

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Helena ŠEME

**TESTIRANJE TRANSGENE RASTLINE *Arabidopsis thaliana* NA
ODPORNOST PROTI SLANOSTI IN SELEKCIJA HOMOZIGOTNIH
LINIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**TESTING TRANSGENIC PLANT *Arabidopsis thaliana* FOR SALINITY
RESISTANCE AND SELECTION OF HOMOZYGOTE LINES**

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 12.4.2010 je bila za somentorico diplomskega dela imenovana izr. prof. dr. Jana Žel, za mentorico diplomskega dela pa prof. dr. Marina Dermastia.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA
Nacionalni inštitut za biologijo

Članica: izr. prof. dr. Jana ŽEL
Nacionalni inštitut za biologijo

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

Datum zagovora: 20.8.2010

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

Helena Šeme

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 606:631.528:575.827(043.2)
KG biotehnologija/transgene rastline/*Arabidopsis thaliana*/navadni repnjakovec/odpornost proti slanosti/selekcija rastlin/homozigotne linije/
AV ŠEME, Helena
SA DERMASTIA, Marina (mentor) / ŽEL, Jana (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2010
IN TESTIRANJE TRANSGENE RASTLINE *Arabidopsis thaliana* NA ODPORNOST PROTI SLANOSTI IN SELEKCIJA HOMOZIGOTNIH LINIJ
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 46 str., 8 pregl., 23 sl., 28 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Zasoljenost tal je ena izmed velikih in naraščajočih globalnih težav, povezanih s podnebnimi spremembami. Medtem ko so kmetijske rastline običajno občutljive na povečane koncentracije talne soli, so nekatere divje rastline in tudi drugi organizmi, ki živijo v slanih razmerah, razvili naravno odpornost proti NaCl. To prilagoditev lahko izkoristimo in poiščemo gene, odgovorne za odpornost proti slanosti ter jih vstavimo v modelne rastline, kjer preizkusimo njihovo delovanje. Za preučevanje delovanja takega gena moramo imeti sistem za njegovo preverjanje. Zato smo v diplomski nalogi vzpostavili uspešen sistem za testiranje odpornosti proti slanosti za gen *gl*. Gen so predhodno že vstavili v navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) in razvili več transformiranih linij, ki smo jih testirali v diplomski nalogi. Linija 3 je imela vstavljen rastlini lastni gen *g1*, linija 4 pa modificiran *g1*. Rast transformiranih tkivnih kultur smo testirali *in vitro* z različnimi koncentracijami NaCl in LiCl. Pri slednjem smo preverjali njegov vpliv na kalitev, kot tudi na rast. Odpornost rastlin smo testirali tudi *in vivo*, po prenosu v lončke s prstjo. Rastline smo zalivali z različnimi koncentracijami NaCl. Vse teste smo izvedli na heterozigotnih linijah za gen *g1*. Ker so za nadaljnje poskuse pomembne tudi homozigotne linije, smo jih s selekcijo pridobili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 606:631.528:575.827(043.2)
CX Biotechnology/transgenic plants/*Arabidopsis thaliana*/Mouse-ear cress/salinity resistance/plant selection/homozygote lines
AU ŠEME, Helena
AA DERMASTIA, Marina (supervisor) / ŽEL, Jana (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY 2010
TI TESTING TRANSGENIC PLANT *Arabidopsis thaliana* FOR SALINITY RESISTANCE AND SELECTION OF HOMOZYGOTE LINES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 46 p., 8 tab., 23 fig., 28 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Soil salinity is one of major global problems, which will get even greater due to climate changes. Because of their low genetic variation, agriculture plants are commonly sensitive to excessive sodium contents. Some plants and other organisms, naturally, developed NaCl tolerance. We can take advantage of that and find responsible genes and then use them for model plants transformation, where we test their effects. We successfully developed system for testing salinity resistance on *A. thaliana* plants in this graduation thesis. Gene g1 is one of that kind and was inserted in *A. thaliana* plants. Line 3 has additional copy of its own g1 gene, line 4 has modified copy of g1 gene. We intended to develop successful salinity test. Plants were tested on MS medium *in vitro* with different NaCl and LiCl contents. We also tested how LiCl effects plant growth and germination. Tests were also made on soil (*in vivo*) with NaCl watering. All the tests were done on T2 plants, not homozygote. Selection for them was made later on and we found some lines.

KAZALO VSEBINE

	STR.
Ključna dokumentacijska informacija (kdi)	III
Key words documentation (kwd)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZASOLJENOST TAL	3
2.2 POSLEDICA SOLNEGA STRESA ZA RASTLINO	3
2.2.1 Toksičnost NaCl	4
2.2.2 Toksičnost LiCl	4
2.2.3 Naravna odpornost rastlin proti solnemu stresu	5
2.3 GENETSKO OZADJE ODPORNOSTI NA SLANOST	7
2.4 TRANSFORMACIJE RASTLIN ZA DOSEGO ODPORNOSTI PROTI SOLNEMU STRESU	9
2.5 NAVADNI REPNJAKOVEC (ARABIDOPSIS THALIANA)	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Rastlinski material	13
3.1.2 Sestava rastlinskih gojišč	14
3.1.3 Raztopine za zalivanje	16
3.2 METODE	16
3.2.1 Sterilizacija semen in kalitev	16
3.2.2 Pobiranje semen	17
3.2.3 Testiranje in vitro	18
3.2.4 Fiziološki testi za preučevanje odpornosti proti NaCl v prsti	19
3.2.5 Selekcija homozigotov	20
3.2.6 Priprava vzorcev za preverjanje genske ekspresije vnesenega gena na ravni mRNK	21
3.2.7 Delo z GSO rastlinami	24
4 REZULTATI	25

4.1	PRELIMINARNI TEST ODPORNOSTI PROTI NATRIJEVEMU KLORIDU V TKIVNI KULTURI	25
4.2	POSKUS ODPORNOSTI PROTI NATRIJEVEMU KLORIDU <i>IN VITRO</i>	26
4.3	TEST ODPORNOSTI PROTI LITIJEVEMU KLORIDU <i>IN VITRO</i>	31
4.3.1	Vpliv prisotnosti LiCl na kalitev	31
4.3.2	Vpliv LiCl na rast rastlin	33
4.4	TEST ODPORNOSTI PROTI NATRIJEVEMU KLORIDU V LONČKIH S PRSTJO	33
4.5	SELEKCIJA HOMOZIGOTOV	35
4.6	IZOLACIJA RNK	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	39
5.1	RAZPRAVA	39
5.2	SKLEPI	41
6	POVZETEK	42
7	VIRI	44
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
PREGLEDINCA 1: SEZNAM UPORABLJENIH LINIJ V POSKUSIH	
143	
PREGLEDNICA 2: POMEN OZNAK LINIJ	
134	
PREGLEDNICA 3: SESTAVA RASTLINSKIH GOJIŠČ	15
PREGLEDNICA 4: SESTAVINE RAZTOPIN ZA ZALIVANJE	16
PREGLEDNICA 5: NAČRT FIZIOLOŠKEGA POSKUSA V ZEMLJI Z NACL	19
PREGLEDNICA 6: UPORABLJENI VZORCI ZA IZOLACIJO RNK	23
PREGLEDNICA 7: TRETIRANJE IZOLIRANE RNK Z DNAZO	24
PREGLEDNICA 8: LINIJE, KI SMO JIH TESTIRALI ZA HOMOZIGOTNOST OB PRISOTNOSTI HIGROMICINA	37

KAZALO SLIK

	str.
SLIKA 1: RASTLINSKI ODGOVOR NA STRES	7
SLIKA 2: URAVNAVANJE IONSKEGA RAVNOVESJA S POMOČJO SOS IN DRUGIH POTI, KI VODIJO V TOLERANCO NA SLANOST (MAHAJAN, TUTEJA, 2005).	9
SLIKA 3: STRATEGIJA PRIPRAVE NA STRES ODPORNE RASTLINE Z GENETSKIM INŽINIRINGOM	10
SLIKA 4: <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	12
SLIKA 5: STERILIZACIJA SEMEN	17
SLIKA 6: <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> Z ZBIRALNIKOM SEMEN ARACON IN CEVJO ARACON.	18
SLIKA 7: PRIKAZ GENERACIJ SEMEN IN RASTLIN <i>A. THALIANA</i>	20
SLIKA 8: RAZLIKA V RASTI NETRANSFORMIRANIH IN TRANSFORMIRANIH RASTLIN NA GOJIŠČU S HIGROMICINOM.	21
SLIKA 9: PREVERJANJE ČISTOSTI IN INTEGRITETE RNK VZORCEV NA AGAROSNI GELSKI ELEKTROFOREZI.	23
SLIKA 10: RAST LINIJ NA GOJIŠČIH Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI NACL PO 5 TEDNIH.	26
SLIKA 11: PRIMERJAVA DEVETIH LINIJ NA 0, 50 IN 100 MM NACL PO 1 MESECU	28
SLIKA 12: DELEŽ RASTLIN S KORENINAMI NAD 3 CM, 18 DNI PO KALITVI	29
SLIKA 13: DELEŽ RASTLIN S KORENINAMI NAD 3 CM PRI 0 MM NACL	29
SLIKA 14: DELEŽ RASTLIN S KORENINAMI NAD 3 CM PRI 50 MM NACL	30
SLIKA 15: DELEŽ RASTLIN S KORENINAMI NAD 3 CM PRI 100 MM NACL	30
SLIKA 16: DELEŽ RASTLIN S KORENINAMI NAD 3 CM PO 18 DNEH	31
SLIKA 17: PRIMERJAVA LINIJ NA RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH LICL PO 1 MESECU	32
SLIKA 18: ODVISNOST KALITVE SEMEN OD KONCENTRACIJE LICL	32
SLIKA 19: PRIMERJAVA PETIH LINIJ NA RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH LICL PO 1 MESECU	33
SLIKA 20: PRIMERJAVA MED LINIJAMI PO 20 DNEVIH ZALIVANJA Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI NACL	34
SLIKA 21: PRIMERJAVA VIŠINE LINIJ PO 20 DNEH ZALIVANJA Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI NACL	35
SLIKA 22: NEGATIVNA (PLOŠČA S HIGROMICINOM IN NETRANSFORMIRANO LINIJO) IN POZITIVNA (PLOŠČA BREZ HIGROMICINA) KONTROLA	36
SLIKA 23: PRIMERJAVA NEHOMOZIGOTNE (3/7-1B) IN HOMOZIGOTNE (3/7-1C) LINIJE.	38

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Zviševanja globalne temperature in z njim povezano pomanjkanje padavin prizadevata kmetijsko proizvodnjo, ki se z naraščanjem človeške populacije povečuje. Vse to vodi k vedno večjim potrebam po namakanju kmetijskih zemljišč, ki vpliva na spremenjeno, ne vedno zeleno sestavo tal. Namakanje z nekakovostno vodo, ki vsebuje veliko raztopljenih soli, vodi do kopičenja soli v tleh ali zasoljevanja. Težave z zasoljevanjem tal so že sedaj vidne v aridnih in semiaridnih območjih, ki se zaradi podnebnih sprememb širijo (Chukwu in Musa, 2008).

Slanost vpliva na rastline tako, da se povečuje privzem natrija in klora, katerih ioni so za rastlino v velikih koncentracijah toksični, z njihovim privzemom pa se niža tudi vodni potencial rastlinskih celic, ki vodo izgubljajo. Rastlina je soočena s fiziološko sušo, katere posledica je zmanjšana rastlinska rast, v skrajnih primerih tudi propad rastline (Zhu, 2001).

Nekatere rastline, glive in mikroorganizmi že naravno tolerirajo večje koncentracije soli v svoji okolici. Taki halotolerantni organizmi so vir genov tolerance na slanost, ki jih lahko vnesemo v kmetijsko pomembnejše rastline (Flowers in Flowers, 2005).

Zaradi dolgega razvoja od semena do pridelka in nove generacije, kmetijske rastline niso najprimernejše za začetne raziskave. V ta namen uporabljamo modelne rastline. Modelna rastlina navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) ima dobro poznan genom, hitro raste in ga preprosto gojimo v nadzorovanih razmerah. Rastlina je idealna za vnos kandidatnih genov, ki jih po uspešnih začetnih testih lahko vnesemo v tarčno kmetijsko rastlino.

1.2 NAMEN DELA

Namen dela je bila postavitve sistema za testiranje rastlin z vnesenimi geni za odpornost proti slanosti. Sistem smo postavili na več transformiranih linijah rastline *A. thaliana* iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo. V rastline sta bila že predhodno vstavljena modificiran gen *g1*, ki izvira iz halotolerantnega organizma, in rastlini *A. thaliana* lastni gen *g1*. Pridobljenih je bilo že nekaj linij s semeni T2 generacije. V tkivni kulturi in v prsti smo testirali odpornost rastlin proti različnim koncentracijam NaCl. Odpornost proti LiCl smo testirali le pri rastlinah v tkivni kulturi. Odpornost smo primerjali z netransformiranimi rastlinami. V generaciji T3 smo selekcionirali tudi homozigote, saj so ti pomembni za nadaljnje testiranje.

1.3 HIPOTEZE

- Transformirane linije rastline *A. thaliana* so primeren modelni sistem za testiranje genov odpornih proti slanosti.

- Odgovor rastlin na slanost je lahko drugačen v *in vivo* in *in vitro* sistemu.
- Za sistem testiranja odpornosti proti slanosti sta primerna tako NaCl kot LiCl, ki je predvidoma bolj toksičen za rastline.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZASOLJENOST TAL

Skoraj 75% zemeljske površine je prekrите s slano vodo, zato ni presenetljivo, da ima sol vpliv tudi na velik del kopnega sveta. Zaradi zmanjšanja padavin, kot posledice podnebnih sprememb, naj bi se posledično povečevala zasoljenost tal. To naj bi skupaj z drugimi posledicami podnebnih sprememb vplivalo na dostopnost vode in hrane, potrebe po njima se zaradi naraščajoče človeške populacije povečujeta (Yeo, 1999).

Naravno nastale slane površine kot so, puščave in obalna slana močvirja, niso kmetijsko najpomembnejše površine. Pomembnejša so območja, kjer se slanost povečuje zaradi namakanja ali izsekavanja gozdov (Flowers in Flowers, 2005). Temu pravimo sekundarno zasoljevanje, ki je posledica človeškega delovanja. Kmetijske rastline uporabijo le 40-45% vode, ki jo dovedemo z namakanjem (Yeo, 1999). Težava namakanja je tudi, da z njim v tla dovedemo večje količine soli, kot jih rastline porabijo in iz tal odstranijo (Chukwu in Musa, 2008), saj je kar polovica vse svetovne podtalnice slane, največ pa v suhem in polsuhem pasu, kjer so zahteve po namakanju največje (Yeo, 1999).

Zaradi prisotnosti soli v tleh pade vodni potencial in rastline vodo izgubljajo, voda postane za rastline manj dostopna. Pri slanoljubnih rastlinah – halofitih se je razvila naravna toleranca na slanost. Halofite najdemo med različnimi rastlinskimi rastnimi oblikami od dreves, grmov in zeli. Na drugi strani pa kmetijske rastline povečane slanosti ne preneso brez velikih posledic za rast in pridelek (Flowers in Flowers, 2005). Ker kmetijske rastline praviloma nimajo velike genetske raznolikosti, se spremembam slabo prilagajajo.

2.2 POSLEDICA SOLNEGA STRESA ZA RASTLINO

Stres je v biološkem smislu težko definirati. Kar je za eno rastlino stres, je lahko za drugo optimum. Lahko bi rekli, da je biološki stres neugoden učinek ali okoliščina, ki ovira normalno delovanje in obstoj bioloških sistemov, kot so rastline (Mahajan in Tuteja, 2005). Poznamo abiotski in biotski stres. Biotski stres rastlinam povzročajo mikroorganizmi, živali in tudi druge rastline. Med abiotski stres poleg slanosti uvrščamo še poplave, mraz, zmrzal, sušo in vročino.

Stres najprej zaznajo membranski receptorji rastlinskih celic. Posledica je tvorba sekundarnih sporočevalcev kot so kalcij, reaktivni kisikovi radikali ali inozitol fosfat. Ti še naprej spreminjajo koncentracijo Ca^{2+} znotraj celice. Na ta signal se odzovejo Ca^{2+} senzorji ali proteini, ki vežejo kalcij. Ti sicer nimajo encimske aktivnosti, vendar pa spremenijo svojo konformacijo, da lahko reagirajo z drugimi proteini, kar sproži fosforilacijsko kaskado. Tarče so geni, ki odgovarjajo na stres in pa njihovi transkripcijski dejavniki. Nastajajo hormoni kot je abscizinska kislina, etilen in salicilna kislina. Vse to pa vodi v prilagoditev rastline na stres, kar ji pomaga preživeti neugodne razmere. Gene, ki se

prepisujejo ob stresu lahko razdelimo med zgodnje in pozno inducirane. Zgodnji se začnejo prepisovati že nekaj minut po zaznavi stresa. Pozno prepisujoči geni pa se inducirajo šele po nekaj urah zaznave stresa in je sprožitev njihovega prepisovanja običajno povezana s sintezo novih proteinov in signalnih komponent (Mahajan in Tuteja, 2005).

