

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nataša HREN

**TRANSFORMACIJA TOBAKA (*Nicotiana tabacum*
L.) Z *Agrobacterium tumefaciens***

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nataša HREN

TRANSFORMACIJA TOBAKA
(*Nicotiana tabacum* L.) Z *Agrobacterium tumefaciens*

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

TRANSFORMATION OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) BY
Agrobacterium tumefaciens

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – agronomija. 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 diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Zlato Luthar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Katja Vadnal
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 Bohanec
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.

Nataša Hren

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
DK UDK 633.71:631.52:577.2 (043.2)
KG tobak/list/transformacija/*Agrobacterium tumefaciens*/gus gen/hptII gen
KK AGRIS F30
AV HREN, Nataša
SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2007
IN TRANSFORMACIJA TOBAKA (*Nicotiana tabacum* L.) Z *Agrobacterium tumefaciens*
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 33 str., 5 pregl., 13 sl., 44 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V celice listnih izsečkov tobaka 'Havana 38' smo s posredno metodo z vektorskim sistemom *A. t.* LBA4404 in plazmidom pCAMBIA1301 s 4 obravnavanji transformirali testni gus gen za sintezo encima β -glukuronidaza in selekcijski hptII gen za odpornost na antibiotik higromicin. Po enem tednu se je pri večini listnih izsečkov, inokuliranih na selekcijsko MSr gojišče s 25 mg/l higromicina, začel oblikovati kalus, ki je po približno dveh tednih prerasel del transformiranega lista. Po 2 - 3 tednih se je začela regeneracija iz transformiranih celic ali iz kalusa. Največ 74,07 % transformiranih oz. GUS pozitivnih regenerantov je nastalo pri 3. obravnavanju, pri katerem sta bila poleg inkubacije z *A. t.* vključena ultrazvok in vakuum. Najmanj 53,75 % GUS pozitivnih regenerantov je bilo pri 1. obravnavanju, pri katerem je bila vključena samo inkubacija z *Agrobacterium*. GUS pozitivnih regenerantov, pri katerih se selekcijski hptII gen na MSm gojišču s 50 mg/l higromicina ni izražal, je bilo pri 1. obravnavanju kar 78,57 %. Najmanj 31,25 % GUS pozitivnih regenerantov je bilo pri 4. obravnavanju, pri katerem je bil poleg inkubacije z *A. t.* vključen ultrazvok. Izbrana koncentracija 25 mg/l higromicina je v kontrolnih poskusih zavrla regeneracijo. Antibiotik timentin 150 mg/l je uspešno preprečil rast bakterije *A. t.*

