ga kodira gen *tcdA*. Transgena rastlina *Arabidopsis thaliana*, ki je sintetizirala toksin A, je bila skoraj popolnoma zaščitena pred napadom gošenic metuljev vrste *Manduca sexta*, prav tako je bil listni ekstrakt toksičen za gošnice metuljev, ki napadajo koruzo (Gatehouse, 2008).

2.7.3 Glive

2.7.3.1 Proteini izolirani iz gob za odpornost proti žuželkam

Fiziološka vloga peptidaznih inhibitorjev iz prostotrosnic še ni povsem poznana, predvideva pa se, da imajo inhibitorji peptidaz pomembno obrambno vlogo pred žuželkami in parazitskimi mikroorganizmi, ki napadajo gobe (Wilhite in sod., 2000). Tudi v naravi lahko opazimo, da mnoge rodove gob žuželke ne napadajo. Veliko število gob je strupenih za žuželke, zato je pomembno razumeti kemijo delovanje teh strupov pri aktivnosti žuželk. Wang in sodelavci (2002) so s svojimi rezultati prišli do zaključka, da imajo proteini iz gob pomembno vlogo pri insekticidni aktivnosti in so zato dober vir genov za zaščito rastlin proti žuželkam. Tudi druge raziskave so pokazale, da so številne vrste gob toksične za vrsti insektov redov *Spodoptera littoralis* in *Drosophila melanogaster*, ki sta bili v tem poskusu izbrani kot modelna organizma (Wang in sod., 2002). Raziskovanje in poskusi uporabe gob kot donorskih organizmov genov za odpornost rastlin proti žuželkam so v začetnih fazah raziskovanja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Gojišča

Za posamezna gojišča smo postavili posode z zatehtanimi sestavinami na magnetni mešalnik, dolili deionizirano vodo in pustili, da se raztopina dobro premeša. Ko so se vse komponente raztopile, smo med mešanjem umerili pH vrednost z dodajanjem NaOH ali HCl (agar smo dodali po umerjanju pH). Gojišča smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C in 103,4 kPa. Če je bilo potrebno v gojišče dodati 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 petrijevke. V steklene epruvete smo gojišče razlili pred avtoklaviranjem in nato epruvete z gojiščem avtoklavirali.

Preglednica 2: Sestava vseh uporabljenih gojišč

GOJIŠČE	SESTAVINE (proizvajalec)	ZALOŽNA KONCENTRACIJA	KONČNA KONCENTRACIJA	OPOMBE
MS		MAKROELEMENTI		pH=5,8
	NH ₄ NO ₃ (Sigma)		1650 mg/l	
	KNO ₃ (Merck)		1900 mg/l	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck)		440 mg/l	
	KH ₂ PO ₄ (Kemika)		170 mg/l	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O (Merck)		370 mg/l	
	MIKROELEMENTI			
	CoCl ₂ · 6H ₂ O (Merck)		0,025 mg/l	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O (Merck)		0,025 mg/l	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)		27,8 mg/l	
	H ₃ BO ₃ (Merck)		1,9 mg/l	
	MnSO ₄ · 4H ₂ O (Sigma)		22,3 mg/l	
	KI (Merck)		0,83 mg/l	
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (Sigma)		0,25 mg/l	
	VIR Fe			
	FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)		27,8 mg/l	
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (Kemika)		37,3 mg/l	

Se nadaljuje

Nadaljevanje

GOJIŠČE	SESTAVINE (proizvajalec)	ZALOŽNA KONCENTRACIJA	KONČNA KONCENTRACIJA	OPOMBE
VIR ORGANSKIH SPOJIN				
	glicin (Merck)		2 mg/l	
	nikotinska kislina (Kemika)		0,5 mg/l	
	piridoksin - HCl (Sigma)		0,5 mg/l	
	tiamin - HCl (Caldiochem)		0,5 mg/l	
Za trdno gojišče MS20 (MS30) dodamo :				
	saharoza (Kemika)		20 g/l(30g/l)	
	agar (Bacto)		8 g/l	
LB	tripton (Bacto)	10g/l		pH=7,0
	kvasni ekstrakt (Bacto)	5 g/l		
	NaCl (Merck)	5 g/l		
	agar (Bacto)	8 g/l		
YM	kvasni ekstrakt Bacto)	0,4 g/l		pH=7,0
	manitol (Kemika)	10 g/l		
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck)	0,2 g/l		
	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O (Kemika)	0,5 g/l		
	NaCl (Merck)	0,1 g/l		
	agar (Bacto)	15 g/l		
R3B	MS gojišče			pH=5,8
	saharoza (Kemika)	30g/l		
	agar (Bacto)	8g/l		
	NAA	180 mg/l	2 mg/l	
	BAP	220 mg/l	1 mg/l	
PACM	MS gojišče			pH=6,5
	saharoza (Kemika)	30g/l		
	kazein hidrolizat	2g/l		
	2,4 D	220 mg/l	1 mg/l	
	kinetin (Sigma)	220 mg/l	0,5 mg/l	
Zcv(h)	MS gojišče			pH=5,8
	saharoza (Kemika)	20g/l		
	agar (Bacto)	8g/l		
	makrocef (Krka)	250mg/ml	200 mg/l	
	zeatin ribozid	220 mg/l	1 mg/l	
	vankomicin	100mg/ml	200 mg/l	
	higromicin	100mg/ml	20 mg/l	

Trdno gojišče MS (Murashige and Skoog, 1962) s 30 g/l saharoze smo uporabili za gojenje tkivnih kultur krompirja v epruvetah, poleg tega je brez agarja služil kot osnovno gojišče za pripravo drugih. Gojišče R3B smo pripravili na začetku transformacije izsečkov. V petrijevke z R3B gojiščem in filter papirjem, katerega smo omočili z PACM gojiščem, smo polagali izsečke, da se pred samo transformacijo ne bi izsušili. Tekoče LB gojišče smo uporabili za pripravo transformacijske suspenzije z agrobakterijo *A. tumefaciens*, medtem ko nam je trdno gojišče služilo za namnožitev agrobakterije. V petrijevkah z gojiščem YM smo namnožili bakterijo *E. coli* in izvedli elektroporacijo (Preglednica 2).

3.1.2 Reagenti in barvila:

- 6 x loading dye (Fermentas),
- etidijev bromid 10 mg/ml (Sigma).

3.1.3 Pufri in raztopine:

- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas),
- MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas),
- TAE pufer (pripravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo),
- sterilni 50% glicerol (pripravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo),
- 70% in 96% etanol (Pharmachem).

3.1.4 Encimi:

- Immolase™ DNA Polymerase (Bioline),
- DNase I (Invitrogen).

3.1.5 Testni kompleti:

- innuPREP Plant RNA Kit (Analytikjena bio solutions),
- Wizard ® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA),
- DNeasy Kit (Qiagen),
- AgPath-ID™ One Step RT-PCR (Ambion).

3.1.6 Rastlinski material

Za transformacijo tkivnih kultur krompirja smo potrebovali zdrave rastline krompirja sorte Désirée v tkivni kulturi (zbirka NIB) (Slika 3). Rastlinski material smo namnožili v brezprašni komori, v sterilnih pogojih. Rastlino smo s pinceto vzeli iz epruvete in s skalpelom izrezali najčvrstejše nodije. Vsak nodij smo prenesli v svojo epruveto s hranilnim gojiščem MS30 (Preglednica 2). Za poskus smo potrebovali približno 120 štiri tedne starih rastlin v tkivni kulturi. Krompirje smo gojili približno 4 tedne v rastni komori pri naslednjih pogojih:

- 16 ur osvetlitve z žarnico (Osram L58 W/77),
- 8 ur teme,

- T med osvetlitvijo 21°C,
- T v temi 19°C,
- relativna zračna vlaga 94 ± 2%,
- osvetljenost 3000 luxov.

Pri enakih razmerah v rastni komori je potekala tudi genska transformacija rastlin krompirja, le da smo tam uporabili izsečke internodijev.



Slika 8: Tkivna kultura zdravega krompirja sorte Désirée

3.1.7 Bakterijski material in plazmidi

3.1.7.1 Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *E. coli* z vstavljenim genom *g1* je bila izhodiščni material za naše delo in je bila predhodno pripravljena na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Plazmid sem prejela v celicah One Shot® OmniMAX™ 2-T1® (Phage-Resistant Cells), (Invitrogen).

3.1.7.2 Bakterija *A. tumefaciens*

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

3.1.8 Laboratorijska oprema:

- Centrifuga (Eppendorf),
- pipete (Eppendorf),
- PCR naprava (Applied Biosystems-AB),
- naprava za elektroforezo (Uvi-tec),
- transiluminator (Invitrogen),
- brezprašna komora za delo z rastlinami v tkivnih kulturah (Ehret),
- brezprašna komora za delo z bakterijami in plazmidi (Biosan),
- avtoklav (Kambič),
- rastna komora (Kambič),
- termoblok (Kambič),
- spektrofotometer (Nanodrop),
- aparatura PCR v realnem času ABI Prism®7900Htsequence detection system (AB),
- homogenizator (Qiagen),
- pH meter (Mettler Toledo),
- tehtnica (Lotrič),
- elektroporator (Eppendorf),
- stresalnik in inkubator (Kambič),
- hladna soba (Angelnatoni Scientifica).

3.2 METODE

3.2.1 Programska orodja za delo s sekvencami

Za preverjanje velikosti produktov verižne reakcije s polimerazo (PCR) in plazmidov na agaroznem gelu, je bilo potrebno računalniško skonstruirati nukleotidni zapis za gen *g1*, označiti vse potrebne sekvence in izračunati pričakovane dolžine naših produktov.

Nukleotidni zapis za plazmid pMDC32 smo poiskali v podatkovnih bazah na spletni strani National Center for Biotechnology Information (NCBI). Zapis je bilo potrebno preurediti v obliko, ki nam omogoča ročno anotacijo določenih sekvenc, ki smo jih potrebovali za izračun pričakovanih dolžin PCR produktov za gen *g1*. Orodje, ki omogoča prenos DNA v ustrezni zapis je Filter DNA na spletni strani Sequence Manipulator Suite (SMS), kjer je na voljo veliko orodij za obdelovanje sekvenc. Ko smo pridobili zapis v ustrezni obliki, smo poiskali in označili vse pomembne sekvence, dodali zapis za naš gen, označili naleganje začetnih oligonukleotidov in izračunali pričakovane dolžine konstruktov.

3.2.2 PCR na osnovi kolonije

Za potrditev prisotnosti gena *g1* v destinacijskih plazmidih pMCD32 in pMDC85 smo uporabili PCR metodo na osnovi kolonije. Gen *g1*, vstavljen v bakterijo *E. coli*, v trajni kulturi, je bil predhodno pripravljen na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Za posamezno transformacijsko reakcijo smo analizirali različno število kolonij bakterij *E. coli*, ki so zrastle na selekcijskih ploščah. Pod aseptičnimi pogoji smo se posamezne kolonije dotaknili s tipsom in jo prenesli v 100 µL vode, lizirali pri 95 °C za 10 min. Nato smo 1 µL liziranih celic prenesli v PCR reakcijo. Tarčni segment, ki smo ga pomnoževali je bil gen *g1*. Detekcija je temeljila na specifični vezavi začetnih oligonukleotidov, ki so jih načrtovali in optimizirali predhodno na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Poleg prisotnosti gena *g1*, smo preverjali tudi intaktnost binarnega plazmida (pMCD32 in pMDC85). V ta namen smo uporabili univerzalne začetne oligonukleotidne M13, ki se jih sicer uporablja za sekvenciranje. Priprava reakcijske mešanice za PCR je bila pri njih enaka, kot pri uporabi gensko specifičnih nukleotidov. Zaradi drugačne temperature taljenja (angl. T melting) in dolžine pričakovanih produktov je bil program podaljševanja nekoliko drugačen (Preglednica 3 in Preglednica 4).

Reakcijo PCR smo izvedli na aparaturi GeneAmp® PCR 9700. Pripravili smo 20 µL reakcijske mešanice za PCR.

