

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Brigita ŠTRAUS

VNOS MARKERSKIH GENOV V GENOM HMELJA
(Humulus lupulus L.) Z Agrobacterium tumefaciens

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

TRANSFER OF MARKERS GENE INTO HOP GENOME
(Humulus lupulus L.) BY Agrobacterium tumefaciens

GRADUATION THESIS
Higher Professional Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo – agronomija smer hortikultura. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomske dela imenovala izr. prof. dr. Zlato LUTHAR.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Borut BOHANEČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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 obliki, identična tiskani verziji.

Brigita Štravs

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 633.791:576.35.086:581.16(043.2)
KG	hmelj/internodiji/transformacije/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /gus gen/ <i>DsRed</i> gen/ <i>hptII</i> gen/tkivne kulture/gojišče/regeneranti/GUS-test/PCR/transgeni
KK	AGRIS F30
AV	ŠTRAUS, Brigita
SA	LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2007
IN	VNOS MARKERSKIH GENOV V GENOM HMELJA (<i>Humulus lupulus</i> L.) Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	X, 56 str., 13 pregl., 13 sl., 83 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V genom hmelja (<i>Humulus lupulus</i> L.) 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' smo z vektorskim sistemom z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. t.</i>) vnesli gus gen za sintezo β-glukuronidaze in <i>DsRed</i> gen za sintezo rdeče fluorescentnega proteina ter selekcijski <i>hptII</i> gen, odpornost na higromicin. Za vnos genov v internodijske izsečke smo uporabili komercialni sev <i>A. t.</i> LBA4404 s plazmidom pCAMBIA1301 in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390. Vzporedno s ko-kultiviranimi internodijskimi izsečki smo nastavili tudi kontrolne poskuse z neokuženimi internodiji. Na neokuženih internodijih sorte 'Tettnanger' je nastalo največ 30,4% regenerantov, 'Savinjskem goldingu' 16,6% in pri 'Aurori' najmanj samo 3,9% in to v obdobju 45 do 60 dni po inokulaciji. Po okužbi z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301 se je oblikovalo 18% regenerantov pri 'Tettnangerju', 6,5% pri 'Savinjskem goldingu' in 0,8% pri 'Aurori'. Po okužbi z <i>A. t.</i> in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390 je nastalo 1,9% regenerantov pri 'Aurori' in 1,3% pri 'Savinjskem goldingu' ter samo 0,9% pri 'Tettnangerju'. Izražanje gus gena z GUS-testom smo zasledili samo pri 26,7% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in to v listih, steblih in vršičkih, ne pa v koreninah. S polimerazno verižno reakcijo (PCR) smo dokazali vgraditev gus in <i>hptII</i> gena iz pCAMBIA1301 pri 69,2% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in 30,8% je bilo brez transgenov. Pri 'Tettnangerju' je imelo 16,7% regenerantov vgrajen gus in <i>hptII</i> gen, medtem ko je imelo kar 50% vgrajen samo gus gen in 33,3% je bilo brez transgenov. Pri 'Savinjskem goldingu' je imelo 7,1% regenerantov vgrajen <i>DsRed</i> in <i>hptII</i> gen iz pCAMBIA1390 in 42,9% je imelo vgrajen samo <i>hptII</i> gen ter kar 50% je bilo netransformiranih. Pri 'Aurori' je imelo 52,9% regenerantov vgrajen <i>DsRed</i> in <i>hptII</i> gen ter 47,1% je imelo samo <i>hptII</i> gen. Pri 'Tettnangerju' so vsi regeneranti propadli. Uspešnost regeneracije in transformacije je bila odvisna od sorte in kombinacije vektorskega sistema.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 633.791:576.35.086:581.16(043.2)
CX hop/internodal/transformations/*Agrobacterium tumefaciens*/*gus* gene/*DsRed* gene/*hptII* gene/tissue culture/culture medium/regenerants/GUS test/ PCR/ transgenes
CC AGRIS F30
AU ŠTRAVS, Brigita
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI – 1000Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2006
TI TRANSFER OF MARKERS GENE INTO HOP GENOME (*Humulus lupulus* L.) BY *Agrobacterium tumefaciens*
DT Graduation thesis (Higher Professional Studies)
NO X, 57 p., 13 tab., 13 fig., 83 ref.
LA sl
AL sl/en
AD A *gus* gene for the synthesis of β -glucuronidase and *DsRed* gene for the synthesis of red fluorescent protein, and selective *hptII* gene for the resistance to hygromycin were transferred into hop genome (*Humulus lupulus* L.) cvs. 'Savinjski golding', 'Aurora', and 'Tettnanger' by *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) vector system. *A. t.* LBA4404 commercial strain with plasmid pCAMBIA1301 and modifying plasmid pCAMBIA1390 were chosen for the gene transfer into the internodal explants. The control series with non-infected internodes were set up in parallel with the co-cultivated internodal explants. During the period of 45 to 60 days, after the inoculation, the most regenerants (30.4%) grew on the non-infected internodes cv. 'Tettnanger', 16.6% at 'Savinjski golding' and the last of them (only 3.9%) grew at 'Aurora'. There were 18% of regenerants at 'Tettnanger', 6.5% at 'Savinjski golding' and 0.8% at 'Aurora' after the infection by *A. t.* and plasmid pCAMBIA1301. There were 1.9% of regenerants at 'Aurora', and 1.3% at 'Savinjski golding' and only 0.9% at 'Tettnanger' after the infection by *A. t.* and modifying plasmid pCAMBIA1390. Expressing *gus* gene by GUS-test was traced only with 26.7% of regenerants of 'Savinjski golding' in leaves, stems, and apices, but not in roots. Integration of *gus* and *hptII* genes from pCAMBIA1301 was proven by Polymerase Chain Reaction (PCR) at 69.2% of regenerants 'Savinjski golding'. 30.8% of them were without a transgene. At 'Tettnanger' 16.7% regenerants were integrated with *gus* and *hptII* genes, meanwhile 50% were integrated with only *gus* gene and 33.3% had no transgenes. At 'Savinjski golding' 7.1% of regenerants were integrated *DsRed* and *hptII* genes from pCAMBIA1390, 42% were integrated with only *hptII* gene and 50% were non-transformed. At 'Aurora' 52.9% of regenerants were integrated *DsRed* and *hptII* genes and 47.1% had only *hptII* gene. At 'Tettnanger' all of regenerants died. The success of regeneration and transformation depended on the cv. and combination of vector systems.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MORFOLOŠKE LASTNOSTI HMELJA	3
2.2 TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA HMELJA	3
2.3 CITOGENETIKA HMELJA	4
2.4 PRIDELAVA HMELJA	5
2.5 SESTAVA, UČINEK IN UPORABA HMELJA	6
2.5.1 Kemična sestava	6
2.5.2 Fitoterapevtski učinek	7
2.5.2.1 Delovanje	7
2.5.2.2 Kontraindikacije	7
2.5.3 Uporaba	8
2.6 ŽLAHTNJENJE HMELJA	8
2.7 GENSKE TRANSFORMACIJE	10
2.7.1 Posredni vnos genov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
2.7.2 Sistem plazmidnega vektorja za vključitev T-DNA v rastlinsko celico	12
2.7.3 Markerski oz. testni in selekcijski geni	14

2.7.4	Določanje transgenov	16
2.8	GENSKE TRANSFORMACIJE HMELJA	17
3	MATERIAL IN METODE	19
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	19
3.2	SESTAVA GOJIŠČ	19
3.3	PRIPRAVA GOJIŠČ	20
3.4	BAKTERIJA IN PLAZMID - VEKTOR	20
3.5	VNOS <i>gus</i> , <i>DsRed</i> IN <i>hptII</i> GENOV V GENOM HMELJA Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
3.6	HISTOKEMIČNI GUS-TEST IZRAŽANJA <i>gus</i> GENA V TRANSFORMIRANIH REGENERANTIH HMELJA	24
3.7	PCR ANALIZA <i>gus</i> , <i>DsRed</i> IN <i>hptII</i> GENOV V TRANSFORMIRANIH REGENERANTIH HMELJA	24
3.7.1	Izolacija rastlinske DNA	24
3.7.2	Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom	26
3.7.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	26
3.7.4	Analiza fragmentov DNA z agarozno elektroforezo	27
3.8	KONTROLNI POSKUS	28
4	REZULTATI	29
4.1	REGENERACIJA HMELJA	29
4.1.1	Regeneracija iz neokuženih internodijev	29
4.1.2	Regeneracija iz internodijev po okužbi z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
4.1.2.1	Plazmid pCAMBIA1301	31
4.1.2.2	Modificiran plazmid pCAMBIA1390	32
4.2	TRANSFORMACIJA HMELJA	34
4.2.1	Histokemični test izražanja <i>gus</i> gena	34
4.2.2	PCR analiza transgenov	35
4.2.2.1	Genski konstrukt z <i>gus</i> in <i>hptII</i> genom	36
4.2.2.2	Genski konstrukt z <i>DsRed</i> in <i>hptII</i> genom	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42

5.1	RAZPRAVA	42
5.1.1	Regeneracija hmelja	42
5.1.2	Transformacija hmelja	43
5.2	SKLEPI	46
6	POVZETEK	48
7	VIRI	51
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: DNA sekvence parov začetnih oligonukleotidov za posamezen gen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta	27
Preglednica 2: Regeneracija organogenih struktur in regenerantov iz neokuženih internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po inokulaciji	30
Preglednica 3: Število neokuženih internodijev, nastalih organogenih struktur in regenerantov ter odstotek regeneracije hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'	31
Preglednica 4: Regeneracija organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301	31
Preglednica 5: Število inokuliranih internodijev, nastalih organogenih struktur in regenerantov ter odstotek regeneracije pri hmelju 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301	32
Preglednica 6: Regeneracija organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1390	33
Preglednica 7: Število inokuliranih internodijev, nastalih organogenih struktur in regenerantov ter odstotek regeneracije hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1390	35
Preglednica 8: GUS pozitivni regeneranti hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' 110 dni po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301	35
Preglednica 9: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA1301 pri mikropropagiranih genotipih hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'	37
Preglednica 10: Število in odstotek transgenov pri hmelju 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' 150 dni po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301	38
Preglednica 11: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA1390 pri mikropropagiranih genotipih hmelja 'Savinjski golding'	39
Preglednica 12: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA1390 pri mikropropagiranih genotipih hmelja 'Aurora'	41
Preglednica 13: Število in odstotek transgenov pri hmelju 'Savinjski golding' in 'Aurora' 150 dni po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1390	41

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sistem umetno pripravljenega Ti-plazmidnega vektorja: A - cis vektorski sistem; B - trans ali binarni vektorski sistem	13
Slika 2: Korala <i>Discosoma</i> sp. iz katere je bil izoliran <i>DsRed</i> gen in struktura kromoforja	15
Slika 3: Plazmid pCAMBIA1301: A - mapa plazmida; B - T-DNA plazmida	21
Slika 4: Modificiran plazmid pCAMBIA1390: A - mapa plazmida; B - T-DNA plazmida	22
Slika 5: Regeneracija hmelja: A - inokulirani internodiji na MSr gojišču; B - začetek kalusiranja internodijev; C - kalus na rezih ploskvah internodija; D - organogene strukture (globule); E - formiranje regenerantov; F - regeneranti	29
Slika 6: Odstotek organogenih struktur in regenerantov iz neokuženih internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po inokulaciji	30
Slika 7: Oblika organogenih struktur in regeneracija regenerantov pri sortah hmelja: A - 'Aurora'; B - 'Savinjski golding'; C - 'Tettnanger'	31
Slika 8: Odstotek organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301	32
Slika 9: Odstotek organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1390	33
Slika 10: Točkovno izražanje <i>gus</i> gena v tkivih hmelja 110 dni po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA1301; A - rastni vršiček; B - steblo z listi; C - listi	35
Slika 11: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov za <i>gus</i> in <i>hptII</i> gen: 1 do 13 - 'Savinjski golding', 14 - 'Aurora', 15 do 20 - 'Tettnanger', K - netransformiran hmelj, P - plazmid pCAMBIA1301, S - slepi vzorec, M - velikostni standard; A - testni <i>gus</i> gen; B - selekcijski <i>hptII</i> gen	37
Slika 12: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov za <i>DsRed</i> in <i>hptII</i> gen: 21 do 34 - 'Savinjski golding', K - netransformiran hmelj, P - modificiran plazmid pCAMBIA1390, S - slepi vzorec, M - velikostni standard; A - testni <i>DsRed</i> gen; B - selekcijski <i>hptII</i> gen	39
Slika 13: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov za <i>DsRed</i> in <i>hptII</i> gen: 35 do 51 - 'Aurora', K - netransformiran hmelj, P - modificiran plazmid pCAMBIA1390, S - slepi vzorec, M - velikostni standard; A - testni <i>DsRed</i> gen; B - selekcijski <i>hptII</i> gen	40

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2iP	δ^2 -izopentenil adenin
<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. r.</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
BAP	6-benzilamino purin (citokinin)
bp	bazni pari
CaMV35S	(»cauliflower mosaic virus«) – mozaik cvetače
CTAB	cetil trimetil-amonijev bromid – kationski detrgent
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DsRed	rdeče fluorescentni protein
<i>DsRed</i>	testni <i>DsRed</i> gen
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GUS	β -glukuronidaza
<i>gus</i>	testni <i>gus</i> gen
HPT	higromicin fosfotransferaza
<i>hptII</i>	seleksijski gen - odpornost na antibiotik higromicin
IAA	indol-3-ocetna kislina (avksin)
NAA	α -naftalen ocetna kislina (avksin)
NPT	naeomicin fosfotransferaza
<i>nptII</i>	seleksijski gen - odpornost na antibiotik kanamicin
PCR	polymerase chain reaction – polimerazna verižna reakcija
RNA	ribonukleinska kislina
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tris borat-EDTA
T-DNA	transfer DNA - del plazmidne DNA, ki se po okužbi vgradi v rastlinski genom
TE	tris-EDTA
TDZ	tidiazuron
Ti-plazmid	tumor inducing – plazmid iz <i>A. t.</i> , ki povzroča novotvorbe
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
UV	ultravijolična svetloba
var.	varieteta

1 UVOD

Biotehnologija ima veliko definicij. V splošnem jo lahko razumemo, kot uporabo tehnologij in znanja o bioloških sistemih v koristne namene človeka. Moderna biotehnologija ima svoje korenine v bazičnih raziskavah osnovnih bioloških mehanizmov, ki so omogočili razvoj orodij za manipulacijo DNA in prenos genetskega materiala med različnimi organizmi ter nastanek gensko spremenjenih organizmov.

Zaradi zahtevnosti in dolgotrajnosti obstoječih postopkov žlahtnjenja, zlasti pri tujeprašnicah in zaradi prenašanja tudi neželenih genov, katere lahko s povratnim križanjem izločimo, se na podlagi hitrega razvoja genskega inženiringa vedno več odločamo za prenos genov s pomočjo različnih postopkov moderne biotehnologije t. j. transformacij.

Osnovni pomen besede transformacija je predrugačenje, preoblikovanje, preobrazba določenih delov. V našem primeru gre za preoblikovanje dednega materiala donorskega organizma in prenos v želeni organizem. Tako lahko s pomočjo genskega inženiringa dobimo nove, nam nepoznane transgene produkte oz. lastnosti. Te lahko spremljamo na molekulskem nivoju z različnimi postopki npr. PCR - verižna reakcija s polimerazo in citogenetskimi proučevanji. Fenotipsko lahko spremljamo izražanje transgenov vizualno, z meritvami oz. z različnimi kemijskimi in biokemijskimi analizami. Delo poteka s pomočjo postopkov mikropropagacije v *in vitro* razmerah.

Hmelj ima določene lastnosti, katere otežujejo delo v *in vitro* razmerah. Te lastnosti so: nezadovoljiva regeneracija, relativno počasna rast in slaba odzivnost hmeljnega genoma na transgene. To so glavni razlogi, zakaj so raziskave na področju genskih transformacij hmelja šele na začetku. Zaradi pomembne vloge hmelja v pivovarstvu in farmacevtski industriji ter pojava določenih bolezni, se v zadnjem času vedno več dela tudi na tem področju.

Veliko transgenih rastlin se danes že komercialno prideluje. Pred sprostitvijo v okolje in komercialno uporabo transgenih rastlin je potrebno temeljito ovrednotiti tveganje oz. biološko varnost pridelovanja in uporabe transgenih rastlin in njihovih pridelkov ter proizvodov.

1.1 CILJI NALOGE

Naš cilj naloge je bil s pomočjo posredne metode z vektorskim sistemom z *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) vnesti v genom hmelja (*Humulus lupulus* L.) dva markerska gena. *Gus* gen za sintezo encima β -glukuronidaze in *DsRed* gen za rdeče fluorescentni protein ter selekcijski *hptII* gen za odpornost rastlin na antibiotik higromicin, kateri omogoča hitro selekcijo transformiranih celic oz. rastlin od netransformiranih. Kot rastlinski material smo uporabili internodije treh mikropropagiranih sort hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'. Spremljali smo regeneracijo organogenih struktur - globul in regenerantov iz neokuženih in okuženih internodijev z *A. t.*. Transgene oz. njihove produkte smo pri regenerantih določali s PCR analizo in GUS-testom.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Hipoteza naloge je bila z vektorskim sistemom *A. t.* v kombinaciji s plazmidom pCAMBIA1301 oz. modificiranim plazmidom pCAMBIA1390 vnesti v genom hmelja genska konstrukta z markerskim oz. testnim *gus* in *DsRed* genom ter selekcijskim *hptII* genom in s pomočjo PCR analize na molekulskem nivoju in GUS-testa histokemično potrditi vgraditev oz. izražanje transgenov. Z uporabljenima genskima konstruktoma smo želeli vzpostaviti transformacijski sistem, ki bi bil v prihodnje uporaben za vnos agronomsko pomembnih genov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MORFOLOŠKE LASTNOSTI HMELJA

Hmelj je dvodomna ovijalka z enospolnimi cvetovi, včasih se pojavijo tudi enodomne rastline ali celo dvospolni cvetovi (Haunold, 1972 cit. po Šuštar-Vozlič, 1997). Plod je orešek. Moške in ženske rastline so morfološko enake, razlikujejo se le po generativnih organih (Baričevič, 1996a).

Moški cvetovi so enostavni, drobni, zelenkasto-beli in neopazni ter združeni v lasasta recimozna socvetja (Baričevič, 1996a). Hmelj je vetrocvetka, razvoj semena pa ni zaželen, ker zmanjšuje količino lupolina. Zaradi tega se moške rastline iz pridelovalnih nasadov odstranjuje. Za potrebe žlahtnjenja se gojijo moške rastline prostorsko izolirane v matičnih nasadih (Šuštar-vožlič, 1997). Moške rastline tudi odstranjujejo zaradi strupenosti semena, ki lahko povzroči zastrupitve s pivom (Petauer, 1993).

2.2 TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA HMELJA

Sistematika hmelja je prirejena po Zelenc (1999) in vključuje varietete oz. lokalne rase.

Phylum	deblo	Spermatophyta (Magnoliophyta)	semenke
Subphylum	poddeblo	Magnoliophytina	kritosemenke
Classis	razred	Magnoliopsida	dvokaličnice
Subclassis	podrazred	Hamamelididae	
Superordo	nadred	Urticales	
Ordo	red	Urticales	koprivovci
Familia	družina	Cannabaceae	konopljevke
Genus	rod	Humulus	hmelj
Species	vrsta	lupulus	
	varieteta	lupulus	evropski divji hmelj
		cordifolius	japonski divji hmelj
		neomexicanus	severozahodna ameriška varieteta
		pubescens	srednjevzhodna ameriška varieteta
		lupuloides	vzhodno ameriška varieteta

Mnenja o tem, koliko vrst vsebuje rod *Humulus*, so deljena. Small (1978) in Neve (1991) navajata tri vrste: *H. lupulus* L., *H. japonicus* Sieb. et Zucc. in *H. yunnanensis*. Divji hmelj

H. lupulus se je prvotno razprostiral na severni polobli od 35° do 70° geografske zemljepisne širine (Neve, 1991). Glede na razširjenost so predlagali naslednjo klasifikacijo oz. taksonomske varietete divjega hmelja: var. *lupulus* za evropski divji hmelj, var. *cordiflorus* za japonski divji hmelj, kar tri varietete naj bi se pojavile na ameriškem srednjem zahodu *H. lupulus* var. *pubescens*, na vzhodnem delu Severne Amerike *H. lupulus* var. *lupuloides* in zahodnem delu Severne Amerike *H. lupulus* var. *neomexicanus* (Small, 1978).

Evropski hmelj in hmelj vzhodnega dela Severne Amerike imenujemo *H. lupulus* var. *lupulus*. V skupini evropskega hmelja *H. lupulus* var. *lupulus* so opazne morfološke razlike. Tako razlikujemo češki (žateški) tip hmelja od angleškega (Goldingi in Fugglesi). To so geografske rase prilagojene svojemu specifičnemu območju. Ker je najizrazitejši vpliv klime, jih imenujemo klimatske rase. Žateški tip hmelja v Sloveniji močno cveti, slabše se razrašča, prej dozori in daje bistveno manjši pridelek kot na Češkem in v Rusiji, medtem ko se angleški tip hmelja v Sloveniji ne spremeni (Kralj in Sušnik, 1983).

H. japonicus Sieb. et Zucc. je enoletnica in storžki so skoraj brez lupolinskih žlez, razširjen je na Japonskem in Kitajskem. Uporablja se v okrasne namene, daje močno senco.

O obstoju vrste *H. yunnanensis* se ve zelo malo, znanih je le nekaj herbarijskih rastlin. Uspevala naj bi na najvišji nadmorski višini južne Kitajske v provinci Yunnan in naj bi bila trajnica. Glede na to, da se vse tri varietete pojavljajo na Kitajskem, domnevajo, da je to gencenter hmelja (Neve, 1991).