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 633.71:631.52:577.2 (043.2)
CX tobacco/leaf/transformation/*Agrobacterium tumefaciens*/*gus* gene/*hptII* gene
CC AGRIS F30
AU HREN Nataša
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2007
TI TRANSFORMATION OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) BY
Agrobacterium tumefaciens
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 33 p., 5 tab., 13 sl., 44 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We conducted four treatments using the indirect method of vector system of *A. t.* LBA4404 and plasmid pCAMBIA1301 to transform the marker *gus* gene for synthesis of enzyme β -glucuronidase and selective *hptII* gene for resistance to antibiotic hygromycin into the leaf discs of the tobacco "Havana 38". After one week the majority of leaf discs inoculated with 25 mg/l hygromycin in the selective MSr media started to form callus, which after approximately two weeks formed part of the transformed leaf. After 2 - 3 weeks began the regeneration of transformed cells or from the callus. The highest proportion (74.07 %) of GUS positive regenerants was evident in the third treatment. The 3rd treatment of incubation with *A. t.* included the use of ultrasound and vacuum. At least 53.75% GUS positive regenerants were evident in the first treatment which included only incubation with *Agrobacterium*. There were as much as 78.57 % GUS positive regenerants, with selective *hptII* gene not expressed on MSr media with 50 mg/l hygromycin in the first treatment. At least 31.25 % GUS positive regenerants appeared in the fourth treatment, with incubation with *A. t.* and ultrasound treatment. Selected concentration of 25 mg/l hygromycin in control experiment prevented regeneration. Antibiotic timentin 150 mg/l successfully prevented growth of bacterium.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|--|------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI) | III |
| Key words documentation (KWD) | VI |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | VII |
| Kazalo slik | VIII |
| Okrajšave in simboli | XI |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.2 CILJ RAZISKAVE | 1 |
| 1.3 DELOVNA HIPOTEZA | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 TOBAK | 3 |
| 2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE | 4 |
| 2.3 METODE VNOSA GENOV V RASTLINE | 5 |
| 2.3.1 Neposredni vnos genov | 5 |
| 2.3.2 Posredni oz. indirektni prenos genov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 6 |
| 2.3.2.1 Mehanizem vnosa T-DNA v rastlinsko celico | 6 |
| 2.3.2.2 Sistem Ti-plazmidnega vektorja za vnos genov v rastlinsko celico | 7 |
| 2.3.2.3 Selekcijski in testni geni | 8 |
| 2.4 GENSKE TRANSFORMACIJE TOBAKA | 9 |
| 3 MATERIAL IN METODE | 11 |
| 3.1 RASTLINSKI MATERIAL | 11 |
| 3.2 BAKTERIJA IN PLAZMID | 11 |
| 3.3 SESTAVA RASTLINSKIH IN BAKTERIJSKIH GOJIŠČ | 13 |
| RASTLINSKI MATERIAL | |
| 3.4 VNOS <i>gus</i> IN <i>nptII</i> GENA V GENOM TOBAKA Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 14 |
| 3.5 HISTOKEMIČNI TEST IZRAŽANJA <i>gus</i> GENA V REGENERANTIH TOBAKA | 16 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.6 | KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA | 17 |
| 4 | REZULTATI | 18 |
| 4.1 | REGENERACIJA LISTNIH IZSEČKOV TOBAKA PO OKUŽBI Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 18 |
| 4.3 | IZRAŽANJE <i>gus</i> GENA V REGENERANTIH TOBAKA | 20 |
| 4.4 | HISTOKEMIČNI TEST IZRAŽANJA <i>gus</i> GENA V REGENERANTIH TOBAKA BREZ SELEKCIJE | 22 |
| 4.5 | KONTROLNI POSKUS NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA | 24 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 25 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 25 |
| 5.2 | SKLEPI | 27 |
| 6 | POVZETEK | 29 |
| 7 | VIRI | 31 |
| | ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|--|------|
| Preglednica 1: Testni geni, ki se uporabljajo pri transformacijah rastlin (prirejeno po Henry, 1997) | 9 |
| Preglednica 2: Postopki vnosa transgenov z <i>A. t.</i> v genom tobaka | 15 |
| Preglednica 3: Število odzivnih izsečkov tobaka in propadlih ter preživelih regenerantov na selekcijskem MSm gojišču po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301 | 18 |
| Preglednica 4: Število GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301 | 20 |
| Preglednica 5: Število GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301, kateri so bili zaradi propadanja predstavljeni na MSm gojišče brez selekcije. | 22 |