Preglednica 3: Priprava reakcijskih mešanic za PCR

KOMPONENTA	VOLUMEN	KONČNA KONCENTRACIJA
10 × Immo pufer	2 µl	1×
50 mM MgCl₂	0,6 µl	1,5 - 2,5 mM
Mešanica dNTP (10 mM)	1 µl	0,5 mM
F začetni oligonukleotid (10 µM)	2 µl	1 µM
R začetni oligonukleotid (10 µM)	2 µl	1 µM
Immolase™ DNA polimeraza (5 enot/µl)	0,2 µl	2,5 enoti
Voda brez nukleaz	11,2 µl	/
Matrična DNA (vzorec)	1 µl	< 0,2 µg / 20 µl
Σ	20 µl	

Preglednica 4: Program podaljševanja zapisa za gen *g1*

Korak	Temperatura	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C	10 min	1×
Denaturacija	95 °C	1 min	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C (gensko specifični začetni oligonukleotidi)	30 s	35×
	60 °C (M13 začetni oligonukleotidi)	30 s	

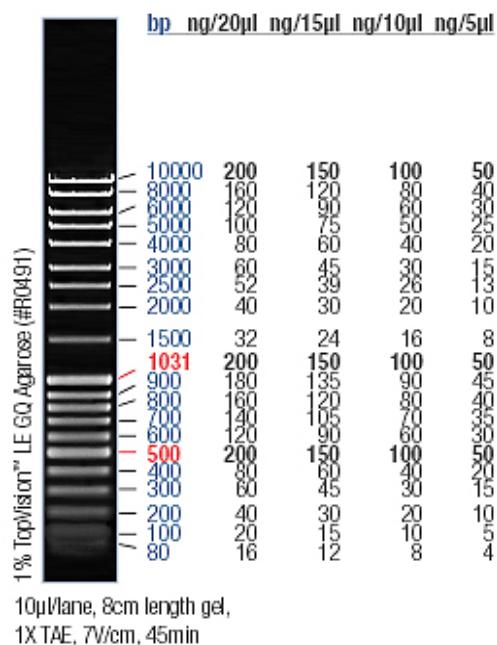
Se nadaljuje

Nadaljevanje

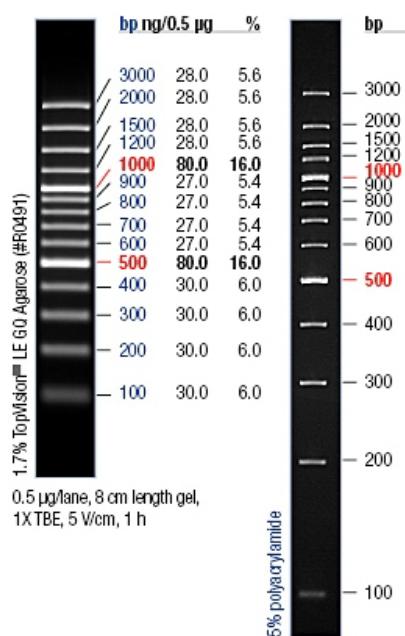
Podaljševanje	72 °C (gensko specifični začetni oligonukleotidi)	2 min	
	72 °C (M13 začetni oligonukleotidi)	3 min	
Končno podaljševanje	72 °C	10 min	1×
Zaustavitev sinteze	4 °C	∞	

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost izvedbe PCR pomnoževanja smo preverili na agarozni gelski elektroforezi. Uporabili smo 0,5 % in 1 % agarozni gel. V čašo smo zatehtali 0,3 g oz. 0,6 g agaroze in dodali 60 ml pufra TAE, ter segrevali do vretja. Ko se je agarosa popolnoma raztopila, smo raztopino pod tekočo hladno vodo ohladili na približno 60 °C, dodali 3 µl etidijevega bromida, nalili v model z vstavljenima glavnikoma in pokrili z aluminijasto folijo, dokler se gel ni strdil. Na gel smo nanesli PCR produkte in izolirane plazmide. Za določanje velikosti produktov smo uporabili 2 različni lestvici (Slika 9 in Slika 10). Elektroforeza je potekala 60 min, na 100 V, 500 mA. Gel smo nato pogledali pod UV svetlobo v transiluminatorju in ga fotografirali.



Slika 9: MassRuler™ DNA Ladder Mix z DNA segmenti velikosti od 80 do 10 000 bp (povzeto po <http://www.fermentas.com/>)

Slika 10: 100 bp DNA Ladder Plus (povzeto po <http://www.fermentas.com/>)

3.2.4 Priprava prekonočne kulture bakterijskih celic *E. coli*

V sterilno Falcon 15 ml centrifugirko smo nalili 5 ml LB gojišča s 50 µg/ml higromicina. V gojišče smo pod sterilnimi pogoji precepili eno kolonijo z agarske plošče. Centrifugirko smo inkubirali preko noči pod aerobnimi pogoji na stresalniku pri 37 °C in 225 obratov na minuto.

3.2.5 Izolacija plazmidne DNA

Iz kulture bakterij smo izolirali plazmidno DNA s pomočjo kita Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Brisco in sod., 1996). Izolacijo smo izvedli po protokolu proizvajalca:

- Z izolacijo smo pričeli zgodaj zjutraj, ko so bile bakterijske celice iz prekonočne kulture v eksponentni fazi rasti.
- Kulturo iz gojišča, smo prenesli v Eppendorf centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 6000 obr/min. Nato smo s pipeto odstranili supernatant.
- Pelet smo raztopili v 250 µl pufra za resuspendiranje (Cell Resuspension Solution) in prenesli v mikrocentrifugirke.
- Celice smo lizirali s 250 µl liznega pufra (Cell Lysis Solution) in premešali, tako da smo mikrocentrifugirko štirikrat obrnili.
- Nato smo dodali 10 µl pufra z alkalno proteazo (Alkaline protease solution), mikrocentrifugirko štirikrat obrnili in inkubirali 5 min na sobni temperaturi.
- Lizatu smo dodali 350 µl nevtralizacijskega pufra in mikrocentrifugirko štiri krat obrnili.
- Centrifugirali smo 10 min pri 20 000 g.

- Lizat smo prenesli v novo mikrocentrifugirko z membransko kolono in centrifugirali 1 min pri 20 000 g.
- Kolono smo nato sprali dvakrat s 750 µl in 250 µl pufra za spiranje kolone (Wash Solution) in centrifugirali 2 min pri istih obratih.
- Sprano kolono smo prenesli v prazno mikrocentrifugirko in dodali 50 µl vode, predhodno ogrete na 80 °C, ter inkubirali 1 min pri sobni temperaturi.
- DNA smo eluirali s centrifugiranjem 1 min pri 20 000 g.
- Izolirano DNA smo shranili pri – 20 °C.
- Po končani izolaciji smo po 1 ul izoliranih plazmidov nanesli na agarozni gel in ocenili količino izolirane DNA.

3.2.6 Elektroporacija agrobakterije

Elektroporacijo smo izvedli po naslednjem postopku:

- Elektrokompetentne celice bakterije *A. tumefaciens*, ki so bile shranjene na -80 °C, smo odtalili na ledu in jih ves čas postopka hranili na ledu.
- V mikrocentrifugirko z odtaljenimi elektrokompetentnimi celicami (100 µl) smo dodali 1 µl plazmidne DNA in mešanico nežno premešali s tapkanjem.
- Vsebino mikrocentrifugirke smo nato nežno prenesli v ohlajeno kiveto (Eppendorf) za elektroporacijo in preverili, da v kiveti ni zračnih mehurčkov. Kiveto smo nastavili v elektroporator (Eppendorf) in elektroporirali celice pri 2000 V.
- Takoj zatem smo v kiveto dodali 1 ml YM tekočega gojišča (segreteta na sobno temperaturo) in suspenzijo prenesli v 15 ml Falcon epruveto, ter inkubirali 3 ure na stresalniku (Kambič) na 30 °C in 225 rpm.
- Po inkubaciji smo z drigalski spatulo razmazali po 20 µl in 200 µl elektroporiranih celic na petrijevke s selekcijskimi gojišči, predgretimi na 30 °C. Petrijevke smo inkubirali 48 ur na 30 °C.

3.2.7 Priprava trajnih kultur

Trajne kulture nam služijo za trajno shranjevanje bakterijskih celic. Pripravili smo jih tako, da smo v sterilno mikrocentrifugirko odpipetirali 350 µl bakterijskih celic in dodali 530 µl 50 % sterilnega glicerola (končna koncentracija glicerola je bila 30 %). Vsebino mikrocentrifugirke smo temeljito premešali na vibracijskem mešalniku, zamrznili v tekočem dušiku ter shranili na - 80°C.

3.2.8 Priprava bakterij *A. tumefaciens* za transformacijo rastlin

Pred samo transformacijo, smo pripravili bakterijsko kulturo z bakterijo *A. tumefaciens*. Z agarne plošče smo pod sterilnimi pogoji precepili eno kolonijo v 50 ml LB gojišča z antibiotikom Hyg in inkubirali na stresalniku 36 ur na 30°C, s stresanjem 225rpm.

3.2.9 Transformacija rastlin

Za transformacijo rastlin smo potrebovali približno 1200 izsečkov iz tkivnih kultur krompirja sorte Désirée. Za konstrukt z genom *g1* smo pripravili 800 izsečkov, za konstrukt z genom *g1* v v fuziji z genom za GFP pa 400 izsečkov. Za oba konstrukta pa je bilo potrebno pripraviti še izsečke za kontrolo. Transformacija je potekala v dveh delih. Sprva smo izvedli transformacijo le za konstrukt z genom *g1*, v drugem delu pa smo izvedli transformacijo za konstrukt z genom *g1* (neobjavljeni rezultati) in z genom *g1* v fuziji z genom za GFP.

- Dan 1: Pred samo transformacijo, 1,5 dneva pred transformacijo, smo pripravili bakterijsko kulturo. Bakterijo *A. tumefaciens* z vstavljenim konstruktom smo nacepili v 50 ml LB gojišča z antibiotikom Hyg in inkubirali v stresalniku na 30 °C s stresanjem 225 rpm (točka 3.2.8).
- Dan 2: Na petrijevke z R3B gojiščem smo prenesli po dva sterilna filter papirja tako, da se nista prekrivala popolno in ju omočili z 2 ml PACM gojišča. Za izsečke smo uporabili internodije tkivnih kultur krompirja v velikosti 2-5 mm. Izsečke smo prenesli na filter papir na R3B ploščah in sicer po 100 izsečkov na petrijevko. Pripravili smo tudi izsečke za kontrolo, za vsak konstrukt 60 izsečkov.
- Dan 3: Bakterijsko kulturo, ki smo jo nacepili na dan ena, smo prenesli v 50 ml epruveto, centrifugirali 10 min na 5000 g ter odlili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 75 ml svežega LB gojišča brez antibiotikov, ogretega na sobno temperaturo. Tako pripravljeno suspenzijo bakterij smo prelili v dve petrijevki, kamor smo s pinceto prenesli filter papir z izsečki z R3B gojišča. Izsečke smo v bakterijski suspenziji pustili 10 minut. Suspenzijo z izsečki smo nato prelili skozi cedilo na steklenem kozarcu, tako da smo suspenzijo lahko ponovno uporabili. Izsečke smo posušili na 25 x 25 cm sterilnem filter papirju, jih s pinceto prenesli nazaj na filter papir na R3B gojišče. Petrijevko smo zaprli ter ovili v prvi transformaciji s parafilmom, pri drugi transformaciji pa smo uporabili mikropor, da smo preprečili kondenzacijo. Prenesli smo jih v rastno komoro za tkivne kulture.
- Dan 5: Izsečke na filter papirju smo z R3B gojišča prenesli na Zcvh gojišče s selekcijo (Hyg).
- Pripravili smo tudi 3 kontrole:
 - brez bakterij, brez selekcije,
 - z bakterijo, brez selekcije,
 - brez bakterije, s selekcijo.
- Dan 19: Izsečke smo prenesli na sveže Zcvh gojišče s selekcijo (Hyg).
- Dan 40: Izsečke ponovno prenesemo na sveže Zcvh gojišče s selekcijo (Hyg).
- Če število transformant po tem času (40 dni) ni zadostno, izsečke prestavljamo na sveže selekcijsko gojišče vsake 3 tedne.

3.2.10 Preverjanje genske ekspresije na stopnji mRNA

3.2.10.1 Izolacija celokupne RNA

Za izolacijo celokupne RNA smo od vsake rastline transformiranega krompirja vzeli po 100 mg listov (približno 2 lista vsake rastline). RNA smo izolirali iz 30 transformiranih linij.

Celokupno RNA smo izolirali s kitom innuPREP Plant RNA Kit (Analytikjena) po protokolu:

- Predpripravljene vzorce, ki so vsebovali kovinsko kroglico za homogenizacijo smo vzeli iz skrinje (-80 °C), ter jih homogenizirali (QIAGEN-Tissuelysser) 1 min na 30 Hz.
- Homogeniziranemu vzorcu smo dodali 450 µl RL pufra, ki inaktivira RNaze.
- Vzorce smo centrifugirali na 20000 g, 1 minuto.
- V novo 2 ml mikrocentrifugirko s filtrom D smo prenesli 400 µl supernatanta, centrifugirali 2 minuti na 10000 g, ter nato filter zavrgli.
- V novo 2 ml mikrocentrifugirko smo nastavili filter R, vanj prenesli filtrat, kateremu smo predhodno dodali 400 µl 70 % etanola in centrifugirali 2 minuti na 10000 g.
- Mikrocentrifugirko s filtratom smo po centrifugiranju zavrgli, filter R pa prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko.
- Na membrano filtra R smo nanesli 500 µl pufra HS (pufer za spiranje) in centrifugirali 1 minuto na 10000 g.
- Mikrocentrifugirko s filtratom smo ponovno zavrgli. Filter R smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko, na membrano filtra nanesli 650 µl pufra LS (pufer za spiranje) in centrifugirali 1 minuto na 10000 g. Zadnji korak smo ponovili dvakrat.
- Filter R smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko, centrifugirali 2 minuti na 10000 g in s tem odstranili vse sledi etanola.
- Po centrifugiranju smo filter R prenesli v 1,5 ml zbiralno mikrocentrifugirko, na membrano filtra dodali 50 µl vode, inkubirali na sobni temperaturi 1 minuto ter nato centrifugirali 1 minuto na 6000 g, da smo dobljeno RNA sprali s kolone. Iz enega vzorca smo tako pridobili 50 µl RNA, ki smo jo shranili pri -80 °C.
- Da bi preverili čistost izolirane RNA smo po 5 µl izolirane RNA nanesli na 1% agarozni gel.