Molekulske študije filogenetskih odnosov hmelja kažejo, da se je evropska populacija, ki vključuje hmelj iz Kavkaza in Altaja, prva ločila od kitajske, japonske in severnoameriške populacije in sicer pred 1,12 milijoni let. Do razhajanja med kitajsko, japonsko in severnoameriško populacijo je prišlo kasneje, pred 0,5 – 0,7 milijoni let. Severno ameriška populacija, ki je ohranila visoko stopnjo genetske raznolikosti, se je ločila od azijske populacije hmelja pred približno 0,6 milijoni let. Glede na visoko stopnjo heterozigotnosti znotraj ameriškega hmelja se predpostavlja, da je bila migracija hmelja iz Azije zelo obsežna oz. da sta migrirali vsaj dve genetsko raznoliki populaciji (Murakami, 2003).

2.3 CITOGENETIKA HMELJA

Natančna morfološka študija kromosomov je bila opravljena že pred več kot 40-let. V njej so razdelili kromosome kultiviranih evropskih, ameriških in japonskih hmeljev v tri glavne skupine, glede na lego centromer. Vsi kariotipi so si bili podobni in niso odkrili razlik, glede na geografsko poreklo hmelja (Haunold, 1991). *H. lupulus* in *H. japonicus* sta citogenetsko stabilni vsaka s svojim osnovnim številom kromosomov. *H. lupulus* ima pri

ženskih in moških rastlinah diploidno število kromosomov $2n=20$ kromosomov. *H. japonicus* pa ima pri ženski rastlinah diploidno število kromosomov $2n=16$, pri moških pa $2x=17$. Vrsti se med seboj ne križata (Ono, 1955 cit. po Šuštar-Vozlič, 1997).

V preteklosti so bili predmet intenzivnih raziskav tudi spolni kromosomi hmelja. Ločeni spoli še ne pomenijo, da je ta lastnost določena s spolnimi kromosomi. Lahko jo določajo samo posamezni geni. O pravih spolnih kromosomih govorimo tedaj, ko ti predstavljajo poseben par ali skupino kromosomov, ki se po strukturi in funkciji loči od ostalih avtosomov. Spol pri hmelju določajo spolni kromosomi. To sta poseben par ali skupina kromosomov, ki se po strukturi in funkciji loči od ostalih kromosomov. V mejozi pelodnih celic - mikrospor je bilo odkritih 5 različnih tipov spolnih kromosomov (Sušnik, 1967).

Citološke študije v kombinaciji s sodobno tehniko pretočne citometrije so omogočile hitro in nedvoumno ločevanje triploidnih aneuploidov hmelja, ki imajo 29 ali 30 kromosomov (Šesek in sod., 2000).

2.4 PRIDELAVA HMELJA

Pridelava hmelja je omejena na območje Savinjske doline, Ptujskega polja, Posavja in Dravske doline. Po statističnih podatkih je v RS zasajenih 2.501 ha hmeljišč. V registru pridelovalcev hmelja je v letu 2003 imelo 169 pridelovalcev vpisanih 1.942 ha hmeljišč (Hmelj, 2003).

V letu 2005 so hmeljarji v RS pridelovali hmelj na 1.511 ha (49 ha obnove), kar je bilo 9% manj kot v 2004 (1.665 ha). Pridelek hmelja je bil ocenjen na 2.320 ton oz. 192 ton alfa kislin. Ocena vsebnosti alfa kislin v 'Aurori' je bila približno 9%. Ves pridelek je bil prodan. Cena za slovenski hmelj je bila določena glede na sorto in kakovost. V povprečju je bila med 3,5 €/kg za 'Auroro' in 4,2 €/kg za 'Savinjski golding'.

V letu 2006 se po oceni obseg površin hmeljišč ni spremenil (1.522 ha). Tako predstavljajo površine hmeljišč v RS 5,7% svetovnih površin posajenih z aromatičnimi sortami. V sortni sestavi v letu 2006 so prevladoval sorte 'Aurora' (961 ha; 63%), sledijo 'Savinjski golding' (274 ha; 18%), 'Celeia' (130 ha; 8,5%), 'Bobek' (95 ha; 6,2%) in nemška visokogrenična sorta 'Magnum' (62 ha; 4%) (Hmeljarstvo..., 2006).

Površine hmeljišč v Sloveniji in tudi na svetovni ravni se zmanjšujejo. Tehnologija varjenja piva se je spremenila v smeri manjše porabe hmelja in na trgu so sorte z višjo vsebnostjo alfa kislin, zato lahko v prihodnje pričakujemo padanje cen hmelja in s tem tudi zmanjšanje površin hmeljišč. V Sloveniji se prideluje več kot 17 različnih sort hmelja, prevladujeta sorti 'Aurora' in 'Savinjski golding'. Pridelava hmelja je v RS izrazito izvozno

naravnana, saj se 90% vsega pridelanega hmelja izvozi. Glavni izvozni trg s 75% predstavljajo države Evropske unije (Nemčija, Belgija), preostanek pa je že tradicionalno namenjen ameriškemu in japonskemu trgu. Domače pivovarne porabijo okoli 10% pridelka. Hmelj je eden izmed redkih kmetijskih pridelkov, pri katerih ima Slovenija pozitivno zunanje trgovinsko bilanco (Hmelj, 2003; Hmeljarstvo..., 2006).

2.5 SESTAVA, UČINEK IN UPORABA HMELJA

2.5.1 Kemična sestava

Aktivne snovi storžka delimo v tri skupine: hmeljne smole, eterično olje in polifenolne spojine (Zupanec, 1991). Za pivovarstvo je najpomembnejša skupina hmeljnih smol, ki predstavljajo glavno sestavino (80%). Glede na topnost v različnih topilih jih delimo na mehke in trde smole. Glavne sestavine mehkih smol so alfa in beta kisline. Vsebnost alfa kislin je najpomembnejši podatek o kvaliteti hmelja, saj so alfa kisline oz. njihov izomerni produkt - izoalfa kisline, ki nastanejo v procesu varjenja, glavni izvor grenčin piva. Alfa kisline so zmes homologov in analogov. Trije glavni homologi so: humulon, kohumulon in adhumulon. Delež kohumulona v alfa kislinah je zelo pomemben, saj je njegova vsebnost v neposredni korelaciji s kvaliteto hmelja. Večji delež kohumulona povzroči grobo in nekvalitetno grenčino piva (Šuštar-Vozlič, 1997). Beta kisline so drugi najpomembnejši sestavni del hmeljevih smol, vendar nekateri pivovarji menijo, da zaradi slabe topnosti v sladici in pivu niso pivovarsko pomembne. Drugi pa trdijo, da je kvaliteta sorte odvisna tudi od razmerja med alfa in beta kislinami. Menijo, da povzročajo beta kisline prijetnejšo in mehkejšo grenčino. Za aromatične hmelje je značilno, da imajo več beta kot alfa kislin. Trde smole predstavljajo netopen ostanek, slabo so topne tudi v sladici, zato v pivovarstvu niso pomembne (Šuštar-Vozlič, 1997). Smola preprečuje razvoj mlečnokislinskih bakterij, deluje, kot konzervans in daje pijači grenak okus (Petauer, 1993).

Druga pomembna sestavina hmeljnega storžka je eterično olje. V povprečju ga je od 0,5 do 1,5%. S pomočjo kapilarne plinske kromatografije so do sedaj ločili okoli 400 komponent eteričnega olja in okoli 200 med njimi so jih določili (Šuštar-Vozlič, 1997). Glavna sestavina eteričnega olja so terpenski ogljikovodiki, med katerimi so najbolj zastopani micerin in humulen, ki predstavljata 80 do 90% vsega olja. Ostalih 10 do 20% sestavljajo oksidacijski produkti ogljikovodikov in hlapni oksidacijski produkti grenčičnih kislin ter spojine, ki vsebujejo žveplo (Peppard, 1981; Šuštar-Vozlič, 1997). Več avtorjev Peacock in sod. (1981) ter Peppard in sod. (1989) se je ukvarjalo s študijo vpliva eteričnega olja in njihovih komponent na aromo piva, vendar so do sedaj uspeli razložiti le vpliv posameznih komponent (Šuštar-vozlič, 1997).

Tretja skupina aktivnih sestavin hmelja so polifenoli. Najpomembnejši med njimi so tanini, flavonoidi, antocianogeni in tanoidi. Vpliv polifenolnih spojin v pivu ni velik, pomembni pa so zato, ker se med varjenjem piva vežejo z beljakovinami in jih obarjajo. Če so dodani v majhni količini, imajo pozitiven vpliv na okus piva, stabilizirajo grenčino, povečajo biološko in koloidno stabilnost ter stabilnost pene (Košir, 1995).

2.5.2 Fitoterapevtski učinek

Hmeljeve sestavine v storžkih imajo tudi zdravilne oz. fitoterapevtske učinke, zato se uporablja v farmacevtski industriji (Zelenc, 1999).

2.5.2.1 Delovanje

Hmeljeve sestavine imajo učinek kot amarum - droga, ki učinkuje samo zaradi grenkega okusa. Deluje kot stomahik. Je sredstvo, ki ugodno vpliva na delovanje želodca. Izboljšuje prebavo, ker povečuje izločanje želodčnega soka in krepi njegovo peristaltiko. Hrana se bolje razgradi in hitreje resorbira. Eupeptik je sredstvo, ki normalizira črevesno floro. Preprečuje razvoj patoloških mikroorganizmov v korist fiziološke črevesne flore. Je blag sedativ (pomirjevalo), šibek antiseptik (sredstvo, ki preprečuje razmnoževanje mikroorganizmov) in diuretik (učinkovine, ki zvečajo hitrost nastajanja urina – deluje odvajalno) ter analgetik (sredstvo, ki blaži ali popolnoma odstrani bolečino). Lupolin morda uničuje celo bacile turbekuloze. Fitosteroli so po delovanju podobni ženskim hormonom estrogenom, zato hmelj blaži težave mene in prostate (Petauer, 1993). Ugotovili so, da hmelj vzbuja odpor do nikotina (Willfort, 1997). Droga se uporablja ob motnjah počutja, kot sta nemir ali občutek tesnobe in ob nespečnosti. Zaradi grenčin, ki jih vsebuje droga, se uporablja za vzbujanje apetita in povečano sekrecijo želodčne sluznice (Baričevič, 1996b).

2.5.2.2 Kontraindikacije

Snovi, ki povzročajo estrogeno aktivnost, se nahajajo v stokrat manjših količinah tudi v pivu, zato nekateri domnevajo, da naj bi bile spremembe, ki jih opažajo pri pivcih piva (debelost, okvara jeter, sterilnost, izguba libida...) bolj pogojena s strani estrogene, kot alkoholne intoksikacije (Zelenc, 1999).

Čeprav je hmelj dragocena zdravilna rastlina, pa lahko ob zlorabi povzroči resne posledice. Pri prevelikih odmerkih in predolgi uporabi utegne povzročiti omotičnost, težave z želodcem in celo ohromelost. Hmeljev čaj potemtakem ni primeren za stalno pitje (Willfort, 1997). Kronično izpostavljanje hmelju lahko povzroči bolezen "obiralcev hmelja". Občutljivi nabiralci hmelja dobijo zlasti po rokah in obrazu izpuščaje in rdečico (kontaktni dermatitis), temu pa se lahko pridruži še bruhanje, vročina in splošna oslabelost

(Petauer, 1993). Paradokсно je, da so simptomi te bolezni ravno nasprotni, kot so terapevtski učinki tega zelišča. Ocenjujejo, da je preobčutljiv 1 človek na 30 ljudi. Število tistih, ki morajo poiskati zdravniško pomoč pa je 1:30000 (Zelenc, 1999).

2.5.3 Uporaba

Že v 7. stoletju so hmelj uporabljali Arabci v zdravilstvu. Od 8. ali 9. stoletja dalje pa evropski narodi za varjenje piva. Predvidevajo, da se je razširil po Evropi med priseljevanjem narodov (Petauer, 1993). Hmelj kot divjo rastlino, so poznali že Babilonci, Egipčani, stari Grki in Rimljani, vendar o njegovi uporabi ni nič znanega (Moir, 2000). Prvi Evropski zapisi o njegovem gojenju segajo v 8. stoletje v Francijo, kjer je bil verjetno uporabljen, kot zelišče in ne pri varjenju piva. V zapisu iz 14. stoletja pa že obstajajo podatki o njegovi uporabi pri varjenju piva. Možno je, da so ga že pred tem uporabljali pri varjenju, je pa zagotovo, da množična pridelava in uporaba pri izdelavi piva sega v 13. in 14. stoletje (Neve, 1961). Za področje Slovenije obstajajo poročila že iz 12. stoletja o gojenju hmelja v teh krajih, vendar pa je pri nas postal hmelj komercialno zanimiv šele po letu 1870 (Neve, 1991). Hmeljarstvo ima v Sloveniji dolgoletno tradicijo, v Savinjski dolini ga pridelujejo že več kot 100 let (Jakše, 2000).

Razen v pivovarski in farmacevtski industriji se hmelj uporablja kot dodatek nekaterim vrstam Vermuta, ki je z zelišči aromatizirano vino in so ga v firmi Carpano v Torinu začeli proizvajati leta 1786 in se danes, kot sestavina dodaja številnim koktajlom. Ime oz. način pisave *Vermouth* lahko v Evropski uniji uporabljajo samo proizvajalci Italije in Francije, vendar ga v ZDA uporabljajo tudi za njihove proizvode (Wikipedija..., 2006).

Mlade poganjke lahko jemo v solati ali kuhamo kot beluše (Willfort, 1997). Hmeljno eterično olje uporabljajo za izdelavo raznih parfumov. Iz stebel so nekoč pletli košare in druge pletarske izdelke (Petauer, 1993).

2.6 ŽLAHTNJENJE HMELJA

Z žlahtnjenjem hmelja se na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu ukvarjajo že od leta 1952, saj je bila intrudukcija tujih kultivarjev v naše pridelovalne razmere neuspešna. Hmelj močno reagira na spremenjene ekološke razmere, spremeni habitus in stopnjo odpornosti na bolezni in škodljivce ter kvaliteto. Posledica tega je, da ima vsaka večja dežela, ki ga predeluje svojo strokovno službo, ki poleg intrudukcije skrbi tudi za vzgojo novih sort, ki bi po svojih proizvodnih lastnostih zadovoljile pridelovalca in pivovarja (Kralj, 1975).

Dosedanje delo na področju žlahtnjenja hmelja v Sloveniji lahko razdelimo na tri časovna obdobja z različnimi cilji žlahtnjenja. Rezultat tega je 11 kultivarjev. Zahteve hmeljnega trga, veliki proizvodnji stroški in uvajanje mehanizacije so vzrok, da so v Sloveniji začutili potrebo po novih sortah, ki bi imele večji pridelek, daljšo vegetacijo, kompaktnjše manj drobljive storžke z večjo količino alfa kislin, s fino strukturo in prijetno aromo. Rezultat prvega žlahtniteljskega obdobja so štiri A-sorte: 'Aurora', 'Ahil', 'Atlas' in 'Apoleon'. Odlikujejo jih velike količine smol, velik pridelek in primernost za strojno obiranje. Razen tega so se z njimi zmanjšali problemi delovnih konic, saj so spomladanska dela razporejena na daljše obdobje, prav tako pa je podaljšana sezona obiranja in sušenja pridelka od prvotnih 14 na 30 dni (Kralj in Wagner, 1971). Sorto 'Ahil' so kmalu prenehali pridelovati zaradi enodonnosti, ki je občasno močno zmanjšala pridelek in velike občutljivosti na hmeljevo peronosporo in na pepelasto plesen. Sorto 'Apolon' je izrinila iz pridelovanja pepelasta plesen in občutljivost na ILAR viruse, 'Atlas' pa so opustili zaradi hmeljeve peronospore. Dobro se je uveljavila sorta 'Aurora', katera je posajena na okoli 60% hmeljišč (Kralj in Friškovec, 1993). V letu 1979 so bile priznane tri nove aromatične sorte hmelja serije B oz. B-sorte: 'Bobek', triploidni 'Blisk' in 'Buket' (Kralj in Wagner, 1980). Zaradi občutljivosti na peronosporo 'Blisk' ni uspel, medtem ko sta se 'Buket' in 'Bobek' uveljavila (Kralj in Friškovec, 1993). Zadnje štiri C-sorte: 'Celeia', 'Cerera', 'Cekin' in 'Cicero', so vse triploidne in so bile priznane leta 1990, kot rezultat žlahtnjenja na primerjavo kakovosti 'Savinskega goldinga'. Vse štiri imajo daljšo vegetacijo, lastnosti aromatičnega hmelja in visok pridelek (Kralj, 1990).

Na žlahtnjenje hmelja močno vplivata dvodonnost in visoka heterozigotnost, kar se odraža v veliki genetski variabilnosti potomstva. Odbrane rastline, ocenjene na kvaliteto in agronomske lastnosti, vegetativno razmnožimo in s tem utrdimo želene lastnosti F1 generacije. Pri izbiri primernih moških rastlin za križanje so žlahtnitelji omejeni na fenotipsko selekcijo ženskih rastlin, ki naredijo storžke in se za objektivno vrednotenje selekcijskih parov uporablja progeno testiranje - testiranje potomstva. Žlahtnitelji hmelja uspešno vključujejo v žlahtnjenje poliploidijo. Triploidne potomce dobijo s križanjem med avtotetraploidom (pridobljenim s kolhicinom) in diploidom. S poliploidnostjo predvsem omejijo vpliv lastnosti enega izmed staršev na lastnosti potomstva. Pri potomstvu pa dosežejo s triploidnostjo več zanimivih lastnosti, kot npr.: bujnejšo rast in večji pridelek, sterilnost cvetov, večjo odpornost na peronosporo, zaradi hitrejše rasti v občutljivih fazah razvoja in dobro prenašanje strojnega obiranja. Tako je med 11 požlahtnjenimi slovenskimi hmeljnimi sortami kar pet triploidnih, vse iz C serije in 'Blisk' (Kralj, 1990).

Dvanajsta slovenska sorta 'Savinjski golding' je sorta, pri kateri je v Sloveniji uspela intrudukcija. Je angleški 'Fuggle', prenesen v naše ekološke razmere. V Savinjsko dolino so ga uvedli že v prejšnjem stoletju, uveljavil pa se je po letu 1924, ko je peronospora uničila ostale občutljive sorte hmelja. S pomočjo naravne in namenske selekcije ter modernejših metod oskrbovanja je sorta postala iz leta v leto rodovitnejša. Dobro se je prilagodila

ekološkim razmeram in je po svojem fenotipu postala značilna za Slovenijo. S pomočjo fenotipske variance (raznolikosti) in genetske analize gospodarsko pomembnih lastnosti potomstva so dokazali, da sta si 'Savinjski golding' in angleška sorta 'Fuggle' genetsko sorodna, ni pa 'Savinjski golding' soroden angleškemu goldingom (Kralj, 1972). Dobro se je prilagodil razmeram v Sloveniji in je uvrščen v skupino klasičnih aromatičnih hmeljev (Šuštar-Vozlič, 1997).

2.7 GENSKE TRANSFORMACIJE

Osnovne metode genskega inženiringa so bile razvite že v 60. letih prejšnjega stoletja, pri bakterijah in se še danes neprestano dopolnjujejo. Od sredine osemdesetih let metode niso več omejene le na bakterije, temveč jih je možno z manjšimi modifikacijami uporabiti praktično pri vseh živih organizmih (Bohanec in sod., 2004).

Hamilton Smith in Kent Wilcox sta leta 1971 izolirala prvi restrikcijski encim, s pomočjo katerega je možno rezati oz. cepiti genski material oz. DNA molekulo. Leta 1973 sta Stanley Cohen in Herb Boywer dopolnila tehnike rezanja in ponovnega združevanja DNA z uporabo restrikcijskih encimov in ligaz ter namnoževanja oz. kloniranja nove DNA v bakterijah. Leta 1973 je bila prvič v praksi uporabljena rekombinatna DNA.

Prvi posredni vnos bakterijskega gena za odpornost na antibiotik so vgradili leta 1983 v tobak. To je odprlo nove možnosti na področju molekulske genetike. S tem odkritjem je uporaba posredne transformacije, kot metode žlahtnjenja, dosegla eksponentno rast in postala najbolj razširjena metoda transformacij rastlin. Druga učinkovita metoda, ki se je razširila v prvi polovici devedesetih letih, posebno za transformacijo enokaličnic (žit), kjer sistem *A. t.* ni bil učinkovit, je bila biolistika.

2.7.1 Posredni vnos genov z *Agrobacterium tumefaciens*

Okužba z *Agrobacterium* je primer horizontalnega genskega prenosa med različnimi organizmi (Bohanec in sod., 2004). Povzročiteljska patogena bakterija lahko skozi svežo rano dovzetnega gostitelja prenese del plazmidne DNA. Bakterija se pritrdi na rastlinsko celično steno. Fiziologija le te deluje tako, da takoj po ranitvi začno celice okoli rane sintetizirati različne fenolne spojine, tako pride posledično do hiperplazije celic. Kot odgovor na fenolne spojine in druge signale se začne izrezovanje DNA s Ti-plazmida (tumor inducirajoči plazmid). Po dveh do treh dneh intenzivnih delitev, gostiteljske celice sprejmejo del bakterijske plazmidne DNA dolžine približno 25 bp. Tumorska DNA (T-DNA) se odcepi iz Ti plazmida in prenese v rastlinske celice kot T-DNA proteinski kompleks. T-DNA se integrira v rastlinsko jedrno DNA, v kromosome in transformira normalne rastlinske celice v tumorske. Tumorske celice nato rastejo in se dele neodvisno

od bakterijskih. Njihova organiziranost, stopnja rasti in delitev ni več pod nadzorom gostiteljske rastline. V tem rakastem tkivu se tvorijo opini, ki jih *Agrobacterium* uporablja, kot vir ogljika in dušika za svojo rast. S pomočjo dednega zapisa bakterija prisili rastlino, da deluje njej v prid (Chilton in sod., 1977). Takšen prenos DNA z bakterije v rastlinsko celico je znan pri *A. t.* in pri *A. rhizogenes* (*A. r.*), ki povzroča rakasto tvorbo v obliki koreninskih laskov.