Slani stres poruši homeostazo v vodnem potencialu in porazdelitvi ionov, tako na ravni celotne rastline kot tudi celični ravni. To pa povzroči molekulske poškodbe, ustavitev rasti in tudi smrt rastline (Zhu, 2001). Slanost vpliva na rastlino različno: znižuje vodni potencial, povzroča toksične učinke Na^+ in Cl^- , ki jih rastlina absorbira in moti privzem drugih esencialnih hranil. Zadnje nima takojšnjega vpliva na rastlinsko rast, saj imajo rastline rezervna hranila, ki jih lahko mobilizirajo (Flowers in Flowers, 2005).

2.2.1 Toksičnost NaCl

NaCl je zelo razširjena snov. Čeprav obstajajo nekatere rastline, ki nujno potrebujejo Na^+ za rast, predvsem halofiti, je za večino rastlin visoka koncentracija NaCl v okolici omejujoč dejavnik rasti. Kalij je v nasprotju esencialni makronutrient, ki ga rastline potrebujejo v visokih koncentracijah. Sodeluje v vzdrževanju osmotskega ravnovesja, pri odpiranju in zapiranju listnih rež in je esencialni kofaktor številnih encimov (Mahajan in Tuteja, 2005). V običajnih razmerah rastline v citosolu vzdržujejo visoko razmerje K^+/Na^+ . Koncentracije kalija so običajno 100 do 200 mM, natrija pa samo 1 do 10 mM. Če se poveča koncentracija Na^+ v okolici, se poveča razmerje Na^+/K^+ v citosolu. To je posledica podobno velikega hidratijskega ovoja natrija in kalija, zaradi katerega transportni proteini, ki skrbijo za transport K^+ v citosol, niso sposobni razločevati med njima. Na^+ se je zaradi svoje podobnosti kaliju sposoben vezati na njegova vezavna mesta v encimih. Ugotovljeno je bilo, da koncentracije Na^+ nad 100 mM inhibirajo sintezo proteinov prav zaradi njegove kompeticije s K^+ (Blumwald in sod., 2000).

2.2.2 Toksičnost LiCl

Litij za razliko od natrija ni mikronutrient in ga rastlina sploh ne potrebuje. Tudi v naravi se pojavlja v zelo majhnih koncentracijah, v večjih pa zaradi onesnaženja. Rastline izpostavljene litijevim solem imajo zmanjšano rast, nižjo vsebnost klorofila, krajše korenine in njihova semena slabše kalijo. Opazili so tudi, da mora biti določena koncentracija LiCl presežena, da postanejo ti vplivi opazni (Li in sod., 2009). LiCl je toksičen že v precej nižjih koncentracijah kot NaCl. Pri NaCl tako pri višjih koncentracijah soli pride tudi do osmotske toksičnosti, medtem ko pri LiCl govorimo izključno o ionski toksičnosti (Ruggiero in sod., 2004).

2.2.3 Naravna odpornost rastlin proti solnemu stresu

Odpornost na slanost je sposobnost rastline, da raste in zaključi svoj življenjski cikel na substratu, ki vsebuje visoke koncentracije raztopljenih soli. Glede na sposobnost tolerirati povečane koncentracije soli halofitne rastline delimo na obligatne in fakultativne. Obligatni halofiti za svojo rast potrebujejo sol in lahko tolerirajo večje količine soli. Za njih je značilna majhna morfološka in taksonomska raznolikost. Fakultativni halofiti lahko rastejo na soli, vendar ta za njih ni nujno potrebna. Najdemo jih na manj slanih območjih (Parida in Das, 2005).

Rastline so razvile različne mehanizme tolerance proti slanosti:

- **izčrpavanje ionov**

Izčrpavanje ionov je odstranjevanje natrijevih ionov iz citoplazme s pomočjo Na^+/H^+ antiporterjev. To je aktivni transport, saj poteka proti elektrokemijskemu potencialu in rastlina zanj potrebuje energijo. Na^+/H^+ antiporterji delujejo tako, da črpajo H^+ ione v smeri elektrokemijskega potenciala, Na^+ pa v nasprotni smeri. Za potek tega procesa je potreben ustrezen H^+ gradient, za katerega skrbijo H^+ -ATPaze na membrani, ki črpajo H^+ ione iz citoplazme. V številnih halotolerantnih rastlinah so opazili povečano aktivnost Na^+/H^+ črpalk in H^+ -ATPaz (Blumwald in sod., 1999).

- **nadzor privzema ionov in izločanje skozi solne žleze v listih**

Rastlina sprejema sol, vendar jo transportira po floemu do listov, kjer so specializirane epidermalne celice s solnimi žlezami skozi katere lahko rastlina izloči sol. V teh celicah se sol koncentrira in kristalizira. Tako nastali kristali na površini listov in stebel se sperejo ali odpihnejo z vetrom. Druga metoda je koncentriranje soli v listih, ki kasneje odpadejo (Parida in Das, 2005).

- **kompartmentizacija**

Kompartmentizacija je kopičenje ionov v vakuolah, ki predstavljajo večino volumna celice. Tudi za to potrebujejo aktivni transport, saj poteka proti koncentracijskem gradientu. Tudi v tem procesu sodelujejo Na^+/H^+ antiporterji in H^+ -ATPaze, le da so te nameščene na membrani vakuole. Posledica kompartmentizacije ionov je tudi sočnost rastlin ali sukulenca. Razvijejo se vodna tkiva, zaradi vzpostavitve ravnotežja z ioni, ki na nek način ione razredčijo. Zaradi velike vsebnosti vode so tkiva takih rastlin odebeljena (Parida in Das, 2005).

- **sinteza kompatibilnih topljencev**

Kompatibilni topljenci so netoksične, močno vodotopne molekule z majhno molsko maso, ki ne vplivajo na potek normalnih biokemijskih reakcij v celici. Pri fiziološkem pH so nenabiti ali v obliki ionov dvojčkov. Stabilizirajo proteine in membrane ter se lahko akumulirajo v visokih koncentracijah. Povečujejo količino

topljenca in s tem zmanjšujejo osmotski potencial v celici oziroma zvišujejo turgor. Na ta način rastline preprečujejo izgubo vode iz celic zaradi NaCl v okolici. Te molekule so razni sladkorji in alkoholi (trehaloza, fruktoza, manitol, sorbitol...) ali bipolarne spojine (prolin, glicin betain...). Na ta način se lahko rastline pri kratkotrajnem stresu izognejo izgubi vode, če pa je ta stres dolgotrajen, morajo rastline zagotoviti stalen osmotski gradient, da ne pride do izgube turgorja (Apse in sod., 2002).

- **sprememba fotosinteznih poti**

Slani stres inhibira fotosintezo zaradi pomanjkanja vode, zato je potrebno zvišati učinkovitost porabe vode. Nekatere rastline C3 fotosintezo spremenijo v CAM, kar jim omogoča manjšo izgubo vode, saj odpirajo reže samo ponoči. Druge rastline kot je loboda *Atriplex lentiformis* pa ob slanosti zamenjajo C3 fotosintezo za C4 (Parida in Das, 2005).

- **indukcija antioksidativnih spojin**

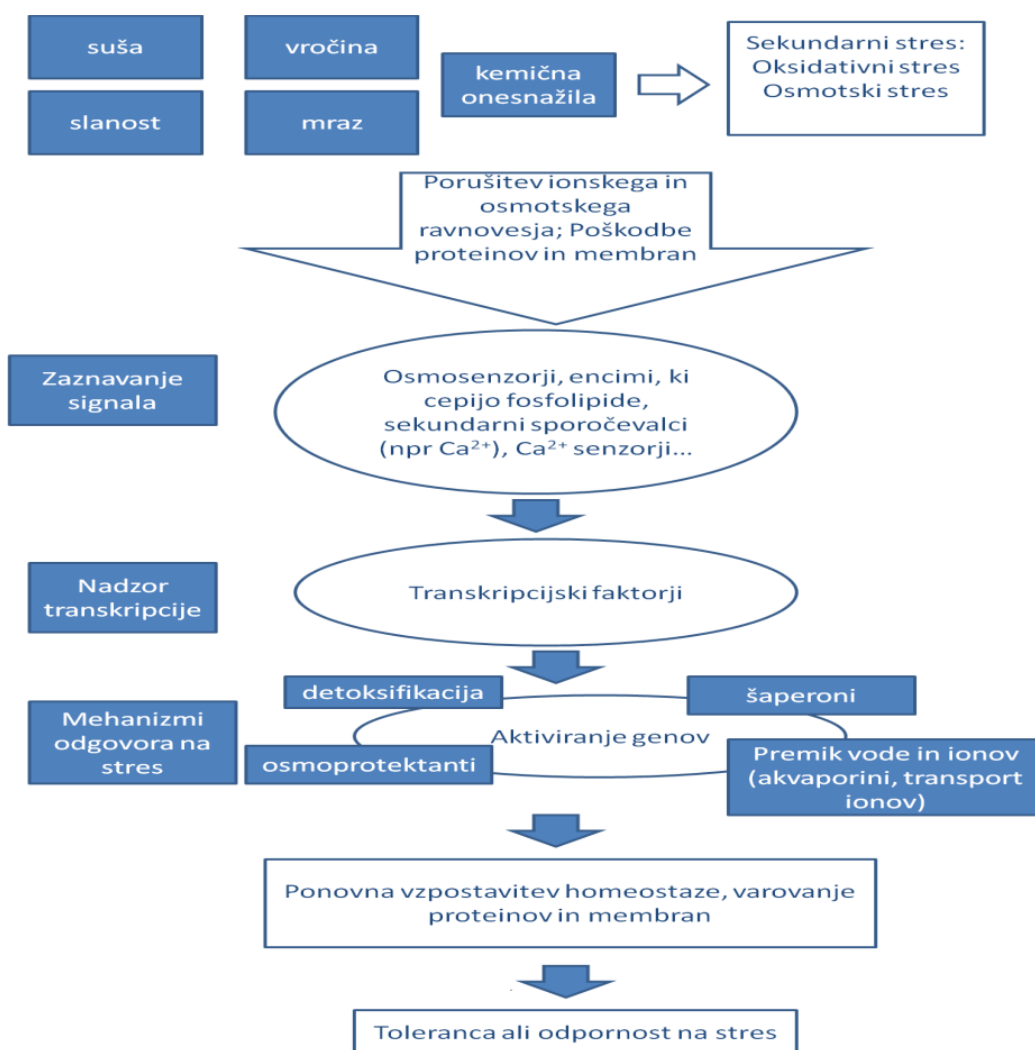
Stresne razmere, kot so temperaturni ekstremi, visoka intenziteta svetlobe, herbicidi, pomanjkanje mineralov in tudi slanost, sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kot je superoksid (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($OH^\cdot$) in singletni kisik (1O_2). Te spojine lahko resno poškodujejo metabolizem v celici, saj povzročajo poškodbe lipidov, proteinov in nukleinskih kislin. Ker se kisik kopiči predvsem v kloroplastih, so ti najbolj nagnjeni k proizvodnji kisikovih radikalov. Rastline vsebujejo veliko število različnih antioksidantov, ki jih ščitijo pred oksidativnimi poškodbami, vendar pa ob velikem stresu nastaja preveč reaktivnih kisikovih spojin, kot bi jih antioksidanti lahko nevtralizirali. Količina antioksidantov je v sorazmerju z odpornostjo proti stresu. Med antioksidante spadajo encimi kot je katalaza in razne peroksidaze, ki razgrajujejo H_2O_2 , superoksid dismutaza (SOD), ki superoksid pretvarja v H_2O_2 ter različne reduktaze. Vsi encimi pretvarjajo radikale v manj aktivne in manj škodljive za celice. Med antioksidante spadajo tudi neencimske molekule kot je askorbat, glutation, karotenoidi in antocianin. Številne med njimi so komponente vitaminov (Parida in Das, 2005).

- **indukcija rastlinskih hormonov**

Povišane koncentracije soli sprožijo povišanje koncentracij rastlinskih hormonov kot so abscizinska kislina ali citokinini. Za abscizinsko kislino je znano, da je odgovorna za aktivacijo genov, ki sodelujejo pri odgovoru na slanost. Vplivala naj bi na prehod iz C3 fotosinteze v CAM in stimulira zaprtje listnih rež (Parida in Das, 2005).

2.3 GENETSKO OZADJE ODPORNOSTI NA SLANOST

Suša, slanost, ekstremne temperature in oksidativni stres povzročajo podobne celične poškodbe. Suša in slanost povzročata predvsem osmotski stres, kar poruši homeostazo in ionsko ravnovesje v celicah. Oksidativni stres pa spremlja vse vrste stresov. Zaradi teh podobnosti različni okoljski stres sprožajo enake celične signalne poti in odgovore, katerih posledice so produkcija stresnih proteinov, antioksidantov ali akumulacija kompatibilnih topljencev (Wang in sod., 2003).



Slika 1: Rastlinski odgovor na stres (Wang in sod., 2003)

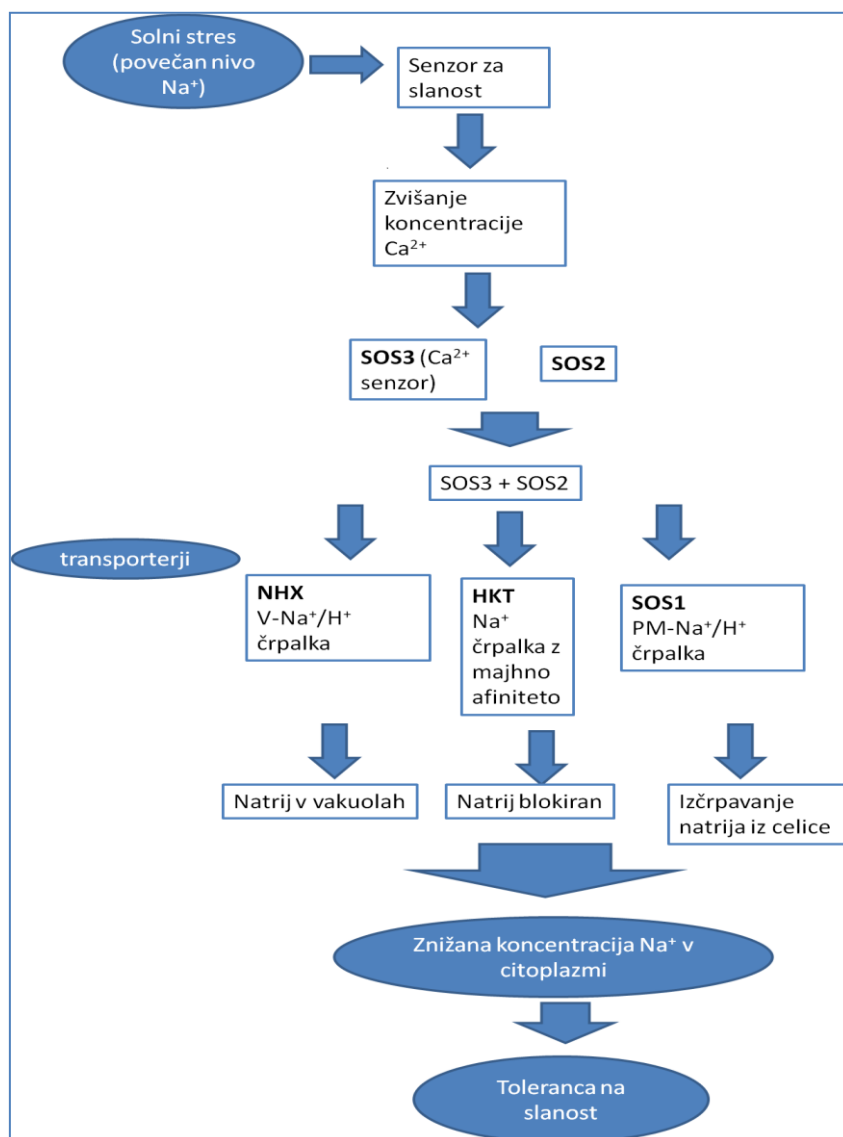
Kot vidimo na sliki 1 je rastlinski odgovor na stres zelo kompleksen. Najpomembnejše gene pri odgovoru na stres lahko razdelimo v tri skupine:

- Geni, ki kodirajo regulatorne proteine (transkripcijski faktorji, signalni proteini)

- b) Geni, katerih proteinski produkti ščitijo membrane in proteine (šaperoni, proteini toplotnega šoka, osmoprotektanti...)
- c) Geni, katerih proteinski produkti vplivajo na privzem in transport vode ter ionov (akvaporini, transporterji ionov...) (Wang in sod., 2003).