3.2.10.2 Merjenje celokupne RNA

Da bi lahko preverili, koliko RNA se nahaja v naših izoliranih vzorcih, smo izmerili celokupno RNA s pomočjo spektrofotometra (Nanodrop), ki meri absorbanco vzorca A260/A280 in A260/A230. Za posamezno meritev smo uporabili 1,5 µl vzorca.

3.2.10.3 Obdelava RNA z DNazo

Glede na dobljene rezultate meritve vsebnosti RNA v vzorcih smo vzorce razdelili v različne velikostne razrede in jih obdelali z DNazo. Reakcijska mešanica je vsebovala izolirano RNA, pufer, DNase I in avtoklavirano ddH₂O v razmerju kot je opisano v preglednici (Preglednica 5).

Preglednica 5: Tretiranje vzorcev z DNazo

Celokupna koncentracija RNA [ng/ μ l]	Dodane komponente
<100 ng/ μ l	1 μ l pufra 8 μ l RNA 1 μ l DNaze I (1enota/ μ l)
od 100 do 300 ng/ μ l	1 μ l pufra 5 μ l RNA 4 μ l DNaze I (1enota/ μ l)
od 300 do 500 ng/ μ l	1 μ l pufra 2,5 μ l RNA 4 μ l DNaze I (1enota/ μ l) 2,5 μ l vode brez RNaz
od 500 do 700 ng/ μ l	1 μ l pufra 1,6 μ l RNA 4 μ l DNaze I (1U/ μ l) 3,4 μ l vode brez RNaz

Mešanico smo nato inkubirali 15 minut na sobni temperaturi, nato pa k vsakemu vzorcu dodali 3 μ l 25 mM EDTA ter ponovno inkubirali 10 minut na 65 °C. Tako pripravljene vzorce smo lahko uporabili za nadaljnje delo.

Količino dodane DNaze smo določili oz. preračunali na podlagi celotne količine RNA.

3.2.10.4 Reakcija PCR v realnem času s predhodnim korakom obratnega prepisovanja

Za določanje števila kopij RNA transgena smo uporabili kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo s predhodnim korakom obratnega prepisovanja (v nadaljevanju RT - qPCR). Prvi korak pri tej metodi je prepis iz RNA v cDNA s pomočjo obratnega prepisovanja. RNA je enoverižna, nestabilna in tvori sekundarne strukture, zato je v taki obliki neprimerna za neposredno analizo izražanja genov. Uporabili smo single step RT - qPCR, kar pomeni, da nam ni bilo potrebno predhodno narediti reverzne transkripcije, temveč se je ta korak izvedel v napravi kot predhodna stopnja PCR v realnem času.

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Pri PCR v realnem času merimo količino produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Teoretično se število kopij želenega odseka v vsakem ciklu podvoji. V eksponentni fazи lahko iz količine produkta sklepamo na začetno število kopij matrice v vzorcu. Za detekcijo produktov uporabljamo s fluorescentnimi barvili označene sonde, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Pomnoževanje in detekcija fluorescence potekata sočasno. Na osnovi podatkov narišemo krivuljo, ki podaja

odvisnost jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescентnega praga, ki predstavlja tisto linijo fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko fluorescenca preseže ta prag (C_t vrednost). S primerjavo C_t vrednosti vzorca in standarda z znanim številom kopij v reakciji lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu, kar imenujemo absolutna kvantifikacija. Za merjenje izražanja genov pa se pogosteje uporablja relativna kvantifikacija, kjer določamo razmerje med hišnim genom Cox, ki nam služi kot standard in vstavljenim genom (Arko, 2004). Vsak cikel podvoji količino DNA, zato se lahko na podlagi teh rezultatov izračuna, kolikokrat je bil določen gen izražen v primerjavi s hišnim genom. Za analizo je bil uporabljen kit AgPath-ID™ One Step RT-PCR, ki omogoča enostopenjsko reakcijo z reverzno transkripcijo v prvem delu reakcije. Analizo izražanja vstavljenega konstrukta v identificiranih transformantah je izvedla Meti Buh Gašparič.

Priprava mešanice za RT - qPCR:

Za referenco ekspresije smo uporabili Cox specifične oligonukleotidne začetnike in sondu (Slika 11), ki pomnožujejo gen za citokrom oksidazo. Za detekcijo našega gena smo uporabili mešanico začetnih nukleotidov in sonde. Vse vzorce smo nanesli v $1\times$ in $10\times$ redčitvi, da smo se prepričali o enaki učinkovitosti pomnoževanja na obeh vzorcih in preverili, če so v vzorcu prisotne snovi, ki inhibirajo PCR reakcijo (Preglednica 6, 7 in 8).

- a) Cox-F 5' CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA 3'
- b) Cox-R 5' CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG 3'
- c) Cox-P 5' FAM -TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-TAMRA 3'

Slika 11: Zaporedja Cox specifičnih začetnih oligonukleotidov in Cox sonde (a) proti 3' koncu obrnjeni začetni oligonukleotid (angl. forward) (b) proti 5' koncu obrnjeni začetni oligonukleotid (angl. reverse) (c) sekvenca za Cox sonda

Preglednica 6: Priprava mešanice za RT – qPCR; gen *g1*

Gen <i>g1</i>	Dodana količina	Končna koncentracija
2× RT - qPCR pufer	5 µl	
25× RT - qPCR mešanica encimov	0,4 µl	
20× sonda/primerji mix	0,5 µl	900 nM
RNA	1 µl	
H₂O brez RNaz	3,1 µl	

Preglednica 7: Priprava mešanice za RT - qPCR; Cox gen

Cox	Dodata količina	Končna koncentracija
2× RT - qPCR pufer	5 µl	
25× RT - qPCR mešanica encimov	0,4 µl	
FP Cox 10 µM	0,9 µl	900 nM
RP Cox 10 µM	0,9 µl	900 nM
sonda Cox 5 µM	0,5 µl	250 nM
RNA	1 µl	
H₂O brez RNaz	1,3 µl	

Preglednica 8: Program pomnoževanja za RT - qPCR

Faza	Korak	Čas	Temperatura	Ponovitve
Faza 1				
	Korak 1	30 min	48°C	
Faza 2				
	Korak 1	10 min	95°C	
Faza 3				
	Korak 1	15 s	95°C	40 ×
	Korak 2	1min	60°C	

4 REZULTATI

Iz izbranih kolonij bakterij *E. coli* smo izolirali plazmidno DNA in dokazali prisotnost vstavljenih konstruktov. Sledila je transformacija bakterije *A. tumefaciens* in transformacija rastlin. Ekspresijo mRNA v transformiranih poganjkih smo preverili z RT – qPCR.

4.1 PREVERJANJE SEKVENCE ZA KONSTRUKT Z GENOM *g1*

Za preverjanje velikosti produktov PCR in plazmidov na agaroznem gelu smo računalniško skonstruirali nukleotidni zapis za gen *g1*, označili vse potrebne sekvence in izračunali pričakovane dolžine naših produktov. S pomočjo zaporedja v bazi NCBI smo ocenili velikosti pričakovanih produktov (Slika 12).

Pričakovana velikost PCR produkta za konstrukt z genom *g1* s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 je 1808 bp, za konstrukt z genom *g1* in GFP pa 2542 bp. Pričakovana velikost PCR produkta za konstrukt z genom *g1* v pMDC32 in pMDC85 z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je 461 bp. Plazmid vsebuje 12462 bp, vendar v sliki nismo vključili celotne sekvence, saj za izračun velikosti produktov, nismo potrebovali celotnega zapisa.

Attr2
Gen 1
Attr1
35S promoter

A začetek, prva baza v plazmidu

M13F: Gtaaaacgacggccag; rev. Complement: ctggccgtcgtttaC

M13R: Caggaaacagctatgac; rev. Complement: gtcatagctgttcctG

caggaaacagctatgac**A**ttcagtaaacatagatgacaccgcgcgcgataatttatcctagttgcgcgtatattttttctatcgcttataatgtataattgcgggactctaattcataaaaaccatctcataaaataacgtcatgcattacatgttaatttattacatgcttaacgttaattcaacagaatttatgtataatcatcgcaagaccggcaacaggattcaatcttaagaaacttattgccaaattgttgaacgatCGGGGAAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTCGAACCACTTGTACAAGAACGAGAAACGTAATGATAATAATATCAATATTTAAATTAGATTTCGATAAAAACAG**(Gen**
g1, 461bp)AAATCTAATTAAATATATTGATATTATCATTTCAGTTCTCGTTCAGCTTTTGACAAACTTGTTGATAGCTTGGCGCGCTCGAGGGGGGGCCCGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGAGGTCTCTCCAAATGAAATGAAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGAGGATAGTGGATTGTGCGTCATCCCTACGTGAGATATCACATCAATCCACTGCTTGAAGACGTGGTGGAAACGTCTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGTCCATTTGGGACCACTGTCGGCAGAGGCATCTCAACCGATGCCCTTCCATTGCAATGATGGCATTTGTAGGAGCCACCTTCCATTCTCACAATAAGTGCAGAGATAGCTGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTTCCGGATATTACCCATTGTTGAAAGTCTCAATTGCCCTTGGTCTGAGACTGTATCTTGATATTGGTAGAGACAAGTGTGCGTCCACCATGTTATCACATCAATCCACTGCTTGAAGACGTGGTGGAAACGTCTCTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGTCCATCTTGGGACCACTGTCGGCAGAGGCATCTCAACGATGCTTCCATTGCAATGATGGCATGCGCTTCCATTGCAATGATGGCATTGTTAGGAGCCACCTTCCATTCTCACAATAAGTGCAGAGATAGCTGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTCTGAGACTGTATCTTGATATTGGTAGAGACAAGTGTGCGTCCACCATGTTGACCTgcaggcacgccaaagcttggcactggccgtcggttacaacgtcgactggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccctgcagcacatcccccttgcgcagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatgcgcctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatgtcgactggcgactgtcgactggatcagattgtcggttccgccttcagttaaactatcagtgttgacaggatattggcggttaacctaagagaaaagagcgttattagaataacggatattaaaggcgtgaaaagggttattccgtccatgtgtcgatgcaaccacagggtccctcgggatcaaagtactttgatccaaccctccgctgtatagtgcagtcggcttcgtacgtcagtgccgtttctgtcggttttagtcgcacaagtccaaatgtcgactgacgacaggctgcccctgcccatttccgtccatgtcggttttagtcgcataaaagttagaataacttgcgactagaaccggagacattacgcccattacgcaacaagagcgcgcgcgtggcctgtggc

Se nadaljuje

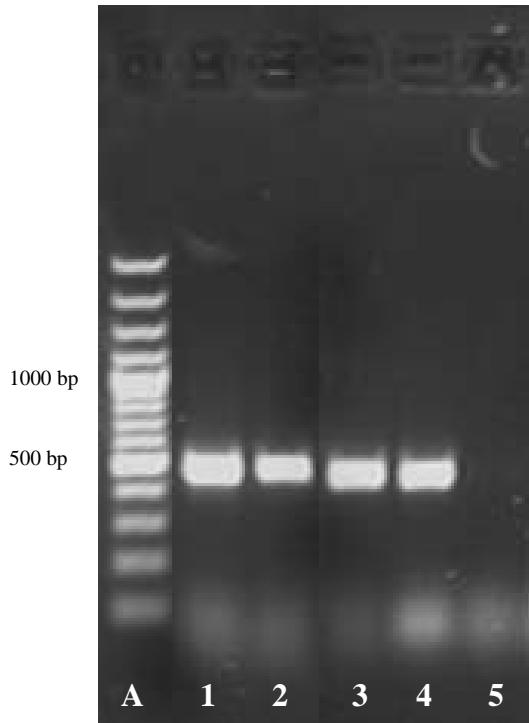
Nadaljevanje

tatccccgcgtcagcaccgacgaccaggacttgaccaaccaacggggccgaactgcacgcggccggctgcaccaag
ctgtttccgagaagatcacccggcaccaggcgccgaccggactggccaggatgcttgcacacctacccct
ggcgcacgttgtgacagtgaccaggctagaccgcctggcccgcacccgcacctaactggacattggcggcgc
atccaggaggccggcggcggcgtgcgtagecctggcagagccgtggccgcacaccacgcggccggccgcatg
gtgttaccgtgttcgcggcattgccgagttcgagcgttccctaattcatcgaccgcacccggagcggccgcag
ggccccaaggccccgaggcgtgaagttggcccccgcctaccctcaccggcacaagatcgccgcacgcggccgcag
ctgatcgaccaggaaggccgcaccgtgaaagaggccgtgcactgctggcgtgatcgctgaccctgtaccgc
gcacttgagcgcagcggaggtgacgcaccggaggccaggccggcgcgtgcctccgtgaggacgcattgacc
gaggccgcacgcctggccggccgcgagaatgaacgcacccgcacccaggacggccagg
acgaaccgttttattaccgaagagatcgaggccggagatgatcgccgcgggtacgttgcagccgcgc
acgtctcaaccgtgcggctgatgaaatctggccggttgtctgatgccaagctggccgcctggccggcagct
tggccgcgtgaagaaaccgagcgcggccgtctaaaaagggtgatgttgcagtaaaacagcttgcgtcatgcgg
tcgctgcgtatatgatgcgatga...tatgaccatgattacg