Ti-plazmid je dolg približno 200 kbp in vsebuje gene za virulenco (*vir* geni), gene za sintezo in razgradnjo opinov ter gene za tvorbo rakastih celic (*onc* geni). Komplet genov za virulenco, približno 35 *vir* genov je organiziranih v 7 operonov, kateri so označeni kot *virA*, *virB*,... in *virG*. Njihovi produkti sodelujejo pri izrezu, prenosu in vgraditvi T-DNA v rastlinski genom. Fenolne komponente (kot acetosiringon in hidroksiacetosiringon), ki se sprostijo ob poškodbi rastline, se vežejo z *virA* proteinom, ga aktivirajo in ta kompleks fosforilira *virG* protein v bakterijski citoplazmi. Modificiran *virG* protein pa deluje kot transkripcijski aktivator za ostale *vir* gene (Stiekema in Visser, 1991; Hellens in sod., 2000).

Gena *chvA* in *chvB* se nahajata na bakterijskem kromosomu in njihovi produkti so pomembni za pritrditev *A. t.* na rastlinsko celično steno. Gen *chvB* kodira protein, ki sodeluje pri sintezi cikličnega glukana, kateri ima pomembno vlogo za pritrditev bakterije na celično steno rastlinske celice, medtem ko *chvA* kodira transportni protein v bakterijski notranji membrani in transportira ciklični β -1,2 glukan v periplazmo - prostor med celično steno in plazmalemo (Stiekema in Visser, 1991).

Poznanih je več sevov *A. t.* glede na sposobnost okužbe. Virulentnejši sevi *A. t.* imajo več kopij *virG* gena. Produkti *virB* operona se transportirajo v bakterijsko membrano in verjetno omogočajo prehod enoverižne T-DNA molekule iz bakterije v rastlinsko celico, podobno, kot pilus pri konjugaciji plazmidov. Produkti *virD* operona (*D1* in *D2* protein) omogočajo specifično cepitev enojne verige T-DNA v mejnih sekvencah. Mejne sekvence T-DNA so približno 25 bp dolge sekvence na levi in desni strani T-DNA s specifičnim mestom za endonukleazno cepitev enojne verige. Po odcepitevi enojne T-DNA se lahko znotraj mejnih sekvenc sintetizira nova veriga. Odcepljena enojna T-DNA se akumulira v bakterijski celici in je pred razgradnjo z nukleazami najverjetneje zaščitena z *virE2* proteini, *virD2* protein pa se veže na 5' koncu T-DNA (Stiekema in Visser, 1991; Zupan in sod., 2000). Za uspešen prenos T-DNA so potrebni produkti bakterijskih plazmidnih in kromosomskih genov.

Proces vključitve T-DNA v rastlinski genom poteka s pomočjo rekombinacije in je pogostejši v območju rastlinske DNA, ki se prepisuje. V rastlinski genom se lahko vključi in ostane stabilna ena ali več kopij T-DNA. Pri procesu integracije sodelujejo tako proteini vezani na T-DNA kot rastlinski encimi.

2.7.2 Sistem plazmidnega vektorja za vključitev T-DNA v rastlinsko celico

Naravni sistem *A. t.* za vnos T-DNA v genom rastline se uporablja, kot metoda vnosa zelenih genov. V ta namen so izdelani različni sistemi umetno pripravljenega Ti-plazmidnega vektorja.

Cis vektorski sistem

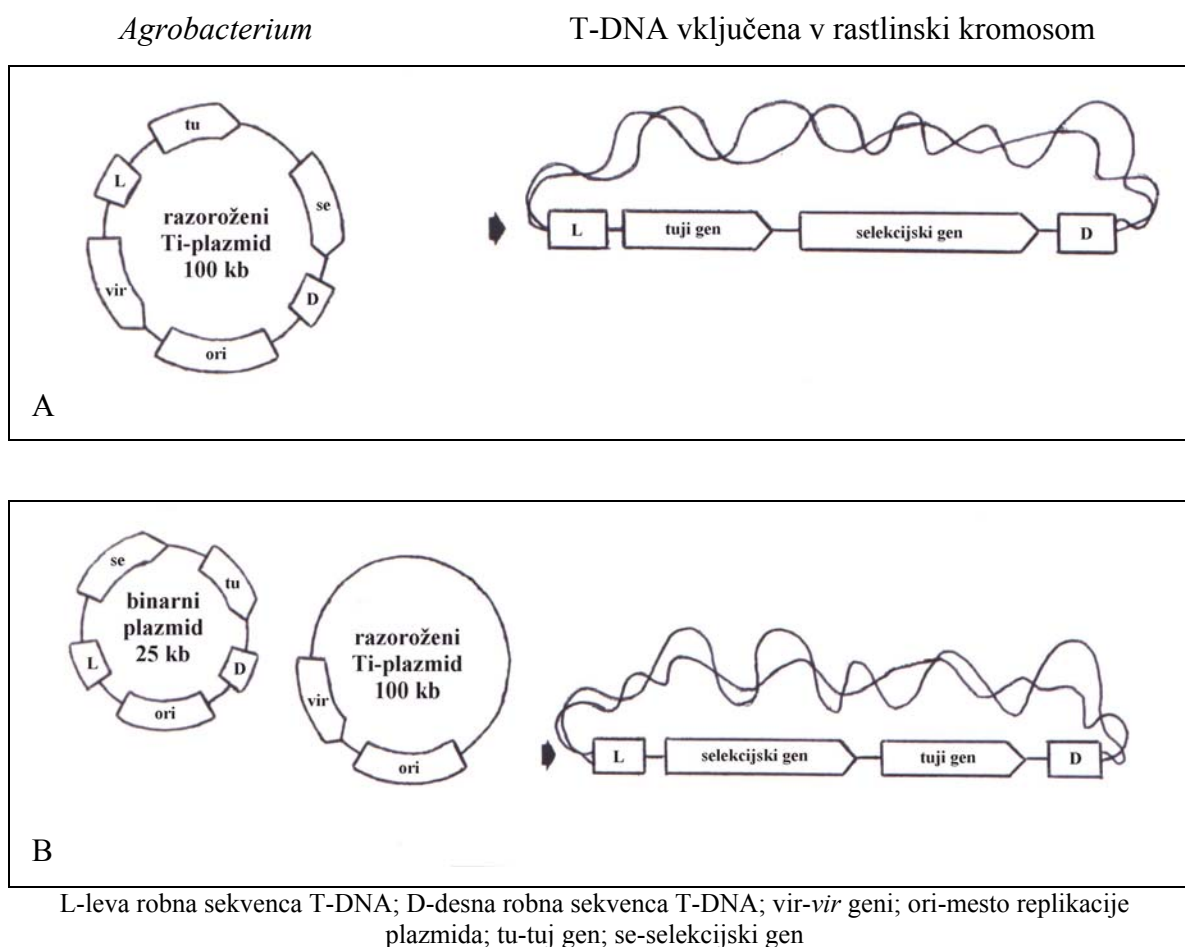
Geni, ki jih želimo vnesti v rastlino, so vključeni v T-DNA, ki je del razoroženega Ti-plazmida (odstranjeni so *onc* geni in geni za sintezo opinov). Na istem plazmidu pa se nahaja tudi *vir* regija potrebna za transport T-DNA (slika 1A).

Trans ali binarni vektorski sistem

Želeni geni so vključeni med robne sekvence binarnega plazmida, velikosti do 25 kbp, kateri je sposoben replikacije v *E. coli* in *A. t.*. V *A. t.* se nahaja še večji t.i. razoroženi plazmid, velikosti do 100 kbp, ki vsebuje *vir* gene za okužbo rastlinske celice in *ori* gene za podvajanje bakterijske celice (slika 1B).

Skupno tem sistemom je, da so iz naravne T-DNA odstranjeni geni za sintezo opinov in *onc* geni, tako da ostanejo samo robne oz. mejne sekvence T-DNA. V območje mejnih sekvenc je mogoče vključiti zelene gene. Tako umetno pripravljeni Ti-plazmid imenujemo razoroženi Ti-plazmid, ker ne more inducirati rakastih tvorbo - onemogočena je normalna diferenciacija transformiranih rastlinskih celic. Preostanek T-DNA, potrebne so samo mejne sekvence, pa obdrži sposobnost vključevanja v genom rastline (Zambryski in sod., 1983). Robne sekvence delujejo hkrati, kot prepoznavna mesta za nukleinsko cepitev in, kot mesta za vključitev v rastlinski genom.

Glavna težava cis vektorskega sistema oz. razoroženega Ti-plazmida, kot vektorja pri transformaciji rastlin, je bila njegova velikost, zaradi česar so otežene molekulske in genetske manipulacije s tako velikim plazmidom, dolžine približno 100 kbp (slika 1A). Glavni napredek pri razvoju uporabnih vektorjev za transformacije je bilo odkritje, da se lahko T-DNA in *vir* regije nahajajo ločeno. To je trans na dveh ločenih plazmidih (slika 1B), brez izgube sposobnosti prenosa T-DNA v rastlinsko celico in da so za prenos T-DNA pomembne mejne sekvence T-DNA, ki delujejo cis, kar je omogočilo razvoj binarnih vektorjev za prenos tujih genov v rastlinski genom (Hoekema in sod., 1983, cit. po Perani in sod., 1986).



Slika 1: Sistem umetno pripravljenega Ti-plazmidnega vektorja: A - cis vektorski sistem; B - trans ali binarni vektorski sistem (prirejeno po Perani in sod., 1986)

Najpogostejši vektorski sistem je binarni tip (slika 1B), kjer so želeni geni vključeni med mejne sekvence binarnega plazmida, velikosti do 25 kbp in ima sposobnost podvojitve predvsem v bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*) in tudi *A. t.*. V *A. t.* se nahaja še pomožni oz. razoroženi plazmid, ki vsebuje *vir* gene za okužbo rastlinske celice in je sestavljen iz skoraj celotnega Ti-plazmida brez T-DNA. Novejši binarni Ti-plazmidi imajo rastlinski seleksijski gen lociran čim bolj proti levi mejni sekvenci, da bi zagotovili čimboljše prenos želenih genov. Desna mejna sekvenca ima pri vnosu T-DNA iz *Agrobacterium* v rastlinsko celico prednost pred levo mejno sekvenco (Sheng in sod., 1996, cit. po Hellens in sod., 2000).

Želeni tuji geni so vneseni med robne sekvence T-DNA. Ključno vlogo v genskem konstrukt pri izražanju oz. ekspresiji genov imajo promotorji in terminatorji. To je specifično zaporedje baz, ki se nahaja na kromosomski DNA in uravnava prepis DNA v mRNA. Promotorji dejansko določajo kdaj, kje in v kakšnem obsegu bo prišlo do prepisa

določenega gena in s tem nastanka določenega proteina. Obstaja mnogo vrst promotorjev, ki se glede na način regulacije genov močno razlikujejo. Načeloma bakterijski promotorji ne delujejo v višjih organizmih in obratno. Promotorje v grobem delimo na:

- konstitutivne

Regulirajo gene, ki se izražajo neprekinjeno, taki so naprimer »house keeping« gen, to je gen, ki skrbi za osnovni metabolizem celice.

- inducibilne

Geni, regulirani z inducibilnim promotorjem, se izražajo le v določenem tkivu ali v določeni fazi razvoja ali ob določenem dražljaju.

V genskem inženiringu so prav promotorji odločilnega pomena. Omogočajo, da se lahko bakterijski gen, opremljeni z ustreznimi promotorji, izrazijo v rastlinah. Omogočajo močno ali šibko izražanje vnesenih genov, izključno le v določenih tkivih ali ob določenih pogojih, le v enem sloju celic nekega organa ali le ob napadu patogena. V rastlino lahko vnesemo gen kateregakoli organizma, če strukturnemu genu dodamo promotorsko sekvenco, ki je prepoznavna za rastlinski transkripcijski mehanizem.

Pri rastlinskih transformacijah je bil največkrat uporabljen konstitutivni promotor izoliran iz virusa cvetačnega mozajika in je pod imenom CaMV35S trenutno vgrajen v okoli 80% na tržišču sproščenih transgenih vrst (Bohanec in sod., 2004).

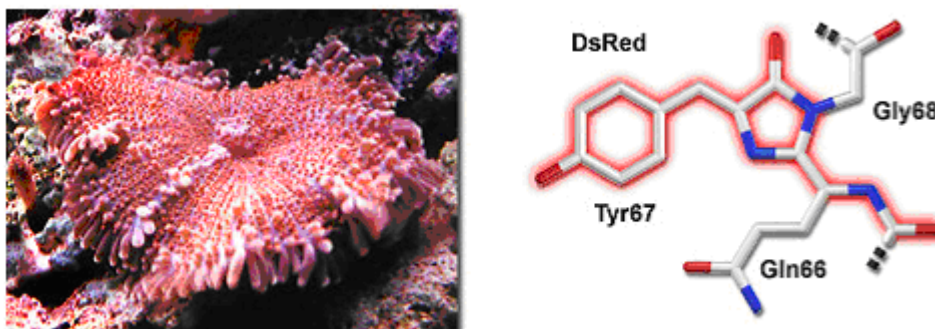
2.7.3 Markerski oz. testni in selekcijski geni

Pri vnosu genov v rastlinsko tkivo se transformira le manjše število celic. Za hitro in lažjo ločitev transformiranih celic lahko, med mejne sekvence T-DNA poleg tarčnega gena, vključimo še selekcijske gene z ustreznimi promotorji.

Najbolj pogosto se, kot testni gen uporablja gen iz *E. coli* (*gus* gen) za sintezo encima β -glukuronidaze, ki ga netransformirane rastline ne sintetizirajo oz. ne kažejo endogene aktivnosti *gus* encima. Njegovo aktivnost oz. izražanje lahko določimo histokemično z modrim obarvanjem, kvantitativno pa jo lahko merimo tudi fluorometrično (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994; Sarma in sod., 1995).

Kot testni gen se pogosto uporablja tudi *gfp* gen - sinteza zeleno fluorescentnega proteina (Haseloff in Amos, 1955). V zadnjem času tudi nov *DsRed* gen - sinteza rdeče fluorescentnega proteina. Produkte teh genov lahko zaznamo s fluorescentnim mikroskopom. V primerjavi z *gus* genom imajo to veliko prednost, da je produkt oz. izražanje gena mogoče zaznati v živi celici (nedestruktiven test).

DsRed gen je bil izoliran iz korale *Discosoma* sp. (slik 2). Uporaben je, kot markerski gen za prehodno in stabilno transformacijo (Jach in sod., 2001). Wenck in sod., (2003) so potrdili uporabnost novega seta fluorescentnih proteinov iz koral AmCyan, ZsGreen, ZsYellow1, DsRed1, DsRed2, AsRed1 in AsRed2 za študije prehodnega in stabilnega izražanja genov pri več vrstah eno- (pšenica, koruza, ječmen, riž, čebula, banana) in dvokaličnic (soja, bombaž, tobak, krompir in paradižnik). Že sedaj in v prihodnosti bodo ti novo odkriti fluorescentni geni in njihovi produkti - proteini zelo pomembni za proučevanje virusno inducirane utišanja genov.



Slika 2: Korala *Discosoma* sp. iz katere je bil izoliran *DsRed* gen in struktura kromoforja (Piston in sod., 2004)

Tako pri konstrukciji bakterijskih plazmidov, kot pri genskih transformacijah rastlin, potrebujemo način, s katerim preverimo, da je vključen gen res prisoten. Za ta namen vnašamo poleg tarčnega gena, ki je lahko testni oz. markerski ali gospodarsko pomemben gen, tudi selekcijski gen.

Selekcijski geni dajo transformiranim celicam določeno prednost pri razvoju. Selekcijski geni bakterijskih plazmidov so pretežno geni za odpornost na določen antibiotik. V gojišču, ki vsebuje določen antibiotik, preživijo le tiste bakterije, ki imajo vključen plazmid s selekcijskim genom oz. geni. Podobno velja za selekcijo rastlinskih celic. Tu so selekcijski geni nekoliko drugačni. Možno je tudi uporabljati iste gene za odpornost proti nekaterim antibiotikom (kanamicin, higromicin, kloramfenikol), ki delujejo toksično na netransformirano rastlinsko tkivo.

Možni so še drugi selekcijski geni. Geni, ki sprožijo odpornost na določene herbicide, so lahko hkrati agronomsko pomembni in selekcijski geni. Gensko spremenjene rastline s toleranco na glufosinat ali fosfinotricin (PTT) imajo vključen *pat* oz. *bar* gen. Rastline s toleranco na glifosat imajo vključen *epsps*, *aroAcp4* ali *gox* gen.

Sodobni selekcijski geni so denimo gen *xylA*, ki kodira ksilozno izomerozo (selekcijski agens je D-ksilaza), gen *manA*, ki kodira fosfomanozno izomerozo (selekcijski agens je manoza 6-fosfat) ter špinačni gen *badh*, ki kodira betain aldehyd dehidrogenazo (selekcijski

agens je betain aldehyd). Ti trije geni omogočajo metabolno prednost celicam na substratu, na katerem netransformirane celice ne uspevajo.

Ne glede na dejstvo, da so pomisleki proti uporabi selekcijskih genov znanstveno neutemeljeni, obstaja vrsta praktičnih razlogov, zaradi katerih bi bila odstranitev selekcijskega gena zaželena. Najpreprostejša rešitev je, da selekcijskih genov ne vključujemo v genski konstrukt, torej da dosežemo transformacijo brez uporabe selekcijskega gena. Ta možnost dejansko že obstaja pri tistih vrstah rastlin, kjer je sam postopek genske transformacije tako razvit, da denimo transgeni predstavljajo 5% ali več vseh regenerantov. Pozitivne regenerante prepoznamo kar z genskimi testi. Pri večini vrst za zdaj ta pristop ni mogoč, ker je število pozitivnih regenerantov premajhno (Bohanec in sod., 2004).

2.7.4 Določanje transgenov

Transgene se lahko spremlja na molekularnem DNA nivoju in fenotipsko izražanje v transgenih celicah oz. rastlinah. Na DNA nivoju se najpogosteje uporablja verižna reakcija s polimerazo, znana tudi pod angleško kratico PCR (*Polymerase Chain Reaction*). To je metoda, ki omogoča namnoževanje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Lahko rečemo, da s to metodo namnožujemo oz. kloniramo DNA, ne da bi za to potrebovali žive celice, to pa pred odkritjem PCR praktično ni bilo mogoče. Metodo je leta 1983 razvil ameriški biokemik Kary Mullis, za kar je leta 1993 prejel Nobelovo nagrado za kemijo.

In vitro namnoževanje odsekov DNA poteka z dvema kratkima molekulama DNA t.i. začetnima oligonukleotidoma, ki sta komplementarna začetnemu in končnemu delu segmenta DNA, ki ga želimo namnožiti. DNA-polimeraza sintetizira komplementarno verigo od mesta na vzorčni DNA, kamor se je vezal začetni oligonukleotid. S ponavljanjem denaturacije dvojne verige DNA molekul, vezave začetnih oligonukleotidov in sinteze komplementarne verige v ciklih lahko DNA, ki se nahaja med dvema primerno izbranim začetnima oligonukleotidoma, eksponentno namnožujemo. Pri vsaki ponovitvi se število kopij namnoževanega odseka podvoji. Tako lahko po 20 ponovitvah reakcije dobimo iz 1 kopije DNA teroretično več kot 1 milijon kopij. Temperatura reakcije se mora kontrolirano spreminjati. Za vezavo kratkih molekul DNA (začetnih oligonukleotidov) na matrico, ki jo želimo namnožiti, je namreč nujno, da je matrica v enoverižni obliki (DNA je običajno dvoverižna molekula), to pa dosežemo tako, da DNA za kratek čas segrejemo na 92 °C ali več (to stopnjo imenujemo denaturacija DNA). Da pride do prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico, je potrebno temperaturo znižati na 37 - 55 °C, nato pa spet prilagoditi pogojem, ki so optimalni za delovanje DNA-polimeraze (Innis in sod., 1990).

Nekaj let po tem, ko je Mullis opisal metodo PCR, so jo drugi avtorji izpopolnili tako, da so namesto DNA-polimeraze iz bakterije *Escherichia coli* (ta ima optimalno temperaturo za delovanje 37 °C in razpade pri visokih temperaturah denaturacije DNA) uporabili polimerazo iz bakterije *Thermus aquaticus*, ki so jo našli v vročih vrelih v ameriškem narodnem parku Yellowstone. Taq-polimeraza je termostabilna, optimalno deluje pri 72 °C, prenese pa tudi kratkotrajna segrevanja nad 90 °C, zato odtlej ni bilo več potrebno v vsakem ciklu dodati svežega encima, kar je omogočilo avtomatizacijo postopka.

PCR reakcija poteka v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati. Določimo lahko temperature, trajanje inkubiranja, število ponovitev ciklov in podobno. Reakcije potekajo v volumnih od 20 µl do 100 µl. Pri klasični izvedbi, kakršna je še vedno najbolj pogosta, po končani reakciji produkte analiziramo z agarozno elektroforezo (Innis in sod., 1990).

2.8 GENSKE TRANSFORMACIJE HMELJA

Zaradi težavne regeneracije hmelja v *in vitro* razmerah, hmelj ni priljubljena rastlina za vnos genov. Le malo avtorjev poroča o uspešni regeneraciji, največ preko oblikovanja kalusa na izsečkih. Objavljeni so postopki regeneracije bodisi pri divjih varietetah (Batista in sod., 1996 in 2000), bodisi pri nekaj komercialnih sortah hmelja (Motegi, 1979; Connell in Heale, 1986; Heale in sod., 1989; Gurriarán in sod., 1999; Šuštar-Vozlič in sod., 1999; Horlemann in sod., 2003). Direktno regeneracijo dveh čeških sort hmelja sta dosegla Rakouský in Matoušek (1994). O izboljšanju regeneracije slovenske sorte 'Aurora' poročajo tudi Ferant in sod. (2001). Najpogostejše proučevani rastlinski hormoni za indukcijo regeneracije so bili indol-3-ocetna kislina (IAA), indole-3-maslena kislina (IBA), kinetin (KIN), 6-benzilaminopurin (BAP), zeatin, zeatin ribozid ter tidiazuron (TDZ). Citokinini so imeli največji vpliv na sposobnost regeneracije (Šuštar-Vozlič in sod., 1999).