KAZALO SLIK

| | str. |
|--|------|
| Slika 1: Plazmid pCAMBIA1301 | 12 |
| Slika 2: T-DNA plazmida pCAMBIA1301 (prirejeno po Roberts in sod., 1997) | 12 |
| Slika 3: Vnos T-DNA v genom tobaka: A - inkubacija listnih izsečkov v bakterijski suspenziji <i>A. t.</i> ; B - zračno sušenje listnih izsečkov po inkubaciji | 14 |
| Slika 4: Listni izsečki tobaka na selekcijskem MSr gojišču | 15 |
| Slika 5: Fenotipsko testiranje <i>gus</i> gena pri regenerantih tobaka | 16 |
| Slika 6: Regeneracija tobaka iz listnih izsečkov na selekcijskem MSr gojišču po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301: A - začetek regeneracije in propad netransformiranega tkiva; B in C | 17 |
| Slika 7: Regeneranti tobaka 3 tedne po subkultivaciji na selekcijskem MSm gojišču: A - normalna in upočasnjena rast ter propadanje regenerantov; B - nekroze na regenerantu od higromicina; C - transformiran regenerant | 18 |
| Slika 8: Odstotek propadlih in preživelih regenerantov tobaka na selekcijskem MSm gojišču po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301 | 19 |
| Slika 9: Izražanje <i>gus</i> gena v regenerantih tobaka: A - steblih; B - listih; C - koreninah; D - celi rastlini | 19 |
| Slika 10: Odstotek GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301 | 20 |
| Slika 11: Različna intenzivnost izražanja <i>gus</i> gena v listih tobaka | 21 |
| Slika 12: Odstotek GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z <i>A. t.</i> in plazmidom pCAMBIA1301, kateri so bili zaradi propadanja prestavljeni na MSm gojišču brez selekcije | 22 |
| Slika 13: Kontrolni poskus listnih izsečkov tobaka na MSr gojišču: A - brez selekcije; B - na selekciji s 25 mg/l higromicina | 23 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|----------------|--|
| GSR | gensko spremenjene rastline |
| <i>A. t.</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| <i>A. r.</i> | <i>Agrobacterium rhizogenes</i> |
| BAP | 6-benzilamino purin - citokinin |
| bp | bazni par |
| CaMV-35S | cauliflower mosaic virus - mozaik cvetače |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| EDTA | etilendiamin tetraocetna kislina |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| GUS | β -glukuronidaza |
| <i>gus</i> | gen, kateri sintetizira encim β -glukuronidazo |
| HPT | higromicin fosfotransferaza |
| <i>hptIII</i> | gen za odpornost na higromicin |
| NAA | α -naftalen ocetna kislina - avksin |
| NPT | neomicin fosfotransferaza |
| PCR | polymerase chain reaction - verižna reakcija s polimerazo |
| pCAMBIA1301 | komercialni plazmid družbe Cambia iz Camberre, Avstralija |
| T-DNA | transfer DNA |
| Ti-plazmid | tumour inducing - plazmid iz <i>A. t.</i> , ki povzroča novotvorbe |
| MS | Murashige in Skoog gojišče |
| MSm | MS mikropropagacijsko gojišče |
| MSr | MS regeneracijsko gojišče |

1 UVOD

Iz medijev velikokrat slišimo o genskem inženiringu, ki marsikomu vzbudi neprijeten občutek. Gensko inženirstvo je integracija biotehnoloških postopkov, s katerimi gene poljubnega izvora pomnožimo, prenesemo in izrazimo v katerem koli organizmu oz. nam transformacije omogočajo vključitev željenih lastnosti v genom rastline brez filogenetskih omejitev. Izrazi, kot so genska tehnologija, gensko inženirstvo, rastlinska biotehnologija, gensko spremenjene rastline, rastlinske tkivne kulture, tehnologija rekombinantne DNA bolj ali manj celovito opisujejo uporabo različnih načinov in tehnik izolacije genov in genskih elementov, njihovo spreminjanje in razvrščanje v nova zaporedja, vnos v izbrane gostiteljske celice in izražanje v obliki beljakovinskih produktov.

Rastlinska biotehnologija omogoča izboljšati prehrambeno vrednost, odpornost oz. tolerantnost na bolezni in škodljivce, obrambo proti stresnim situacijam iz okolja, toleranco oz. popolno odpornost na določene herbicide, odpornost na soli v tleh itd.

Prvi poljski poskus z gensko spremenjenimi rastlinami je bil opravljen leta 1986, in sicer za odpornost transgenega tobaka na glifosat. Od takrat pa do danes je bilo v poljske poskuse vključenih že več kot 70 različnih rastlinskih vrst in število še narašča. Največji delež pripada koruzi, sledijo oljna ogrščica, soja, paradižnik, krompir, bombaž, tobak, in druge vrste (Javornik B., 2004).

Tobak (*Nicotiana tabacum* L.) je enoletnica, ki uspešno in hitro raste v tkivni kulturi in v kratkem času se lahko pridobi veliko regenerantov, kar povečuje možnost za uspešno transformacijo. Ravno zato se tobak uporablja kot testno rastlino za študije regeneracijskih mehanizmov in optimizacijo transformacije z novimi genskimi konstrukti ter preverjanje uspešnosti vnosa z molekulskimi analizami in spremljanje izražanja transgenov.