Pomemben dejavnik tolerance je tudi kalcij. Kakšen je njegov vpliv, lahko vidimo na sliki 2. Ob povišani koncentraciji NaCl v okolici se poviša tudi koncentracija Ca^{2+} v rastlinskem citosolu. Povišana koncentracija kalcija je tisti stresni signal, ki sproži prilagajanje rastline na sol. Geni, ki sodelujejo pri toleranci na slanost pa so SOS (salt overly sensitive) geni. Gen *SOS3* kodira protein, ki ima tri vezavna mesta za Ca^{2+} . Če se veže kalcij, protein spremeni konformacijo in prenese signal naprej. Gen *SOS2* kodira serin/treonin kinazo, s katero se fizično poveže *SOS3*. Skupaj pa aktivirata gen *SOS1*, ki kodira antiporter Na^+/H^+ , ki izloča odvečni natrij iz citosola (Mahajan in Tuteja, 2005).

V divjem tipu *A. thaliana* so ugotovili, da se izražanje gena *SOS1* poveča ob izpostavitvi solnemu stresu. Če pa se pojavijo mutacije na genih *SOS2* ali *SOS3*, se izražanje zmanjša (Zhu, 2001).



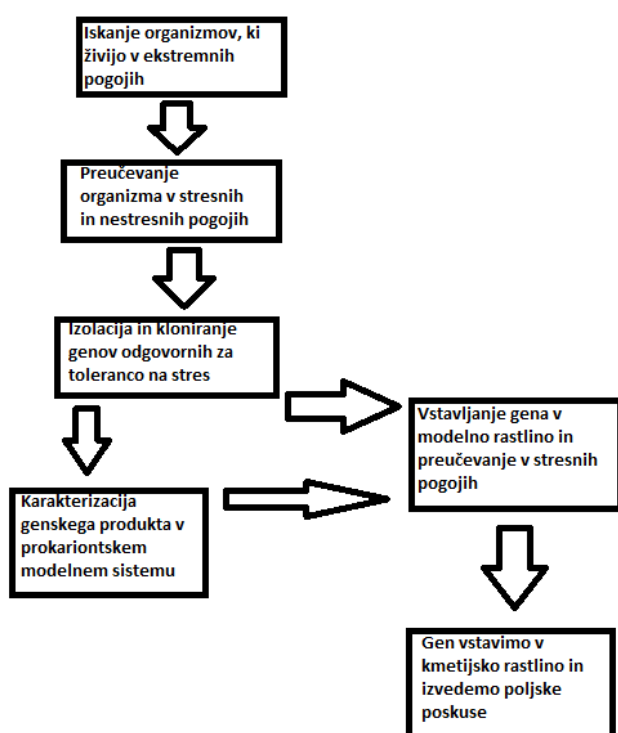
Slika 2: Uravnavanje ionskega ravnovesja s pomočjo SOS in drugih poti, ki vodijo v toleranco na slanost (Mahajan inTuteja, 2005).

2.4 TRANSFORMACIJE RASTLIN ZA DOSEGO ODPORNOSTI PROTI SOLNEMU STRESU

Transgene rastline, odporne proti solnemu stresu pogosto tolerirajo tudi druge stresne dejavnike kot so zmrzal, mraz, vročina in suša. Zato se tolerance na abiotiski stres prekrivajo. Razlog je v tem, da pri vseh naštetih stresih pride do pomanjkanja vode in oksidativnega stresa z nastankom reaktivnih kisikovih spojin. Takšne rastline so tako še bolj primerne za kmetijsko uporabo (Zhu, 2001). Geni, ki jih vnesemo v transgene rastline za odpornost proti slanosti, lahko izvirajo iz drugih rastlin, gliv ali bakterij, ki so naravno

tolerantni na povišane koncentracije soli. Transformacij rastlin z odpornostjo na slanost je veliko, saj je to eno izmed obetajočih področij rastlinske biotehnologije.

Na sliki 3 vidimo pot do pridobitve transformirane rastline, odporne proti stresu. Za začetek potrebujemo organizem, z naravno toleranco proti slanosti. Sledi ugotavljanje odgovornih genov za to in njihova izolacija. Gene nato vstavimo v prokariotski modelni sistem, kjer opazujemo, če se tudi tam pojavi povečana toleranca. Lahko pa se odločimo in gen vstavimo že v rastlinski modelni sistem. Sledijo testi v stresnih razmerah in če so uspešni, gen vstavimo v tarčno kmetijsko rastlino, za katero izvedemo poljske poskuse (Holmberg in Bülow, 1998).



Slika 3: Strategija priprave na stres odporne rastline z genetskim inženiringom (Holmberg in Bülow, 1998).

Klähn in sod. (2009) so v rastlino *A. thaliana* vstavili gen za biosintezo kompatibilnega topljenca glukozilglicerola (GG) iz bakterije *Azotobacter vinelandii*. Transgene rastline, sposobne kopičenja zelo visokih koncentracij GG, so bile v nestresnih razmerah prizadete v rasti. Tiste z manjšimi koncentracijami akumuliranega kompatibilnega topljenca, pa so ob izpostavitvi solnemu stresu, imele večji odstotek preživetja, boljšo rast korenin in tudi celotne rastline pri testih v tleh kot kontrolne rastline. Prasad in sod. (2000) so v križnico *Brassica juncea* vstavili gen za sintezo kompatibilnega topljenca glicin betaina. Nastala transgena rastlina je imela povečano halotoleranco.

Mnogi raziskovalci so se osredotočili na raziskave odpornosti proti slanosti s povečano produkcijo abscizinske kisline. Ob osmotskem stresu se povešajo koncentracije abscizinske kisline v celicah, kar sproži izražanje genov, ki odgovarjajo na osmotski stres. Park in sod. (2008) so v rastlini *A. thaliana* povečali izražanje gena *ZEP*, enega izmed regulatornih genov v biosintezi abscizinske kisline. Transgene rastline so imele v primerjavi z divjim tipom daljše primarne korenine, več razvitih rozetnih listov in večjo svežo težo ob izpostavitvi 150 mM NaCl; rastline pa so bile tudi odporne proti suši. Vse transgene rastline s povečanim izražanjem gena *ZEP* so preživele 3 tedne brez zalivanja, divji tip pa ni preživel.

Kot posledica pomanjkanja vode v rastlini zaradi osmotskega stresa, začnejo v rastlini nastajati reaktivni kisikove spojine (ROS). Wang in sod. (2004) so v rastlini *A. thaliana* s pomočjo povečanega izražanja encima Mn-SOD, superoksid dismutaze prisotne v mitohondrijih, povečali odpornost proti solnemu stresu. Mitohondriji so poleg kloroplastov eni izmed glavnih organelov odgovornih za nastanek ROS. Prav mitohondriji in njihova elektronska transportna veriga na notranji membrani, so najbolj izpostavljeni poškodbam zaradi ROS. Mn-SOD ščiti mitohondrije pred poškodbami, ob povečanem izražanju pa so transgene rastline v primerjavi z divjim tipom bolje zaščitene pred celičnimi poškodbami, zato prenesejo tudi večje koncentracije soli.

Apse in sod. (1999) so s pomočjo povečanega izražanja antiporterjev Na^+/H^+ v rastlini *A. thaliana* pokazali odpornost proti soli tudi v fizioloških poskusih v zemlji. Pri zalivanju s slano raztopino so pri divjem tipu rastlin opazili manjše liste, kloroze in tudi zmanjšano rast rastlin. Transgene rastline pa do zalivanja z 200 mM raztopino NaCl niso kazale nobenih znakov stresa. Shi in sod. (2003) so dokazali, da se je v rastlinah *A. thaliana* s povečanim izražanjem gena *SOS1* kopičilo manj natrija v celicah, saj ta gen kodira antiporterje Na^+/H^+ na plazemski membrani, ki natrij odstranjujejo iz celic.

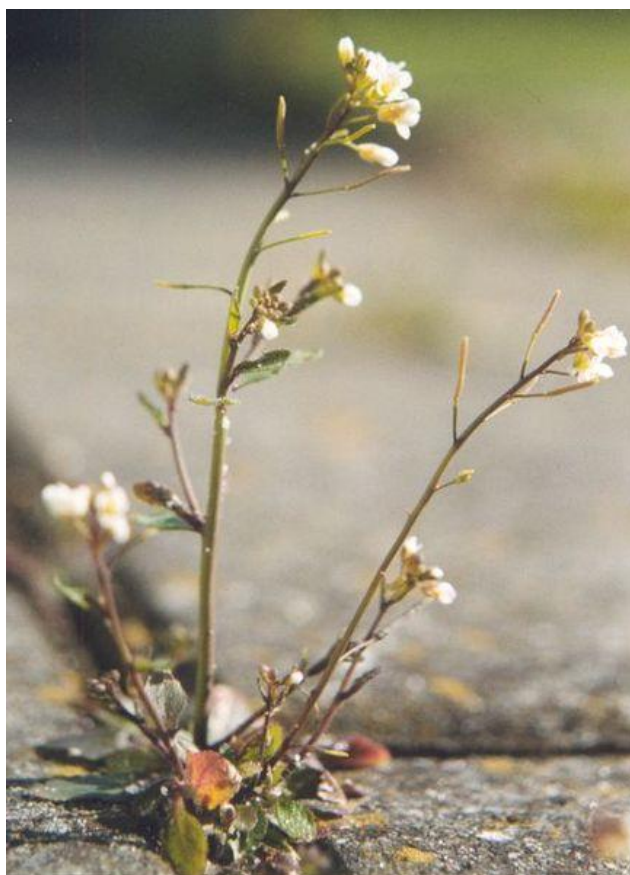
Nagaoka in Takano (2003) sta opravila poskuse na transgenih rastlinah *A. thaliana*, s povečanim izražanjem gena *STO*, ki sodeluje pri vzdrževanju ustreznega razmerja Na^+/K^+ v celicah. Rastline so imele ob izpostavitvi slanosti 30-70% več korenin kot divji tip rastlin.

V naslednjih letih je mogoče na tržišču pričakovati transgene rastline z odpornostjo proti abiotskemu stresu, predvsem suši, vendar tudi slanosti in drugim stresom. V nekaterih državah namreč že izvajajo poljske poskuse (Edmeades, 2008).

2.5 NAVADNI REPNJAKOVEC (*Arabidopsis thaliana*)

A. thaliana je majhna rastlina iz družine križnic (Brassicaceae) (slika 4). V naravi se pojavlja v Evropi, Aziji in severozahodni Afriki in običajno zraste 20 do 25 cm v višino. Bazalni listi, dolžine 1,5 do 5 cm, tvorijo rozeto, iz katere požene cvetno steblo, na katerem

se tudi pojavi nekaj manjših listov. Listi so prekriti z enoceličnimi trihomi. Cvetovi so veliki približno 3 mm in rastejo v obliki kobula. Plodovi so 5 do 20 cm dolgi stroki, vsak vsebuje 20 do 30 semen. Korenine so preproste, imajo eno primarno korenino, ki ima več manjših stranskih koreninic. Lahko tvorijo povezave z rizosferno bakterijo *Bacillus megaterium* (Clough in Bent, 1998).



Slika 4: *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis thaliana*, 2010)

Prednosti *A. thaliana* kot modelne rastline (Leonelli, 2007):

- prva rastlina z znanim zaporedjem nukleotidnih kislin
- majhen genom (125Mbp)
- malo nekodirajoče DNA
- kratek življenjski cikel (6 do 8 tednov)
- veliko število semen
- zaradi majhne rasti je primerna za vzgojo v laboratorijskih razmerah, zlahka izzovemo mutacije z obsevanjem semen ali njihovo izpostavitvijo kemičnim mutagenom
- lahko se samooprašuje in na ta način zlahka pridemo do homozigotov
- izdelana metoda transformacije z *Agrobacterium tumefaciens*
- prilagojena laboratorijskemu življenju.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Rastlinski material

Uporabili smo več linij rastline *A. thaliana* iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so bile že predhodno transformirane z metodo inokulacije (preglednica 1, 2).

Preglednica 1: Seznam uporabljenih linij v poskusih

Linija	Poskus (T2 generacija)	Selekcija homozigotov (T3 generacija)
3/1-1	preliminarni <i>in vitro</i> poskus z NaCl, poskus <i>in vivo</i>	
3/4-1		X
4/3-2		X
4/13-1		X
3/2-1	LiCl, NaCl test <i>in vitro</i>	
3/11-1		
4/8-1		
4/14-1		
3/4-2	NaCl test <i>in vitro</i>	
3/7-1		X
3/9-1		
3/9-2		
3/9-3		
3/12-3		
3/12-4		
3/12-5		
4/1-2		
4/3-1		
4/5		
4/6		
4/7-1		
4/7-2		
4/9		
4/10-3		
4/12		
4/13-2		

Pregledinca 2: Pomen oznak linij

Linija 1	netransformirana
Linija 2	transformirana s prazno <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Linija 3	povečano izražanje lastnega gena g1
Linija 4	vstavljen modificiran gen g1

Kalitev in poskusi v tkivnih kulturah so potekali v rastni komori s fotoperiodo 16 ur svetlobe (žarnica Osram L58 W/77 z osvetljenostjo 3092,8 lx) in 8 ur teme. Temperatura med osvetljevanjem je bila 21°C, v času teme pa 19°C, relativna zračna vlaga pa 94±2 %. Rastlinski material za poskuse v zemlji ali pridobivanje semen je bil prestavljen v zaprto rastno komoro s fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme ter gostoto pretoka fotonov 120 do 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Temperatura v komori je bila 20±2°C v času osvetljevanja in 18±2°C v času teme, zračna vlaga pa 75±2 %.

3.1.2 Sestava rastlinskih gojišč

Za gojenje rastlin v tkivni kulturi smo uporabili trdno MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962). V bidestilirano vodo smo na magnetnem mešalniku dodali vse sestavine gojišča razen agarja. Ko so bile dobro premešane in raztopljene, smo z dodajanjem HCl ali NaOH umerili pH na 5,8. Nato smo gojišču dodali agar in gojišče avtoklavirali 15 min pri 121°C in 103,4 kPa. Antibiotike smo dodali, ko se je gojišče ohladilo na približno 50°C in ga nato v laminariju razlili v sterilne petrijevke. Sestava gojišča je predstavljena v preglednici 3.

Preglednica 1: Sestava rastlinskih gojišč

Gojišče	Sestavina	Proizvajalec	Založna koncentracija (mg/l)	Koncentracija v mediju
MS	MAKROELEMENTI			
	NH ₄ NO ₃	Sigma	33000	1650 mg/l
	KNO ₃	Merck	38000	1900 mg/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	8800	440 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	7400	370 mg/l
	KH ₂ PO ₄	Kemika	3400	170 mg/l
	MIKROELEMENTI			
	KI	Merck	166	0,83 mg/l
	H ₃ BO ₃	Merck	1240	6,2 mg/l
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	Sigma	4460	22,3 mg/l
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	1720	8,6 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Sigma	50	0,25 mg/l
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Merck	5	0,025 mg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	5	0,025 mg/l
	VIR ŽELEZA			
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma	5560	27,8 mg/l
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	Kemika	7460	37,3 mg/l
	VIR ORGANSKIH SPOJIN			
	myo-inositol	Sigma	20000	100 mg/l
	nikotinska kislina	Kemika	100	0,5 mg/l
	piridoksin-HCl	Sigma	100	0,5 mg/l
	tiamin-HCl	Caldiochem	100	0,5 mg/l
	glicin	Merck	400	2 mg/l
1% MS10	MS			
	saharoza	Kemika		10g/l
	MES	Sigma		0,5 g/l
	agar	Bacto		10 g/l
vcnh	1% MS10			
	vankomicin	Sigma	100 mg/ml	200 mg/l
	cefatoksin	Krka	250 mg/ml	200 mg/l
	nistatin	Sigma	100 mg/ml	50 mg/l
	higromicin	InvivoGen	100 mg/ml	20 mg/l

Antibiotika vankomicin in cefatoksin sta namenjena za selekcijo proti *A. thumefaciens*, nistatin je protiglivni antibiotik, higromicin pa selekcijski (selekcija transformant).