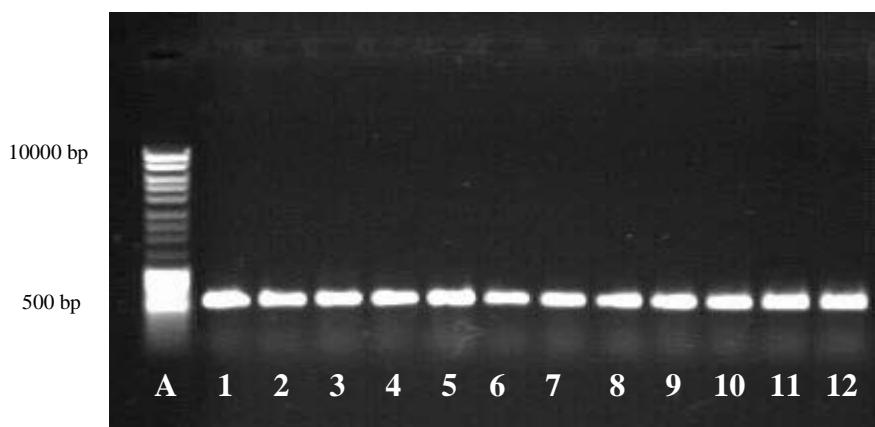
Slika 12: Nukleotidni zapis za konstrukt z genom *g1*

4.2 POTRDITEV GENA *g1* V TRANSFORMIRANIH BAKTERIJAH *E.coli*

Za potrditev gena *g1* v destinacijskih vektorjih, smo naredili PCR na osnovi kolonije iz petih naključnih kolonij na selekcijskih ploščah za konstrukt z genom *g1*, za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP smo preverili 12 naključno izbranih kolonij. Prisotnost gena *g1* smo preverili z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Lise na gelu (Slika 13) so pokazale prisotnost gena *g1* v štirih kolonijah od petih, gen *g1* v fuziji z genom za GFP (Slika 14) smo dokazali v vseh 12 kolonijah (461 bp).



Slika 13: Analiza PCR produktov na osnovi kolonije za določanje prisotnosti gena *gl*. Uporabili smo 1 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus lestvica. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (I-5) PCR produkti. Na gel smo nanesli 5 µl PCR produkta, 2 µl nanašalnega barvila in 5 µl H₂O



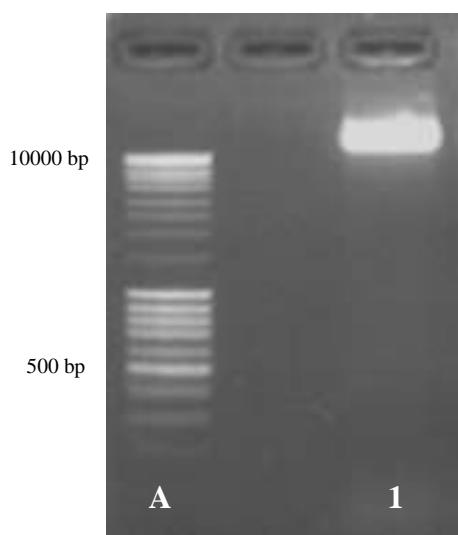
Slika 14: Analiza PCR produktov na osnovi kolonije za določanje prisotnosti gena *g1* v fuziji z genom za GFP. Uporabili smo 0,5 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) Kilobazna lestvica Mass ruler. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (1-12) PCR produkti. Na gel smo nanesli 5 µl PCR produkta, 2 µl nanašalnega barvila in 5 µl H₂O

4.3 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

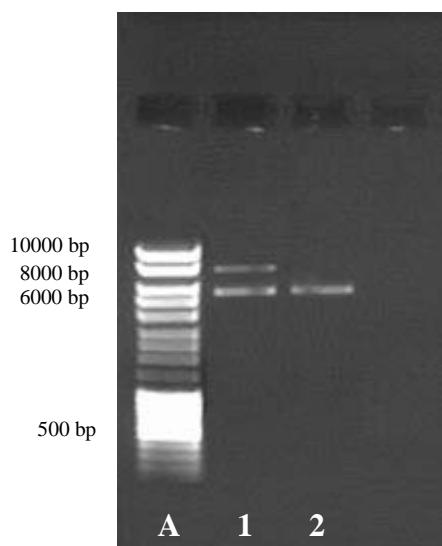
Na podlagi rezultatov iz PCR na osnovi kolonije smo za nadaljnje delo izbrali bakterijski kulturi dveh kolonij, pri katerih smo dokazali zapis za tarčni gen. Iz ustreznih kolonij smo pripravili prekončni kulturi in naslednji dan izolirali plazmidno DNA. Z uporabo kita Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System smo izolirali plazmidno DNA. Učinkovitost izolacije in velikosti plazmidov smo preverili na gelu.

Na agaroznem gelu (Slika 15) smo dokazali izolirano plazmidno DNA pMDC32 z vstavljenim genom *g1* iz izbrane kolonije (oznaka 1). Pričakovana velikost plazmida je bila 11752 bp, vendar na gelu velikosti nismo mogli natančno določiti (več kot 10000 bp). Dokazali smo le, da je bila izolacija učinkovita.

Izolirano plazmidno DNA pMDC85 z genom *g1* smo dokazali v dveh izbranih kolonijah (Slika 16 oznaka 1 in 2). Pričakovana velikost plazmida pMDC85 z genom *g1* je bila 12462 bp. Na gelu je ta vrednost nižja. Do tega rezultata je prišlo zaradi razlike hitrosti potovanja DNA v gelu. Kilobazna lestvica Mass Ruler je v obliki linearne DNA, medtem, ko je bila DNA izoliranih plazmidov v obliki plazmidne DNA s prekinjeno krožno verigo (angl. open circle) in super zviti obliki (angl. supercoiled). Zaradi teh razlik je v gelu prišlo do drugačnega potovanja. Pri oznaki 1 je lepo razvidno, kako super zvita plazmidna DNA potuje hitreje, kot plazmidna DNA s prekinjeno krožno verigo. Pri plazmidu pMDC85 z genom *g1* smo za razliko od pMDC32 z genom *g1* uporabili 0,5 % gel, kar omogoča hitrejše potovanje, kot 1 % gel.



Slika 15: Izoliran plazmid pMDC32 iz bakterij *E. coli*. Uporabili smo 1 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) Kilobazna lestvica Mass Ruler. Na gel smo nanesli 2 µl lestvice z dodanim barvilom in 10 µl H₂O. (1) Izoliran plazmid pMDC32 z genom *g1*. Na gel smo nanesli 15 µl plazmida in nanašalno barvilo



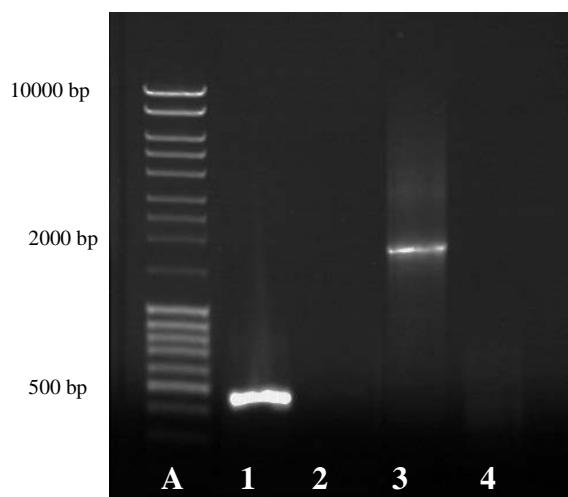
Slika 16: Izoliran plazmid pMDC85 iz bakterij *E. coli*. Uporabili smo 0,5 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) Kilobazna lestvica Mass Ruler. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (1-2) Izolirana plazmida pMDC85 z genom *g1*. Na gel smo nanesli 1 µl plazmida, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O

4.4 POTRDITEV GENA *g1* V IZOLIRANIH PLAZMIDIH BAKTERIJE *E.coli*

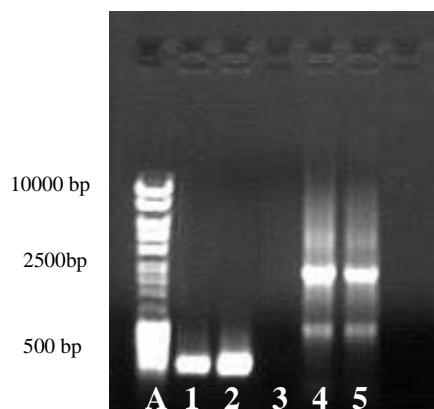
Na izoliranih plazmidih iz bakterij *E. coli* smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi določevali prisotnost gena *g1* in s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 ustreznost plazmidov. Začetni olionukleotidi M13 so bili premalo specifični, da bi dobili rezultate pri PCR na kolonijah, zato smo jih uporabili na plazmidni DNA.

Analiza PCR produktov na gelu z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za konstrukt z genom *g1* (Slika 17) in konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP (Slika 18) je

pokazala, da PCR produkti iz izbranih kolonij vsebujejo gen *g1* (461 bp). Tudi s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi smo dobili pričakovane velikosti produktov, tako pri pMDC32 (1808 bp), kot pri pMDC85 (2542 bp). Tako smo potrdili, da imamo gen v ustreznih plazmidih, in da ti niso poškodovani v regiji, ki smo jo pomnoževali, torej regiji s promotorjem in našim genom.



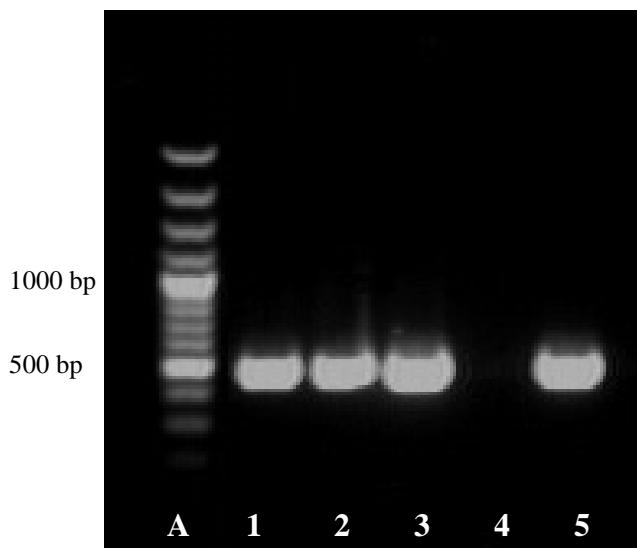
Slika 17: Analiza PCR produktov na osnovi plazmidne DNA pMDC32 z genom *g1*. Uporabili smo 0,5 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) Kilobazna lestvica Mass Ruler. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (1) PCR produkt, dokazan z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (461 bp). (2 in 4) Negativna kontrola (ddH₂O). (3) PCR produkt, dokazan s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 (1808 bp). Na gel smo nanesli 5 µl PCR produkta, 2 µl nanašalnega barvila in 5 µl H₂O



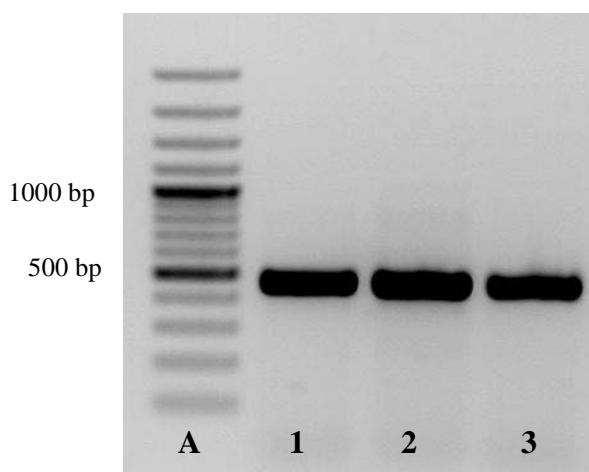
Slika 18: Analiza PCR produktov na osnovi plazmidne DNA za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP. Uporabili smo 0,5 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) Kilobazna lestvica Mass Ruler. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (1-2) PCR produkti pomnoženi z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gen *g1* (461 bp). (3) Negativna kontrola (ddH₂O). (4-5) PCR produkti pomnoženi s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 (2542 bp). Na gel smo nanesli 5 µl PCR produkta, 2 µl nanašalnega barvila in 5 µl H₂O

4.5 POTRDITEV GENA *g1* V TRANSFORMIRANIH BAKTERIJAH *A. tumefaciens*

Po elektroporaciji bakterij *A. tumefaciens* je na selekcijski plošči z nanosoma 200 µl zraslo več sto kolonij. Plošča ni bila števna, zato je nismo uporabili za nadaljnje delo. Na plošči, kamor smo nanesli 20 µl, je zraslo približno 50 kolonij. Da bi potrdili, da so kolonije transformirane z želenim genom, smo naredili PCR na kolonijah *A. tumefaciens*. Z agarne plošče smo pod sterilnimi pogoji precepili v YM gojišče tri kolonije za konstrukt z genom *g1* (Slika 19), tri kolonije za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP (Slika 20) in pripravili prekonočne kulture. Naslednji dan smo naredili PCR analizo, da bi potrdili prisotnost tarčnega gena v izbranih kolonijah.