1.1 CILJ RAZISKAVE

Cilj diplomskega dela je bil z različnimi postopki oz. obravnavanji posrednega vnosa transgenov z *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) in plazmidom pCAMBIA1301 vnesti v genom tobaka sorte 'Havana 38' testni oz. markerski *gus* gen za sintezo β -glukuronidaze in selekcijski *hptII* gen za odpornost na antibiotik higromicin, hitro in uspešno selekcionirati transformirane celice in regenerante od netransformiranih ter spremljati izražanje vnesenih transgenov.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavili smo, da bomo z genskim konstruktom pCAMBIA1301, ki vsebuje 2 transgena, markerski *gus* gen in selekcijski *hptII* gen, ki sta opremljena s CaMV-35S

promotorjem in Nos poli-A terminatorjem zanesljivo spremljali izražanje obeh transgenov pri regenerantih tobaka oz. v posameznih delih. Za fenotipsko spremljanje transgenov smo se odločili 3 mesece po transformaciji izsečkov, da potrdimo ne samo predhodno temveč tudi stabilno transformacijo regenerantov, želeli smo ugotoviti tudi, kateri postopek posrednega vnosa je najprimernejši za optimizacijo transformacijskega sistema.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TOBAK

Tobak je poznan v Evropi od leta 1492, ko je Krištof Kolumb prišel v Ameriko in srečal Indijance. Ti so ga gojili in uporabljali za žvečenje, kajenje in njuhanje (Zgodovina tobaka, 2004).

Tobak (*Nicotiana tabacum* L.) je zelnata trajnica oz. enoletnica iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*) in je samoprašnica, ki zraste do 2 m višine. Rod tobakov obsega 60 vrst, v uporabi (kajenje, žvečenje in njuhanje) sta dve vrsti tobaka: navadni tobak (*Nicotiana tabacum* L.) in kmečki tobak (*Nicotiana rustica* L.). Oba vsebujeta strupen alkaloid nikotin, ki deluje na centralno in vegetativno živčevje. Poleg nikotina so v cigaretnem dimu še katran, aldehidi, ogljikov monoksid, ketoni, piridi, fenoli, amoniak, metanol, žveplov dioksid in še mnogo drugega.

Zanimivo je, da koncentracija nikotina narašča, ko se rastlina bliža cvetenju in hitro pade med cvetenjem in razvojem semen. Zato na rastlini trgamo cvetove in tako v listih obdržimo višjo koncentracijo nikotina. Tobak uporabljamo tudi kot nadomestek za pesticide v biološki pridelavi hrane. Nikotin je namreč učinkovit insekticid.

Tobak ima precej velik genom, velikost celotne haploidne jedrne DNA je 4221-4646 Mbp/1C (Henry, 1997) in veliko število majhnih kromosomov $2n = 48$ (Jones in sod., 1996).

Tobak uspešno in hitro raste v tkivni kulturi, regeneracija iz listnih izsečkov je hitra in uspešna (Stolarz in sod., 1991). Hitra in uspešna regeneracija je velika prednost, saj omogoča, da v relativno kratkem času pridobimo veliko regenerantov in s tem se tudi možnosti za uspešno transformacijo povečajo.

Tobakov genom je za transformacijo zelo primeren, zato se tobak uporablja predvsem kot testna rastlina za vzpostavitev transformacijskega sistema in študije mehanizmov izražanja vnešenih genov. Take raziskave so pomembna osnova za doseg končnega cilja, to je uspešen vnos zelenih agronomsko pomembnih genov v kulturne rastline in s tem izboljšanje določene lastnosti rastline.

2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE

Genske transformacije oz. vnos genov v genom rastline so ena od metod žlahtnjenja rastlin in dopolnitev obstoječim metodam žlahtnjenja. Prednost genskih transformacij pred ostalimi metodami žlahtnjenja je, da v relativno kratkem času pridobimo požlahtnjene zelene lastnosti rastlin. Omogočajo tudi prenos genov med različnimi organizmi brez filogenetskih omejitev (Javornik, 2000).