Za testiranje rastlin za odpornost proti slanosti v testih *in vitro* smo pripravili gojišče vcnh z različnimi koncentracijami NaCl (Merck) ali LiCl (Sigma). To je običajno 1% MS10

gojišče, ki smo mu pred avtoklaviranjem dodali še NaCl do končnih koncentracij 50, 100 ali 150 mM NaCl oz. LiCl do končnih koncentracij 5, 10 in 20 mM. Po avtoklaviranju smo dodali vankomicin, cefatoksin, nistatin in higromicin.

3.1.3 Raztopine za zalivanje

Za test rastlin na odpornost proti slanosti v lončkih s prstjo smo uporabili tekoči medij MS koncentracije 0,125%, ki smo ji dodali različne koncentracije NaCl ter premešali na električnem mešalniku. Način priprave raztopin je opisan v preglednici 4. Raztopine smo hranili na 4°C, zato smo jih pred zalivanjem segreli na sobno temperaturo.

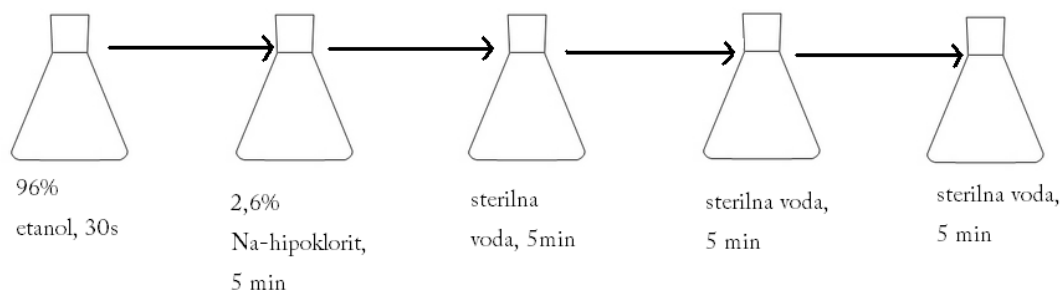
Preglednica 2: Sestavine raztopin za zalivanje

Raztopina	Sestavina	Količina
A (0 mM NaCl)	MS	125 ml
	voda	875 ml
B (50 mM NaCl)	MS	125 ml
	NaCl	2,92 g
	voda	875 ml
C (100 mM NaCl)	MS	125 ml
	NaCl	5,84 g
	voda	875 ml
D (150 mM NaCl)	MS	125 ml
	NaCl	8,77 g
	voda	875 ml
E (200 mM NaCl)	MS	125 ml
	NaCl	11,69 g
	voda	875 ml

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija semen in kalitev

Pripravili smo pet 250 mL erlenmajeric, steklene valčke s pritrjenim najlon filtrom, filterski papir in vodo. Pred samo sterilizacijo semen smo avtoklavirali potreben material 15 min na 121°C in pri 103,4 kPa. V laminariju smo v sterilne erlenmajerice nalili 96% etanol, 2,6% natrijev hipoklorit (Kemika) z 0,05% detergentom Tween 20 (Sigma) in v tri erlenmajerice sterilno vodo. Semena smo stresli v sterilni valjček s pritrjenim najlon filtrom (Eckert, 60µm) in jih za 30 s namočili v erlenmajerico s 96% etanolom, nato za 5 min v erlenmajerico s 2,6% natrijevim hipokloritom in nato po trikrat 5 minut v erlenmajericah s sterilno vodo (slika 5).



Slika 5: Sterilizacija semen

Po sterilizaciji smo semena iz valjčka prenesli v sterilno petrijevko, v katero smo predhodno položili tudi sterilni filterski papir, da je popil odvečno vodo. S konico plastične eze smo semena prenesli na petrijevko z MS gojiščem in jo ovili z lepilnim trakom (Micropore, Tosama). Plošče smo nato zavili v aluminijasto folijo in jih postavili na 4°C za 48 ur.

3.2.2 Pobiranje semen

Na rastline smo namestili zbiralec semen Aracon in cevi Aracon (Arasystem), za zagotovitev samoopraševanja, za preprečitev raznašanja semen po prostoru in za lažje pobiranje semen (slika 6).



Slika 6: *Arabidopsis thaliana* z zbiralnikom semen Aracon in cevjo Aracon.

Vso delovno površino in posodo, v kateri smo pobirali semena, smo obložili s plastično folijo, ker so bile rastline gensko spremenjene in je bilo potrebno preprečiti pobeg v okolje. Na dno posode smo položili še aluminijasto folijo in bel papir za lažje pobiranje semen, ki smo ga med različnimi linijami zamenjali. Stroke s semeni smo strli v Aracon cevi, da so vsa semena padla v zbiralnik semen. Poskušali smo odstraniti čim več nečistoč (zemlja, ostanki strokov) in semena stresli v 2 ml safelock mikroepruveto. Semena smo shranili v hladilniku.

3.2.3 Testiranje *in vitro*

V preliminarjem poskusu smo testiranje opravili na štirih različnih koncentracijah NaCl (0, 50, 100 in 150 mM). Na vsako ploščo smo nanesti 100 semen v dveh vrstah, plošče pa postavili vertikalno v laminarij. Test smo opravili na petih linijah (netransformirana, 3/1-1, 3/4-1, 4/3-2 in 4/13-1). Različne linije smo samo vizualno primerjali med seboj. V nadaljnjem poskusu smo testirali samo še tri različne koncentracije NaCl (0, 50 in 100 mM). Testirali smo 23 linij (netransforirana, 3/2-1, 3/4-2, 3/7-1, 3/9-1, 3/9-2, 3/9-3, 3/11-1, 3/12-3, 3/12-4, 3/12-5, 4/1-2, 4/3-1, 4/5, 4/6, 4/7-1, 4/7-2, 4/8-1, 4/9, 4/10-3, 4/12, 4/13-2, 4/14-1). Tokrat smo vsako ploščo razdelili na levo in desno polovico in na vsako stran

nanesli 40 semen dveh različnih linij v dveh vrstah. Merili smo dolžine korenin ob različnih časih. Enako smo storili pri testih na LiCl, le da smo tam uporabili samo pet linij (netransforirana, 3/2-1, 3/11-1, 4/8-1 in 4/14-1). Želeli smo primerjati vpliv LiCl na kaljivost semen in na samo rast, zato smo nekatera semena kalili na štirih različnih koncentracijah LiCl (0, 5, 10 in 20 mM). Enake linije pa smo tudi kalili brez LiCl in jih čez osem dni prestavili na enake štiri različne koncentracije LiCl. Tudi v tem primeru smo plošče razdelili na levo in desno polovico, v dveh vrstah smo nanesli 10 rastlin posamezne linije. V tem primeru nismo merili dolžine korenin, plošče smo primerjali samo vizualno. Vse plošče so bile v laminariju postavljene vertikalno, da smo lažje primerjali dolžine korenin.

3.2.4 Fiziološki testi za preučevanje odpornosti proti NaCl v prsti

Fiziološke teste za odpornost proti NaCl v lončkih s prstjo (Hawita Gruppe Gmbh, Vechta), smo izvedli kot so opisali Apse in sod. (1999).

Uporabili smo po 20 rastlin petih linij, ki smo jih razdelili v 5 skupin (A-E), glede na različne koncentracije NaCl s katerimi smo jih tretirali. Rastline smo zalivali vsak drugi dan s 25 mL ustrezne raztopine (preglednica 5).

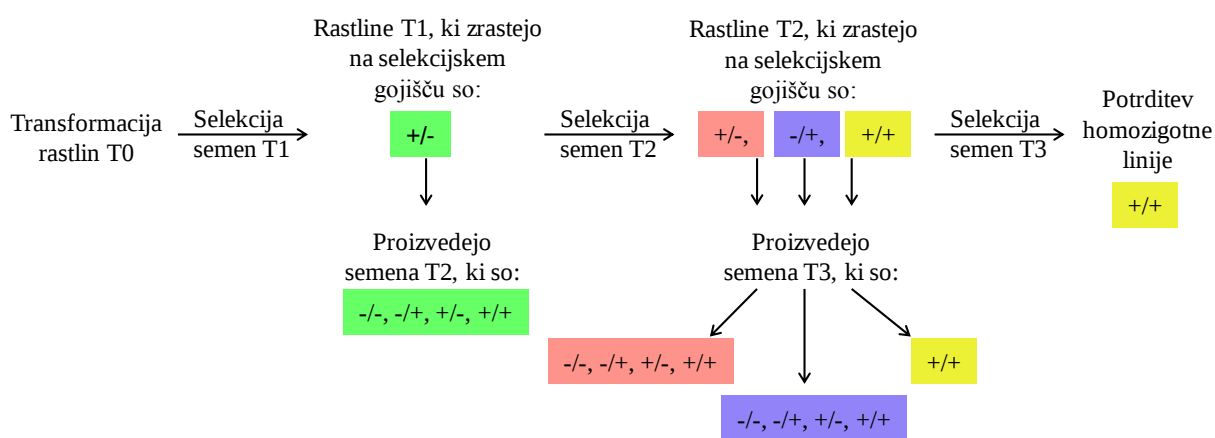
Preglednica 3: Načrt fiziološkega poskusa v zemlji z NaCl (mM). Popsod smo uporabili 1/8 MS gojišče, ki smo mu dodali ustrezno količino NaCl.

Dan	A	B	C	D	E
1	0	50	50	50	50
3	0	50	50	50	50
5	0	50	100	100	100
7	0	50	100	100	100
9	0	50	100	150	150
11	0	50	100	150	150
13	0	50	100	150	200
15	0	50	100	150	200
17	0	50	100	150	200
19	0	50	100	150	200

Po 20 dneh zalivanja smo rastline izmerili (višino) in slikali.

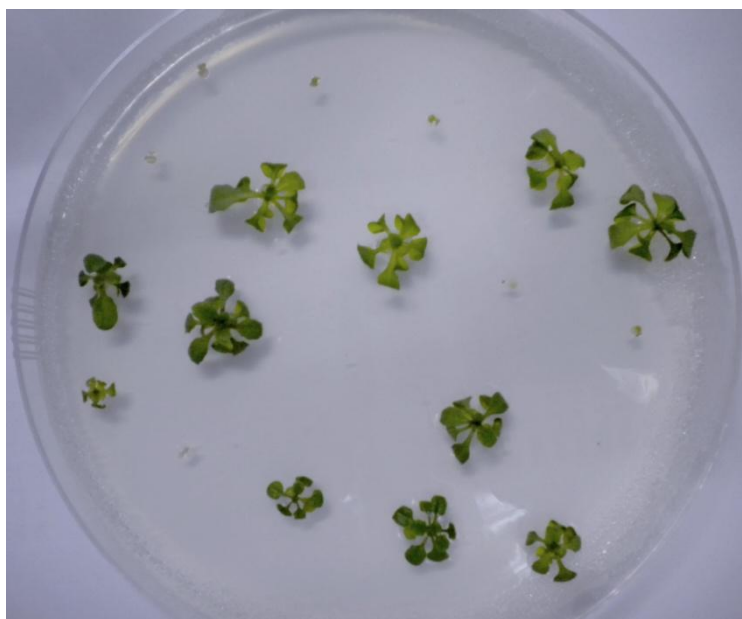
3.2.5 Selekcija homozigotov

Rastline so bile predhodno transformirane in označene kot T0. Iz njih smo pridobili T1 semena, ki niso bila vsa transformirana, zato smo izvedli selekcijo na higromicinu. Gen za odpornost proti higromicinu je bil v rastlino vnesen skupaj z genom *g1* v postopku transformacije. Transformirane rastline T1 so vse heterozigotne za vneseni gen. Za pridobitev homozigotnih rastlin, rastline samooprašimo. Četrtnina naslednje generacije rastlin (T2) je homozigotnih. Ker nismo vedeli, katere so homozigotne smo jih ponovno samooprašili in pridobili generacijo rastlin T3 (slika 7). T2 rastline so bile uporabljene v vseh *in vitro* in *in vivo* testih, izjema je le selekcija homozigotov.



Slika 7: Prikaz generacij semen in rastlin *A. thaliana*, v primeru, ko je Gen1 vključen v en lokus na kromosomu. Alel brez Gen1 je – in alel z Gen1 je + (Makovac, 2009).

Selekcija transformiranih rastlin je potekala na gojišču z dodanim higromicinom. Na tem gojišču so vzkalila tako transformirana kot tudi netransformirana semena, vendar so samo transformirana razvila več kot štiri prave liste in korenine. Netransformirane rastline so po kalitvi sčasoma odmrle (slika 8).



Slika 8: Razlika v rasti netransformiranih in transformiranih rastlin na gojišču s higromicinom.

Selekcija homozigotov je potekala na rastlinah T3. Pri metodi inokulacije cvetov s katero so bile pridobljene T0 rastline, se konstrukt lahko vključi v genom rastline v eni ali več kopijah (en ali več lokusov). Kadar je konstrukt vključen samo v eni kopiji (lokusu), ločimo homozigota od heterozigota ob samooprašitvi tako, da vsa semena homozigota zrastejo na gojišču s selekcijskim antibiotikom (higromicinom). Pri heterozigotu pa je porazdelitev odpornih rastlin glede na neodporne v razmerju 3:1. Če imamo konstrukt vključen v rastlino v dveh kopijah (na dveh lokusih), je porazdelitev odpornih potomcev pri heterozigotu 15:1, pri treh lokusih pa kar 63:1.

Na plošče s premerom 14 cm, smo nanegli po 60 semen.

3.2.6 Priprava vzorcev za preverjanje genske ekspresije vnesenega gena na ravni mRNK

3.2.6.1 Izolacija RNK

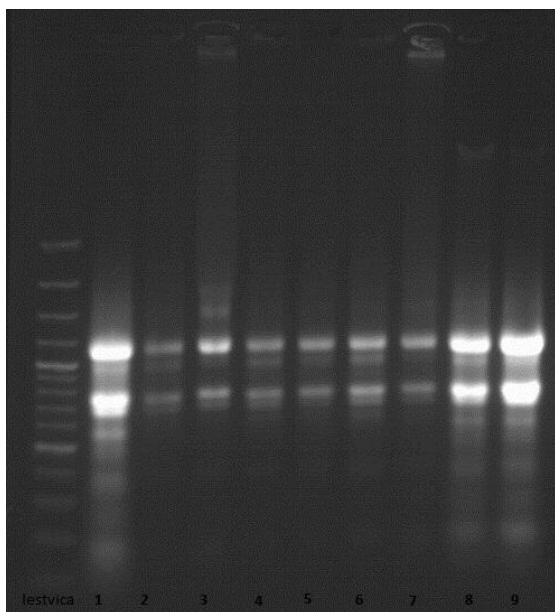
Izolacijo smo izvedli s kitom innuPREP Plant RNA Kit (Analytikjena) iz 100 mg rastlinskega materiala, zamrznjenega pri -80°C po protokolu:

- Rastlinskemu vzorcu dodamo kovinsko kroglico za homogenizacijo in jih homogeniziramo s homogenizerjem (QIAGEN-Tissuelysner) 1 min pri 30 Hz.
- Homogeniziranemu vzorcu dodamo 450 μL pufra RL, ki povzroči lizo celic.
- Centrifugiramo 1 min pri maksimalni hitrosti (20 000 g).

- Supernatant prenesemo v novo 2 mL mikrocentrifugirko s spin filtrom D in centrifugiramo 2 min pri 10 000 g. Nato spin filter D zavržemo.
- Filtrat iz prejšnjega koraka, ki smo mu dodali 400 μ L 70% etanola dobro premešamo s pipetiranjem in ga prenesemo v novo 2 mL mikrocentrifugirko s spin filtrom D ter centrifugiramo 2 min pri 10000 g.
- Spin filter R prenesemo v novo 2 mL mikrocentrifugirko.
- Dodamo 500 μ L pufra za spiranje HS in 1 min centrifugiramo pri 10000 g. Spin filter R prenesemo v novo 2 mL mikrocentrifugirko.
- Dodamo 650 μ L pufra za spiranje LS in centrifugiramo 1 min pri 10000 g. Spin filter R prestavimo v novo 2 mL mikrocentrifugirko.
- Ponovno dodamo 650 μ L pufra za spiranje LS in 1 min centrifugiramo pri 10 000 g. Spin filter R prenesemo v novo 2 mL mikrocentrifugirko.
- Centrifugiramo 2 min pri 10 000 g, da odstranimo še vse ostanke etanola.
- Spin filter R prenesemo v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko in previdno naneseemo na membrano 50 μ L vode brez RNaz. 1 minuto inkubiramo na sobni temperaturi in nato 1 minuto centrifugiramo na 6000 g, da se RNK spere s kolone.
- Izolirano RNK shranimo pri -80°C .