Šuštar-Vozlič in sod. (1999) so dosegli 12,5% regeneracijo izsečkov na gojišču z dodatkom 5 mg/l kinetina. Ferant in sod. (2001) poročajo o enaki 12,5% regeneraciji pri 'Aurori' na gojišču z dodatkom 3,5 mg/l citokinina BAP. Oboji poročajo, da so najbolj odzivni tipi izsečkov internodiji, medtem ko so bili listni peclji manj odzivni, listi pa sploh ne. Tudi večina drugih avtorjev poroča o internodijih, kot najprimernejših izsečkih za regeneracijo (Rakouský in Matoušek, 1994; Batista in sod., 1996; Gurriarán in sod., 1999; Šuštar-Vozlič in sod., 1999; Horlemann in sod., 2003). Sorta 'Aurora' se je že v prejšnjih raziskavah izkazala za slabo odzivno sorto z nizko regenerativno sposobnostjo (Šuštar-Vozlič in sod., 1999; Ferant in sod., 2001).

Zaradi dolgotrajnih in zahtevnih postopkov obstoječih načinov žlahtnjenja hmelja so novejša biotehnoške metode dobrodošlo dopolnilo prenosa dednega materiala.

Genske transformacije omogočajo relativno hitro vključitev želenih lastnosti v genom že obstoječih sort hmelja, ne da bi spremenili njihove kvalitativne agronomsko pomembne lastnosti. Le nekaj objav poroča o začetkih transformacij pri hmelju. Do sedaj so dosegli le prehodno izražanje testnega *gus* gena v kalusnem tkivu (Oriniaková in sod., 1999) in stabilno izražanje testnega *gus* gena in to samo pri dveh tesno sorodnih genotipih hmelja 'Tettnanger' in 'Saazer' (Horlemann in sod., 2003; Okada in sod., 2003). Ker je regeneracija pri hmelju močno odvisna od genotipa (Gurriarán in sod., 1999), je potrebno razviti modificiran protokol regeneracije in posledično transformacije za vsako sorto posebej. Do sedaj ni poročil o uspešni regeneraciji in transformaciji slovenske sorte oz. divje oblike hmelja.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V poskus smo vključili slovenski sorti 'Auroro' in 'Savinjski golding' ter nemško sorto 'Tettnanger'. Vse rastline so bile mikropropagirane na MSm gojišču (Murashige in Skoog, 1962). Kot rastlinski material smo uporabili 1 cm dolge internodije, katere smo po enem dnevu inokulacije na MSr gojišču s 100 µM acetosiringonom okužili z bakterijo *A. t.* sev LBA4404 in plazmidom pCAMBIA1301 oz. z modificiranim plazmidom pCAMBIA1390. Na gojišče ene petrijevke premera 9 x 1,5 cm smo inokulirali približno 30 internodijev, skupno je bilo inokuliranih 1555 internodijev. Zaradi morebitnih sekundarnih okužb in izhlapevanja smo zgornji del (pokrov) in spodnji del (dno) petrijevke zaščitili z dvema trakovima parafilma.

Vzporedno z okuženimi internodiji smo nastavili še kontrolni poskus z neokuženimi internodiji sort 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'. Z namenom določiti regeneracijo iz internodijskih izsečkov na MSr gojišču. Skupno je bilo inokuliranih 2992 internodijev.

3.2 SESTAVA GOJIŠČ

MSm gojišče za mikropropagacijo in rast hmelja:

MS (Murashige in Skoog, 1962) bazalno gojišče:

makro- in mikroelementi	4,3 g/l
inozitol	0,1 g/l
tiamin	0,1 mg/l
piridoksin	0,5 mg/l
nikotinska kislina	0,5 mg/l
glukoza	20 g/l
BAP	1 mg/l
agar	8 g/l
pH	5,8

MSr gojišče za regeneracijo hmelja:

MS bazalno gojišče (Murashige in Skoog, 1962), MSr (Okada in sod., 2003)

MS bazalno gojišče	4,3 g/l
inozitol	0,1 g/l
tiamin	0,1 mg/l
piridoksin	0,5 mg/l
nikotinska kislina	0,5 mg/l

glukoza	20 g/l
2iP	6,0 mg/l
IAA	0,025 mg/l
agar	8 g/l
pH	5,8

YEB gojišče za rast *A. t.* LBA4404:

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

3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ

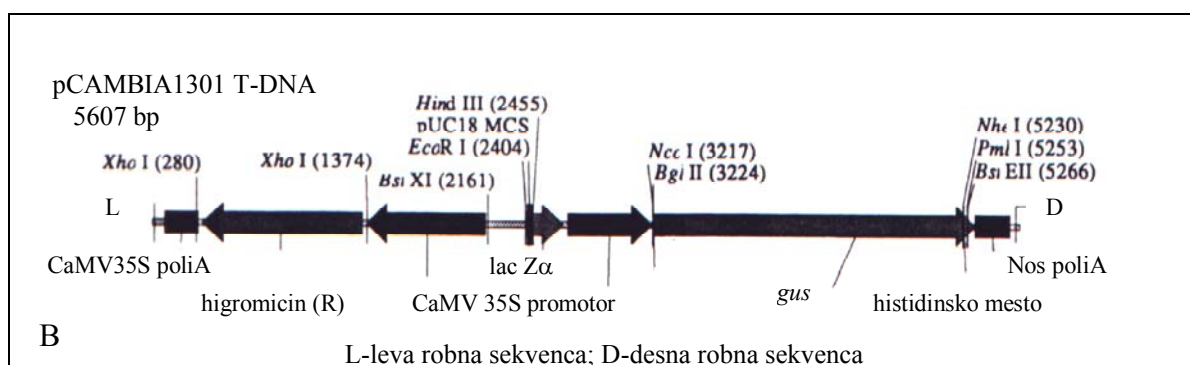
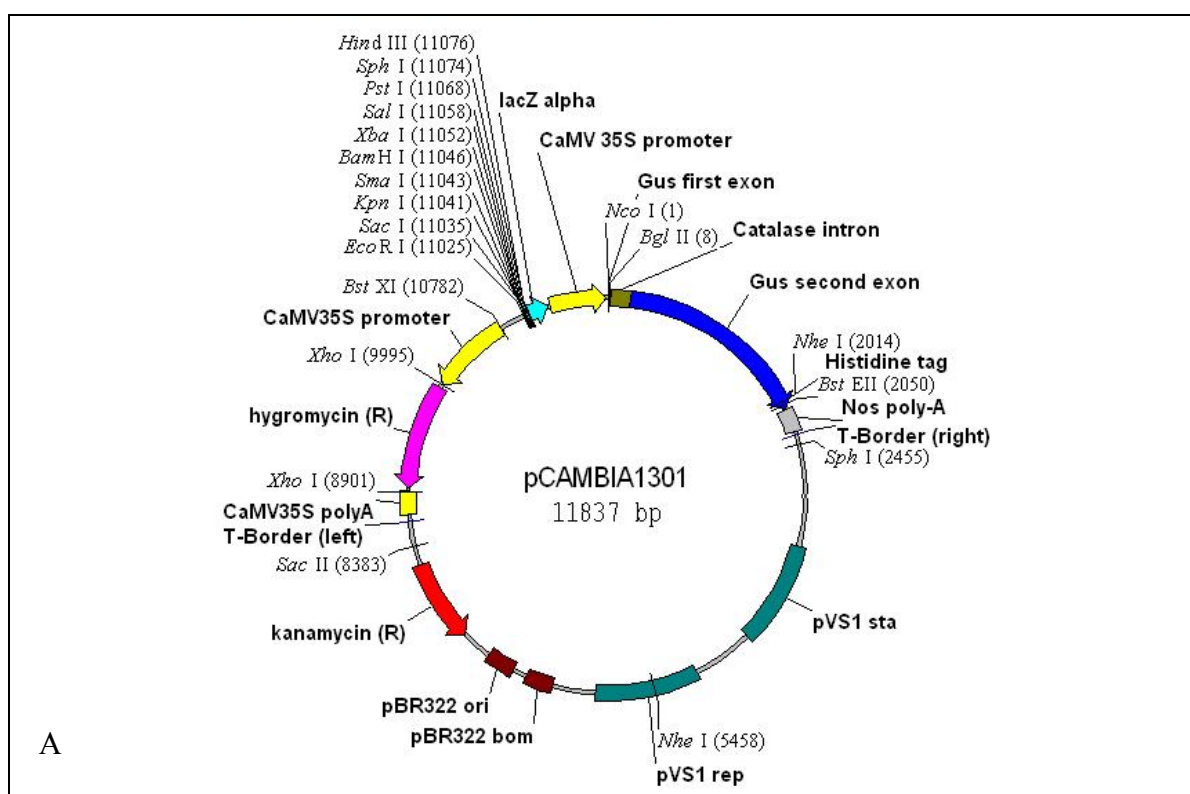
Posamezne komponente gojišč smo stehali in jih pretresli v čašo ter prelili z bidestilirano vodo. V nastalo zmes smo dali magnet obdan s teflonom in postavili na električni mešalnik. Med mešanjem smo s pipeto iz založnih raztopin dodali vitamine in hormone. Zaradi natančnosti smo končni volumen določili z merilno bučko in tako umerjeno raztopino prelili nazaj v čašo ter določili pH vrednost z 1N HCl oz. 1N KOH. Nato smo dodali še agar - strjevalec gojišča in 3 krat do vretja segreli v mikrovalovni pečici, da se je agar raztopil in porazdelil po gojišču. Potem smo približno po 25 ml vlili v steklenice premera 5,5 x 7,5 cm s polipropilenskim pokrovom. Gojišče, ki smo ga po avtoklaviranju razlili v sterilne petrijevke oz. dodali antibiotike, smo prelili v Schott-Duran steklenice z agarjem in avtoklavirali 20 min pri 121 °C in pritisku 1,1 bar. V ohlajena gojišča na približno 40 °C smo filtrsko dodali antibiotike, temeljito premešali ter razlili v sterilne petrijevke oz. steklenice s polipropilenskim pokrovom.

3.4 BAKTERIJA IN PLAZMID - VEKTOR

Za vnos genov v genom hmelja smo izbrali komercialno bakterijo *A. t.* sev LBA4404. V katero smo ločeno z elektroporacijo vnesli dva komercialna plazmida družbe Cambia iz Camberre, Avstralija z oznako pCAMBIA1301 z *gus* in *hptII* genom in modificiran plazmid pCAMBIA1390 z *DsRed* in *hptII* genom. Geni so bili opremljeni z rastlinskim CaMV35S poromotorjem (slika 3 in 4).

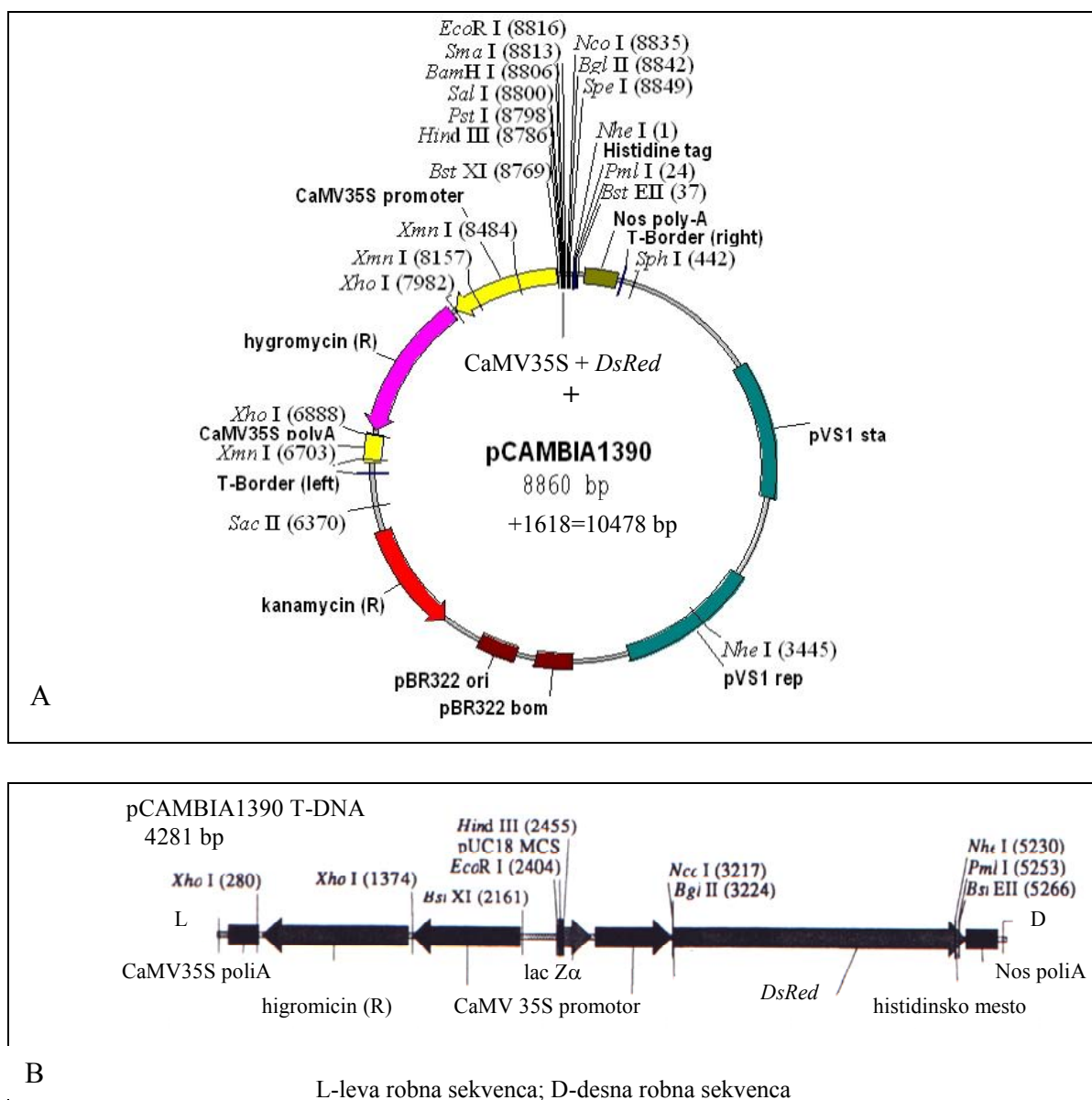
Plazmid pCAMBIA1301 ima 5607 bp dolgo T-DNA. Celoten plazmid meri 11837 bp in ima vključen bakterijski selekcijski *nptII* gen - odpornost na kanamacin. T-DNA vsebuje

rastlinski selekcijski *hptIII* gen - odpornost na higromicin in markerski *gus* gen za sintezo encima β -glukuronidaze. Selekcijski geni omogočajo selekcijo transformiranih bakterij in selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv. Markerski *gus* gen leži proti desni robni sekvenci, medtem ko *hptIII* gen proti levi robni sekvenci T-DNA. Vmes so številna restrikcijska mesta, kamor lahko vključimo želene gene (Roberts in sod., 1997). N358Q mutacija omogoča *gus* genu, da ohrani popolno aktivnost v rastlinski celici, tako da se veže na signalni peptid. Njegov produkt oz. izražanje v regeneriranih rastlinah lahko spremljamo z GUS-testom. *Gus* gen je dodatno opremljen z intronom iz ricinusove katalaze, ki preprečuje ekspresijo v prokariontih, kot je *A. t*. Ta intron se učinkovito izreže pri evkariontih tako pri eno- kot dvokaličnicah (Ohta in sod., 1990; Tanka in sod., 1990).



Slika 3: Plazmid pCambia1301: A - mapa plazmida; B - T-DNA plazmida

Modificiran plazmid pCAMBIA1390 ima 4281 bp dolgo T-DNA. Celoten modificiran plazmid je dolg 10478 bp in vsebuje bakterijski selekcijski *nptII* gen. T-DNA vsebuje *DsRed* gen - rdeče fluorescentni protein, ki omogoča po vgraditvi v genom hitro (že po nekaj urah) sintezo proteina. *DsRed* gen je bil izrezan iz plazmida pCMV-*DsRed*-Express in CMV promotor, za izražanje v sesalskih celicah, je bil nadomeščen s CaMV35S promotorjem. Tako pripravljen genski konstrukt je bil vnesen na ustreznih restrikcijskih mestih v plazmid pCAMBIA1390 (slika 4A in B). Izražanje rdeče fluorescentnega proteina se lahko spremlja s fluorescentnim mikroskopom s filtri 557 in 579 nm valovne dolžine (BD Biosciences Clontech, 2004).



Slika 4: Modificiran plazmid pCAMBIA1390: A - mapa plazmida; B - T-DNA plazmida

V plazmidih pCAMBIA1301 in pCAMBIA1390 je pUC18 polilinker z lacZ α izbrisan in nadomeščen z enostavnejšim pUC9 polilinkerjem, ki ne vsebuje start in stop kodona. V takšni obliki je plazmid primernejši za PCR analizo in izražanje gena oz. genov (Hajdukiewicz in sod., 1994). Plazmidi so stabilni v *Agrobacterium* tudi pri gojenju v neselektivnih pogojih zaradi prisotnosti *rep* (funkcija podvajanja plazmida) in *sta* (funkcija stabilnosti plazmida) regij iz plazmida pVS1 (Deblaere in sod., 1987) (slika 3A in B).

3.5 VNOS *gus*, *DsRed* IN *hptII* GENOV V GENOM HMELJA Z *Agrobacterium tumefaciens*

Transformacijo hmelja z *A. t.* smo izvedli po nekoliko modificirani metodi transformacije listov tobaka Horsch in sod. (1985) ter po Fisher in Gultinan (1995). Internodije mikropropagiranega hmelja na MSm gojišču smo s sterilnim skalpelom v brezprašni komori narezali na približno 1 cm izsečke in jih za 1 dan inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče z dodatkom 100 μ M acetosiringona.

A. t. smo do namnoževanja za transformacijo hranili pri -80 °C. Iz odtaljene suspenzije smo odpipetirali 15 μ l in dodali v 35 ml YEB gojišča z dodatkom 50 mg/l rifampicina (selekcija na razoroženem plazmidu bakterije LBA4404) in 100 mg/l kanamicina (bakterijska selekcija na binarnem plazmidu). Bakterije smo gojili čez noč pri 28 °C in tresenju 120 obratov/min do logaritemske faze oz. optične gostote ($A_{600\text{ nm}}$) = 0,6 ($\sim 5 \times 10^6$ celic/ml).

Naslednji dan smo bakterijsko suspenzijo prelili v 25 ml centrifugirke in centrifugirali 5 min, pri 5000 obratih/min in 4 °C. Potem smo supernatant odlili, pelet pa prelili s polovično koncentracijo MS gojišča z dodatkom 10 g/l saharoze.

Izsečke internodijev smo pobrali iz MSr gojišča, na katerem so bili čez noč, jih dali v prazno petrijevko in prelili s prej opisano bakterijsko suspenzijo ter pustili 10 min z vmesnim nekajkratnim mešanjem. Nato smo s parafilmom obvili petrijevko in izpostavili za 1 min ultrazvoku, odvili parafilm in še 10 min vakuumu ter pustili še 10 min v bakterijski suspenziji. Internodije smo zračno posušili v brezprašni komori na sterilnem filterškem papirju in inokulirali nazaj na MSr gojišče s 100 μ M acetosiringonom. Po štirih dneh kokultivacije smo internodije 2 krat sprali z 200 mg/l timentina [100 : 1 tikarcilin : klavulonska kislina], jih zračno posušili in subkultivirali na MSr gojišče z dodatkom 150 mg/l timetina, da bi preprečili rast *A. t.*. Po približno dveh do treh tednih kultivacije se je začela regeneracija iz kalusa. Nastale regenerante smo subkultivirali na MSm mikropropagacijsko gojišče z dodatkom 25 mg/l higromicina. Priporočena koncentracija 50 mg/l higromicina je uničila tudi regenerante, pri katerih smo z molekulsko in histokemično analizo zasledili transgene oz. njihove produkte. Regeneranti so po treh

tednih subkultivacije na gojišču z dodatkom 25 mg/l higromicina začeli propadati, zato smo jih prestavili na MSm gojišče brez selekcije.

3.6 HISTOKEMIČNI GUS-TEST IZRAŽANJA *gus* GENA V TRANSFORMIRANIH REGENERANTIH HMELJA

Kot rastlinski material smo uporabili rastline, ki so bile normalno razvite, velike vsaj 3 cm, zelene barve in niso bile vitrificirane. Test smo opravili 110 dni po transformaciji internodijev.

Prisotnost encima β -glukuronidaze pri regenerantih hmelja smo testirali s histokemičnim GUS-testom (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994). Kot barvilo smo uporabili X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukorid). Encim β -glukuronidaza razgradi X-Gluc in produkt se obarva modro. Z regenerantov hmelja smo odrezali dva lista spodaj in dva lista zgoraj na rastlini, približno 2 cm stebela in vrh ter korenine. Položili smo jih v valj 24 valne plošče in prelili z 800 μ l 50 mM fosfatnim pufrom NaPO_4 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{PO}_4$, pH 6,8) z dodatkom Tritona X-100 ter inkubirali 1 uro pri 37 °C. Pufer smo nato z mikropipeto odpipetirali in dodali 800 μ l svežega fosfatnega pufru z dodatkom barvila 1,0 mM X-Gluc in 20% metanola. Reakcijsko zmes in dele rastlin smo nato izpostavili vakuumu za 5 min (100 mbar), nato pa inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo modro obarvan produkt aktivnega *gus* gena vizualno in s pomočjo stereomikroskopa pregledali. Modro se obarvajo le tiste celice, tkiva oz. regeneranti, ki imajo v genom vključen in aktiven *gus* gen. Kot kontrolo smo uporabili liste, steblo, vrh in korenine netransformiranega hmelja.