Slika 19: Analiza PCR-produktov z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gen *g1* v agrobakteriji transformirani z genom *g1* v pMDC32. Dolžina PCR produkta pomnoženega s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je 461 bp. Uporabili smo 1 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus lestvica. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (1-3) PCR-produkt na osnovi treh različnih kolonij agrobakterije, ki je vsebovala vektor pMDC32 z genom *g1*. (4) Negativna kontrola (ddH₂O). (5) Pozitivna kontrola (gen *g1* v pMDC32)



Slika 20: Analiza PCR-prodiktov z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gen *g1* v agrobakteriji transformirani z genom *g1* v pMDC85. Dolžina PCR produkta pomnoženega s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je 461 bp. Uporabili smo 1 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus lestvica. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila in 9 µl H₂O. (1-3) PCR-produkt na osnovi treh različnih kolonij agrobakterije, ki je vsebovala vektor pMDC85 z genom *g1*

4.6 TRANSFORMACIJA RASTLIN

Po uspešni transformaciji agrobakterije *A. tumefaciens* je sledila transformacija rastlin (Slika 21, 22, 23, 24, 25). V spodnjih preglednicah so prikazani poteki transformacij izsečkov tkivnih kultur krompirja (Preglednica 9, 10, 11 in 12) in rezultati (Preglednica 13). Sama regeneracija izsečkov je potekala precej različno glede na prvi in drugi del transformacije, saj je bilo v drugem delu na poganjke potrebno čakati precej več časa, kot prvič, poganjkov je bilo tudi veliko manj.

Preglednica 9: Potek transformacije za konstrukt z genom *g1*

	Dan	Dogodek	Sprememba izsečki	Sprememba kontrole	Opombe
Gen <i>g1</i> v pMDC32	1	Priprava bakterijske kulture iz bakterije <i>A. tumefaciens</i>			Rast bakterije je bila uspešna
	3	Transformacija izsečkov krompirja sorte Désirée			Transformirali smo 800 izsečkov
	5	Prestavitev izsečkov na sveže selekcijsko gojišče Zvh			
	19	Prestavitev izsečkov na sveže selekcijsko gojišče	Transformirani izsečki že kalusirajo, opaženi so prvi poganjki	Ustrezna (Preglednica11)	
	40	Prestavitev izsečkov na sveže selekcijsko gojišče	24 poganjkov	Ustrezna (Preglednica11)	
	47		40 novih poganjkov		
	54		48 novih poganjkov		
	Vsi poganjki		112 poganjkov		

Preglednica 10: Potek transformacije za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP

	Dan	Dogodek	Sprememba izsečki	Sprememba kontrole	Opombe
Gen <i>g1</i> v pMDC85	1	Priprava bakterijske kulture iz bakterije <i>A. tumefaciens</i>			Rast bakterije je bila uspešna
	3	Transformacija izsečkov krompirja sorte Désirée			Transformirali smo 400 izsečkov
	5	Prestavitev izsečkov na sveže selekcijsko gojišče			
	19	Prestavitev izsečkov na sveže selekcijsko gojišče	Transformirani izsečki ne tvorijo poganjkov	Ustrezna (Preglednica12)	
	40	Prestavitev izsečkov na sveže selekcijsko gojišče	0 poganjkov		
	90		1 poganjek		
	113		3 poganjki		
	Vsi poganjki skupaj		4 poganjki		

Preglednica 11: Potek transformacije za gen *g1* – kontrole

	Dogodek	Negativna kontrola	Pozitivna kontrola	Kontrola za Gen <i>g1</i>
Gen <i>g1</i> v pMDC32	Opis kontrole	20 izsečkov, na gojišču s selekcijo (Zcvh), brez bakterij	20 izsečkov, na gojišču brez selekcije (Zcv), z bakterijo	20 izsečkov, Na gojišču s selekcijo (Zcvh), z bakterijo
	Pričakovani rezultati	Izsečki naj ne bi kalusirali in imeli poganjkov	Vsi transformirani izsečki naj bi kalusirali in imeli poganjke	Le izsečki z vstavljenim konstruktom naj bi kalusirali in imeli poganjke
	Dejanski rezultati	Enako kot pričakovani	Enako kot pričakovani	Enako kot pričakovani

Preglednica 12: Potek transformacije za gen *g1* v fuziji z genom za GFP – kontrole

	Dogodek	Negativna kontrola	Pozitivna kontrola	Kontrola za Gen <i>g1</i>
Gen <i>g1</i> v pMDC85	Opis kontrole	20 izsečkov, na gojišču s selekcijo (Zcvh), brez bakterij	20 izsečkov, na gojišču brez selekcije (Zcv), z bakterijo	20 izsečkov, Na gojišču s selekcijo (Zcvh), z bakterijo
	Pričakovani rezultati	Izsečki naj ne bi kalusirali in imeli poganjkov	Vsi transformirani izsečki naj bi kalusirali in imeli poganjke	Le izsečki z vstavljenim konstruktom naj bi kalusirali in imeli poganjke
	Dejanski rezultati	Enako kot pričakovani	Enako kot pričakovani	Enako kot pričakovani

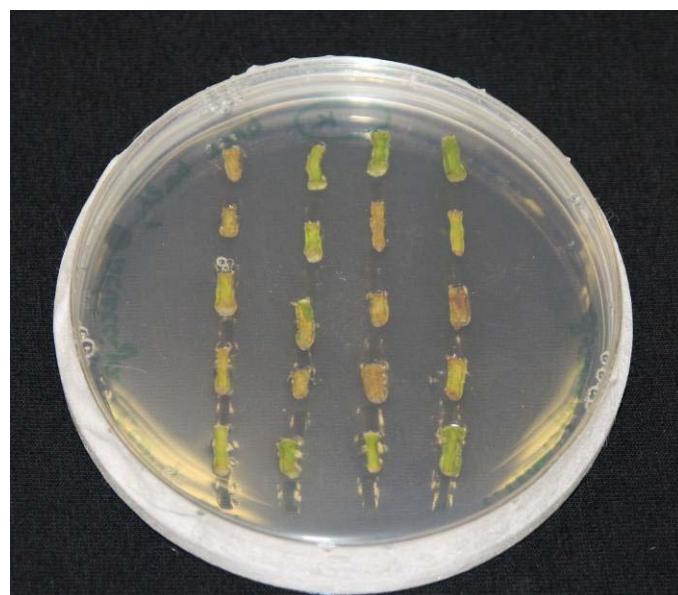
Preglednica 13: Uspešnost transformacije za konstrukt z genom *g1* in za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP

	Število vseh izsečkov	Število transformant	Transformacija (%)
Gen <i>g1</i> v pMDC32	800	112	14
Gen <i>g1</i> v pMDC85	400	4	1

$$\text{Uspešnost transformacije} = \frac{\text{število pridobljenih transformant}}{\text{število testiranih izsečkov}} \times 100$$



Slika 21: Priprava izsečkov za transformacijo. (a) Tkvina kultura krompirja v sterilnih pogojih pripravljena za razrez. Na levi strani slike je petrijevka z R3B gojiščem in dva sterilna filter papirja, kamor smo s pinceto prenašali izsečke. (b) Izsečki pridobljeni iz ene rastline. (c) Petrijevka s 100 izsečki, pripravljena za transformacijo



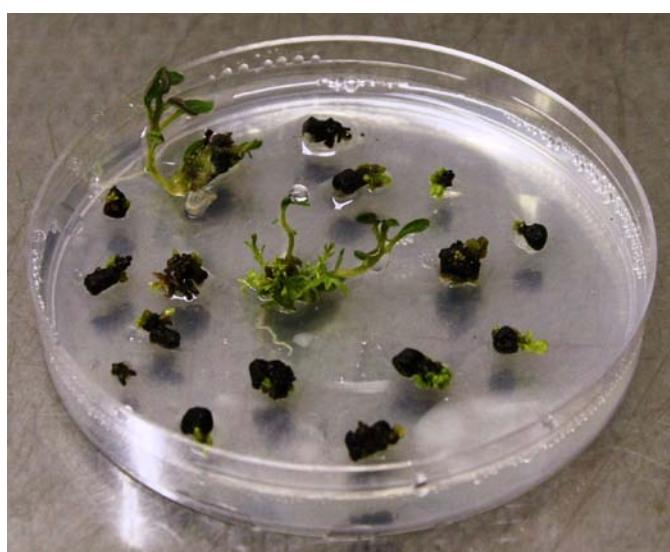
Slika 22: Negativna kontrola (nestransformirana Désirée) na gojišču s selekcijo, 37. dan



Slika 23: Pozitivna kontrola (netransformirana Désirée) na gojišču brez selekcije, 37. dan



Slika 24: Kontrola (transformiran Désirée z genom *g1*) na gojišču brez selekcije, 37. dan

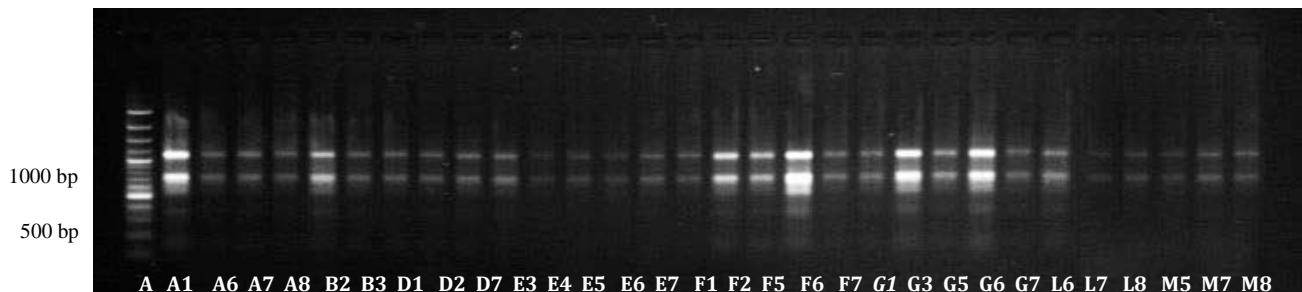


Slika 25: Transformirani izsečki na gojišču s selekcijo za gen *g1* v fuziji z genom za GFP

4.7 PREVERJANJE EKSPRESIJE GENA *g1* NA NIVOJU mRNA

4.7.1 Izolacija in potrditev izolirane RNA iz linij krompirja

S kitom innuPREP Plant RNA Kit, smo izolirali RNA iz 30 linij krompirja prve transformacije (konstrukt z genom *g1*). Z elektroforezo smo preverili učinkovitost izolacije in morebitno kontaminacijo z genomsko DNA (Slika 26). V drugem delu transformacije smo preverili vse 4 dobljene linije krompirja s konstruktom z genom *g1* v fuziji z genom za GFP.



Slika 26: Potrditev izolirane RNA. Uporabili smo 1 % gel. Elektroforeza je tekla 60 min, na 100 V, 500 mA. (A) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus lestvica. Na gel smo nanesli 1 µl lestvice, 2 µl nanašalnega barvila ter 9 µl vode. (A1-M8) Izolirana RNA iz 30 različnih linij transformiranega krompirja s konstruktom z genom *g1* v pMDC32. Na gel smo nanesli 5 µl izolirane RNA, 2 µl 6x nanašalnega barvila in 5 µl vode.

Rezultati na agaroznem gelu so pokazali, da smo iz vseh 30 linij izolirali RNA. Na gelu ni nikjer prisotne genomske DNA. Kljub temu, smo vse vzorce dodatno obdelali z DNazo.