3.2.6.2 Agarozna gelska elektroforeza

Čistost izolirane RNK smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1% gel. Natehtali smo 0,6 g agaroze, dodali 60 mL pufra TAE in segrevali do vretja. Ko se je agaroz popolnoma raztopila, smo raztopino ohladili na približno 60°C , ji dodali 3 μ L etidijevega bromida in nalili v model z vstavljenim glavnikom, da se strdi. V 5 μ L vsakega vzorca smo dodali 5 μ L vode in 2 μ L barvila za nanašanje. V 1 μ L lestvice pa smo dodali 9 μ L vode in 2 μ L barvila za nanašanje. Vse to smo nanegli na gel in pustili 30 minut pri napetosti 100 V in toku 500 mA. Gel smo po končani elektroforezi pogledali pod UV svetlobo v transiluminatorju in ga fotografirali (slika 9).



Slika 9: Preverjanje čistosti in integritete RNK vzorcev (preglednica 6) na agarozni gelski elektroforezi.

Preglednica 4: Uporabljeni vzorci za izolacijo RNK

Št vzorca	Linija	Konc. NaCl (mM)	Način testiranja
1	netransf	0	tkivna kultura
2	netransf	0	lonček s prstjo
3	netransf	150	lonček s prstjo
4	3-1-1	0	lonček s prstjo
5	3-1-1	150	lonček s prstjo
6	4/13-1	0	lonček s prstjo
7	4/13-1	150	lonček s prstjo
8	4/ 7-2	0	tkivna kultura
9	4/7-2	100	tkivna kultura

3.2.6.3 Spektrofotometrično določanje količine in čistosti RNK

Količino RNK smo določili s spektrofotometrom Nanodrop, ki meri absorbanco vzorca pri valovnih dolžinah A260/A280 in A260/A230. RNA molekule absorbirajo UV svetlobo z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 260 nm; proteini pa imajo maksimalno absorbanco pri 280 nm. Razmerje A260/A280 nam pove stopnjo kontaminacije našega vzorca. Čist vzorec RNK ima razmerje nad 2. Absorbanca pri 230 nm pa nam pove stopnjo kontaminiranosti vzorca s solmi, ogljikovimi hidrati, fenoli in aromatskimi spojinami. Če je vzorec čist, je razmerje A260/A230 približno 2,2.

3.2.6.4 Reakcija z DNazo

Za obdelavo vzorcev z DNazo (Invitrogen) smo v 0,5mL mikrocentrifugirko na ledu dodali od 0,5 do 4,3 μL vzorca, glede na koncentracijo RNA v vzorcu. Preračunane vrednosti so predstavljene v preglednici 7. Vzorcju dodamo 1 μL pufra, 0,1 μL DNaze I (1U/ μL) in avoklavirano bidestilirano vodo, da je skupni volumen 10 μL .

Preglednica 5: Tretiranje izolirane RNK z DNazo

Številka vzorca	Količina RNK (ng/ μL)	V _{vzorca} za reakcijo (μL)	V _{voda} (μL)
1	1817,05	0,6	8,3
2	287,52	3,5	5,4
3	403,38	2,5	6,4
4	249	4	4,9
5	231,28	4,3	4,6
6	414,14	2,4	6,5
7	333,34	3	5,9
8	1323,35	0,8	8,1
9	2080	0,5	8,4

Mešanico inkubiramo pri sobni temperaturi. Po 15 minutah DNazo I deaktiviramo z dodatkom 1 μL 25 mM EDTA (Invitrogen) in segrevanjem pri 65°C, 10 min.

Tako pripravljeno izolirano RNK iz navedenih vzorcev so raziskovalci Nacionalnega inštituta za biologijo analizirali v nadaljnjih raziskavah.

3.2.7 Delo z GSO rastlinami

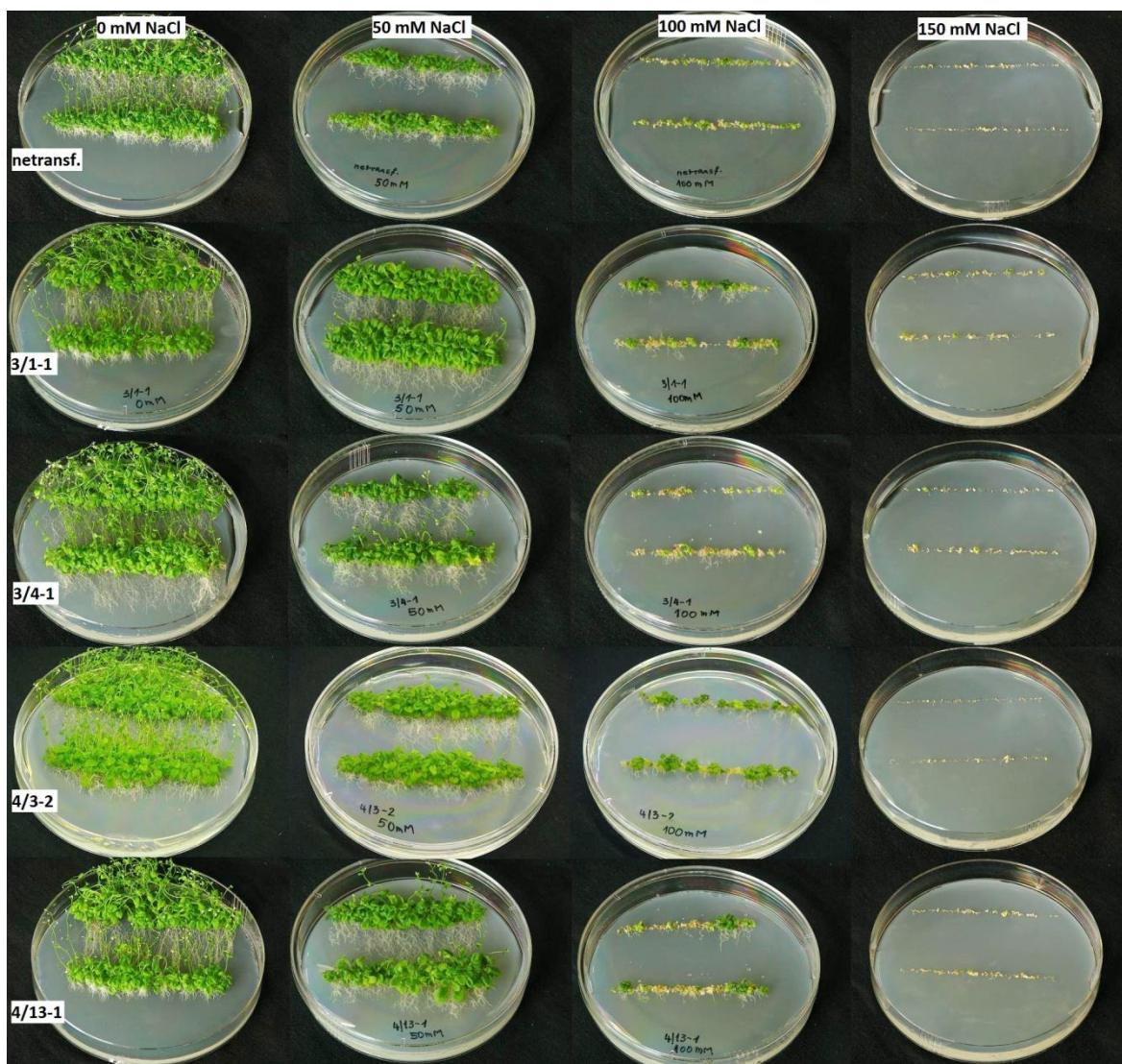
Delo je bilo opravljeno v skladu z Zakonom o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO). Pazili smo, da ni prišlo do iznosa rastlin ali njihovih semen v okolje. Vse odpadne tekočine pridelu z GSO smo avtoklavirali, prav tako vse odpadke, ki so nastali pri delu. Tudi orodje in steklovino, ki so prišli v stik z GSO rastlinami, smo po uporabi sterilizirali.

4 REZULTATI

4.1 PRELIMINARNI TEST ODPORNOSTI PROTI NATRIJEVEMU KLORIDU V TKIVNI KULTURI

V preliminarnem testu smo testirali štiri transformirane linije (3/4-1, 3/1-1, 4/13-1 in 4/3-2) in netransformirano linijo na ploščah s koncentracijami NaCl 0, 50, 100 in 150 mM. Plošče smo postavili vertikalno. Primerjavo med linijami po petih tednih rasti na ploščah prikazuje slika 9. Kontrolne plošče so bile brez soli in na njih so rasle vse linije primerljivo. Pri koncentraciji 50 mM NaCl so opazne največje razlike. Pri tej koncentraciji so vse transformirane linije veliko bolje rasle od netransformirane linije. Sklepamo, da povečano izražanje gena *glv*pliva na toleranco rastlin na sol. Pri koncentraciji 100 mM NaCl so razlike med linijami manjše. Koncentracija 150 mM NaCl je bila preveč toksična za vse linije, zato v kasnejših testih te koncentracije nismo uporabili.

Na sliki 10 je vidno, da se ponekod pojavljajo velike razlike med spodnjo in zgornjo vrsto, kar je verjetno posledica odtekanja vode.



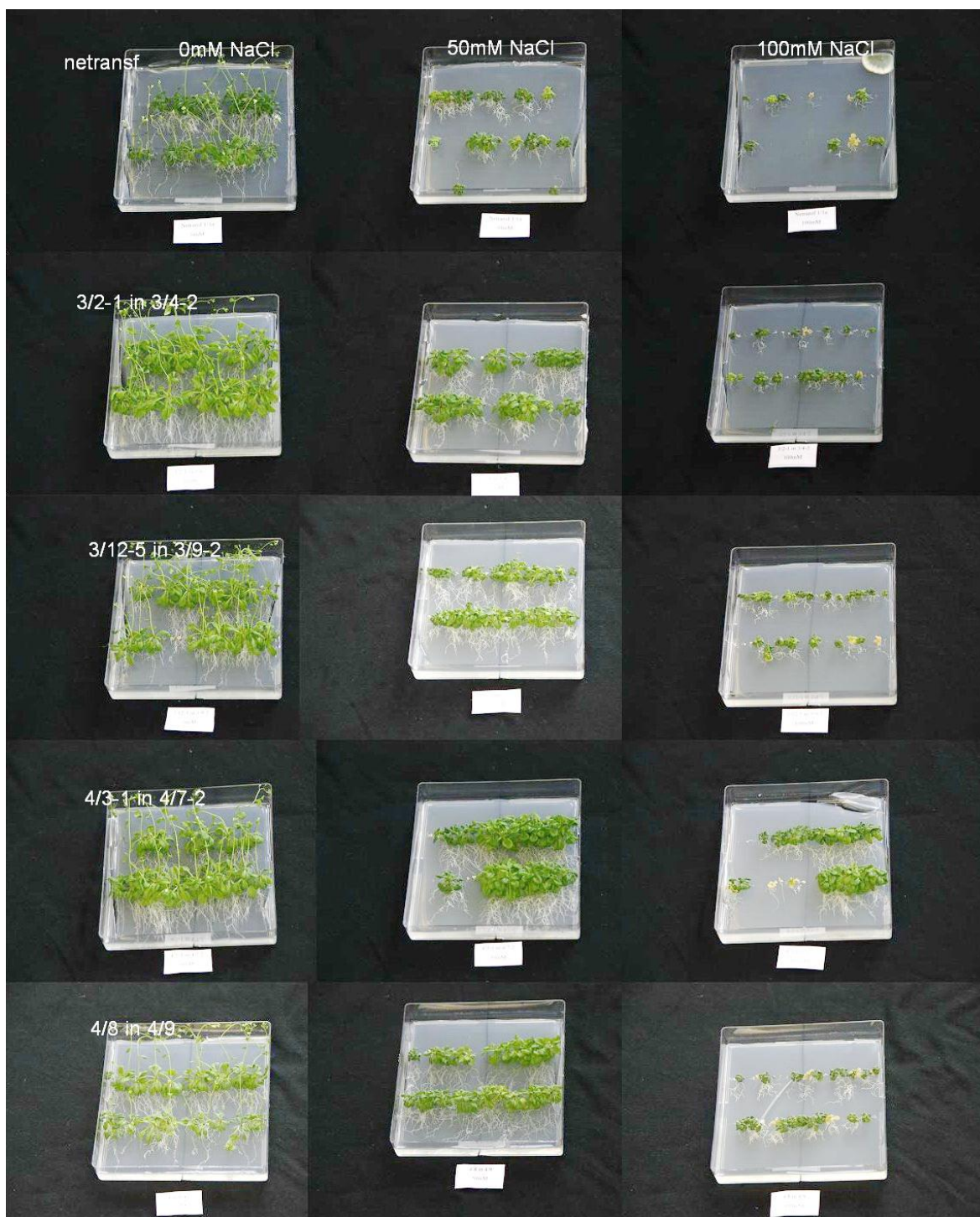
Slika 10: Rast linij na gojiščih z različnimi koncentracijami NaCl po 5 tednih.

Preliminarni test nam je pokazal, da je zastavljeni način testiranja odpornosti proti slanosti ustrezen.

4.2 POSKUS ODPORNOSTI PROTI NATRIJEVEMU KLORIDU *IN VITRO*

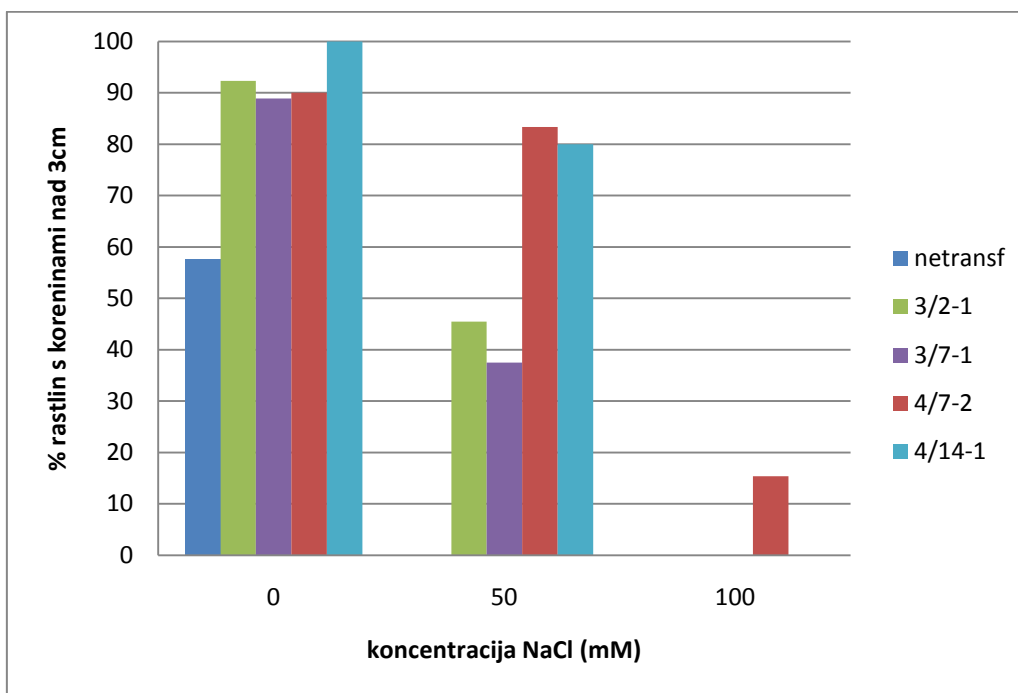
V tem testu smo uporabili 23 linij (1 netransformirana, 10 linij s povečanim izražanjem rastlini lastnega gena *g1* in 12 z modificiranim genom *g1*). V to analizo smo vključili koncentracije 0 mM, 50 mM in 100 mM NaCl. Vsako ploščo smo razdelili na levo in desno polovico, da smo nanjo lahko nanesli po 20 semen vsake od dveh linij. Izjema je bila le netransformirana linija, kjer smo na ploščo brez selekcijskega nanesli 40 semen v dveh vrstah, da je bila gostota semen enaka kot pri transformiranih linijah.

Na sliki 11 vidimo, da so vse transformirane linije na povečanih koncentracijah soli, zlasti pri 50 mM NaCl, rasle bolje od netransformirane linije. Kontrolna netransformirana linija je rasla malo slabše tudi že brez soli v gojišču. Semena netransformirane linije so slabše kalila, saj je na tej plošči zraslo manj rastlin kot pri drugih linijah. Zanimiva je linija 4/7-2, ki je uspevala bolje kot vse ostale transformirane linije, velika razlika je opazna pri koncentraciji 100 mM NaCl.