3.7 PCR ANALIZA *gus*, *DsRed* IN *hptII* GENOV V TRANSFORMIRANIH REGENERANTIH HMELJA

Po GUS-testu smo ostanek regenerantov s stranskimi meristemi subkultivirali na mikropropagacijsko MSm gojišče. Po 40 dneh oz. 150 dni po okužbi z *A. t.* smo dobili različno število rastlin znotraj posameznega regeneranta oz. genotipa. Iz vseh smo izolirali DNA in jih testirali na prisotnost transgenov.

3.7.1 Izolacija rastlinske DNA

Iz ustrezne količine svežega rastlinskega materiala regenerantov, ki so nastali po transformaciji in netransformiranih kontrol, smo izolirali celokupno genomsko DNA po metodi Kump in sod. (1992). Rastlinskemu tkivu smo dodali 500 μ l na 68 °C segretega ekstrakcijskega pufru cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) ter macerirali v terilnici. Nastalo suspenzijo smo prelili v 1,5 ml mikrocentrifugirke in inkubirali 1,5 ure na 68 °C. Nato smo dodali 500 μ l topila kloroform : izoamilalkohol v razmerju 24 : 1 in dobro

premešali, da je nastala suspenzija in centrifugirali 15 min pri 11000 obratih/min. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali 1/10 volumna (50 μ l) 3M natrijevega acetata (NaAc) in 1 volumen (500 μ l) ledeno hladnega izopropanola in dobro premešali. Vzorce smo 25 - 30 min inkubirali pri -18 °C. Po pretečenem času smo vsebino mikrocentrifugirke dobro premešali in centrifugirali 15 min pri 11000 obratih/min. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in DNA peletu dodali 500 μ l 70% etanola (čiščenje DNA) ter pretresli, da se je pelet odlepil od mikrocentrifugirke. Po 20-ih min smo previdno odpipetirali etanol in posušili DNA pelet pri sobni temperaturi ter dodali 30 - 50 μ l TE pufra (odvisno od količine izolirane DNA), premešali in vzorce shranili v hladilnik pri 4 °C, da se stopi DNA.

Priprava raztopin za izolacijo rastlinske DNA:

Ekstrakcijski CTAB pufer (200 ml)

CTAB	4 g
1 M Tris, pH 8	20 ml
0,5 M EDTA, pH 8	8 ml
NaCl	16,36 g
Merkaptoetanol	400 μ l
H ₂ O	do 200 ml

CTAB pufer brez merkaptoetanol se filtrira skozi 0,4 μ m filter in nato doda merkaptoetanol.

0,5 M EDTA, pH 8 (200 ml)

EDTA	37,22 g
H ₂ O	do 200 ml

Pred avtoklaviranjem je bil pH uravnan z NaOH.

1M TRIS, pH 8 (100 ml)

TRIS	12,11 g
H ₂ O	do 100 ml

Pred avtoklaviranjem je bil pH uravnan s HCl.

3 M NaAc (natrijev acetat), pH 5,2 (100 ml)

NaAc	24,61 g
H ₂ O	do 100 ml

Pred avtoklaviranjem je bil pH uravnan s CH₃COOH (ocetna kislina).

TE pufer (200 ml)

1 M TRIS	2 ml
0,5 M EDTA	0,4 ml
H ₂ O sterilna	do 200 ml

3.7.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom

Koncentracijo DNA v TE smo izmerili s pomočjo DNA fluorometra DyNA Quant 200 po navodilih proizvajalca Hoefer Scientific Instruments. Najprej smo pripravili delovno raztopino iz 10 × TNE pufru [0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7)]. Pri merjenju koncentracije smo uporabili barvilo Hoechts 33258, ki smo ga dodali v delovno raztopino 10 × TNE pufer in dobili končno koncentracijo 0,1 µg/ml. Kot standard pri meritvah in za kalibracijo fluorometra smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 × TNE pufru). DNA vzorcev smo razredčili na 20 ng/µl.

Priprava 100 ml delovne raztopine za merjenje višjih koncentracij DNA:

10 × TNE	10 ml
H ₂ O destilirana	90 ml
H 33258	100 µl

TNE pufer in H₂O se filtrira skozi 0,4 µm filter in posodo ovije z alufolijo ter nato doda barvilo H 33258.

3.7.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Namnoževanje fragmentov *gus*, *DsRed* in *hptII* genov v PCR reakciji je potekalo z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi (preglednica 1). PCR reakcijske mešanice smo pripravljali v komori za aseptično delo. V PCR mikrocentrifugirke (0,5 ml) smo odpipetirali 5 µl DNA vzorca (konc. 20 ng/µl), centrifugirali do 1000 obratov/min in dodali 20 µl reakcijske mešanice: 1 × PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3)], 0,1 mM vsakega deoksinukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 mM ustreznega specifičnega začetnega oligonukleotida (preglednica 1) in 1 enoto encima Taq polimeraze (Fermentas, Nemčija) ter centrifugirali do 1000 obratov/min. Končni volumen reakcijske mešanice, v katerem je potekalo namnoževanje DNA, je bil 25 µl. Polimerazna verižna reakcija je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp[®], PCR System 9700, PE Applied Biosystems po temperaturnem vzorcu (Lakshmi in sod., 1998):

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

Pred nadaljnjo analizo smo vzorce hranili pri 12 °C.

Preglednica 1: DNA sekvence parov začetnih oligonukleotidov za posamezen gen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta

Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5' - 3'	Pričakovana dolžina fragmenta
Red-for	AGG ACG TCA TCA AGG AGT TCA	200 bp
Red2-rev	GTG CTT CAC GTA CAC CTT GGA	
Gus3-for	GGC GAA CAG TTC CTG ATT AAC	408bp
Gus3-rev	TTC GTT GGC AAT ACT CCA CAT	
Hyg-for	ATG ACC GCT GTT ATG CGG CCA TTG	641 bp
Hyg2-rev	AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG ACG	

Začetni oligonukleotidi so bili izdelani na osnovi sekvenc plazmidov in sintetizirani pri MWG Bitech AG (Ebersberg, Nemčija).

3.7.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno elektroforezo

Za pripravo gela smo zatehtali prečiščeno agarozo v steklenico (Schott-Duran) in dolili 1×TBE pufer [890 mM Tris, 890 mM borna kislina, 10 mM EDTA]. Mešanico smo 3 - 4 krat zavreli v mikrovalovni pečici, da se je agarosa popolnoma stopila in ohlajali z enakomernim vrtenjem pod mrzlo vodo. Ko je temperatura padla na 56 °C, smo dodali 0,05% etidijevega bromida (EtBr) ter ga z vrtenjem steklenice enakomerno porazdelili po raztopini. Na podstavku z vodno tehtnico smo pripravili elektroforetsko ploščo, katero smo ob straneh oblepili z lepilnim trakom in vanjo postavili glavnik ter vlili pripravljeno zmes za gel. Strjevanje gela je potekalo pri sobni temperaturi približno 20 min, medtem ko se je gel ohlajal in strjeval, smo vzorcem s PCR produkti dodali 5 µl nanašalnega barvila ter centrifugirali do 1000 obratov/min. Strjenemu gelu smo odstranili glavnik in samolepilni trak, da je lahko električni tok nemoteno tekel od katode po gelu do anode ter ga namestili v elektroforetsko posodo ter prelili z 1 × TBE pufrom.

Vzorci smo pred nanosom premešali in 17 µl vzorca nanесли v utore agaroznega gela. Poleg vzorcev smo na gel nanесли še iz kontrole izolirano DNA (netransformiran hmelj), ustrezeni čisti plazmid (izoliran iz *E. coli*), slepi vzorec (vse komponente reakcijske mešanice razen DNA oz. namesto DNA je bilo dodano 5 µl vode) in velikostni standard (Fermentas, Nemčija) z 11 različno dolgimi DNA fragmenti (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 in 80 bp).

Elektroforeza je potekala pri 140 V, približno 1 uro in 30 min. Gel je vseboval 0,05% etidijevega bromida, kateri interkalira med baze DNA in fluorescira pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 302 nm. Gele smo fotografirali pod UV svetlobo s polaroidnim fotoaparatom.

Priprava raztopin za analizo fragmentov DNA z agarozno elektroforezo:

1,4 % agarozni gel (250 ml)

SeaKem agaroz	3,5 g
1 × TBE pufer (250 ml)	30 ml 5 × TBE + 220 ml destilirane vode)
0,05 % etidijev bromid	12 µl (10 mg/ml)

Posodni pufer 1 × TBE (3000 ml)

5 × TBE	360 ml
H ₂ O destilirana	2640 ml

Barvilo

ficol 400	12,5% (w/v)
bromfenol modro	0,2% (w/v)
10 × TBE	6,7% (v/v)

3.8 KONTROLNI POSKUS

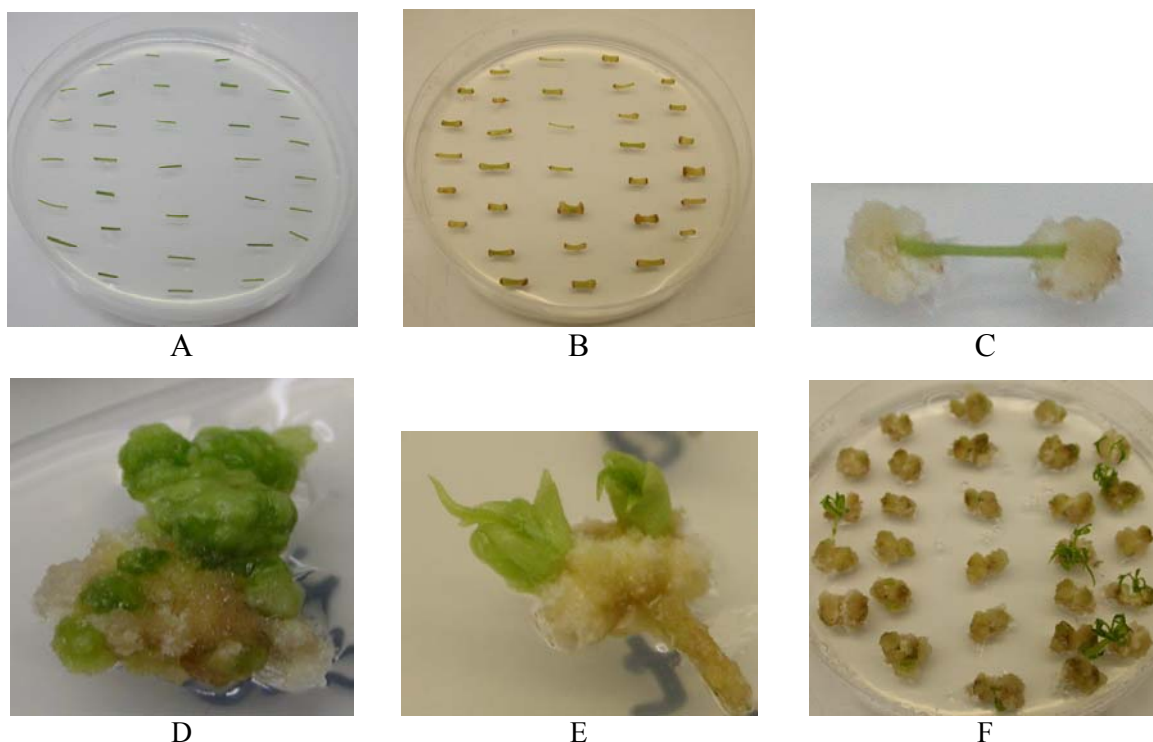
Istočasno s kokultiviranimi internodiji sorte 'Aurora', 'Savinjski golding' in 'Tettnanger' smo pripravili kontrolne poskuse z neokuženimi izsečki. Na MSr regeneracijsko gojišče ene petrijevke brez dodanih antibiotikov smo inokulirali približno 30 internodijskih izsečkov. Vsak teden smo spremljali nastanek organogenih struktur - globul in regenerantov. Pri hmelju se iz vseh organogenih struktur ne razvijejo regeneranti, zato smo spremljali regeneracijo obeh faz.

Z *A. t.* okužene in neokužene internodije in regenerante smo gojili v rastnih komorah pri 16/8 h (svetloba/tema) fotoperiodi, temperaturi 24 ± 1 °C in osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Na vsake štiri tedne smo izsečke in regenerante subkultivirali na ustrezno sveže gojišče.

4 REZULTATI

4.1 REGENERACIJA HMELJA

Kalusno tkivo se je začelo formirati 8 - 10 dni po inokulaciji na koncih internodijev oz. reznih ploskvah (slika 5A, B in C). Po 2 - 3 tednih so bili internodiji v celoti prekriti s kalusom. Po 2 tednih se je začela regeneracija prvih organogenih struktur oz. globul (slika 5D). Direktne regeneracije (regeneracije brez kalusa) nismo opazili. Po 3 - 4 tednih so se začeli pojavljati prvi regeneranti (slika 5E in F).



Slika 5: Regeneracija hmelja: A - inokulirani internodiji na MSr gojišču; B - začetek kalusiranja internodijev; C - kalus na rezih ploskvah internodija; D - organogene strukture (globule); E - formiranje regenerantov; F - regeneranti

4.1.1 Regeneracija iz neokuženih internodijev

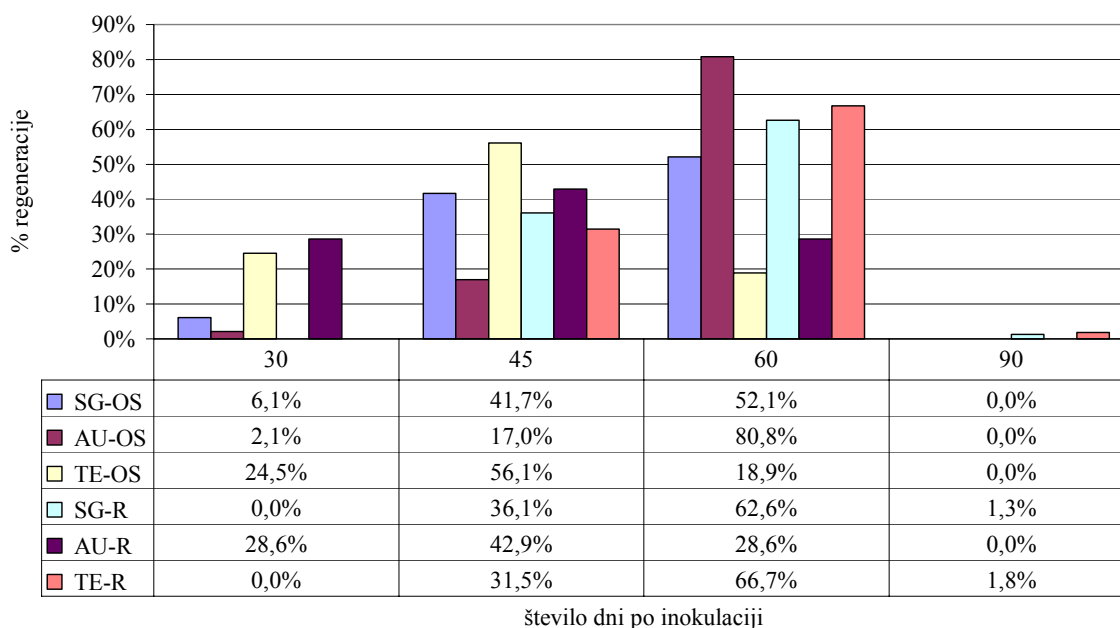
Pri sorti 'Savinjski golding' je nastalo največ 52,1% organogenih struktur v 60 dneh po inokulaciji internodijev. V enakem obdobju se je na internodijih 'Aurore' oblikovalo kar 80,8% organogenih struktur. Pri sorti 'Tettnanger' je nastalo 56,1% organogenih struktur v 45 dneh po inokulaciji in kar 24,5% že v 30 dneh po inokulaciji. Pri 'Savinjskem goldingu' je nastalo največ 62,6% regenerantov v 60 dneh po inokulaciji internodijev. V istem obdobju je pri sorti 'Tettnanger' nastalo kar 66,7% regenerantov. Pri sorti 'Aurora' je bilo

največ 42,9% renerantov že v 45 dneh po inokulaciji internodijev (preglednica 2 in slika 6).

Preglednica 2: Regeneracija organogenih struktur in regenerantov iz neokuženih internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettanager' v štirih časovnih intervalih po inokulaciji

Sorta	Število dni po inokulaciji							
	30		45		60		90	
	OS	R	OS	R	OS	R	OS	R
'Savinjski golding'	23	0	157	45	196	97	0	2
'Aurora'	1	2	8	56	38	2	0	0
'Tettanager'	13	0	30	3	10	36	0	1

Legenda: OS - organogene strukture, R - regeneranti



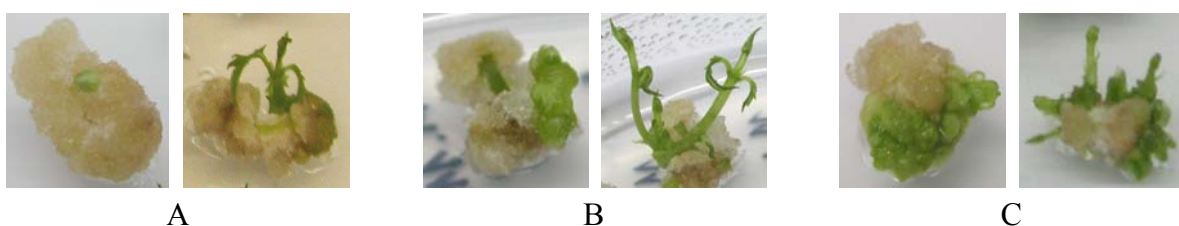
Legenda: SG - 'Savinjski golding', AU - 'Aurora', TE - 'Tettanager', OS - organogene strukture, R - regeneranti

Slika 6: Odstotek organogenih struktur in regenerantov iz neokuženih internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettanager' v štirih časovnih intervalih po inokulaciji

Največ 30,4% renerantov je nastalo na neokuženih internodijih sorte 'Tettanager'. Iz skoraj vseh nastalih organogenih struktur (31,0%) so se razvili regeneranti. Pri sorti 'Savinjski golding' je nastalo 40,3% organogenih struktur in samo 16,6% regenerantov. Najmanj samo 3,9% regenerantov je nastalo pri sorti 'Aurora' iz 26,6% nastalih organogenih struktur (preglednica 3 in slika 7).

Preglednica 3: Število neokuženih internodijev, nastalih organogenih struktur in regenerantov ter odstotek regeneracije hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'

Sorta	Št. inokuliranih internodijev	Št. organogenih struktur	Št. regenerantov	% organogenih struktur	% regenerantov
'Savinjski golding'	933	376	155	40,3	16,6
'Aurora'	177	47	7	26,6	3,9
'Tettnanger'	174	54	53	31,0	30,4



Slika 7: Oblika organogenih struktur in regeneracija regenerantov pri sortah hmelja: A - 'Aurora'; B - 'Savinjski golding'; C - 'Tettnanger'

4.1.2 Regeneracija iz internodijev po okužbi z *Agrobacterium tumefaciens*

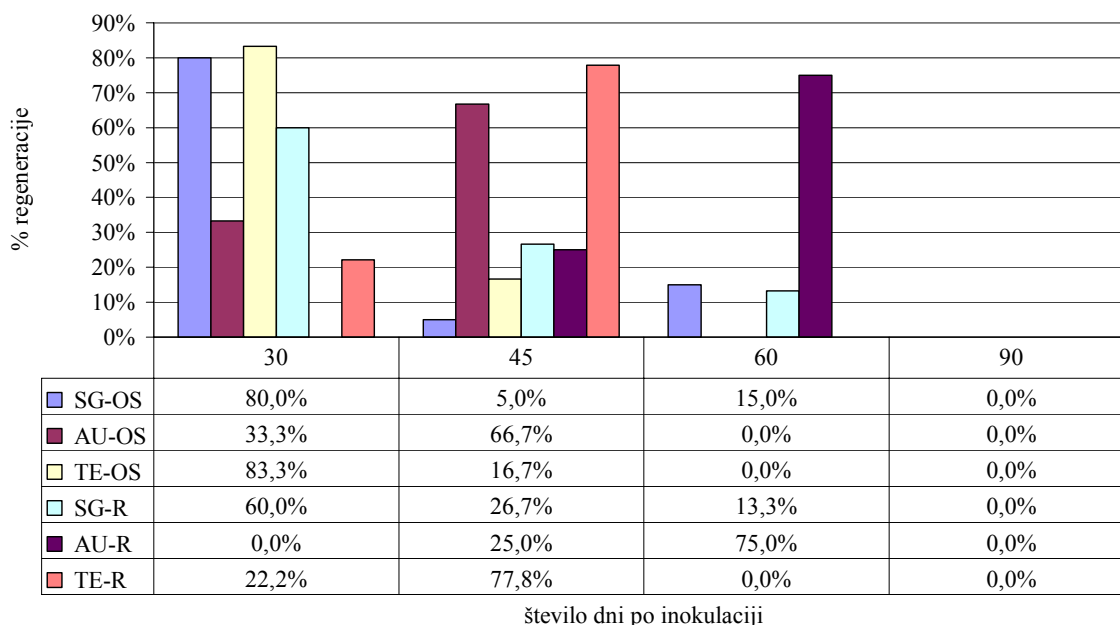
4.1.2.1 Plazmid pCAMBIA1301

Pri sorti 'Tettnanger' je nastalo v 30 dneh po inokulaciji na okuženih internodijih z *A. t.* pCAMBIA1301 kar 83,3% organogenih struktur. V enakem obdobju je pri sorti 'Savinjski golding' nastalo 80,0% organogenih struktur. Pri sorti 'Aurora' se je oblikovalo 66,7% organogenih struktur v 45 dneh po inokulaciji. V enakem obdobju je nastalo pri sorti 'Tettnanger' 77,8% regenerantov. Pri 'Aurori' je nastalo največ 75,0% regenerantov v 60 dneh po inokulaciji. Pri 'Savinjskem goldingu' se je oblikovalo 60,0% regenerantov že v 30 dneh po inokulaciji (preglednica 4 in slika 8).