Osnovne metode genskega inženiringa so bile razvite najprej pri bakterijah, in sicer že v 60. letih prejšnjega stoletja, seveda pa se še danes neprestano dopolnjujejo. Od sredine 80. let metode niso več omejene le na bakterije, temveč jih je možno z manjšimi modifikacijami uporabiti pri praktično vseh živih organizmih. Prva uspela genska transformacija je bila izvedena na tobaku leta 1983. Vnešen je bil bakterijski gen za odpornost na antibiotik, in sicer s posredno metodo s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*). Druga uspešna metoda je biolitska, ki se je razširila v prvi polovici devetdesetih let, posebno za transformacijo žit, ker za enokaličnice *A. t.* ni bil učinkovit. Večina današnjih sevov, ki se uporablja v laboratoriju za transformacije, uspešno okužuje tudi enokaličnice (Bohanec B., 2004).

V poljske poizkuse je bilo vključenih okoli 15 različnih lastnosti. Največji delež zavzema toleranca na herbicide (30 %), sledi odpornost na škodljivce (24 %), izboljšanje kakovosti (21 %), odpornost na viruse (10 %), odpornost na glivične bolezni (4 %) in druge lastnosti (11 %), kot so modifikacija moške sterilnosti, odpornost na bakterije ali strune, kot tudi vnešeni geni, ki so pomembni samo za metodologijo transformacije rastlin (Javornik B., 2004).

Transformiranih je bilo že več kot 100 rastlinskih vrst in 70 vrst jih je vključenih v poljske poizkuse. Od prvih dovoljenj leta 1994 pa do leta 2005 imamo več kot 90 milijonov ha zemljišč, posejanih z gensko spremenjenimi rastlinami (GSR). Največji delež v tržni pridelavi z GSR ima soja (60 %), sledijo koruza (24 %), oljna ogrščica (5 %) in bombaž (11 %) ter v manjšem deležu krompir, paradižnik, repa, buče (Clive, 2005). Največji delež svetovnih zemljišč posejanih s transgenimi poljščinami, je v ZDA (60 %), sledi Argentina (20 %) z manj kot 10 %, Kanada, Kitajska in druge države (Javornik B., 2004).

V Sloveniji so se genske transformacije uspešno uporabljale v laboratorijskih razmerah za vnos genov pri krompirju (virus PVYNTN, ki povzroča prstanasto nakrozo krompirja) (Žel, 1998) in pri mikrosporah ječmena z večjo vsebnostjo lizina v semenih (Luthar, 1999).

2.3 METODE VNOSA GENOV V RASTLINE

2.3.1 Neposredni oz. direktni vnos genov

Sistem vnosa genov z *Agrobacterium* je uspešen predvsem pri dvokaličnicah, čeprav lahko odstranjevanje bakterije po okužbi zmanjša regeneracijske sposobnosti tkiva zaradi uporabe antibiotikov. Enokaličnice (žita) pa se slabo odzovejo na okužbo z *A. t.*, zato so se začele uveljavljati metode neposrednega vnosa genov. Osnovni princip neposrednega vnosa genov v rastlinsko celico ali tkivo je povečanje propustnosti membrane z različnimi postopki (Portykus, 1990; Songstad in sod., 1995).

- Elektroporacija

Tehnika sloni na povečanju permeabilnosti lipidnih dvojnih slojev celične membrane, s pomočjo kratkih električnih impulzov. Tako je omogočena difuzija makromolekul DNA skozi membrano. Metoda je uspešna in lažji prehod makromolekul je pri specifičnem rastlinskem materialu, kot so protoplasti, mikrospore, meristemi in somatski embriji z manjšim številom celic. Glavni problem dela s protoplasti je nizka regeneracija. Le pri manjšem številu rastlinskih vrst je regeneracija iz protoplastov uspešna. Zato je ta metoda omejena na manjše število rastlinskih vrst. Metoda je bila uspešno uporabljena za transformacijo riža, koroze itd. Elektroporacija se uporablja tudi za vnos DNA v mikrospore, ovule, predvsem v enocelične strukture oz. v tkiva z manjšim številom celic.

- Polietilen glikol (PEG)

Se pogosto uporablja pri protoplastih v kombinaciji z ultrazvokom ali izbranih tkivih in sloni na podobnem principu kot elektroporacija.

- Mikro in makro vbrizgavanje DNA

Z mikro pipeto vbrizgamo DNA v protoplaste (uspešna le pri ogrščici). To je zelo natančna in zahtevna tehnika. Makro vbrizgavanje DNA v mlade cvetne poganke je bilo uspešno pri rži.