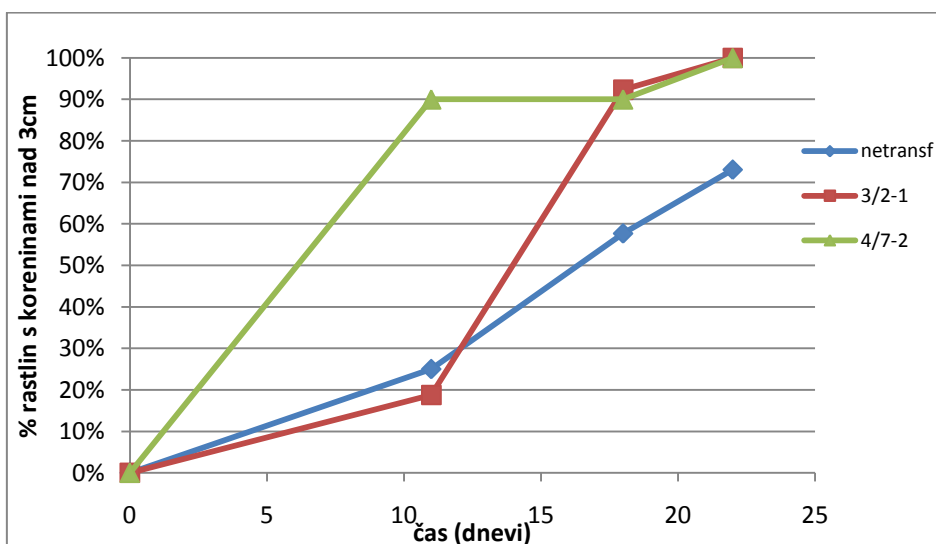
Slika 11: Primerjava devetih linij na 0, 50 in 100 mM NaCl po 1 mesecu (na plošči sta po 2 liniji na levi in desni polovici plošče, izjema je netransformirana linija).

Na sliki 12 je prikazana primerjava deleža rastlin s koreninami nad 3 cm pri petih različnih linijah. Vidimo, da je netransformirana linija že brez soli rasla slabše od ostalih.

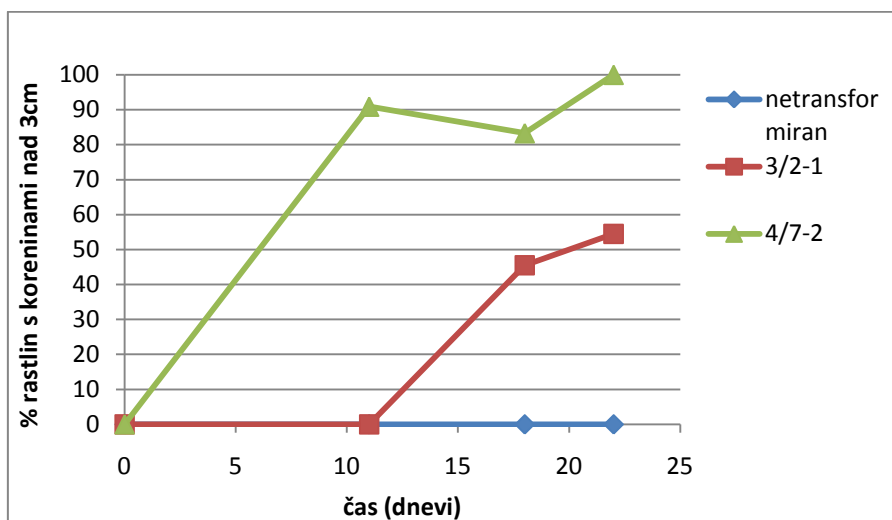


Slika 12: Delež rastlin s koreninami nad 3 cm, 18 dni po kalitvi, pri različnih konc. NaCl.

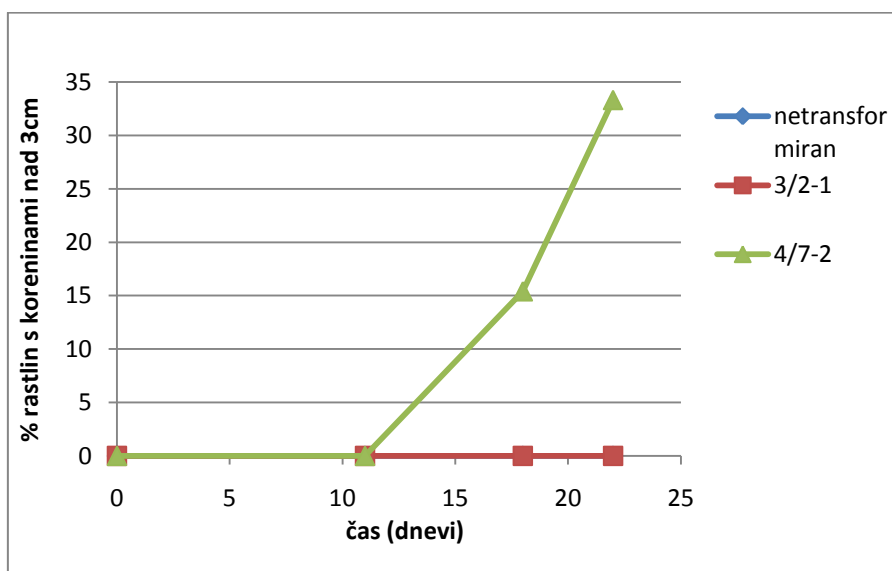
Na slikah 13, 14 in 15 je prikazana primerjava v času med netransformirano, 3/2-1 in 4/7-2 linijo. Netransformirana linija že pri koncentraciji soli 50 mM ni razvila korenin daljših od treh cm. Linija 4/7-2 je uspevala bolje tudi od linije 3/2-1, s povečani izražanjem rastlini lastnega gena *g1*.



Slika 13: Delež rastlin s koreninami nad 3 cm pri 0 mM NaCl

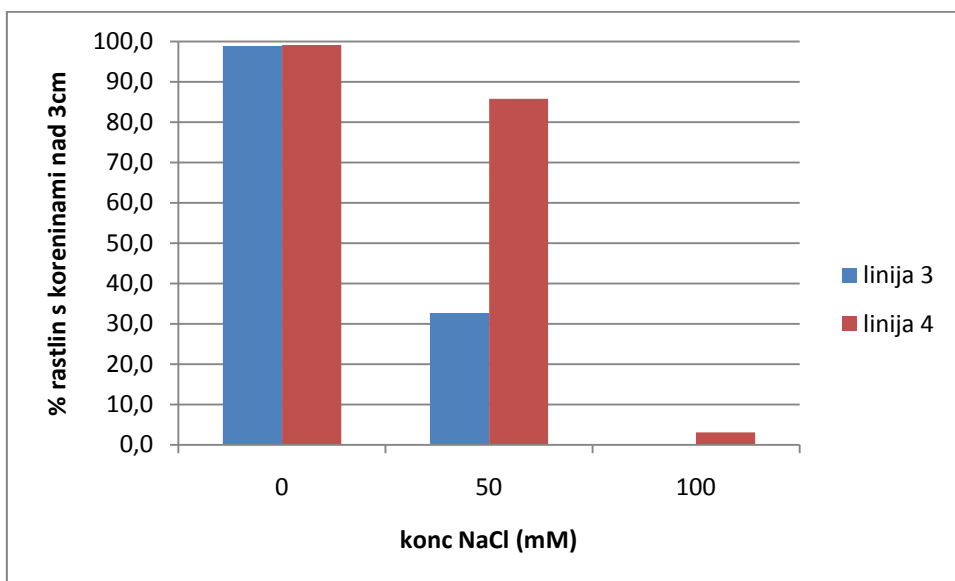


Slika 14: Delež rastlin s koreninami nad 3 cm pri 50 mM NaCl



Slika 15: Delež rastlin s koreninami nad 3 cm pri 100 mM NaCl

Slika 16 prikazuje primerjavo med linijama 3 s povečanim izražanjem rastlini lastnega gena in 4 z vstavljenim modificiranim genom v odstotku rastlin s dolžino korenin nad 3 cm po 18 dneh. Na plošči brez NaCl je ta odstotek skoraj identičen, pri koncentracij 50 mM NaCl uspeva v povprečju linija 4 veliko bolje od linije 3. Pri koncentraciji 100mM NaCl je bila linija 4/7-2 edina, ki je razvila korenine daljše od treh cm.



Slika 16: Delež rastlin s koreninami nad 3 cm po 18 dneh pri različnih konc. soli

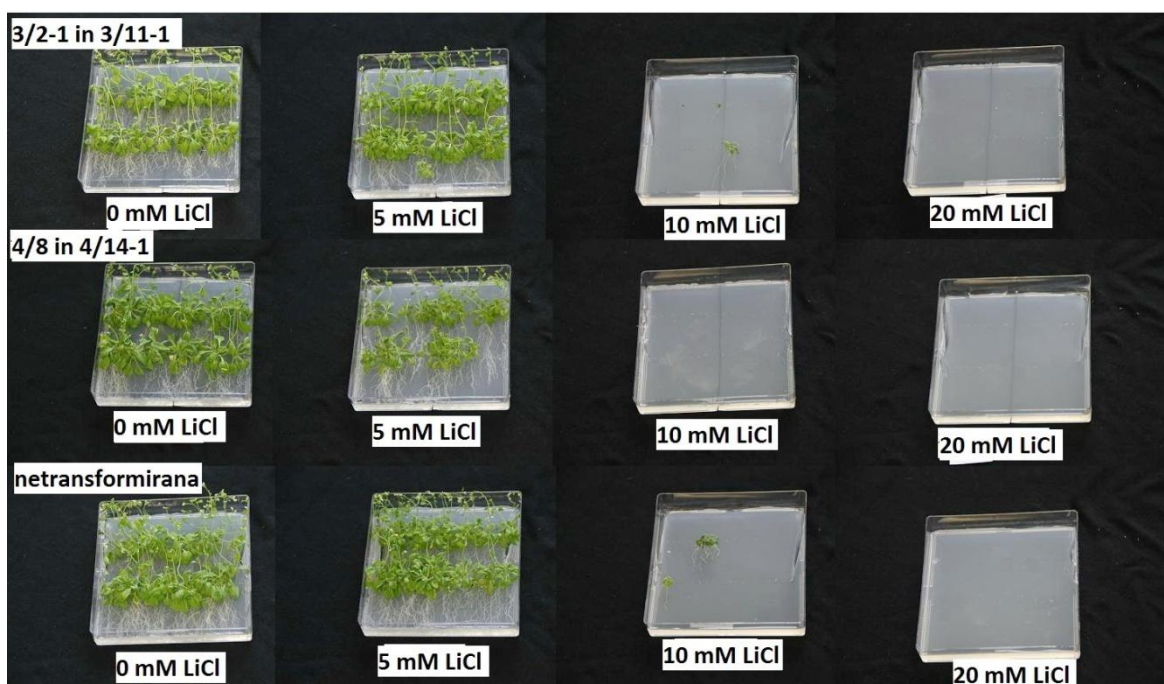
4.3 TEST ODPORNOSTI PROTI LITIJEVEMU KLORIDU *IN VITRO*

Odpornost proti LiCl smo testirali na petih linijah: 3/2-1, 3/11-1, 4/8, 4/14-1 in netransformirani liniji. Koncentracije soli so bile 0, 5, 10 in 20 mM LiCl. Zanimalo nas je ali je lahko razlika vpliva ionov na kalitev in rast rastlin, zato smo teste izvedli na dva različna načina, v obeh primerih so bile uporabljene iste linije.

4.3.1 Vpliv prisotnosti LiCl na kalitev

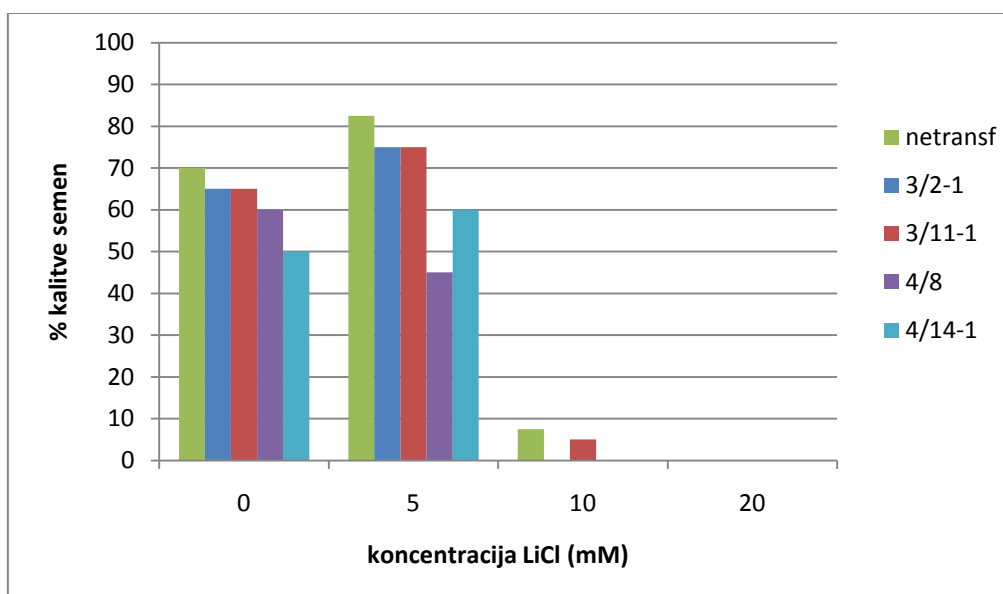
Plošče smo kot pri testu z NaCl razdelili na levo in desno polovico in na vsako nanesti po 20 semen vsake linije. Izjema je bila netransformirana linija, kjer smo nanesti 40 semen

Koncentracija 5 mM LiCl ni bistveno vplivala na rast nobene od testiranih linije. Pri višjih koncentracijah LiCl so bile netransformirane in transformirane linije podobno občutljive (slika 17).



Slika 17: Primerjava linij na različnih koncentracijah LiCl po 1 mesecu (na plošči sta po 2 liniji na levi in desni polovici plošče, izjema je netransformirana linija).

Koncentraciji 10 in 20 mM LiCl sta bili preveč toksični že za samo kalitev rastlin (slika 18).

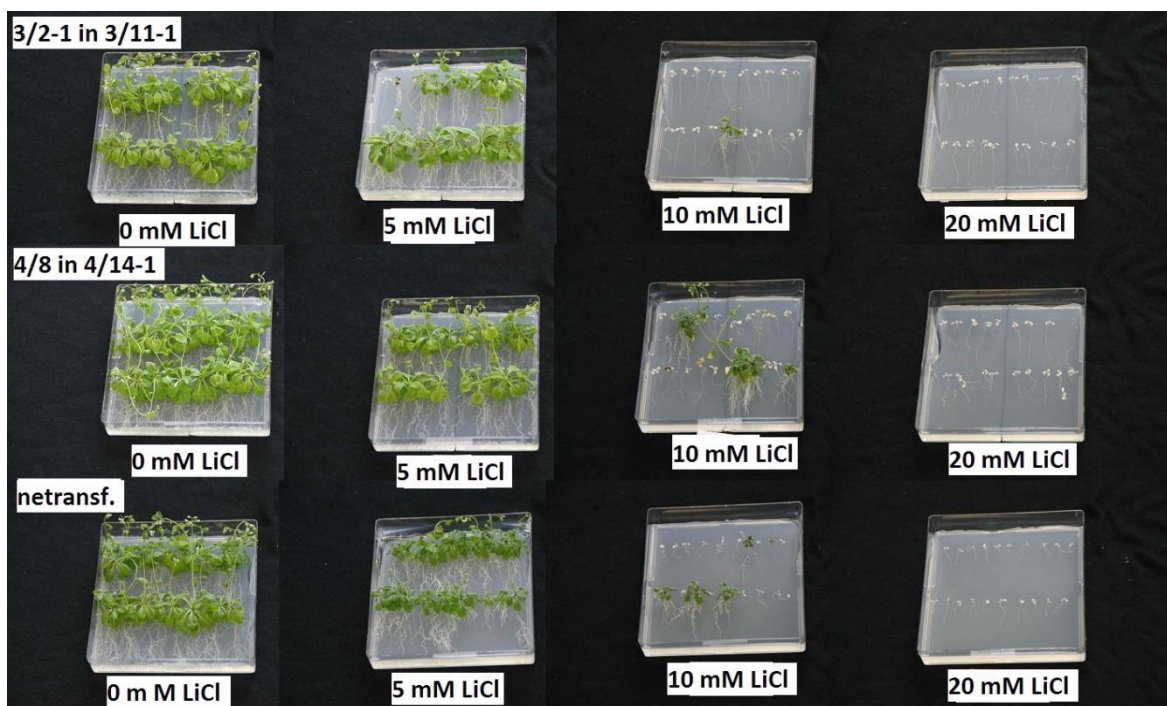


Slika 18: Odvisnost kalitve semen od koncentracije LiCl

4.3.2 Vpliv LiCl na rast rastlin

Da bi preučevali samo rast ob prisotnosti LiCl in se izognili vplivu LiCl na kalitev, smo iste linije kot v zgornjem poskusu kalili na ploščah brez LiCl in jih po osmih dneh predstavili na plošče z 0, 5, 10 in 20 mM LiCl. Tudi tokrat smo razdelili plošče na levo in desno polovico, da smo lahko na eno nanесли dve različni liniji. V dveh vrstah smo prenesli 10 rastlin posamezne linije, pri netransformirani pa 20.