Preglednica 4: Regeneracija organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1301

Sorta	Število dni po inokulaciji							
	30		45		60		90	
	OS	R	OS	R	OS	R	OS	R
'Savinjski golding'	16	9	1	4	3	2	0	0
'Aurora'	2	0	4	1	0	3	0	0
'Tettnanger'	5	2	1	7	0	0	0	0

Legenda: OS - organogene strukture, R - regeneranti



Legenda: SG - 'Savinjski golding', AU - 'Aurora', TE - 'Tettnanger', OS - organogene strukture, R - regeneranti

Slika 8: Odstotek organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z *A. t. pCAMBIA1301*

Na 12% okuženih internodijih z *A. t. pCAMBIA1301* sorte 'Tettnanger' so nastale organogene strukture iz katerih se je regeneriralo 18,0% regenerantov. Pri sorti 'Savinjski golding' se je oblikovalo 8,6% organogenih struktur iz katerih je nastalo 6,5% regenerantov. Najmanj samo 0,8% regenerantov je nastalo pri sorti 'Aurora' iz 1,2% nastalih organogenih struktur (preglednica 5).

Preglednica 5: Število inokuliranih internodijev, nastalih organogenih struktur in regenerantov ter odstotek regeneracije pri hmelju 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' po okužbi z *A. t. pCAMBIA1301*

Sorta	Št. internodijev	Št. organogenih struktur	Št. regenerantov	% organogenih struktur	% regenerantov
'Savinjski golding'	232	20	15	8,6	6,5
'Aurora'	474	6	4	1,2	0,8
'Tettnanger'	50	6	9	12	18

4.1.2.2 Modificiran plazmid pCAMBIA1390

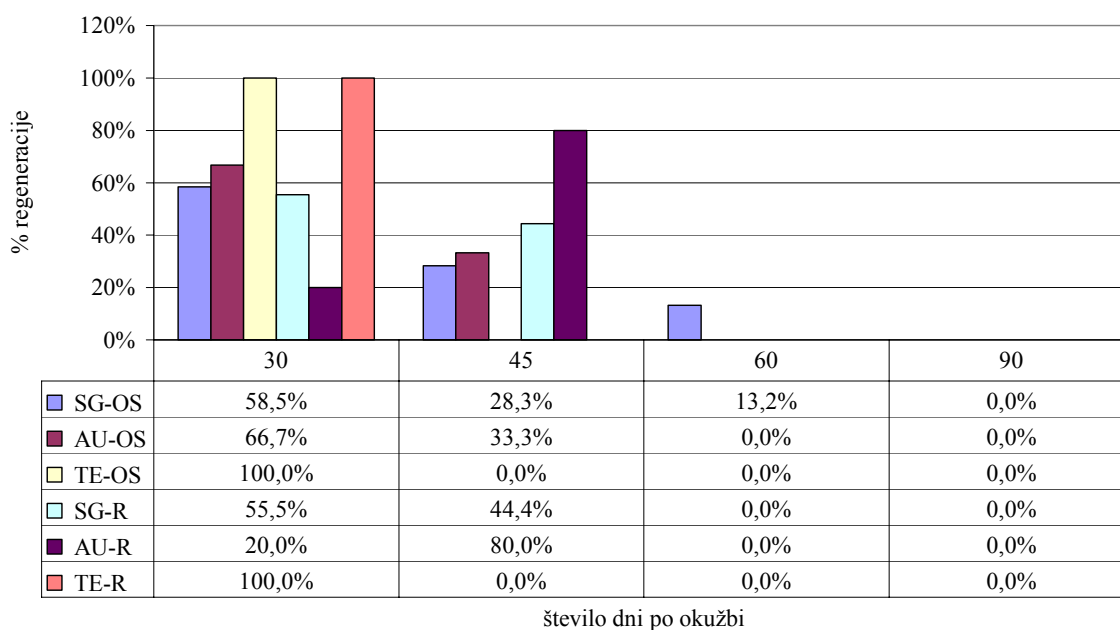
Pri vseh proučevanih sortah je nastalo največ organogenih struktur v 30 dneh po inokulaciji okuženih internodijev z *A. t. pCAMBIA1390*. Pri sorti 'Tettnanger' so nastale

vse organogene strukture v tem obdobju, pri sorti 'Aurora' 66,7% in pri sorti 'Savinjski golding' 58,5%. Že v 30 dneh po inokulaciji internodijev so nastali vsi regeneranti pri sorti 'Tettnanger' in 55,5% pri sorti 'Savinjski golding'. Pri 'Aurori' je nastalo največ 80,0% regenerantov v 45 dneh po inokulaciji internodijev (preglednica 6 in slika 9).

Preglednica 6: Regeneracija organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1390

Sorta	Število dni po inokulaciji							
	30		45		60		90	
	OS	R	OS	R	OS	R	OS	R
'Savinjski golding'	31	5	15	4	7	0	0	0
'Aurora'	6	1	3	4	0	0	0	0
'Tettnanger'	12	1	0	0	0	0	0	0

Legenda: OS - organogene strukture, R - regeneranti



Legenda: SG - 'Savinjski golding', AU - 'Aurora', TE - 'Tettnanger', OS - organogene strukture, R - regeneranti

Slika 9: Odstotek organogenih struktur in regenerantov iz internodijev hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' v štirih časovnih intervalih po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1390

Pri Aurori je iz 2,9% organogenih struktur nastalo 1,9% regenerantov iz okuženih internodijev z *A. t.* in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390. Pri 'Savinjskem

goldingu' se je iz 7,5% organogenih struktur regeneriralo 1,3% renerantov. Najmanj samo 0,9% regenerantov je nastalo pri 'Tettnangerju' iz kar 11,4% nastalih organogenih struktur (preglednica 7).

Preglednica 7: Število inokuliranih internodijev, nastalih organogenih struktur in regenerantov ter odstotek regeneracije hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1390

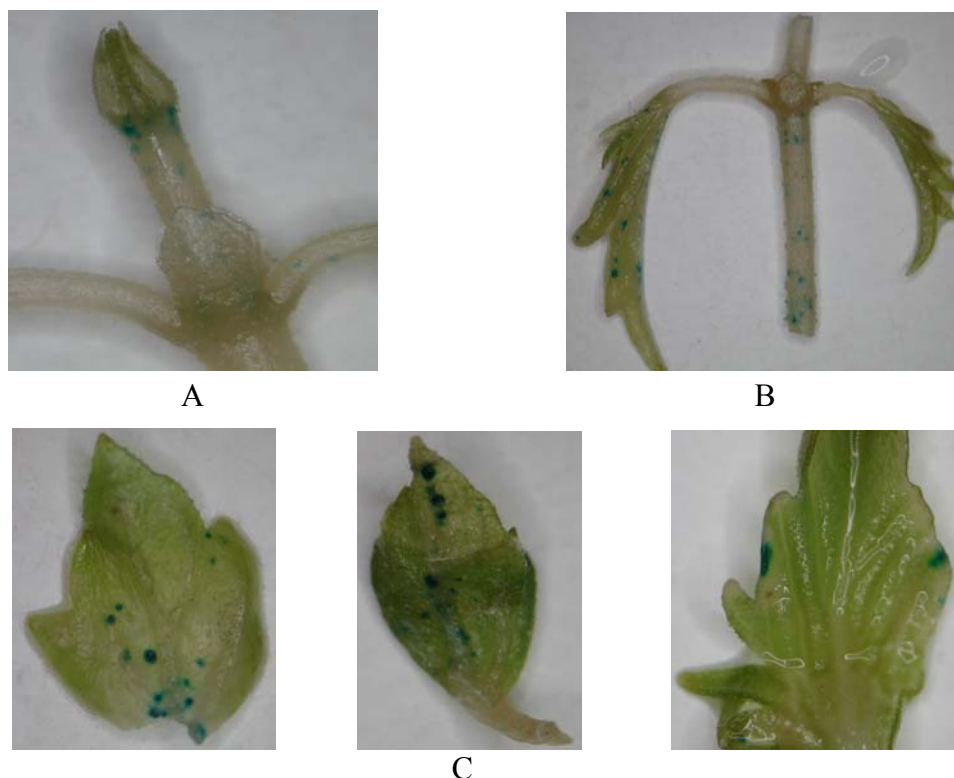
Sorta	Št. internodijev	Št. organogenih struktur	Št. regenerantov	% organogenih struktur	% regenerantov
'Savinjski golding'	709	53	9	7,5	1,3
'Aurora'	302	9	6	2,9	1,9
'Tettnanger'	105	12	1	11,4	0,9

4.2 TRANSFORMACIJA HMELJA

4.2.1 Histokemični test izražanja *gus* gena

Pokazatelj izražanja *gus* gena v genomu hmelja je značilno modro obarvanje rastlinskih celic oz. tkiv po dodatku X-Gluc barvila. Izražanje testnega *gus* gena smo preverili 110 dni po okužbi, da bi lahko potrdili stabilno, ne samo prehodno transformacijo. Ker je bil *gus* gen opremljen s CaMV35S promotorjem, smo lahko spremljali izražanje *gus* gena po celih regenerantih. Po listih, steblih in vršičkih se je *gus* gen izražal zelo točkovno (slika 10). V koreninah z GUS-testom nismo zasledili izražanje *gus* gena.

Pri vseh treh sortah je nastalo 28 regenerantov na okuženih internodijih z *A. t.* pCAMBIA1301. Vse smo v začetni fazi mikropropagacije subkultivirali na MSm gojišče s 25 mg/l higromicina. Ker so po treh tednih začeli propadati, smo jih subkultivirali na MSm gojišče brez selekcije. Pri sorti 'Savinjski golding' je nastalo 15 regenerantov, od teh so bili 4 oz. 26,7% GUS pozitivni, 3 so v nadaljnjih subkultivacijah propadli in propadlo je še 7 GUS negativnih regenerantov. Pri sorti 'Aurora' so nastali 4 regeneranti, pri katerih nismo zasledili izražanja *gus* gena z GUS-testom in od teh so 3 propadli. Pri sorti 'Tettnanger' je nastalo 9 regenerantov, 7 jih je propadlo in pri nobenem nismo zasledili izražanje *gus* gena (preglednica 5, 8 in 9).



Slika 10: Točkovno izražanje *gus* gena v tkivih hmelja 110 dni po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1301; A - rastni vršiček; B - steblo z listi; C - listi

Preglednica 8: GUS pozitivni regeneranti hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' 110 dni po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1301

Sorta	Št. regenerantov	Št. propadlih regenerantov	Št. GUS pozitivnih regenerantov	% propadlih regenerantov	% GUS pozitivnih regenerantov
'Savinjski golding'	15	10	4	66,7	26,7
'Aurora'	4	3	0	75,0	0
'Tettnanger'	9	7	0	77,8	0

4.2.2 PCR analiza transgenov

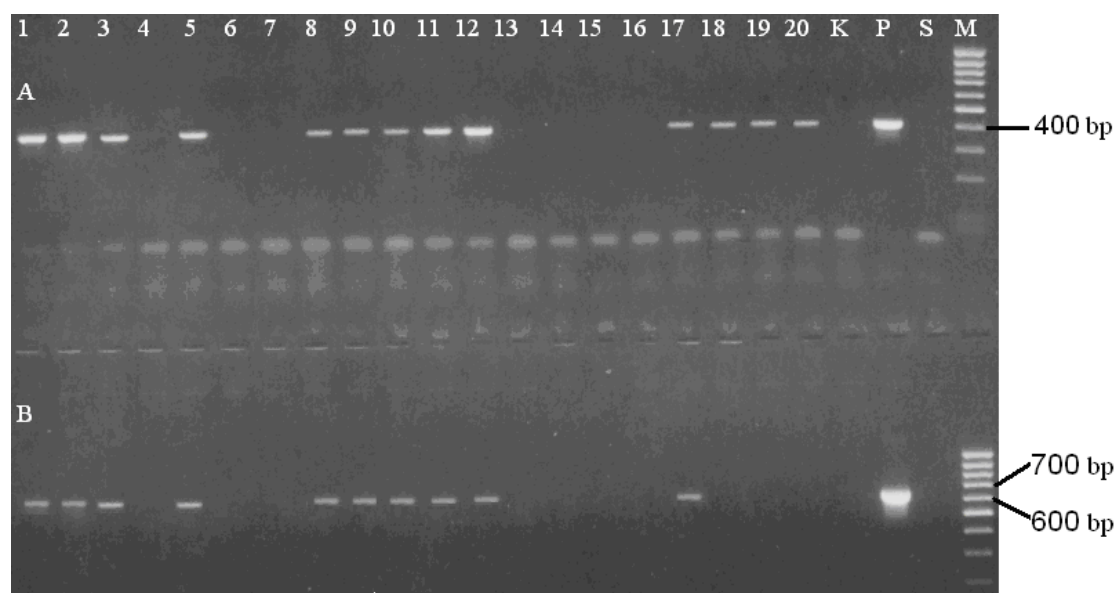
Pri mikropropagiranih rastlinah hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' je vnos transgenov uspel pri tistih, pri katerih smo s PCR analizo potrdili vključenost celotnega genskega konstrukta z *gus* in *hptII* genom oz. z *DsRed* in *hptII* genom ali samo del genskega konstrukta s posameznimi transgeni z *gus* oz. *DsRed* ali *hptII*.

Elektroforetski gel je bil sestavljen iz dveh delov A in B, ker sta bila oba genska konstrukta sestavljena iz dveh transgenov. Na zgornjo A polovico gela smo nanegli DNA vzorce s parom začetnih oligonukleotidov za *gus* gen (slika 11) oz. *DsRed* gen (slika 12, 13). Na spodnjo B polovico gela pa iste DNA vzorce s parom začetnih oligonukleotidov za *hptII* gen (slika 11, 12 in 13). Pri *DsRed* genu so se namnožili fragmenti dolžine 200 bp, pri *gus* genu 408 bp in pri *hptII* genu dolžine 641 bp (preglednica 1).

4.2.2.1 Genski konstrukt z *gus* in *hptII* genom

Na elektroforetski gel (slika 11) je bilo nanešenih 13 DNA vzorcev 5 genotipov 'Savinjskega goldinga', 1 vzorec 'Aurore' in 6 vzorcev 2 genotipov 'Tettnangerja'. Pri 'Savinjskem goldingu' sta se pri 9 rastlinah z oznako 1, 2, 3, 5, 8 - 12 oz. pri 69,2% namnožila fragmenta dolžine 408 in 641 bp in s tem smo potrdili prisotnost *gus* in *hptII* gena oz. celoten genski konstrukt. Pri 4 rastlinah z oznako 4, 6, 7 in 13 oz. pri 30,8% se noben od fragmentov ni namnožil, s katerim bi lahko potrdili prisotnost transgenov v genomu. Tudi pri DNA vzorcu 'Aurore' z oznako 14 se noben od fragmentov ni namnožil. Pri 'Tettnangerju' sta se pri eni rastlini z oznako 17 oz. pri 16,7% namnožila oba fragmenta, ki sta značilna za *gus* in *hptII* gen. Pri 3 vzorcih z oznako 18, 19 in 20 oz. pri 50% se je namnožil fragment dolžine 408 bp značilen za *gus* gen in pri 2 rastlinah z oznako 15 in 16 oz. pri 33,3% s PCR analizo nismo potrdili prisotnosti transgenov (slika 11 in preglednica 9, 10).

Znotraj genotipa z oznako 1 pri 'Savinjskem goldingu' so vse tri rastline na podlagi PCR analize imele vgrajen celoten genski konstrukt z *gus* in *hptII* genom. Pri genotipu 2 je imela od treh rastlin celoten genski konstrukt vgrajen samo ena. Pri genotipu 3 so imele tri rastline od štirih vgrajen prav tako celoten genski konstrukt. Genotip 5 je imel samo eno rastlino in ta ni bila transformirana. Prav tako je bil pri sorti 'Aurora' samo genotip 1 z eno rastlino, ki ni bila transformirana. Pri 'Tettnangerju' so genotip 1 sestavljale 4 rastline od teh je imela ena vgrajen celoten genski konstrukt in ena samo *gus* gen. Pri genotipu 2 sta bili dve rastlini in obe sta imeli vgrajen smo *gus* gen (preglednica 9).



Slika 11: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov za *gus* in *hptII* gen: 1 do 13 - 'Savinjski golding', 14 - 'Aurora', 15 do 20 - 'Tettananger', K - netransformiran hmelj, P - plazmid pCambia1301, S - slepi vzorec, M - velikostni standard; A - testni *gus* gen; B - selekcijski *hptII* gen

Preglednica 9: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCambia1301 pri mikropropagiranih genotipih hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettananger'

Sorta	Genotip rastlin	Oznaka s slike 11	Transgeni			
			<i>gus</i> + <i>hptII</i>	samo <i>gus</i>	samo <i>hptII</i>	brez
'Savinjski golding'	1	1	+			
	1	2	+			
	1	3	+			
	2	4				+
	2	5	+			
	2	6				+
	3	7				+
	3	8	+			
	3	9	+			
	3	10	+			
	4	11	+			
	4	12	+			
	5	13				+
'Aurora'	1	14				+

se nadaljuje

nadaljevanje

'Tettnanger'	1	15				+
	1	16				+
	1	17	+			
	1	18		+		
	2	19		+		
	2	20		+		

Preglednica 10: Število in odstotek transgenov pri hmelju 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' 150 dni po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1301

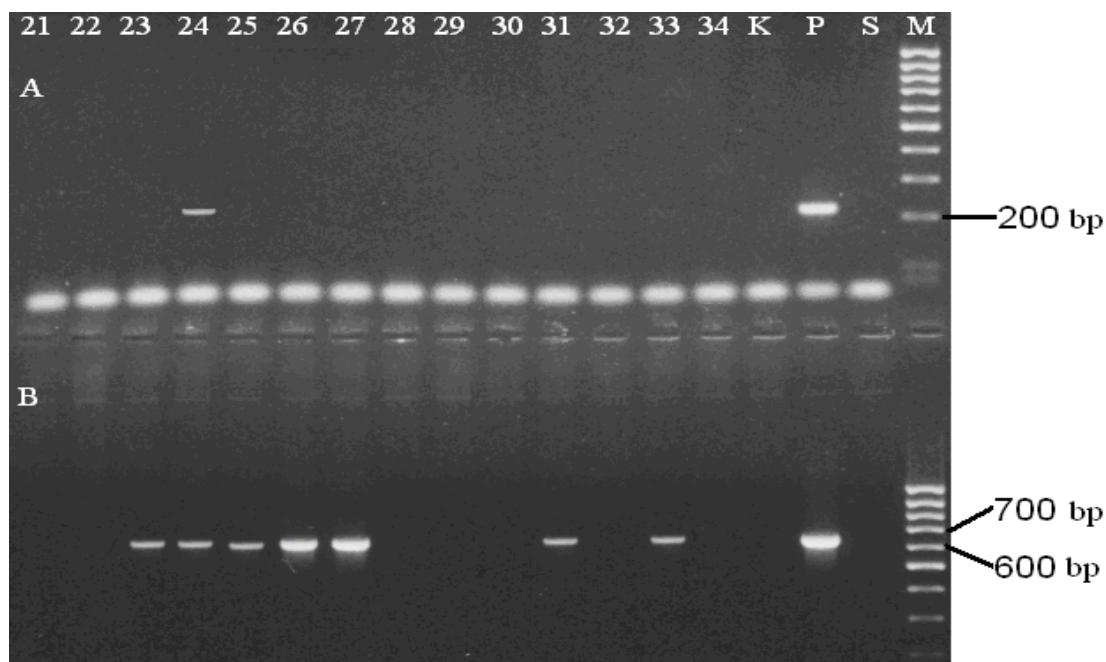
Sorta	Št. genotipov / rastlin	Transgeni							
		<i>gus</i> + <i>hptII</i>		samo <i>gus</i>		samo <i>hptII</i>		brez	
		št.	%	št.	%	št.	%	št.	%
'Savinjski golding'	5 / 13	9	69,2	0	0	0	0	4	30,8
'Aurora'	1 / 1	0	0	0	0	0	0	1	100
'Tettnanger'	2 / 6	1	16,7	3	50,0	0	0	2	33,3

4.2.2.2 Genski konstrukt z *DsRed* in *hptII* genom

Na elektroforetska gela je bilo nanešenih 14 DNA vzorcev 6 genotipov 'Savinjskega goldinga' (slika 12) in 17 DNA vzorcev 6 genotipov 'Aurore' (slika 13).

Pri 'Savinjskem goldingu' sta se pri 1 rastlini z oznako 24 oz. pri 7,1% namnožila fragmenta dolžine 200 in 641 bp in s tem smo potrdili prisotnost *DsRed* in *hptII* gena oz. celoten genski konstrukt. Pri 6 rastlinah z oznako 23, 25, 26, 27, 31 in 33 oz. pri 42,9% se je namnožil samo fragment dolžine 641 bp, s katerim smo potrdili prisotnost *hptII* gena. Pri 7 rastlinah oz. pri 50% se noben od fragmentov ni namnožil, s katerim bi lahko potrdili prisotnost transgenov v genomu (slika 12 in preglednica 11, 13).

Pri genotipu 'Savinjski golding' z oznako 1 je bila samo ena rastlina in pri tej se niso namnožili fragmenti, na podlagi katerih bi potrdili, da je transformirana. Pri genotipu 2 je imela od štirih rastlin vgrajen celoten genski konstrukt samo ena in pri dveh se je vgradil samo del genskega konstrukta s *hptII* genom. Pri genotipu 3 sta imeli obe rastlini vgrajen samo *hptII* gen. Pri genotipu 4 je imela samo ena od štirih rastlin vgrajen samo *hptII* gen. Genotip 5 je imel samo eno rastlino in ta ni bila transformirana. Genotip 6 je imel dve rastlini, pri eni je bil vgrajen samo *hptII* gen in ena ni bila transformirana (preglednica 11).