4.7.2 Kvantifikacija celokupne RNA

Pred tretiranjem vzorcev z DNazo smo izmerili količino RNA v vzorcih in določena razmerja absorbanc, ki povedo, kako čist je vzorec. Količino celokupne koncentracije RNA smo potrebovali za oceno, koliko DNaze naj dodamo. Poleg celokupne koncentracije, smo preverili še razmerja absorbanc (260/280 in 260/230). Razmerje 260/280 nam pove, če je v vzorcu prisotna kontaminacija s proteini, medtem ko razmerje absorbanc 260/230 prikazuje vsebnost soli v vzorcu. Obe razmerji naj bi bili večji od 1,8, kar pomeni, da je vzorec primerno čist. Rezulati označeni s sivo barvo predstavljajo vzorce, ki so imeli določene kontaminacije. Rezultati meritve s spektrofotometrom Nanodrop (Preglednica 14) so pokazali, da je čistost RNA zadovoljiva in domnevamo da je kljub nekaterim nečistočam primerna za nadaljnje eksperimente.

Preglednica 14: Količina izmerjene RNA, kontaminacija s proteini in prisotnost soli v vzorcih

Ime vzorca	Količina RNA [ng / µl]	A[260 / 280]	A[260 / 230]
Slepi vzorec-voda	0	/	/
A1	656	2,22	1,07
A6	258	2,18	1,78
A7	318	2,20	2,06
A8	232	2,19	1,39
B2	550	2,18	2,12
B3	210	2,20	0,98
D1	254	2,20	1,86
D2	236	2,20	1,74
D7	253	2,18	2,12
E3	231	2,18	1,83
E4	136	2,19	2,23
E5	120	2,22	1,02
E6	122	2,16	1,07
E7	191	2,17	1,30
F1	168	2,17	2,25
F2	401	2,18	2,13
F5	337	2,16	2,16
F6	868	2,21	2,11
F7	201	2,17	2,26
G1	263	2,20	2,04
G3	530	2,18	1,81
G5	212	2,21	1,71
G6	546	2,16	2,27
G7	215	2,17	1,99
L6	259	2,20	1,79
L7	271	2,18	2,35
L8	65	2,18	0,59
M5	295	2,19	2,30
M7	246	2,18	2,22
M8	124	2,21	1,22

4.7.3 RT - qPCR

Z RT - qPCR smo žeeli preveriti RNA ekspresijo na 29 transformiranih linijah z vstavljenim konstruktom za izražanje gena *g1* in na 4 linijah gena *g1* v fuziji z genom za GFP (Preglednica 15 in Preglednica 16). Za standard smo uporabili Cox gen za citokrom oksidazo.

RNA preiskovanega konstrukta z genom *g1* v se je izražala od 2- pa do 15-krat manj, v dveh linijah (G7 in G3) 662- in 5040-krat manj, kot se je izražal standardni Cox gen (RNA smo zaznali v vseh preiskovanih linijah). Le ena izmed linij je imela zelo slabo izražanje. V večini primerov je nivo izražanja RNA visok.

Pri drugi transformaciji se je RNA gena *g1* v fuziji z genom za GFP izražala med 22- in 60-krat manj kot standardni gen. Tudi obe uporabljeni kontroli sta dali pričakovane rezultate: nivo izražanja RNA netransformiranega krompirja je bil negativen (ni bilo nespecifičnega pomnoževanja), prav tako tudi NTC kontrola.

Primer izračuna izražanja gena *g1* v transformiranih linijah (vzorec A1 za gen *g1*):

1. Ct Cox gen 1x redčitev = 16,3
Ct Cox gen 10x redčitev = 19,9 $\Delta\text{Ct Cox gen} = (\text{Ct Cox gen } 10x \text{ redčitev} - \text{Ct Cox gen } 1x \text{ redčitev}) = 3,5$
2. Ct gen *g1* 1x redčitev = 18,6
Ct gen *g1* 10x redčitev = 22,0 $\Delta\text{Ct gen } g1 = (\text{Ct gen } g1 \text{ } 10x \text{ redčitev} - \text{Ct gen } g1 \text{ } 1x \text{ redčitev}) = 3,4$
3. $\Delta\text{Ct } 1x \text{ redčitev} = \text{Ct gen } g1 - \text{Ct Cox gen} = 18,6 - 16,3 = 2,3$
 $\Delta\text{Ct } 10x \text{ redčitev} = \text{Ct gen } g1 - \text{Ct Cox gen} = 22,0 - 19,9 = 2,1$
4. Izražanje gena *g1* v primerjavi s Cox genom (1x redčitev) $= \Delta\text{Ct}^2 = 2,3^2 = 5,3$
Izražanje gena *g1* v primerjavi s Cox genom (10x redčitev) $= \Delta\text{Ct}^2 = 2,1^2 = 4,4$
5. Povprečje izražanja gena *g1* v primerjavi s Cox genom (obe redčini) $= (5,3 + 4,4)/2 = 5$

Preglednica 15: Rezultati izražanja preiskovanega gena *g1* v primerjavi s Cox genom

Ime vzorca (redčitev)	Ct Cox	ΔCt Cox	Ime vzorca (redčitev)	Ct gen <i>g1</i>	ΔCt gen <i>g1</i>	Ct gen <i>g1</i> - Ct COX	Kolikokrat manj od Cox gena se izraža gen <i>g1</i>
A1, 1x	16,3	3,5	A1, 1x	18,6	3,4	2,3	5
A1, 10x	19,9		A1, 10x	22,0		2,1	
A6, 1x	15,9	3,4	A6, 1x	17,1	3,4	1,2	2
A6, 10x	19,3		A6, 10x	20,5		1,2	
A7, 1x	17,1	3,6	A7, 1x	19,7	3,8	2,6	6
A7, 10x	20,8		A7, 10x	23,5		2,7	
A8, 1x	16,4	3,4	A8, 1x	17,8	3,4	1,4	3
A8, 10x	19,8		A8, 10x	21,1		1,3	
B2, 1x	17,3	4,2	B2, 1x	19,6	4,2	2,3	5
B2, 10x	21,6		B2, 10x	23,8		2,2	
B3, 1x	16,7	3,4	B3, 1x	18,8	3,5	2,1	4
B3, 10x	20,1		B3, 10x	22,3		2,2	
D1, 1x	16,1	4,2	D1, 1x	17,4	3,9	1,2	2
D1, 10x	20,3		D1, 10x	21,2		0,9	
D2, 1x	16,2	3,7	D2, 1x	18,4	3,7	2,2	5
D2, 10x	19,9		D2, 10x	22,1		2,2	
D7, 1x	16,1	3,3	D7, 1x	20,0	3,8	3,9	15
D7, 10x	19,4		D7, 10x	23,8		4,4	
E3, 1x	16,7	3,3	E3, 1x	18,2	4,2	2,3	5
E3, 10x	20,0		E3, 10x	22,3		2,3	
E4, 1x	16,7	3,8	E4, 1x	18,5	3,7	1,8	4
E4, 10x	20,5		E4, 10x	22,3		1,8	
E5, 1x	17,0	4,0	E5, 1x	18,9	4,0	1,9	4
E5, 10x	21,0		E5, 10x	22,9		1,9	
E6, 1x	17,2	4,0	E6, 1x	18,7	4,2	1,4	3
E6, 10x	21,3		E6, 10x	22,9		1,6	
F1, 1x	16,5	4,1	F1, 1x	19,3	3,7	2,8	7

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Ime vzorca (redčitev)	Ct Cox	Δ Ct Cox	Ime vzorca (redčitev)	Ct gen <i>g1</i>	Δ Ct gen <i>g1</i>	Ct gen <i>g1</i> - Ct Cox	Kolikokrat manj od Cox gena se izraža gen <i>g1</i>
F1, 10x	20,6		F1, 10x	23,0		2,4	
F2, 1x	17,0	3,4	F2, 1x	19,8	3,7	2,8	7
F2, 10x	20,4		F2, 10x	23,5		3,1	
F5, 1x	16,9	3,4	F5, 1x	19,4	3,4	2,5	6
F5, 10x	20,3		F5, 10x	22,8		2,5	
F6, 1x	16,0	3,2	F6, 1x	17,9	3,4	1,9	4
F6, 10x	19,2		F6, 10x	21,3		2,1	
F7, 1x	16,3	4,0	F7, 1x	18,6	3,6	2,4	5
F7, 10x	20,3		F7, 10x	22,3		2,0	
G1, 1x	16,7	3,7	G1, 1x	17,5	3,5	0,8	2
G1, 10x	20,4		G1, 10x	21,0		0,6	
G3, 1x	16,8	3,3	G3, 1x	29,1	4,1	12,3	5040
G3, 10x	20,1		G3, 10x	33,2		13,1	
G5, 1x	16,8	3,5	G5, 1x	19,4	3,6	2,6	6
G5, 10x	20,3		G5, 10x	23,0		2,7	
G6, 1x	17,0	5,6	G6, 1x	18,9	6,0	1,9	4
G6, 10x	22,6		G6, 10x	24,9		2,3	
G7, 1x	16,3	3,5	G7, 1x	25,6	4,3	9,4	662
G7, 10x	19,8		G7, 10x	29,9		10,2	
L6, 1x	16,5	3,2	L6, 1x	18,9	3,6	2,4	5
L6, 10x	19,7		L6, 10x	22,4		2,7	
L7, 1x	15,9	3,6	L7, 1x	17,5	3,6	1,6	3
L7, 10x	19,5		L7, 10x	21,1		1,6	
L8, 1x	17,8	3,5	L8, 1x	18,6	3,5	0,8	2
L8, 10x	21,3		L8, 10x	22,1		0,8	
M5, 1x	16,7	3,4	M5, 1x	17,9	3,4	1,2	2
M5, 10x	20,2		M5, 10x	21,4		1,2	
M7, 1x	16,2	3,5	M7, 1x	18,6	3,7	2,4	5
M7, 10x	19,7		M7, 10x	22,3		2,6	
M8, 1x	17,6	3,4	M8, 1x	19,5	3,4	1,9	4
M8, 10x	21,0		M8, 10x	22,8		1,8	

Preglednica 16: Rezultati in izračuni izražanja preiskovanega gena *g1* v fuziji z genom za GFP v primerjavi s Cox genom

<u>Cox gen</u>			<u>Gen <i>g1</i></u>			Kolikokrat manj od Cox gena se izraža gen <i>g1</i> (povprečje redčitev)	
Ime vzorca (redčitev)	Ct Cox	Δ Ct Cox	Ime vzorca (redčitev)	Ct gen <i>g1</i>	Δ Ct gen <i>g1</i>	Δ Ct (gen <i>g1</i> - Cox)	
a1, 1x	14,6	3,7	a1, 1x	19,1	3,6	4,5	22
a1, 10x	18,2		a1, 10x	22,7		4,5	
b1, 1x	16,1	2,5	b1, 1x	21,0	3,3	4,9	41
b1, 10x	18,6		b1, 10x	24,3		5,7	
b2, 1x	16,3	3,6	b2, 1x	22,3	3,5	6,0	60
b2, 10x	20,0		b2, 10x	25,8		5,8	
b3, 1x	16,1	3,4	b3, 1x	21,1	3,5	4,9	31
b3, 10x	19,6		b3, 10x	24,6		5,0	

5 RAZPRAVA

Namen našega dela je bila transformacija krompirja sorte Désirée z genom iz gliv za povečanje odpornosti proti žuželkam. Krompir je zaradi visoke hranilne kakovosti in enostavnosti proizvodnje eden izmed glavnih kandidatov za izboljšave pridelka s pomočjo biotehnologije (Banerjee in sod., 2006). Désirée je sorta krompirja, ki se najpogosteje uporablja za transformacijo, saj je zelo odzivna v *in vitro* sistemih (Beaujean in sod., 1998).

Prenos heterologne DNA v genom rastline je potekal s transformacijo izsečkov v suspenziji bakterij *A. tumefaciens*. Tarčni gen, gen *g1*, ki je bil kloniran v destinacijska vektorja pMDC32 in pMDC85 je bil naša izhodiščna točka. Ta binarna vektorja smo uporabili za transformacijo kompetentnih bakterij *A. tumefaciens*. Dejstvo, da vektorja nosita zapis za odpornost proti antibiotikoma (higromicinu in kanamicinu), smo nato uporabili za selekcijo transformant.