Koncentracija LiCl 20 mM je bila preveč toksična, saj so vse rastline odmrle. Na ploščah z 10 mM LiCl so nekatere rastline preživele, vendar značilnih razlik med transformiranimi linijami in netransformirano linijo nismo zaznali (slika 19).

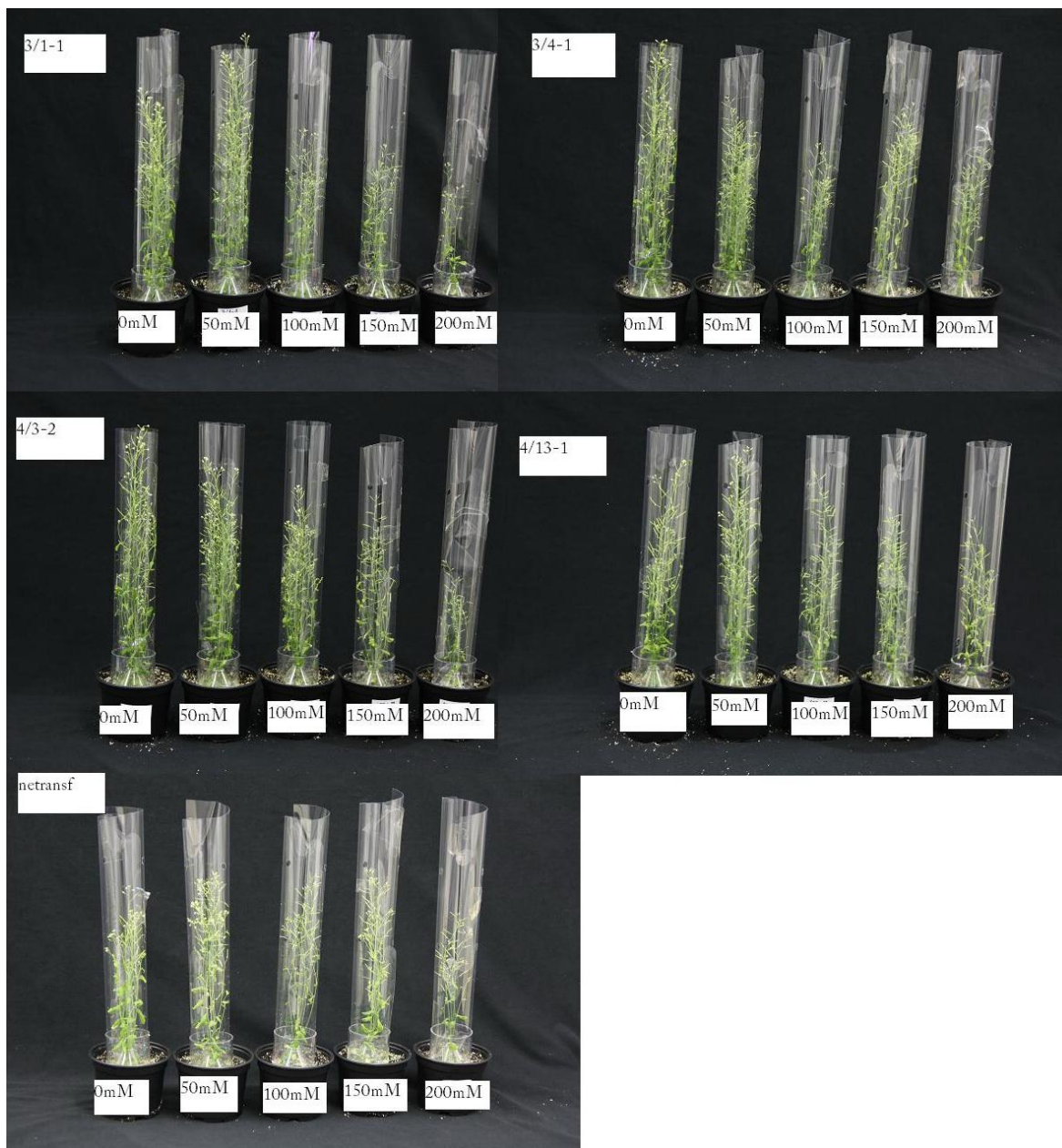


Slika 19: Primerjava petih linij na različnih koncentracijah LiCl po 1 mesecu (na plošči sta po 2 liniji na levi in desni polovici plošče, izjema je netransformirana linija).

4.4 TEST ODPORNOSTI PROTI NATRIJEVEMU KLORIDU V LONČKIH S PRSTJO

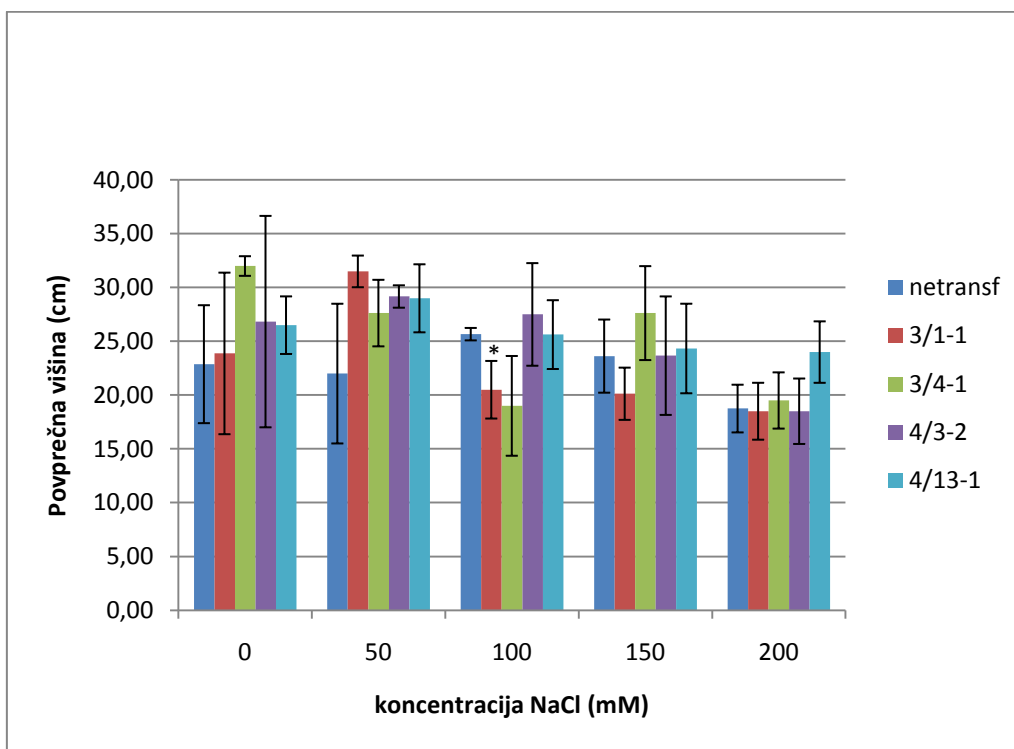
Test odpornosti proti NaCl prsti, smo izvedli na rastlinah iz preliminarne poskusa z NaCl v tkivni kulturi. S plošč z 50 mM NaCl smo rastline presadili v lončke s prstjo. Rastline smo deset dni zalivali z vodo, da so si rastline opomogle, nato smo začeli z zalivanjem z različnimi koncentracijami NaCl. Iz vsake linije smo izbrali 20 rastlin, ki smo jih razporedili v pet skupin glede na koncentracijo NaCl s katerimi smo jih zalivali. Kontrolo smo zalivali samo s 25 mL raztopine z dodatkom 1/8 MS. Ostale pa smo začeli zalivati s

25 mL 1/8 MS z dodatkom 50 mM NaCl. Rastline smo zalivali vsak drugi dan, vsake štiri dni pa smo koncentracijo NaCl povišali, do končne maksimalne koncentracije za vsako skupino. Te koncentracije so bile 50, 100, 150 in 200 mM. Test je trajal 20 dni, nato smo rastline primerjali (slika 19).



Slika 20: Primerjava med linijami po 20 dnevih zalivanja z različnimi koncentracijami NaCl (za sliko je bila izbrana druga najboljša rastlina vsake linije).

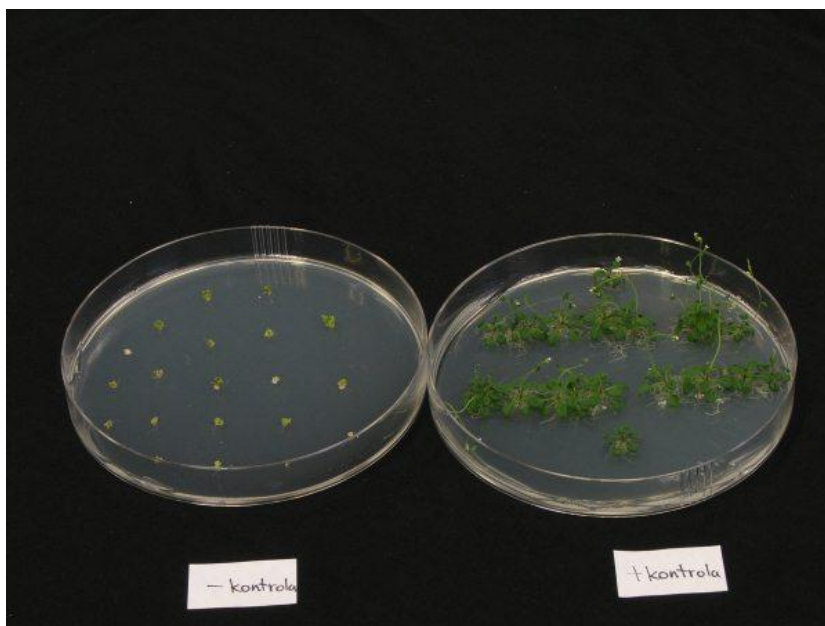
Razlika v višini rastlin netransformirane linije in transformiranih linij ni bila statistično značilna, izjema je linija 3/1-1 zalivana s 100 mM koncentracijo NaCl, ki je celo slabša od netransformirane (sliki 20 in 21).



Slika 21: Primerjava višine linij po 20 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami NaCl (* statistično značilno, uporabljen je bil Studentov t test s 95% gotovostjo).

4.5 SELEKCIJA HOMOZIGOTOV

Semena T3 generacije iz šestih rastlin smo testirali na homozigotnost. Testirali smo linije 3/4-1, 3/7-1, 4/3-2 in 4/13-1. Na plošče s selekcijskim antibiotikom higromicinom smo nanegli 60 semen posamezne linije. Imeli smo tudi tri kontrole. Pozitivni sta bili plošči brez higromicina, na kateri so bila semena netransformirane linije in linije 3/4-1e. Negativno kontrolo nam je predstavljala plošča s higromicinom in netransformiranimi semeni (slika 22).



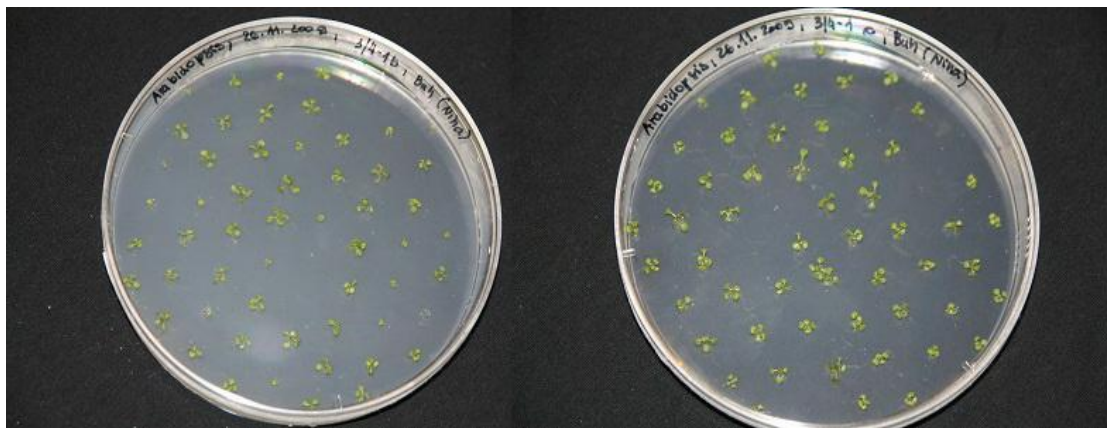
Slika 22: Negativna (plošča s higromicinom in netransformirano linijo) in pozitivna (plošča brez higromicina) kontrola

V preglednici 8 vidimo, da smo našli šest homozigotnih linij.

Preglednica 6: Linije, ki smo jih testirali za homozigotnost ob prisotnosti higromicina (transformirane rastline so rasle kljub antibiotiku, netransformirane pa so sčasoma odmrle).

Rastline	Št. semen, ki niso skalila	Št. netransf. Rastlin	Št. transf. Rastlin
3/4-1 a	okužba (plošča zavržena)		
3/4-1 b	5	16	39
3/4-1 c	5	0	55
3/4-1 d	7	10	43
3/4-1 e	1	16	43
3/4-1 f	2	0	58
3/7-1 a	0	20	40
3/7-1 b	2	16	42
3/7-1 c	1	13	46
3/7-1 d	4	28	28
3/7-1 e	4	0	56
3/7-1 f	1	16	43
4/3-2 b	4	9	47
4/3-2 d	okužba (plošča zavržena)		
4/3-2 e	2	9	49
4/3-2 f	2	19	39
4/3-2 g	7	0	53
4/3-2 h	20	11	29
4/13-1 a	0	5	55
4/13-1 b	5	14	42
4/13-1 c	4	0	56
4/13-1 d	0	3	57
4/13-1 e	1	5	54
4/13-1 f	2	0	58

Pri homozigotni liniji, so vsi njeni potomci ob samooprašitvi rasli na plošči s higromicinom (slika 23).



Slika 23: Primerjava nehomozigotne (3/7-1b) in homozigotne (3/7-1c) linije.

4.6 IZOLACIJA RNK

Iz nekaj rastlin različnih linij smo izolirali tudi RNA. To so v nadaljnjih poskusih raziskovalci Nacionalnega inštituta uporabili za analizo izražanje gena *g1*. Ugotovili so, da je bila izolacija RNK uspešno opravljena in primerna za nadaljnje poskuse. Pri vseh preizkušanih linijah so dokazali, da se je RNK vstavljenih konstruktov izrazila.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Slanost postaja čedalje večji globalni problem, saj se zaradi klimatskih sprememb aridna in semiaridna območja širijo (Chukwu in Musa, 2008). Sol za rastlino pomeni stres, saj poruši ionsko homeostazo rastline. Povečana koncentracija soli v okolici znižuje vodni potencial, moti privzem esencialnih hranil in tudi natrijevi in klorovi ioni so toksični, če jih rastlina absorbira v prevelikih koncentracijah (Flowers in Flowers, 2005).

Želeli smo postaviti sistem za testiranje rastlin *A. thaliana* *in vitro* ter *in vivo*. Ker smo poleg osmotske toksičnosti, želeli testirati tudi ionsko toksičnost, smo teste *in vitro* opravili tudi na LiCl.