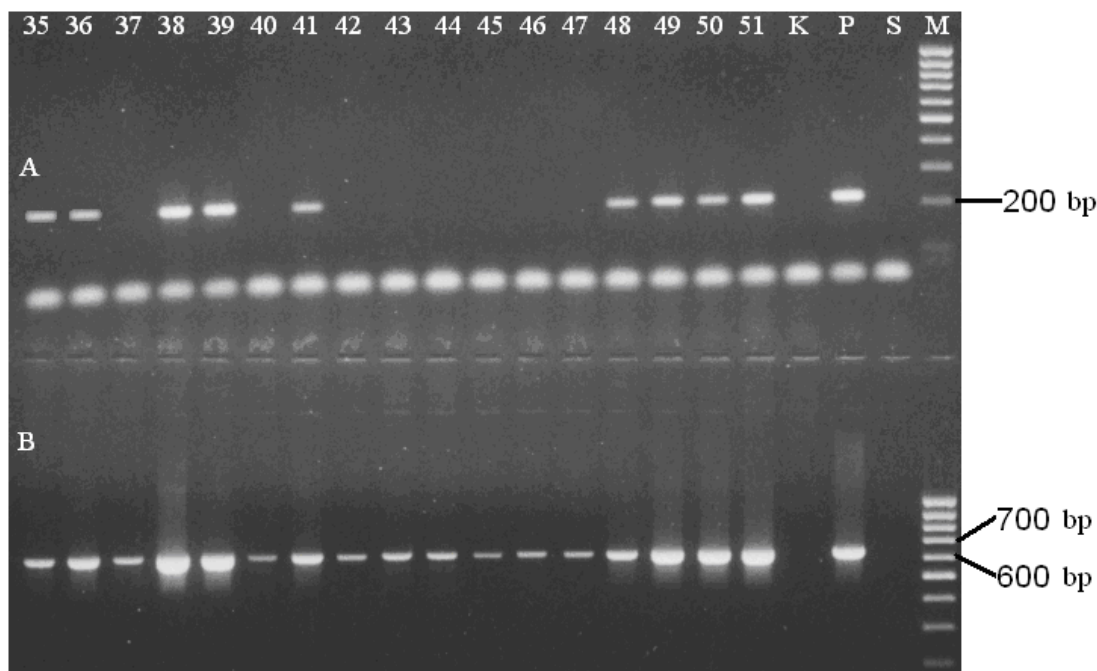
Slika 12: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov za *DsRed* in *hptII* gen: 21 do 34 - 'Savinjski golding', K - netransformiran hmelj, P - modificiran plazmid pCAMBIA1390, S - slepi vzorec, M - velikostni standard; A - testni *DsRed* gen; B - selekcijski *hptII* gen

Preglednica 11: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA1390 pri mikropropagiranih genotipih hmelja 'Savinjski golding'

Sorta	Genotip rastlin	Oznaka s slike 12	Transgeni			
			<i>DsRed</i> + <i>hptII</i>	samo <i>DsRed</i>	samo <i>hptII</i>	brez
'Savinjski golding'	1	21				+
	2	22				+
	2	23			+	
	2	24	+			
	2	25			+	
	3	26			+	
	3	27			+	
	4	28				+
	4	29				+
	4	30				+
	4	31			+	
	5	32				+
	6	33			+	
	6	34				+

Pri 'Aurori' sta se pri 9 rastlinah z oznako 35, 36, 38, 39, 41, 48 - 51 oz. pri 52,9% namnožila oba fragmenta dolžine 200 in 641 bp, ki sta značilna za *DsRed* in *hptII* gen. Pri 8 rastlinah z oznako 37, 40, 42 - 47 oz. pri 47,1% se je namnožil fragment dolžine 641 bp s katerim smo potrdili prisotnost samo *hptII* gena. Pri nobeni rastlini s PCR analizo nismo zasledili vgrajen samo *DsRed* gen (slika 13 in preglednica 12, 13).

Pri sorti 'Aurora' je genotip 1 imel tri rastline od štirih, ki so imele vgrajen celoten genski konstrukt z *DsRed* in *hptII* genom in ena rastlina je imela vgrajen samo *hptII* gen. Pri genotipu 2 sta imeli dve rastlini od štirih vgrajena oba gena *DsRed* in *hptII* in dve rastlini sta imeli vgrajen samo *hptII* gen. Vse štiri rastline genotipa 3 so imele vgrajen del genskega konstrukta s samo *hptII* genom. Pri genotipu 4 je imela ena rastlina vgrajena oba gena *DsRed* in *hptII*, medtem ko je imela ena rastlina vgrajen samo *hptII* gen. Obe rastlini genotipa 5 sta imeli vgrajen celoten genski konstrukt z *DsRed* in *hptII* genom. Pri genotipu 6 je bila samo ena rastlina in ta je imela, prav tako vgrajen *DsRed* in *hptII* gen (preglednica 12).



Slika 13: Namnoženi fragmenti DNA s pari začetnih oligonukleotidov za *DsRed* in *hptII* gen: 35 do 51 - 'Aurora', K - netransformiran hmelj, P - modificiran plazmid pCAMBIA1390, S - slepi vzorec, M - velikostni standard; A - testni *DsRed* gen; B - selekcijski *hptII* gen

Preglednica 12: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA1390 pri mikropropagiranih genotipih hmelja 'Aurora'

Sorta	Genotip rastlin	Oznaka s slike 13	Transgeni			
			<i>DsRed + hptII</i>	samo <i>DsRed</i>	samo <i>hptII</i>	brez
'Aurora'	1	35	+			
	1	36	+			
	1	37			+	
	1	38	+			
	2	39	+			
	2	40			+	
	2	41	+			
	2	42			+	
	3	43			+	
	3	44			+	
	3	45			+	
	3	46			+	
	4	47			+	
	4	48	+			
	5	49	+			
	5	50	+			
	6	51	+			

Preglednica 13: Število in odstotek transgenov pri hmelju 'Savinjski golding' in 'Aurora' 150 dni po okužbi z *A. t.* pCAMBIA1390

Sorta	Št. genotipov / rastlin	Transgeni							
		<i>DsRed + hptII</i>		samo <i>DsRed</i>		samo <i>hptII</i>		brez	
		št.	%	št.	%	št.	%	št.	%
'Savinjski golding'	14 / 6	1	7,1	0	0	6	42,9	7	50,0
'Aurora'	17 / 6	9	52,9	0	0	8	47,1	0	0

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Eden od osnovnih pogojev za uspešno transformacijo je visoka odzivnost oz. regeneracija izsečkov v *in vitro* razmerah. Zaželeno je direktna regeneracija transformiranih celic, brez vmesne faze oblikovanja kalusa. Proučevali smo regeneracijo iz internodijskih izsečkov treh sort hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'. Odzivnost oz. regeneracijo smo spremljali na neokuženih internodijih (kontrolni poskus) in na okuženih internodijih z vektorskim sistem *A. t.* sev LBA4404 v kombinaciji s plazmidom pCAMBIA1301 ali modificiranim plazmidom pCAMBIA1390.

5.1.1 Regeneracija hmelja

Kontrolni poskus z neokuženimi internodiji smo zasnovali z namenom, da v kombinaciji z okuženimi internodiji preverimo, kako vpliva na regeneracijo okužba z *A. t.* in selekcijski antibiotik higromicin 25 mg/l ter timentin 150 mg/l za preprečitev rasti *A. t.*. Kalusno tkivo je začelo rasti, ne glede na sorto 8 - 10 dni po inokulaciji na koncih internodijev oz. reznih ploskvah (slika 5A, B in C). Po 2 - 3 tednih so bili internodiji prekriti v celoti s kalusom. Po 2 tednih se je začela regeneracija prvih organogenih struktur oz. globul (slika 5D). Direktno regeneracijo nismo opazili. Po 3 - 4 tednih so se začeli pojavljati prvi regeneranti (slika 5E in F). Na okuženih internodijih z *A. t.*, ne glede na kombinacijo plazmida, se je kalus oblikoval počasneje in manj ga je nastalo kot pri neokuženih internodijih.

Največ 30,4% regenerantov je nastalo na neokuženih internodijih sorte 'Tettnanger'. Iz skoraj vseh nastalih organogenih struktur (31,0%) so se razvili regeneranti. Pri sorti 'Savinjski golding' je nastalo 40,3% organogenih struktur in samo 16,6% regenerantov, to je 2,4 krat manj, kot nastalih organogenih struktur. Najmanj samo 3,9% regenerantov je nastalo pri sorti 'Aurora' iz 26,6% nastalih organogenih struktur, to je kar 6,8 krat manj, kot nastalih organogenih struktur (preglednica 3 in slika 7). Vse tri sorte so imele zelo različno regeneracijo iz internodijskih izsečkov in ponovljivost je bila močno variabilna. Tudi Batista in sod. (1996); Gurriarán in sod. (1999) ter Ferant in sod. (2001) poročajo o razlikah v regeneracijski sposobnosti med različnimi genotipi in o problemih stabilne regeneracije.

Pri sorti 'Aurora' je nastalo največ 42,9% regenerantov že v 45 dneh po inokulaciji internodijev na MSr gojišče. Pri 'Savinjskem goldingu' je nastalo 62,6% regenerantov v 60 dneh po inokulaciji internodijev in v enakem obdobju je nastalo pri 'Tettnangerju' kar 66,7% regenerantov (preglednica 2 in slika 6). V obdobju 45 do 60 dni po inokulaciji je nastalo največ regenerantov pri vseh treh sortah. V 60 do 90 dneh je odstotek novo nastalih

regenerantov močno padel oz. se je začelo pri internodijih staranje kulture in propadanje kalusa.

Na okuženih internodijih z *A. t.* pCAMBIA1301 sorte 'Tettnanger' je nastalo 12% organogenih struktur, iz katerih se je regeneriralo 18,0% regenerantov. Pri sorti 'Savinjski golding' se je oblikovalo 8,6% organogenih struktur in 6,5% regenerantov. Najmanj, samo 0,8% regenerantov je nastalo pri sorti 'Aurora' iz 1,2% organogenih struktur (preglednica 5).

Pri sorti 'Aurora' je iz 2,9% organogenih struktur nastalo 1,9% regenerantov iz okuženih internodijev z *A. t.* in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390. Pri sorti 'Savinjski golding' se je iz 7,5% organogenih struktur regeneriralo 1,3% regenerantov. Najmanj samo 0,9% regenerantov je nastalo pri sorti 'Tettnanger' iz kar 11,4% nastalih organogenih struktur (preglednica 7).

Odstotek nastalih regenerantov po okužbi z *A. t.*, ne glede na kombinacijo plazmida, je zelo padel pri vseh sortah. Okužba in sami postopki (ultrazvok 60 sekund, vakuum 10 min), ki smo jih vključili v postopek transformacije, z namenom izboljšati vnos genov, so negativno vplivali na uspeh regeneracije. Zelo pomembno je, da je regeneracija visoka in stabilna.

5.1.2 Transformacija hmelja

V MSr gojišče smo dodali acetosiringon, ki pospešuje okužbo in izrez T-DNA iz plazmida (Sunilkumar in sod., 1999). Naš namen je bil vključiti čim več dejavnikov, ki bi izboljšali odstotek transformiranih rastlin. To smo hoteli doseči s kombinacijo ultrazvoka, ki razrahlja celične stene in vakuuma, ki omogoči hitrejšo infiltracijo transgenov. Za preprečitev rasti *A. t.* smo dodali v MSr in MSm gojišče 150 mg/l antibiotika timentina, kateri je uspešno in hitro zavrl rast bakterije. Na internodijih, kalusu in regenerantih ni bilo vidnih poškodb, ki bi jih povzročil timentin. Nasprotno, opazili smo, da so bili regeneranti na gojišču s timentinom zelo vitalni in zeleni. O podobnem učinku timentina na rastline poročajo Cheng in sod. (1998).

Fenotipsko izražanje *gus* gena smo spremljali v vseh delih regenerantov z GUS-testom 110 dni po okužbi internodijev z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301, da bi potrdili stabilno transformacij, ne samo prehodno. V listih, steblih in vršičkih regenerantov se je izražal *gus* gen zelo točkovno (slika 10). V koreninah z GUS-testom nismo zasledili izražanja *gus* gena. Pri vseh treh sortah je nastalo po okužbi internodijev 28 regenerantov, ki so po treh tednih na selekcijskem MSm gojišču s 25 mg/l higromicina začeli propadati. Nato smo jih subkultivirali na MSm gojišče brez higromicina. Po nekaj dneh se je pri večini

regenerantov bledenje listov ustavilo in novo nastali listi ter stranski poganjki so bili normalno zeleni. Nekaj regenerantov je propadlo.

Pri sorti 'Savinjski golding' je nastalo 15 regenerantov, od teh so bili 4 oz. 26,7% GUS pozitivni, 3 so v nadaljnjih subkultivacijah propadli in propadlo je še 7 GUS negativnih regenerantov. Pri sorti 'Aurora' so nastali 4 regeneranti pri katerih nismo zasledili izražanja *gus* gena z GUS-testom in od teh so 3 propadli. Pri sorti 'Tettnanger' je nastalo 9 regenerantov, 7 jih je propadlo in pri nobenem nismo zasledili izražanje *gus* gena (preglednica 5, 8 in 9).

Na molekulskem DNA novoju smo s PCR analizo pri mikropropagiranih regenerantih oz. rastlinah spremljali vgraditev transgenov *gus*, *DsRed* in *hptII* v genom hmelja 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger'.

Celoten genski konstrukt oz. T-DNA plazmida pCAMBIA1301 z *gus* in *hptII* genom se je pri 69,2% rastlin 'Savinjskega goldinga' vgradil v genom, kar smo potrdili z namnoženo dolžino fragmentov 408 in 641 bp za *gus* in *hptII* gen. Pri 30,8% rastlin se je namnožil samo fragment dolžine 641 bp, s katerim smo potrdili vgraditev samo *hptII* gena. Pri sorti 'Aurora' je samo en regenerant preživel in pri tem se noben od fragmentov ni namnožil, s katerim bi lahko potrdili, da je transformiran. Pri 'Tettnangerju' sta se pri 16,7% rastlin namnožila oba fragmeneta, s katerima smo potrdili prisotnost *gus* in *hptII* gena oz. celotni genski konstrukt. Kar 50% rastlin je imelo vgrajen samo *gus* gen in pri 33,3% rastlin se noben od fragmentov ni namnožil, s katerim bi lahko potrdili, da so te rastline transformirane. Vgraditev samo *hptII* gena nismo zasledili. Pri 'Savinjskem goldingu' je selekcijo in nadaljnje subkultivacije preživel 5 regenerantov oz. genotipov z različnim številom mikropropagiranih rastlin, za katere je predviden enak genotip. Pričakovali smo, da bodo vse rastline znotraj genotipa vsebovale oz. ne bodo vsebovale določen transgen. Vendar smo s PCR analizo in namnoženimi fragmenti značilnimi za posamezni transgen ugotovili, da rastline znotraj genotipa ne vsebujejo vedno vseh oz. enake transgene iz genskega konstrukta (preglednica 9, 10 in slika 11).

Celoten genski konstrukt oz. T-DNA modificiranega plazmida pCAMBIA1390 z *DsRed* in *hptII* genom se je samo pri eni rastlini 'Savinjskega goldinga' z oznako genotipa 2, vgradil v genom, kar smo potrdili z namnoženimi fragmenti dolžine 200 in 641 bp. Pri 42,9% rastlin se je namnožil samo fragment dolžine 641 bp s katerim smo potrdili vgraditev samo *hptII* gena. Kar 50% rastlin v genomu ni imelo dokazanih transgenov oz. je bilo netransformiranih. Pri sorti 'Aurora' je imelo kar 52,9% rastlin prisotna oba fragmenta, torej celoten genski konstrukt in 47,1% rastlin je imelo vgrajen samo *hptII* gen. Vgraditev samo *DsRed* gena nismo zasledili ne pri 'Savinjskem goldingu' in ne pri 'Aurori'. Pri Savinjskem goldingu in tudi pri 'Aurori' je selekcijo in nadaljnje subkultivacije preživel 6 regenerantov oz. genotipov z različnim številom mikropropagiranih rastlin. Tudi pri teh

smo predvidevali, da bodo mikropropagirane rastline znotraj genotipa, glede transgenov popolnoma enake. Vendar smo, tako kot pri konstrukt iz plazmida pCAMBIA1301, s PCR analizo in namnoženimi fragmenti značilnimi za posamezni transgen ugotovili, da ni nujno, da so glede transgenov rastline znotraj genotipa enake (preglednica 11, 12, 13 in slika 12, 13).

Možna razlaga je lahko, da pri prenosu biološke informacije ob delitvi celic endonukleaze prepoznajo transgene sekvence, kot tujek in jih izrežejo iz DNA molekule. Ob končani mitotizi ob takem dogotku vse hčerinske celice ne vsebujejo transgen oz. transgenov. Tako lahko nastanejo regeneranti, katerih celice določenega tkiva ne vsebujejo transgenov. Z mikropropagacijo lahko razmnožimo rastline z oz. brez transgenov. Tudi točkovno izražanje *gus* gena lahko nakazuje na to. Pri nekaterih rastlinskih vrstah je to zelo pogosto (Santarém in sod., 1998; Finer K.R. in Finer J.J., 2000).

Pri nekaterih regenerantih smo na DNA nivoju potrdili vgraditev *gus* in *hptII* gena, venadar se fenotipsko nista izražala. Transformiran *gus* gen ni sintetiziral encima β -glukuronidaze, kateri bi lahko razgradil komponente X-Gluc raztopine in modro obarvanega produkta nismo zasledili. Ravno tako regeneranti z vgrajenim *hptII* genom niso bili sposobni razgraditi prisoten higromicin v MSm gojišču. Listi so se po treh tednih povsesili, začeli rumeneti in konice so se vihale navznoter ter rastline so nehale rasti. O podobnih rezultatih poročajo tudi Yao in sod. (1995) na jablani, Hiei in sod. (1997); Kohli in sod. (1999) na rižu ter Mercuri in sod. (2000) na afriški vijolici. Ti avtorji so kljub negativnemu fenotipskemu izražanju transgena s hibridizacijo (Hiei in sod., 1997) oz. s PCR analizo (Yao in sod., 1995; Mercuri in sod., 2000) potrdili prisotnost tako testnega kot selekcijskega gena.

GUS pozitivni poganjki hmelja niso bili sposobni razgraditi higromicina v gojišču in normalno rasti. Pri nekaterih smo s PCR analizo dokazali, da niso imeli vgrajen *hptII* gen, ki bi jim omogočal razgraditi higromicin. Pri nekaterih se je namnožil fragment dolžine 641 bp s katerim smo potrdili prisotnost *hptII* gena, vendar so tudi ti propadali na selekcijskem gojišču. Možna razlaga je, da se je vgradil na mesto v genomu, ki ni kodirajoče oz. se ne prepisuje, lahko je prišlo do mutacij (delecij, insercij oz. preureditev genov). Neizražanje transgena je lahko posledica vgradnje tuje DNA v območje rastlinskega kromosoma, ki je transkripcijsko neaktivno, zaradi mutacij ali utišanja genov. O multiplih insercijah, preureditvah ali delecijah v integriranih tujih genih poročajo pri manjšem številu transformiranih rastlin Hiei in sod. (1997); Kohli in sod. (1999) za riž, Yao in sod. (1995) za jablano, Mercuri in sod. (2000) za afriško vijolico, Atkinson in Gardner (1991) za *Solanum muricatum* in ista avtorja (1993) za tamarilo. Do utišanja genov lahko pride na transkripcijski ali postranskripcijski ravni in je podobno naravni obrambi rastline pred virusi (Ratcliff in sod., 1997; Britt in May, 2003). Na transkripcijski ravni se prepreči izražanje genov večinoma zaradi homologije med sekvencami transgenov

in endogenov. Pri postranskripcijskem utišanju pa deluje mehanizem razgradnje prepisane transgene RNA (Mondal in sod., 1997). Nekaj regenerantov je propadlo brez znanega vzroka, tako kot propade določen odstotek rastlin v postopku mikropropagacije. Zaradi propadanja regenerantov so bili ti subkultivirani na MSm gojišče brez higromicina.

Ugotovili smo, da je antibiotik higromicin (25 mg/l) za hmelj zelo močan selekcijski agens. Pravilno izbrana koncentracija selekcijskega agensa mora preprečiti regeneracijo netransformiranih rastlin, hkrati pa mora čim bolj zmanjšati število netransformiranih regenerantov, ki se razvijejo na transformiranih izsečkih zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic (Park in sod., 1998). Uporabljena koncentracija 25 mg/l higromicina je povzročila poškodbe tudi transformiranega tkiva, razbarvanja, bolj ali manj obsežne lezije in propad regenerantov, kljub temu, da so dokazano s PCR metodo imeli vgrajen transgen. Higromicin je antibiotik, na katerega je večina rastlinskih tkiv (eno- in dvokaličnic) bolj občutljiva kot na kanamicin (Wilmink in Dons, 1993).

Učinkovitost transformacije je močno odvisna od izbora seva *A. t.* in kombinacije plazmida, rastlinske vrste oz. sorte ter postopkov vnosa genov. Nekatere rastlinske vrste oz. posamezni genotipi, med njimi je tudi hmelj, so slabo odzivni v tkivni kulturi, kar dodatno otežuje transformacije (Hiei in sod., 1997).

5.2 SKLEPI

Ne glede na proučevane sorte se je začelo kalusno tkivo na internodijskih izsečkih formirati 8 - 10 dni po inokulaciji. Po 2 - 3 tednih so bili internodiji v celoti kalusirani. Regeneracija organogenih struktur se je začela po 2 tednih in po 3 - 4 tednih so začeli nastajati prvi regeneranti. Direktne regeneracije nismo zasledili.

Odstotek organogenih struktur, regenerantov in obdobje nastanka so bili odvisni od sorte. Največ regenerantov je nastalo pri vseh treh sortah v 45 do 60 dneh po inokulaciji internodijev na MSr gojišče. Po 60 dneh se je regeneracija ustavila in na internodijih so se začeli pojavljati znaki staranja kulture.

Pri 'Tettnangerju' je nastalo največ kar 30,4% regenerantov, 'Savinjskem goldingu' 16,6% in pri 'Aurori' najmanj samo 3,9% regenerantov.

Iz skoraj vseh nastalih organogenih struktur pri 'Tettnangerju' so nastali regeneranti. Pri 'Savinjskem goldingu' je nastalo 2,4 krat manj in pri 'Aurori' kar 6,8 krat manj regenerantov kot organogenih struktur.