Iz bakterijskih kolonij *E. coli*, ki so zrasle na seleksijskem gojišču s higromicinom, smo z metodo PCR na osnovi kolonije preverili prisotnost konstrukta z genom *g1* v pMDC32 in pMDC85. Konstrukt z genom *g1* v pMDC32 smo dokazali v štirih od petih izbranih kolonij. Konstrukt z genom *g1* v pMDC85 smo dokazali v vseh dvanajstih izbranih kolonijah, z uporabo gensko specifičnih začetnih oligonukleotidov. Na podlagi rezultatov iz PCR na osnovi kolonije smo za nadaljnje delo izbrali bakterijski kulturi dveh kolonij, pri katerih smo dokazali zapis za tarčni gen. Iz ustreznih kolonij smo pripravili prekonočni kulturi in naslednji dan izolirali plazmidno DNA z uporabo kita Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Omenjeni kit smo izbrali, ker je najbolj primeren za izolacijo plazmidov velikosti do 20 kb. Druga prednost kita pa je v njegovem sistemu čiščenja, ki vključuje uporabo alkalne proteaze. Ta inaktivira endonukleazo I in druge proteine, ki so se sprostili z lizo bakterijskih celic in bi lahko vplivali na stabilnost izolirane DNA. Uporaba alkalne proteaze je v izolaciji z alkalno lizo zelo primerna, saj je aktivna v alkalnem lizatu pri pH 10 in omogoča izolacijo kvalitetnih plazmidov (Brisco in sod., 1996).

Za doseganje visoke transformacijske učinkovitosti mora biti izolirana plazmidna DNA v čim bolj čisti obliki, torej brez prisotnosti fenola, etanola, soli, proteinov in detergentov, ki bi vplivali na učinkovitost elektroporacije. Poleg tega je z uporabo YM gojišča za rast bakterij *A. tumefaciens* učinkovitost elektroporacije 2- do 5-krat večja kot z uporabo LB gojišča.

Na agaroznem gelu smo dokazali prisotnost obeh plazmidov z vstavljenim genom *g1* (pMDC32 in pMDC85), medtem ko nam pričakovanih velikosti plazmidov ni uspelo natančno dokazati.

Na izoliranih plazmidih iz bakterij *E. coli* smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi določali prisotnost gena *g1* in s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 ustreznost plazmidov. Pričakovana velikost PCR produktov z vstavljenim genom *g1* je bila 461 bp, kar nam je uspelo dokazati pri obeh vektorjih (pMDC32 in pMDC85). Pričakovana dolžina PCR produktov pomnoženih s komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 za vektor pMDC32 je bila 1808 bp ter 2542 bp za vektor pMDC85. S komercialnimi začetnimi oligonukleotidi M13 smo potrdili, da je bil gen *g1* v ustreznem plazmidu in da je bil pomnoženi amplikon ustrezne velikosti.

Za transformacijo rastlin in rastlinskih celic je bilo uporabljenih že veliko različnih protokolov, a najbolj široko uporabljana tehnika za vnos tuje DNA v rastlinske celice je metoda z agrobakterijo (Fraley in sod., 1986). Biolične tehnike se namreč uporabljajo le v tistih primerih, kjer sistem agrobakterije ni učinkovit. Romano in sod. (2001) so za transformacijo krompirja razvili protokol za obstreljevanje z gensko pištolo, ki pa ni bil tako učinkovit kot protokoli z agrobakterijo. Raziskovalci so mnenja, da bo protokol uporaben predvsem v prihodnosti, ko bo potrebno v rastline krompirja vnesti več genov hkrati, saj s sistemom agrobakterije to zelo težko dosežemo.

V moji diplomski nalogi smo se odločili za transformacijo z *A. tumefaciens*, saj je ta vrsta agrobakterije najpogosteje uporabljan pri transformacijah. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je izbira metode za vnos destinacijskih vektorjev v *A. tumefaciens*, ki je bila uporabljena za transformacijo, ustrezna. Za transformacijo krompirja so bili sicer uspešno uporabljeni tudi druge vrste agrobakterije, kot so *A. rhizogenes* in *A. rubi* (Ooms in sod., 1983).

Postopek transformacije z bakterijo *A. tumefaciens* ima več ključnih stopenj: priprava pravilnega vektorskega konstrukta, vzgoja rastlin krompirja Désirée, priprava suspenzije bakterije za transformacijo, prestavljanje izsečkov na sveže gojišče ter selekcija transformant.

Prejemni organizem je bila bakterija *A. tumefaciens*, sev LBA4404 (Invitrogen), obdelana tako, da so celice postale elektrokompetentne. Po elektroporaciji je na selekcijskih ploščah s higromicinom zraslo več sto kolonij (kjer je bilo nanešenih 200 µl bakterijske kulture). Te plošče so bile neštevne. S plošče z 20 µl bakterijske kulture *A. tumefaciens* smo prenesli po tri kolonije za vsak konstrukt, pripravili prekonočni kulturi, potrdili prisotnost gena *g1* v ustremnem vektorju in pripravili trajne kulture. V vseh izbranih kolonijah smo potrdili vstavljen konstrukt. Bakterija *A. tumefaciens* sev LBA4404 je najbolj pogosto uporabljan sev za transformacijo krompirja, vendar pa so Banerjee in sod. (2006) v poskusu uporabili sev GV2260, ki je prispeval k boljši učinkovitosti transformacije.

Po uspešnem vnosu konstrukta v agrobakterijo, je bilo potrebno izvesti še transformacijo krompirja. Transformacija krompirjevih listnih izsečkov ali steba (internodiji) je že dolgo poznana metoda. Glavni problem te metode je dolgo časovno obdobje, ki je potrebno za regeneracijo transformirane rastline in dolgo fazo tvorbe kalusa. Zato smo se poslužili kombinirane metode transformacije internodijev z adventivno regeneracijo koreninskega sistema. Uporaba te metode transformacije omogoča regeneracijo rastlin v šestih tednih (Visser in sod., 1989). Večina objavljenih protokolov za transformacijo krompirja z internodiji opisuje uporabo celega internodija, medtem, ko so Beaujean in sod. (1998) internodije vzdolžno prerezali na dva dela. V diplomski nalogi smo za transformacijo uporabljali celotne internodije. Visser in sod. (1989) so za transformacijo krompirja uporabljali tako listne izsečke, kot tudi stebelne internodije. Transformacija je potekala pod enakimi pogoji. Pri listnih izsečkih se je po transformaciji v enemu mesecu regeneriralo kar 70% vseh izsečkov, medtem ko pri internodijih le 20%. Vendar je bila ta razlika le začetna, saj se je po šestih tednih stanje izenačilo v obeh primerih. Frekvenca transformacije pa je bila mnogo višja pri internodijih (8,1%), kot pri listnih izsečkih (2,3%) (Visser in sod., 1989).

Za transformacijo krompirja je bilo najprej potrebno pripraviti rastlinski material, ki smo ga pridobili iz zdravih tkivnih kultur krompirja Désirée v epruvetah. Za pripravo izsečkov smo porabili približno 120 rastlinic krompirja. Iz teh rastlin smo pridobili 1200 izsečkov za transformacijo (800 izsečkov za konstrukt z genom *g1* in 400 izsečkov za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom GFP). Izsečke smo po protokolu namakali v bakterijski suspenziji *A. tumefaciens*. Agrobakterija, ki je transformirana, nosi odpornost proti higromicinu in lahko raste na selekcijskem gojišču. Po določenem času je zato potrebno transformirane izsečke prestaviti na gojišče z antibiotiki, ki preprečujejo njeno rast. V našem primeru smo izsečke prenesli na selekcijsko gojišče drugi dan po transformaciji. Selekcijsko gojišče vsebuje higromicin v koncentraciji, ki je primerna za selekcijo transformiranih rastlin, ni pa dovolj velika za preprečevanje okužb. Zato sta v gojišču za odstranjevanje agrobakterije dodana antibiotika vankomicin in klaforan. Antibiotik klaforan ima širok spekter delovanja proti po Gramu negativnim in po Gramu pozitivnim bakterijam že pri nizkih koncentracijah, medtem ko ima vankomicin spekter delovanja le proti po Gramu pozitivnim bakterijam (Da Silva in Fukai, 2001). Visser in sod. (1989) so preizkusili, kakšna je frekvenca transformacije, če izsečke takoj po namakanju v bakterijski suspenziji prenesejo na gojišče s selekcijo. Frekvenca transformacije je bila v tem primeru tudi do 9 krat nižja, kot če so izsečke nekaj dni pustili na gojišču brez selekcije.

Po prestavljanju izsečkov na sveže regeneracijsko gojišče smo 19 dni po prvi transformaciji za konstrukt gen *g1* že opazili kalusiranje transformiranih izsečkov in prve poganjke. Tudi kontrolne plošče so dale ustrezni rezultat: negativna kontrola ni vsebovala nobenega izsečka, ki bi tvoril kalus ali poganjke, medtem ko so, nasprotno, na plošči s pozitivno kontrolo vsi izsečki kalusirali in tvorili poganjke. Izsečki so začeli tvoriti poganjke veliko prej, kot v drugem delu transformacije, bilo jih je več. Pri transformaciji konstrukta z genom *g1* v fuziji z genom za GFP poganjkov po prvem prestavljanju na sveže regeneracijsko gojišče še ni bilo, izsečki so postopoma postajali nekoliko črni in izsušeni, prvi poganjki so se začeli tvoriti šele po treh mesecih.

Uspešnost transformacije za konstrukt z genom *g1* je bila 14 %, kar je primerljiv rezultat s podatki iz literature, ki opisujejo uspešnost transformacije med 1% in 20% (Sheerman in Bevan, 1988; Stiekema in sod., 1988). Visser in sod. (1989) so s to metodo dosegli 6% do 8% frekvenco transformacije, medtem ko je bila frekvenca transformacije z listnimi izsečki okoli 2%. Novejši podatki iz literature dosegajo tudi 35% frekvenco transformacije pri čemer odstotek transformacije predstavlja število poganjkov po transformaciji, deljeno z vsemi izsečki (Banerjee in sod., 2006). Enako metodo za izračun uspešnosti transformaciji smo uporabili tudi v tej diplomski nalogi.

Pri drugi transformaciji s konstruktom z geno *g1* (neobjavljeni rezultati) in z genom *g1* v fuziji z genom za GFP nismo uspeli ponoviti rezultatov prve, saj je izmed vseh izsečkov, regeneracija potekla le pri štirih, kar predstavlja 1% uspešnost transformacije. Kljub daljšemu časovnemu obdobju prestavljanja izsečkov na sveže Zcvh gojišče, smo na koncu pridobili le 4 transformirane poganjke. Postopek same transformacije je bil v obeh primerih povsem enak, le da smo za tesnenje petrijevk v drugi transformaciji uporabili mikropor trak in ne parafilm, kot pri prvi. Za zamenjavo tesnila smo se odločili zaradi velike prisotnosti vlage, ki se je nabirala na pokrovu petrijevk, saj so v nekaterih petrijevkah z izsečki kapljice vlage popolnoma prekrile izsečke. Na podlagi rezultatov frekvenc obeh transformacij sklepamo, da

je premalo vlage v drugi transformaciji in posledično izsuševanje gojišča privedlo do slabše frekvence transformacije. Mogoče bi bilo v tem primeru izsečke potrebno prestavljati pogosteje na sveže selekcijsko gojišče Zcvh, kot v prvi transformaciji. Visser in sod. (1989) navajajo, da ima letni čas močan vpliv na samo transformacijo, saj so znotraj večih poskusov ugotovili, da so bile frekvence transformacij v času pomlad veliko boljše, kot rezultati, ki so jih pridobili v zimskem času. Možno je, da je takšen rezultat posledica fiziološkega stanja rastlinskega materiala v kombinaciji s stresom, ki ga povzroči kanamicin, saj so kontrolne plošče brez kanamicina v vsakem letnem času proizvedle enako število poganjkov. Za selekcijo so v tem članku uporabili antibiotik kanamicin in ne higromicin, kot v tej diplomi.

Analizo prisotnosti in izražanje transgena v identificiranih transformatah (29 linij za konstrukt z genom *g1* in 4 linije za konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP) smo izvedli z metodo RT - qPCR. Analizo mRNA smo izbrali zato, da bi lahko izbrali najprimernejše linije za nadaljnja testiranja.

Iz transformiranih linij rastlin z genom *g1* smo najprej izolirali celokupno RNA s kitom innuPREP Plant RNA Kit. Dobljeno RNA smo preverili na agaroznem gelu in dokazali izolirano RNA v vseh transformiranih linijah krompirja. Sledilo je spektrofotometrično določanje celokupne koncentracije RNA z napravo Nanodrop. Na podlagi razmerij določenih absorbanc (260/280 in 260/230) smo lahko preverili, kako uspešna je bila izolacija RNA. Pri vseh vzorcih smo se izognili kontaminaciji s proteini, kar smo razbrali iz razmerja absorbanc pri 260/280. Kljub temu, pa smo v nekaterih vzorcih zaznali prisotnost soli, kar je pokazalo razmerje absorbanc pri 260/230. Kljub temu to ni vplivalo na rezultate, ki smo jih pridobili z RT-qPCR. Na podlagi dobljenih celokupnih koncentracij RNA, smo vse vzorce tretirali z DNazo, ter jih nato shranili na - 80 °C do analize s PCR v realnem času. S pomočjo dobljenih rezultatov smo lahko izračunali izražanje našega gena *g1* v primerjavi s standardnim genom Cox. Ugotovili smo, da se naš preiskovan konstrukt z genom *g1* 2- do 15-krat manj izraža kot Cox gen, konstrukt z genom *g1* v fuziji z genom za GFP pa 22- do 60-krat manj kot Cox gen. Naša hipoteza na začetku je predvidevala da bo izražanje v obeh vektorjih enako, a se je izkazalo, da se mRNA slabše izraža v vektorju z vključenim genom za GFP.