Rastline smo testirali na odpornost proti različnim koncentracijam NaCl (0, 50, 100 in 150 mM) v tkivni kulturi. Koncentracije smo povzeli po Wang in sod. (2004), ki so s povečano ekspresijo gena Mn-SOD, encima, ki sodeluje pri odstranjevanju ROS, dokazali povečano toleranco na sol. Poskusa sta se razlikovala v več korakih. (1) Njihove plošče niso bile postavljene vertikalno kot v našem primeru. (2) Semen niso kalili ob prisotnosti soli. Po 7-10 dneh so jih predstavili na enake koncentracije soli kot v našem poskusu in po 20 dneh rasti so jih primerjali. (3) Transformirane rastline iz poskusa Wang in sodelavci (2004) so dobro rasle tudi pri 150 mM koncentraciji NaCl, v našem preliminarnem poskusu, pa so na tej koncentraciji tako transformirane kot netransformirane rastline samo kalile, rasle pa ne, zato v nadaljnjih poskusih rastlin na tej koncentraciji nismo več testirali in teh podatkov za linijo 4/7-2 nimamo. (4) Podobno kot Wang in sod. (2004) sta tudi Nagaoka in Takano (2003) za test rasti korenin *A. thaliana* semena kalila ob odsotnosti soli in jih po štirih dneh prestavila na sveže gojišče z 0, 50, 100 in 200 mM koncentracijami NaCl za deset dni. Testirala sta povečano izražanje gena *STO*, ki sodeluje pri vzdrževanju razmerja med kalijem in natrijem. V tem primeru so bile tako kot v našem poskusu plošče postavljene vertikalno. Pri 100 mM koncentraciji NaCl so imele transformirane rastline 58% boljšo rast od divjega tipa. Park in sod. (2008) so semena prav tako kalili ob odsotnosti soli in rastline po sedmih dneh prestavili na MS plošče z 0, 100, 140, 150 in 160 mM NaCl in merili dolžine korenin. Pozitivne rezultate so opazili tudi na 150 mM NaCl. Testirali so vpliv povečane ekspresije gena *ZEP*, ki sodeluje pri sintezi abscizinske kisline, na odpornosti proti osmotskemu stresu. Poskus podoben našemu so opisali Klähn in sod. (2009), ki so v rastline *A. thaliana* vstavili gen za sintezo kompatibilnega topljenca glukozilglicerola. Semena so kalili 48 ur pri 4°C na ploščah z različnimi koncentracijami soli in testirali % kaljivosti semen ter dolžine korenin na vertikalnih ploščah. Samo pri nekaterih transformiranih linijah so opazili pozitiven učinek na rast pri 150 mM koncentraciji NaCl in tudi na rast korenin na 100 mM.

V večini opisanih raziskav so testirali samo eno linijo, mi pa smo jih nad 20. V našem primeru je ena sama linija kazala nadpovprečno dobre rezultate, vendar tudi zanjo ne

moremo trditi, da je to posledica vstavljenega gena, ali samo naključja. Ker so v vseh objavljenih raziskavah dobili pozitivne rezultate vsaj pri nekaterih linijah tudi pri koncentracijah višjih od 100 mM, bi bilo primerno v prihodnosti testirati rastline tudi na 150 mM.

Litijevega iona rastlina ne potrebuje in je v naravi predvsem posledica človeškega onesnaženja (Ruggiero in sod., 2004), kar je možen razlog, da rastline proti njemu še niso razvile tolerančnih mehanizmov. V poskusih se LiCl uporablja, ker je za razliko od osmotske toksičnosti, ionsko toksičen (Rus in sod., 2001). Zato smo nekatere linije testirali tudi na odpornost proti LiCl. Ta se je že v manjših koncentracijah izkazal kot zelo toksičen. V poskusu nismo opazili razlik med transformiranimi in netransformirano linijo. Že 10 mM koncentracije LiCl so bile preveč toksične za samo kalitev, če pa smo na to koncentracijo soli prenesli kalice, so tudi skoraj vse odmrle. LiCl je že pri 10-krat manjših koncentracijah bolj toksičen kot NaCl. Koncentracije litijeve soli smo povzeli po Gao in sod. (2003), ki so rastline štiri dni kalili na ploščah brez LiCl in jih nato prestavili na 0, 10 in 20 mM koncentracije LiCl. Po sedmih dneh so merili dolžino korenin. Preučevali so vpliv povečane ekspresije gena *SOD2* na odpornost proti slanosti. Tudi na 20 mM so imeli značilno boljšo rast korenin pri transformirani liniji kot pri kontroli. Quan in sod. (2007) so rastline po štirih dneh na ploščah brez soli, prestavili na 10 mM koncentracijo LiCl. Transformirane rastline so bile v tem primeru celo bolj občutljive kot divji tip. Preučevali so vezavo senzorja za kalcij njegove na gen *SOD2* in vpliv na odpornosti proti NaCl. Tudi v poskusu Ruggieroa in sod. (2004) so bile rastline po sedmih dneh predstavljene na plošče z 20 mM LiCl in so bile transformante občutljivejše na LiCl kot kontrola. Preučevali so mutanto *A. thaliana sto1/nced3*, ki ne proizvaja abscizinske kisline, vendar je tolerantna na sol. Zanimivo je, da so netransformirane rastline rasle tudi po 20 dneh pri 20 mM LiCl. V našem primeru so vse rastline odmrle.

Primerjave različnih testnih pristopov pokaže, da je večina poskusov zastavljenih tako, da rastline kalijo brez NaCl (ali LiCl) in jih nato prestavijo na različne koncentracije soli. Slabost takih poskusov je, da na ta način lahko testirajo samo rast korenin in ne tudi vpliva soli na samo kaljivost; se pa tako izognejo vplivom soli na kalitev. V našem primeru se je pokazalo, da NaCl pomembno vpliva na kalitev netransformirane linije. Menimo, da je testiranje kalivosti pomembno, saj morajo v naravi rastline že kaliti ob prisotnosti soli in niso kasneje predstavljene v slano zemljo.

Test z NaCl v prsti ni pokazal pričakovanih rezultatov, saj nismo opazili razlik v toleranci na višje koncentracije soli med transformiranimi in netransformiranimi rastlinami. Vsem se je zmanjšala rast. Možen razlog je, da smo vse rastline uporabljene v testu, prenesli s plošč s 50 mM NaCl. To nakazuje, da imajo vpliv tudi druge razlike kot sama koncentracija soli, npr. pH, prisotnost Ca^{2+} , transpiracija in drugih dejavnikov (Xue in sod., 2004). Razlike v razmerah za rast v prsti in v tkivnih kulturah so zelo velike. V lončkih smo rastline zalivali s slano vodo in 1/8 MS medija, pri čemer se je sol verjetno nabirala v zemlji. Ta dejavnik naj bi bil izvzet pri bolj nadzorovanih razmerah rasti na ploščah. Izvedbo poskusa smo

povzeli po Apse in sod. (1999). Razlika je bila le v tem, da so v objavljenem poskusu rastline gojili pri drugačnem svetlobnem režimu (8 ur svetlobe in 16 ur teme). Njihova transformirana linija je dobro rasla tudi po zalivanju s 200 mM NaCl. Podoben poskus so izvedli tudi Shi in sod. (2003), le da so, tako kot mi, rastline gojili pri 16 urah svetlobe in 8 urah teme. Tudi oni so opazili boljšo rast transformiranih rastlin ob zalivanju s soljo. Klähn in sod. (2009) pri testih z zalivanjem s slano vodo, koncentracije soli niso stopnjevali postopoma. Divji tip (kontrola) so skupaj s transformiranimi rastlinami gojili v istem lončku, da so zagotovili enako koncentracijo. Pri eni liniji so opazili toleranco do 200 mM NaCl.

V našem poskusu smo testirali večje število transformiranih linij rastline *A. thaliana*. V nekatere je bil že predhodno vstavljen modificiran gen *g1*, ki izvira iz halotolerantnega organizma, v druge pa rastlini lasten gen *g1*, s katerim je bilo sproženo povečano izražanje tega gena. V poskusih *in vitro* so bile vse transformirane rastline odpornejše od kontrole, *in vivo* pa enako občutljive. Razmere pri rasti na ploščah so bolj nadzorovane, pri rasti v prsti pa so bližje naravnim.

Če želimo gen kasneje vstaviti v kmetijsko pomembno rastlino, je pomembno da toleranco proti slanosti preizkusimo tudi v tleh; a pri poskusih v *in vitro* razmerah hitreje dobimo rezultate. V nadaljnjih raziskavah bi lahko preliminarne poskuse izvedli v *in vitro* razmerah. V primeru, da bi izolirali odporne transformante, pa bi jih testirali tudi v tleh. Iz nekaterih rastlin različnih linij smo izolirali tudi RNK. To so v nadaljnjih poskusih raziskovalci Nacionalnega inštituta uporabili za analizo izražanje gena *g1*. Ugotovili so, da je bila izolacija RNA uspešno opravljena v tem diplomskem delu in primerna za nadaljnje poskuse. Pri vseh preizkušenih linijah so dokazali, da se je RNK vstavljenih konstruktov izrazila.

5.2 SKLEPI

Postavili smo uspešen sistem za testiranje odpornosti proti slanosti rastline *A. thaliana*. V tkivni kulturi smo opazili večjo toleranco transformiranih rastlin za koncentracijo soli 50 mM. Kljub temu, ta ni bila ponovljiva pri poskusu v lončkih s prstjo, verjetno zaradi drugačnih fizioloških razmer. Linija 4/7-2 je bila tolerantnejša od vseh linij tudi pri 100 mM koncentraciji NaCl. To linijo bodo na Nacionalnem inštitutu za biologijo selekcionirali do homozigotov in narediti nadaljnje teste. LiCl se je pokazal bolj toksičen od NaCl, že pri 10-krat nižjih koncentracijah. Pri testiranju je pomembno gledati vpliv soli pri različnih fizioloških pogojih. Opazovanje vpliva na kalitev in rast se je v naših poskusih izkazalo kot primerno.

6 POVZETEK

Za prihodnost so napovedane klimatske spremembe, ki bodo prinesle povišanje temperatur in večje koncentracije CO₂ v ozračju. Tudi človeška populacija se stalno povečuje, s tem pa tudi potrebe po hrani, za njeno pridelovanje so potrebne nove kmetijske površine, ki potrebujejo namakanje. Problem namakanja je, da se manj kot polovica dovedene vode porabi s strani pridelka, v zemlji ostajajo soli (Yeo in sod., 1999). Povečana slanost pa vpliva na dostopnost vode za rastlino, poruši se homeostaza ionov in posledično tudi rast rastline (Flowers in Flowers, 2005).

V diplomski nalogi smo želeli vzpostaviti sistem testiranja rastlin *A. thaliana* proti slanosti. Opravili smo teste *in vitro* ter *in vivo*. Iz zbirke NIB-a smo testirali več linij rastline *A. thaliana*. V nekatere je bil že predhodno vstavljen modificiran gen *g1*, ki izvira iz halotolerantnega organizma, v druge pa lasten gen *g1*, imele so povečano ekspresijo.

Na začetku smo naredili preliminarni test s samo štirimi linijami in netransformirano linijo na ploščah z NaCl. Koncentracije so bile 0, 50, 100 in 150 mM. Na ploščah brez soli so rasle vse linije primerljivo dobro, na 50 mM ploščah pa so se vse transformirane linije izkazale bolje od netransformirane. V velikem testu slanosti nismo uporabili 150 mM koncentracije NaCl, saj se je v preliminarnem testu izkazala za preveč toksično za rast. Testirali smo večje število linij, rezultati so bili podobni preliminarnim, izstopala je le ena linija z vstavljenim modificiranim genom *g1*. Ta je tudi na 100 mM NaCl rasla veliko bolje kot vse ostale transformirane in netransformirane linije.

Nekaj linij smo testirali tudi na ploščah z LiCl. Testirali smo vpliv LiCl na kaljenje in na samo rast. Že zelo majhne koncentracije (10 mM) so bile preveč toksične za kalitev. Če pa smo kalice prenesli na plošče z enako koncentracijo, in opazovali rast, so skoraj vse odmrle. Transformirane in netransformirane linije niso kazale razlik v odpornosti na to sol.

Test v zemlji, ko smo rastline *A. thaliana* zalivali z različnimi koncentracijami NaCl z dodanim MS gojiščem, prav tako ni pokazal razlik v odpornosti proti soli med transformiranimi in netransformiranimi linijami. Uporabljene so bile enake linije kot v preliminarnem testu, kjer so transformirane linije kazale odpornost proti NaCl. Verjetno na rezultate vpliva tudi to, da se ob zalivanju sol nabira v zemlji, v petrijevkah imajo rastline bolj kontrolirane pogoje.

Selekcionirali smo tudi homozigote, saj so ti pomembni za nadaljnje poskuse. Homozigoti imajo namreč gen *g1* na obeh lokusih, prav tako vsi njihovi potomci. Selekcija poteka na gojišču s higromicinom, saj je bil skupaj z genom *g1* vstavljen tudi gen za odpornost na ta antibiotik. Selekcija poteka na T3 rastlinah. Če je rastlina heterozigot, ima $\frac{3}{4}$ potomcev vsaj na enem lokusu gen *g1* in s tem tudi odpornost na higromicin. Opazili smo, da to ni vedno res, kar pomeni da se je v nekaterih primerih v rastline vključilo več kopij gena. V tem primeru razmerje ni več 3:1, ampak 15: 1 (dve kopiji) ali celo 63:1 (tri kopije gena).

Uspešno smo postavili sistem testiranja odpornosti proti slanosti na rastlinah *A. thaliana* v *in vitro* ter *in vivo* sistemu.

7 VIRI

- Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A., Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 1256-1258
- Arabidopsis thaliana*. 2010. Wikipedia (2. Januar 2010)
http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana (9. avgust 2010)
- Blumwald E., Aharon G. S., Apse M. P. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 140-151
- Chukwu O., Musa J. J. 2008. Soil salinity and water logging problem due to irrigation and drainage: A case study of Chanchaga irrigation project. *Agricultural Journal*, 3, 6: 469-471
- Clough S. J., Bent A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16,6: 735-743
- Edmeades G. O. 2008. Drought tolerance in maize: An emerging reality. ISAAA Brief No. 39:
<http://www.isaaa.org/RESOURCES/PUBLICATIONS/briefs/39/companiondocument/Executive%20Summary%20-%20Drought%20Tolerance%20in%20Maize.pdf> (26. Januar 2010)
- Flowers T. J., Flowers S. A. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management*, 78: 15-24
- Gao X., Ren Z., Zhao Y., Zhang H. 2003. Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133: 1873-1881
- Holmberg N., Bülow L. 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 3, 2: 61-66
- Klähn S., Maryuardt D. M., Rollwitz I., Hagemann M. 2009. Expression of the ggpPS gene for glucosylglycerol biosynthesis from *Azotobacter vinelandii* improves the salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 60, 6: 1679-1689
- Leonelli S. 2007. *Arabidopsis*, the botanical *Drosophila*: from mouse cress to model organism. *Endeavour*, 13, 1: 34-38
- Li X., Gao P., Gjetvaj B., Westcott N., Gruber M. Y. 2009. Analysis of the metabolome and transcriptome of *Brassica carinata* seedlings after lithium chloride exposure. *Plant Science*, 177: 68-80
- Mahajan S., Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158

- Makovac S. 2009. Transformacija modelne rastline *Arabidopsis thaliana* s hitro metodo za povečanje odpornosti na slanost. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 63 str.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497
- Nagaoka S., Takano T. 2003. Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 54, 391: 2231-2237
- Parida A. K., Das A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324-349
- Park H., Seok H., Park B., Kim S., Goh C., Lee B., Lee C., Moon Y. 2008. Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375: 80-85
- Prasad K. V. S., Sharmila P., Kumar P. A., Pardha Saradhi P. 2000. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. *Molecular Breeding*, 6: 489-499
- Quan R., Lin H., Mendoza I., Zhang Y., Cao W., Yang Y., Shang M., Chen S., Pardo J.M., Guo Y. 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant Cell*, 19: 1415-1431
- Ruggiero B., Koiwa H., Manabe Y., Quist T. M., Inan G., Saccardo F., Joly R. J., Hasegawa P. M., Bressan R.A., Maggio A. 2004. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136: 3134-3147
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B.H., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 24: 14150-14155
- Shi H., Lee B., Wu S., Zhu J. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21: 81-85
- Wang Y., Ying Y., Chen J., Wang X. 2004. Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science*, 167: 671-677
- Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14

- Xue Z.Y., Zhi D.Y., Xue G.P., Zhang H., Zhao Y.X., Xia G.M. 2004. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and reduced level of leaf Na⁺. *Plant science*, 167: 849-859
- Yeo A. 1999. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. *Scientia Horticulturae*, 78: 159-174
- Zhu J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 2: 6

ZAHVALA

Zahvaljujem se Nacionalnemu inštitutu za biologijo, oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, kjer sem lahko opravljala praktični del svoje diplome in Meti Buh Gašparič, ki mi je pri tem pomagala. Zahvala gre tudi izr. prof. Jani Žel in prof. Marini Dermastia za vso pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Hvala tudi družini in vsem prijateljem za podporo in vzpodbudo.