Pri vseh treh sortah so imele organogene strukture in regeneranti značilno obliko. Na internodijih 'Tettnangerja' so nastali večji organogeni skupki, iz katerih je nastalo tudi več regenerantov. Pri 'Savinjskem goldingu' so bili skupki manjši in vse globularne strukture znotraj skupka se niso regenerirale. Za 'Auroro' so bile značile posamezne majhne organogene strukture s posameznimi globulami, iz katerih so nastajali posamezni regeneranti. Veliko struktur pri 'Aurori' je ostalo samo v fazi globul.

Odstotek regeneracije se je po transformaciji internodijev, ne glede na sorto, bistveno znižal. Po okužbi z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301 je nastalo samo 18% regenerantov pri 'Tettnangerju', 6,5% pri 'Savinjskem goldingu' in 0,8% pri 'Aurori'. Po okužbi z *A. t.* in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390 je nastalo 1,9% regenerantov pri 'Aurori' in 1,3% pri 'Savinjskem goldingu' ter samo 0,9% pri 'Tettnangerju'.

Izražanje *gus* gena smo zasledili samo pri 26,7% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in to v listih, steblih in vršičkih, ne pa v koreninah. Pri regenerantu 'Aurore' in pri dveh regenerantih 'Tettnangerja' se *gus* gen ni izražal.

Na DNA nivoju smo dokazali vgraditev celotnega genskega konstrukta z *gus* in *hptII* genom pri 69,2% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in 30,8% regenerantov ni imelo vgrajen transgen. Pri 'Aurori' je nastal samo en regenerant, ki ni imel dokazanih transgenov. Pri 'Tettnangerju' je imelo 16,7% regenerantov vgrajen *gus* in *hptII* gen, medtem ko je imelo kar 50% vgrajen samo *gus* gen in 33,3% ni imelo vgrajenih transgenov.

Po okužbi z *A. t.* in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390 je imelo 7,1% regenerantov 'Savinjskega goldinga' vgrajen *DsRed* in *hptII* gen in 42,9% je imelo samo *hptII* gen ter kar 50% je bilo netransformiranih. Pri 'Aurori' je imelo 52,9% regenerantov vgrajen celoten genski konstrukt in 47,1% je imelo vgrajen samo *hptII* gen. Regenerantov z vgrajenim samo *DsRed* genom ni bilo. Vsi regeneranti 'Tettnangerja' so propadli.

Uspešnost transformacije je bila odvisna od sorte in kombinacije vektorskega sistema *A. t.* sev LBA4404 in plazmida pCAMBIA1301 oz. modificiranega plazmida pCAMBIA1390.

Antibiotik timentin 150 mg/l je popolnoma preprečil rast *A. t.*. Tri mesece po transformaciji ga v selekcijsko MSm gojišče nismo več dodajali in kultura regenerantov je bila popolnoma brez *A. t.*.

Selekcijski antibiotik higromicin v koncentraciji 25 mg/l je bil premočen oz. neustrezen agens za selekcijo netransformiranih celic oz. regenerantov hmelja.

6 POVZETEK

Metoda vnosa genov oz. transformacija omogoča uporabo širšega genskega fonda, natančnejše delo in hitrejšo vzgojo novih sort z želenimi lastnostmi v primerjavi z metodami obstoječega žlahtnjenja rastlin. Tehnike genskega inženiringa omogočajo spremembo obstoječih lastnosti, vključevanje novih lastnosti v že obstoječe sorte, spremljanje izražanja vnesenih genov na molekulski ravni oz. na nivoju genotipa in tudi fenotipsko. Eden od osnovnih pogojev za uspešno transformacijo je zadovoljiv odstotek regeneracije. Nekatere rastlinske vrste so slabo odzivne oz. imajo nizko regeneracijo, med njimi je tudi hmelj (*Humulus lupulus* L.).

V naši nalogi smo opravili študijo posrednega vnosa genov z *A. t.* v genom hmelja. Pri čemer smo želeli ugotoviti, če obstajajo razlike v uspešnosti regeneracije in transformacije internodijev med tremi sortami 'Savinjski golding', 'Aurora' in 'Tettnanger' po transformaciji z *A. t.* sev LBA4404 in plazmidom pCAMBIA1301 in modificiranim plazmidom pCAMBIA1390. Izražanje genov je bilo pod kontrolo CaMV35S promotorja, ki omogoča, da se produkt genov lahko izrazi po celi rastlini.

Regeneracijo neokuženih internodijev smo spremljali z namenom, da v primerjavi z okuženimi internodiji preverimo, kako vpliva okužba z *A. t.* in selekcijski antibiotik higromicin 25 mg/l ter timentin 150 mg/l za preprečitev rasti *A. t.* na regeneracijo. Kalusno tkivo je začelo rasti, ne glede na sorto 8 - 10 dni po inokulaciji na koncih internodijev oz. reznih ploskvah (slika 5A, B in C). Po 2 tednih se je začela regeneracija prvih organogenih struktur oz. globul (slika 5D). Direktne regeneracije nismo opazili. Po 3 - 4 tednih so se začeli pojavljati prvi regeneranti (slika 5E in F). Na okuženih internodijih z *A. t.*, ne glede na kombinacijo plazmida, se je kalus oblikoval počasneje in manj ga je nastalo kot pri neokuženih internodijih.

Največ 30,4% regenerantov je nastalo na neokuženih internodijih sorte 'Tettnanger'. Iz skoraj vseh nastalih organogenih struktur so se razvili regeneranti. Pri sorti 'Savinjski golding' je nastalo 16,6% regenerantov, to je 2,4 krat manj, kot nastalih organogenih struktur. Najmanj samo 3,9% regenerantov je nastalo pri sorti 'Aurora', kar 6,8 krat manj, kot nastalih organogenih struktur (preglednica 3 in slika 7). Vse tri sorte so imele zelo različno regeneracijo iz internodijskih izsečkov. Največ regenerantov je nastalo v 45 do 60 dneh po inokulaciji internodijev. Po 60 dneh je odstotek novo nastalih regenerantov močno padel oz. se ustavil.

Internodije velikosti približno 1 cm smo pustili 10 min v bakterijski suspenziji, nato 1 min izpostavili ultrazvoku in 10 min vakuumu ter pustili še 10 min v bakterijski suspenziji. Internodije smo zračno osušili na sterilnem filterskem papirju v brezprašni komori in jih kokultivirali štiri dni na MSr gojišču z dodatkom 100 μ M acetosiringonom. Nato smo

bakterijsko kolonijo sprali z 200 mg/l timentina in jih inokulirali na MSr gojišče z 150 mg/l timentina za preprečitev rasti *A. t.*. Gojili smo jih v rastni komori pri fotoperiodi 16 ur svetlobe, 6 ur teme in temperaturi 23 ± 1 °C ter osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nastale regenerante smo subkultivirali na MSm gojišče s 150 mg/l timentina in 25 mg/l higromicina. Po treh tednih so se začele pojavljati na regenerantih nekroze (razpad klorofila), ki smo jih pripisali higromicinu. Zato smo regenerante subkultivirali na MSm gojišče brez higromicina.

Na okuženih internodijih z *A. t.* pCAMBIA1301 sorte 'Tettnanger' je nastalo 18% regenerantov, pri sorti 'Savinjski golding' 6,5% in samo 0,8% pri 'Aurori' (preglednica 5). Po okužbi internodijev z *A. t.* pCAMBIA1390 je pri 'Aurori' nastalo 1,9% regenerantov, pri 'Savinjskem goldingu' 1,3% in pri 'Tettnangerju' samo 0,9% regenerantov (preglednica 7).

Aktivnost vnesenega *gus* gena iz genskega konstrukta pCAMBIA1301 smo preverili s histokemičnim testom (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994). Modro so se obarvale celice in deli regenerantov, ki so imeli aktiven *gus* gen. Te smo upoštevali kot uspešno transformirane regenerante hmelja. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je bila sorta 'Savinjski golding' najprimernejša za okužbo z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301, saj je bilo 26,7% GUS pozitivnih regenerantov. Pri sorti 'Aurora' in 'Tettnanger' ni bilo GUS pozitivnih regenerantov oz. fenotipskega izražanja *gus* gena (slika 10 in preglednica 8). Na DNA nivoju so se namnožili fragmenti dolžine 408 in 641 bp, s katerimi smo potrdili vgraditev celotnega genskega konstrukta pri 69,2% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in 30,8% regenerantov ni imelo dokazan transgen. Pri 'Tettnangerju' sta se namnožila oba fragmenta pri 16,7% regenerantov, 50% je imelo namnožen fragment dolžine 408 bp značilen za *gus* gen in pri 33,3% regenerantov se noben od fragmentov ni namnožil, s katerima bi lahko potrdili prisotnost transgenov (slika 11 in preglednica 9, 10).

Transgene z modificiranega genskega konstrukta pCAMBIA1390 smo spremljali na DNA nivoju in ugotovili, da so se fragmenti dolžine 200 in 641 bp značilni za *DsRed* in *hptII* gen namnožili pri 7,1% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in 52,9% regenerantov 'Aurore'. Fragment dolžine 641 bp značilen za *hptII* gen je bil prisoten pri 42,9% regenerantov 'Savinjskega goldinga' in pri 47,1% regenerantov 'Aurore'. Pri 50% regenerantov 'Savinjskega goldinga' se noben od fragmentov ni namnožil s katerim bi lahko potrdili prisotnost transgenov. Pri obeh sortah nismo zasledili fragment dolžine 200 bp, s katerim bi lahko potrdili vgraditev *DsRed* gena (slika 12, 13 in preglednica 11, 12, 13).

Tako smo s PCR analizo za transformirane regenerante šteli tiste, kjer so se namnožili specifični DNA fragmenti dolžine 200, 408 in 641 bp. S katerimi smo lahko potrdili, da je v genom vključen ali celoten genski konstrukt z *DsRed* oz. *gus* v kombinaciji s *hptII* genom ali samo posamezni transgen.

Pri nekaterih regenerantih, ki so slabo rasli oz. so propadali na selekcijskem gojišču, smo s PCR analizo dokazali prisotnost *hptII* gena. Ti regeneranti potrjujejo trditev, da je pri njih prišlo do utišanja *hptII* gena, saj niso bili sposobni razgraditi higromicina v gojišču, da bi nemoteno rasli.

7 VIRI

- Atkinson R.G., Gardner R.C. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation of pepino and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 10: 208-212.
- Atkinson R.G., Gardner R.C. 1993. Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell Reports*, 12: 347-351.
- Baričevič D. 1996a. Priročnik za ciklus predavanj pridelovanje zdravilnih rastlin I. del Ljubljana, Samozaložba: 15 str.
- Baričevič D. 1996b. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti- surovina rastlinskih sekundarnih pripravkov. Ljubljana, Samozaložba: 81 str.
- Batista D. Sousa M.J., Pais M.S. 1996. Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Braganca and var. Brew's Gold. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 32: 37-41.
- Batista D. Ascensão L., Sousa M.J., Pais M.J. 2000. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures. *Plant Science*, 151: 47-57.
- BD Biosciences Clontech, Product Catalog. 2004. Faulds M. (ur.), Palo Alto, California, USA: 145.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Britt A.B., May G.D. 2003. Re-engineering plant gene targeting. *Trends in Plant Science*, 8, 2: 90-95.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263-271.
- Connell S.A., Heale, J.B. 1986. Development of an in vitro selection system for novel sources of resistance to Verticillium wilt in hops. V: Withers, L., Anderson, P.G. (ur). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. London, Butterworth: 457-459.
- Cheng Z.M., Schnurr J.A., Kapaun J.A. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*, 17: 646-649.
- Deblaere R., Reynaerts A., Höfte H., Hernalsteens J.P., Leemans J., VanMontagu M. 1987. Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology*, 153: 277-292.
- Ferant N., Javornik B., Luthar Z. 2001. Regeneracija hmelja (*Humulus lupulus* L.) pri cv. Aurora. *Hmeljarski bilten*, 8: 19-25.
- Finer K.R., Finer J.J. 2000. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 5: 406-410.
- Fisher D.K., Gultinan M.J. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 3: 278-289.

- Gurriarán M.J., Revilla M.A., Tames, R.S. 1999. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brevers Gold and Nugget. Plant Cell Reports, 18: 1007-1011.
- Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Molecular Biology, 25 (6): 989-994.
- Haseloff J., Amons B. 1955. GFP in plants. Trends in Genetics, 11: 328-329.
- Haunold A. 1991. Cytology and cytogenetics of hops. V: Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B. Tsuchiya T., Gupta P.K. (eds). Elsevier Science Publishers: 551-563.
- Heale J.B., Legg, T., Connell, S. 1989. *Humulus lupulus* L. (Hop): *in vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance. V: Bajaj, Y.P.S. (ur.) Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Springer, Heidelberg New York: 264-285.
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. Aquide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends in Plant Science, 5, 10: 446-451.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant Journal, 6, 2: 271-282.
- Hiei Y., Komari T., Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology, 35: 205-218.
- Horlemann C., Schwekendiek A., Höhnle M., Weber G. 2003. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 22: 210-217.
- Hmelj. 2003. Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano.
<http://www.mkgp.gov.si/index.php?id=1148> (20.8.2006).
- Hmeljarstvo v Sloveniji. 2006. Hmlejarsko združenje.
http://www.hmelj-giz.si/mp_pri.htm (10.8.2006).
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 227: 1229-1231.
- Innis M.A., Gelfand D.H. Sninsky J.J., White T.J. 1990. PCR Protocols. Academic Press, Inc., San Diego: 482 str.
- Jach G., Binot E., Frings S., Luxa K., Schell J. 2001. Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp (dsRED) as a reporter for plant gene expression. The Plant Journal, 28: 483-491.
- Jakše J. 2000. Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja (*Humulus lupulus* L.) z mikrosatelitskimi markerji. Magistersko delo Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 89 str.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: β -glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal, 6,13: 3901-3907.

- Kohli A., Gahakwa D., Vain P., Laurie D. A., Christou P. 1999. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 208: 88-97.
- Košir I. 1995. Kemizem in analitika hmelja. *Hmeljarski bilten*, 4: 73-83.
- Kralj D., Wagner T. 1971. Prve slovenske sorte hmelja. *Sodobno kmetijstvo*, 9, 7-8: 408-441.
- Kralj D. 1972. Ugotavljanje sorodnosti med sortami hmelja (*Humulus lupulus*) Savinjski golding, Fuggles in Erly bird golding. *Hmeljarski bilten*, 2: 65-75.
- Kralj D. 1975. Lastnosti hmeljnih sort v kolekciji inštituta za hmeljarstvo v Žalcu. *Hmeljarski bilten*, 3, 46-79.
- Kralj D., Wagner T. 1980. Novi slovenski kultivarji hmelja - Bobek, Blisk, Buket. *Sodobno kmetijstvo*, 13, 7-8: 281-286.
- Kralj D., Sušnik F. 1983. Germplasm transfer in hops.- *Genetika*, 15,3, 313-323.
- Kralj D. 1990. Novi hmeljarski kultivarji: Cerera, Celeia, Cekin in Cicero. *Hmeljar*, 3: 3.
- Kralj D., Friškovec I. 1993. Hmeljni kultivarji v Sloveniji. *Hmeljar*, 63, 23-28.
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo*, 59: 63-66.
- Lakshmi Sita G., Sreenivas G.L., Bhattacharya A. 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4, 3-4: 189-195.
- Mercuri A., De Benedetti L., Burchi G., Schiva T. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of African violet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 39-46.
- Moir M. 2000. Hops - a millenium review. *American Society of Brewing Chemists*, 58: 131-146.
- Motegi T. 1979. Differentiation of shoots from hop stem callus culture. *Kyoyubo kenkyu Neupo Iwate Ika Daigaku*, 14: 15-17.
- Mondal T.K., Kundu P.K., Ahuja P.S. 1997. Gene silencing: a problem in transgenic research. *Current Science*, 72, 10: 699-700.
- Murakami A. 2003. Molecular evolution of hops, *Humulus lupulus*. V: *Proceedings of the scientific commission, Dobrna-Žalec, Slovenia, 24-27 june 2003*. Seigner E. (ed.). Dobrna-Žalec, International Hop Growers' Convention: 92-96.
- Murashige T., Skoog H. 1962. A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
- Neve R.A. 1961. Hops. Sex determination in the cultivated hop *Humulus lupulus*. Ph.D.thesis, London. University of London: 120 str.
- Neve R.A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant and Cell Physiology*, 31, 6: 805-813.

- Okada Y., Seaki K., Inaba A., Suda N., Kaneko T., Ito K. 2003. Construction of a gene expression system in hop (*Humulus lupulus* L.) lupulin gland using valerophenone synthase promoter. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1101-1108.
- Oriniaková P., Pavingerova D., Matoušek J. 1999. Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. *Rostlinna Výroba*, 45: 219-227.
- Park S.H., Rose S.C., Zapata C., Srivatanakul M., Smith R.H. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 34, 2: 117-121.
- Peacock V.E., Deinzer, M.L., Likens S. T., Nickerson, G.B., McGill L.A. 1981. Floral hop aroma in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 1265-1269.
- Peppard T. L. 1981. Volatile organosulphur compounds in hops and hop oils. A review. *Journal of the institute of Brewing*, 87, 11-12: 376-385.
- Peppard T.L., Ramus S.A., Witt C.A., Siebert K.J. 1989. Correlation of sensory and instrumental data in elucidating the effect of varietal differences of hop flavour in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 47, 1: 18-26.
- Perani L., Radke S., Wilke-Douglas M., Bossert M. 1986. Gene transfer methods for crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. *Physiologia Plantarum*, 68: 566-570.
- Petauer T. 1993. *Leksikon rastlinskih bogastev*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 683 str.
- Piston D.W., Nathan C.S., Scott G.O., Davidson M.W. 2004. The Fluorescent Protein Color Palette.
<http://www.olympusfloview.com/applications/images/fpcolorpalettefigure9.jpg>
(5.7.2006).
- Rakouský S., Matoušek J. 1994. Direct organogenesis in hop - a prerequisite for the application of *A. tumefaciens*- mediated transformation. *Biologia Plantarum*, 36, 191-200.
- Roberts C.S., Rajagopal S., Smith L.A., Nguyen T.A., Yang W., Nugroho S., Ravi K.S., Cao M.L., Vijayachandra K., Patell V., Harcourt R.L., Dransfield L., Desamero N., Slamet I., Keese P., Kilian A., Jefferson R.A. 1997. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. V: *pCambia Vector release manual version 3.05*. Cambia, Canberra, Australia, 6 str. (Navodila za uporabo).
http://www.cambia.org.au/main/r_et_camvec.htm (1.3.2006).
- Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276: 1558-1560.
- Santarém E.R., Trick H.N., Essig, Finer J.J. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports*, 17: 752-759.

- Sarma K.S., Sunilkumar G., Balamani V., Veluthambi K. 1995. GUS activity and generation of transformed shoot buds are highly correlated in *Agrobacterium*-transformed tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 3: 377-382.
- Small E. 1987. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*, 3: 37-76.
- Stiekema W.J., Visser L. 1991. Gene transfer and genes to be transfereed. V: *Biotechnologica innovations in crop improvement*. Jones L. (ed.). Oxford, Butterworth-Heinemann: 184-199.
- Sunilkumar G., Vijayachandra K., Veluthambi K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. *Plant Science*, 141: 51-58.
- Sušnik F. 1967. Spolni kromosomi pri hmelju (*Humulus lupulus*). V: 2. jugoslovanski simpozij za hmeljarstvo. Dobrna, 26.-27. maj 1967. Četina L. (ur.). Inštitut za hmeljarstvo Žalec in Inštitut za poljoprivredna istraživanja Novi Sad: 53-65.
- Šesek P., Šuštar-Vozlič J., Bohanec B. 2000. Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. *Pflügers Archiv*, 439: r016-r018.
- Šuštar-Vozlič J. 1997. Vrednotenje genetske variabilnosti akcesij hmelja (*Humulus lupulus* L.) in preučitev samoklonske variabilnosti regenerantov in vitro. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 119str.
- Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Bohanec B. 1999. Studies of Somaclonal Variation in hop (*Humulus lupulus* L.). *Phyton-Annales Reis Botanica*, 39: 283-287.
- Tanaka A., Mita S., Ohta S., Kyojuka J., Nakamura K. 1990. Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and efficient splicing of the intron. *Nucleic Acids Research*, 18, 23: 6767-6770.
- Wenck A., Puieux C., Turner M., Dunn M., Stacy C., Tiozzo A., Dunder E., van Grinsven E., Khan R., Sigareva M., Wang W.C., Reed J., Drayton P., Oliver D., Trafford H., Legris G., Rushton H., Tayab S., Launis K., Chang Y.F., Chen D.F., Melchers L. 2003. Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Report*, 22: 244 - 251.
- Wilmink A., Dons J.J.M. 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 2: 165-185.
- Willfort R. 1997. Zdravilne rastline in njih uporaba. 5. izdaja. Maribor. Založba obzorja Maribor: 576 str.
- Wikipedija, prosta enciklopedija. 2006. Vermut (26.10.2006).
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Vermut> (20.11.2006)
- Yao J.L., Cohen D., Atkinson R., Richardson K., Morris B. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Reports*, 14, 7: 407-412.

Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. The EMBO Jurnal, 2, 12: 2143-2150.

Zelenc T. 1999. *Humulus lupulus*.

<http://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/humulus.htm> (25.7.2006).

Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insight. The Plant Journal, 23, 1: 11-28.

Zupanec J. 1991. Kemične instrumentalne metode v analitiki hmelja. Zbornik Biotehniške fakultete univerze v Ljubljani. Kmetijstvo, 57: 133-144.

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem mentorici prof. dr. Zlati Luthar za vso pomoč, pridobljeno zanje, spodbudo, nasvete pri delu in izdelavi diplomske naloge.

Zahvala velja tudi članu komisije prof. dr. Borutu Bohancu in predsedniku komisije Akademiku prof. dr. Ivanu Kreftu za pregled in popravilo diplomskega dela.

Zahvaljujem se vsem, ki ste kakorkoli pomagali, pa vas nisem omenila.