Poleg določanja prisotnosti izražanja mRNA z metodo PCR v realnem času, je v nadalnjem delu smiselno z analizo po Southernu ugotoviti število vstavljenih kopij T-DNA, ter z analizo po westernu dokazati prisotnost proteinskega produkta vstavljenega gena.

6 SKLEPI

Binarna plazmida pMDC32 in pMDC85 sta se izkazala kot zelo učinkovita tako za namnoževanje v bakterijah *E. coli* in *A. tumefaciens*, kot za izražanje gena v transformiranih linijah.

V vseh preiskovanih 29-ih transgenih linijah krompirja z vstavljenim konstruktom gen *g1* in v 4-ih linijah z vstavljenim konstruktom gen *g1* v fuziji z genom za GFP smo zaznali mRNA gena *g1*. V večini primerov je bil nivo izražanja mRNA visok.

Transformacija po postopku, ki ga je opisal Visser s sod. (1989), se je izkazala kot zelo primerna metoda za vnos konstrukta v rastlino *S. tuberosum*.

Zaradi razlike v učinkovitosti transformacije bi bilo smiselno v prihodnjih eksperimentih uporabljati izključno parafim za zaščito petrijevk s transformiranimi izsečki.

Uspeli smo pridobiti dovolj transgenih linij za nadaljnje analize.

7 POVZETEK

Koloradski hrošč povzroča ogromno škodo na krompirju, kar predstavlja velik problem za kmetovanje. Številna zatiralna sredstva na tržišču, kot so insekticidni pripravki in herbicidi niso več dovolj učinkovita, saj je koloradski hrošč sposoben izredno hitre prilagoditve na tovrstne učinkovine. Poleg klasičnih metod žlahtnjenja, so na voljo številne alternativne metode, kot so biotehnološke metode žlahtnjenja. Ena izmed alternativ je vnos genov iz drugih rastlinskih vrst, mikroorganizmov ali vnos genov iz gliv.

Diplomska naloga je osredotočena na protein iz gliv, ki ima močno insekticidno aktivnost. Gen iz gliv, uporabljen v tej diplomski nalogi smo poimenovali gen *g1*. Zanimalo nas je, ali bi lahko protein proizvajale tudi rastline, zato smo gen *g1* vnesli v krompir sorte Désirée. Gen *g1* smo vnesli v dva različna pMDC vektorja tako, da se je izražal kot samostojen protein ali v fuziji z GFP. Izvedli smo posredovano transformacijo za bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* in selekcionirali transformante na gojišču z antibiotikom. Ko smo pridobili dovoljšnje število transformant, smo preverili ekspresijo na mRNA nivoju in izbrali najprimernejše linije za nadaljnje testiranje.

Bakterija *Escherichia coli* z vstavljenim genom *g1* je bila izhodiščni material za naše delo. Za potrditev prisotnosti gena *g1* v destinacijskih plazmidih pMCD32 in pMDC85 smo uporabili PCR metodo na osnovi kolonije. Iz kolonij bakterij *E. coli* smo izolirali plazmidno DNA in jo z elektroporacijo vnesli v *A. tumefaciens*. Za transformacijo smo pripravili 1200 izsečkov in ves potreben material. Pri transformaciji smo sledili protokolu povzetem po članku (Visser in sod., 1989). Po treh tednih so prvi transformirani izsečki pričeli kalusirati in tvoriti poganjke. V drugem delu transformacije so prvi izsečki pričeli poganjati šele 3 mesece po transformaciji. Učinkovitost transformacije smo izračunali tako, da smo število poganjkov delili s številom vseh izsečkov. Predvidevali smo, da naj bi bila učinkovitost transformacije v obeh primerih podobna. Frekvanca prvega dela transformacije je bila 14%, v drugem delu transformacije je bila uspešnost 1%. Do teh razlik je prišlo verjetno zaradi uporabe mikropor traka pri drugi transformaciji, saj smo žeeli preprečiti previsoko vlago v petrijevkah z izsečki, a je ravno to povzročilo preveliko izsuševanje izsečkov. Z RT-qPCR smo preverili gensko ekspresijo vseh transformiranih linij krompirja in izbrali najboljše linije za nadaljnje teste.

8 VIRI

- Ammann K. 2005. Effects of biotechnology on biodiversity: herbicide-tolerant and insect-resistant GM crops. *Trends in Biotechnology*, 23, 8: 388-394
- Arends P., Kus M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, Mercator-KŽK Kmetijstvo Kranj, d.o.o., LFVB: 242 str.
- Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn.* 2004 55: 215-220
- 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
- Barrett S. C. H. 1995. Cvetnice, kritosemenke sveta. Heywood V. H. in sod. (ur.). Ljubljana, DZS, str: 335
- 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
- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 22: 8711-8721
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167str.
- Bowna P. D., Wilkinsons S. H., Jongsma M. A., Gatehouse J. A. 2004. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 205-320
- Brisco P., Creswell D., Ekenberg S., Towne J., Holmes D., Hurst R., Mendez J., Selman S. 1996. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System: The next generation in miniprep purification. *Promega Notes Magazine*, 59: 10
- Cheng J., Saunders J. A., Sinden S. L. 1995. Colorado potato beetle resistant somatic hybrid potato plants produced via protoplast electrofusion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 31: 90-95
- Copping L.G., Menn, J. J., 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56, 8: 651–676

- Curtis M. D., Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, 133: 462-469
- De Leo F, Bonade-Bottino M, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L. 2001. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three Lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 593-60
- 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
- De Maagd A. R., Bosch D., Stiekema W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in plant Science*, 4, 1: 9-13
- Ferry N., Edwards G. M., Gatehouse J. A., Gatehouse A. M. R. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 155-161
- Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B. 1986. Genetic transformation in higher plants. CRC Crit Rev Plant Sci, 4: 1-46
- Galun E., Breiman A. 1997. Transgenic plants: with an appendix on intellectual properties and commercialisation of transgenic plants by John Barton, str. 21-29, 34-40
- Gatehouse A. M. R., Davidson G. M., Newell C. A. 1997. Transgenic potato with enhanced resistance to the tomato moth *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Molecular Breeding*, 3: 1-15
- Global status of commercialized biotech/gm crops: 2008 The first thirteen years, 1996 to 2008 (ISAAA brief 39-2008: executive summary)
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>
- Gruden K., Strukelj B., Popovič T., Lenarčič B., Bevec T., Brzin J., Kregar I., Herzog-Velikonja J., Stiekema W. J., Bosch D., Jongsma M. A. 1998. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 549–560
- Gruden K., Kuipers A. G. J., Gunčar G., Slapar N., Štrukelj B., Jongsma M. A. 2004. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 365–375
- Habib H., Khalid M. F. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2, 3: 68-85

Hawkes J.G., 1997. A database for wild and cultivated potatoes. *Euphytica* 93: 155-161

Imai T., Aida R., Ishige T. 1993. High-frequency of tetraploidy in Agrobacterium-mediated transformants regenerated from tuber disks of diploid potato lines. *Plant Cell Rep*, 12: 299-302

Jouanin L., Bonade-Bottino M., Girard C., Morrot G., Gibaud M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant science* 131: 1-11

Kramer K. J., Morgan T. D., Throne J. E., Dowell F. E., Bailey M., Howard J.A. 2000. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature biotechnology*, 18: 670-674

Kristensen C., Morant M., Olsen C. E., Ekstrom C.T., Galbraith D. W., Moller B.L., Bak S. 2005. Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1779–1784

Krznar J. J., Pogačnik M., Stele A. Zgodnja napoved pridelkov poljščin, Slovenija, maj 2008. 2008. Statistični urad Republike Slovenije http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=1649 (20. Nov. 2009)

Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control*, 21: 230-248

Lalitha S., Shade E. R., Murdock M. L., Hasegawa P. M., Bressan A. R., Nielsen S. S. 2005. Comparison of Chemical Characteristics of Three Soybean Cysteine Proteinase Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1591-1597

Lalitha S., Shade E. R., Murdock L.L., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Nielsen S.S. 2005. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 140, 2: 227-235

Leptinotarsa decemlineata. 1824. ITIS (24. Nov. 2009) http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=720110 (24. Nov. 2009)

Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil, (Biotehnologija in mikrobiologija za prihodnost, 03). Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, str. 165–170

Milevoj L. Koloradski hrošč ali krompirjevec - *Leptinotarsa decemlineata*. 2000. Inštitut za fitomedicino (Nov. 2000) http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/Fito2/OrgCirs/OpisiSkod/vsi/lep_dece.htm (20. Nov. 2009)

Mullins E., Milbourne D., Petti C., Doyle-Prestwich M. B., Meade C. 2006. Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Science*, 11, 5: 254-260

- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497
- Peferoen M. 1997. Insect control with transgenic plants expressing *Bacillus Thuringiensis* is crystal proteins. V: Advance in Insect Control: The Role of Transgenic Plants. Carozzi N., Koziel M. London, Taylor in Francis: 21-48
- Oliveira A. S., Xavier-Filho J., Sales M. P. 2003. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 1: 91-104
- Ooms G, Karp A, Roberts J: From tumour to tuber: tumour cell characteristics and chromosome numbers of crown gall-derived tetraploid potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). 1983. *Theor Appl Genet* 66:169-172
- Perlak J. F., Stone B. T., Muskopf M. Y., Petersen J. L., Parker B. G., McPherson A. S., Wyman J., Love S., Reed G., Biever D., Fischhoff A. D. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology*, 22:313-321
- Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. 2001. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 20:198–204
- Sabotić J., Trček T., Popović T., Brzin J. 2007. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128: 297-307
- Sasson A. 1998. Plant Biotechnology - Derived Products: market-Value Estimates and Public Acceptance. Kluwer Academic Publishers
- Sheerman S., Bevan M. W. 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep*, 7: 13-16
- Stiekema W. J., Heidekamp F., Louwerse J.D., Verhoeven H. A., Dijkhuis P. 1988. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Rep*, 7: 47-50
- Terra R. W., Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 1: 1-62
- Thomas J. C., Adams D. G., Nessler C. L., Brown J. K., Bohnert H. J. 1995. Tryptophan decarboxylase, tryptamine, and reproduction of the whitefly. *Plant Physiology*, 109: 717-720
- Turner C.T., Davy M. W., MacDiarmid R. M., Plummer K. M., Birch N. P., Newcomb R.D. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15: 383-391

Ülker B., Li Y., Rosso M. G., Logemann E., Somssich I. E., Weisshaar B. 2008. T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nature Biotechnology*, 26, 9: 1015-1017

Vasconcelos M. I., Oliveira A. J. T. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44: 385-403

Wang E., Wang R., DeParasis J., Loughrin J. H., Gan S., Wagner G. J. 2001. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nature Biotechnololy*, 19: 371–374

Wang M., Trigueros V., Paquereau L., Chavant L., Fournier D. 2002. Proteins as Active Compounds Involved in Insecticidal Activity of Mushroom Fruitbodies. *Journal of Economic Entomology*, 95, 3: 603-607

Wilhite E. S., Elden C. T., Brzin J., Smigocki C. A. 2000. Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1181-1188

Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi. 2005. Uradni list Republike Slovenije (10. Mar. 2005)
http://www.uradni-list.si/_pdf/2005/Ur/u2005023.pdf (22. Nov. 2009)

Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah – vnos genov. V: Raspor P. (Ur.). *Biotehnologija, Osnovna znanja*. Bia, Ljubljana, str. 299–308

Žel J. 2004. Gensko spremenjene rastline: sedanjost in prihodnost. V: Raspor P. (Ur.). *Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil, (Biotehnologija in mikrobiologija za prihodnost, 03)*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, str. 165–170

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Maji Ravnikar za pomoč, nasvete in konstruktivno kritiko.

Za pomoč se zahvaljujem tudi somentorici prof. dr. Jani Žel, ki mi je vedno znala prisluhniti in bila pripravljena pomagati.

Za razumevanje in pregled dela se zahvaljujem recenzentu prof. dr. Borutu Bohancu.

Za koristne in prijateljske nasvete, uvod v delo in vso pomoč pri delu v laboratoriju, ter pri diplomski nalogi se zahvaljujem Meti Buh Gašparič in Idi Istinič.

Za izvedeno analizo RT – qPCR se zahvaljujem Meti Buh Gašparič in Idi Istinič.

Za prijaznost in pomoč se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Zahvaljujem se kolegici Urški Vidic, ki mi je prostovoljno prebrala in pregledala delo.

Za podporo med delom se iskreno zahvaljujem staršem in fantu Urošu za vso računalniško pomoč in oblikovanje diplomske naloge.