- Obstreljevanje s hitrimi delci oz. biolitska

Postopek temelji na nanosu DNA na drobne delce (0,1 - 1,5 μm) zlata ali volframa. Delce DNA nanese na membrane ali na plastične 'istrelke', s pomočjo potisnega plina (helij ali dušik) jih močno pospešimo in nato 'ustrelimo' v tarčno tkivo. Delci zlata prodrejo skozi celično steno in omogočijo vnos DNA. Ta metoda je trenutno najbolj konkurenčna posrednemu vnosu s pomočjo vektorjev in se uporablja tam, kjer drugi načini, predvsem transformacija z *A. t.*, še niso uspeli, zaradi narave rastlinskega tkiva (Bohanec B., 2004).

2.3.2 Posredni oz. indirektni vnos genov z *Agrobacterijum tumefaciens*

To je naravni prenos DNA iz bakterijskega plazmida v rastlinski genom. Pri dvokaličnicah je že dolgo znano, da pri poškodbi rastline lahko na tem mestu nastane rakasta tvorba (crown gall), ki jo povzroči infekcija z *A. t.*, patogene bakterije, ki živi v zemlji. Odkrili so že seve *Agrobacterium* z modificirano virulenco, ki uspešno okužuje enokaličnice, kar je doslej uspelo pri rižu (Hiei in sod., 1994) in koruzi (Ishida in sod., 1996 cit. po Galun in Breiman, 1998).

V tem kalusnem tkivu se tvorijo snovi, imenovane opini, ki so derivati aminokislin arginina in leucina, ki jih *A. t.* uporablja kot vir ogljika in dušika za svojo rast (Zupan in sod., 2000). Bakterija torej spremeni del rastline v tvorbo celic, ki ji proizvajajo snovi za njeno uporabo. Ta sprememba nastane zato, ker *A. t.* vključi majhen del svoje DNA, tako imenovan T-DNA, v genom rastline (Chilton in sod., 1977). Takšen prenos DNA iz bakterije v rastlinski genom je znan tudi pri *A. rhizogenes*, ki tvori pospešeno rast koreninskih laskov.

A. t. vsebuje plazmid, imenovan T-plazmid, dolžine ≈ 200 kbp, z geni za virulenco, sintezo in razgradnjo opinov ter geni za tvorbo rakastih celic (*onc* geni). Del DNA Ti-plazmida z *onc* geni in geni za sintezo opinov imenujemo T-DNA (Zupan in sod., 2000).

Promotorje genov v T-DNA prepozna rastlinski transkripcijski mehanizem in se lahko prepisujejo v rastlinski celici. Metoda ima prednost pred neposrednim vnosom, ker rezultati kažejo, da med transgenimi regeneranti pri tej metodi vnesemo manjše število kopij genov, ki so pogosto tudi manj poškodovani. Ker gre za naravni vnos genov je tudi rastlinsko tkivo manj poškodovano (Bohanec B., 2004).

2.3.2.1 Mehanizem vnosa T-DNA v rastlinsko celico

Za prenos T-DNA so potrebni geni za virulenco oz. *vir* geni na Ti-plazmidu. 35 *vir* genov je organiziranih v 7 operonov, ki so označeni kot *virA*, *virB*, ..., *virG* in se nahajajo na Ti-plazmidu, in kromosomski virulentni geni (*chv* geni), ki so na bakterijskem kromosomu. Produkti *chvA* in *chvB* so pomembni za stik med *A. t.* in rastlino. *ChvB* kodira protein, ki sodeluje pri sintezi cikličnega glukana, ki ima važno vlogo za pritrditev bakterije na celično steno rastlinske celice, produkt *chvA* gena pa je transportni protein, ki prenese ciklični glukan β -1,2 v celično steno (Stiekema in Visser, 1991; Hellens in sod., 2000). Fenolne komponente, nastale ob poškodbi rastline, se vežejo z *virA* proteinom in ta kompleks nato fosfolira *virG* protein, ki je v bakterijski citoplazmi. Modificiran *virG* protein ima vlogo transkripcijskega aktivatorja za ostale *vir* gene. Poznanih je več sevov *A. t.* glede na sposobnost okužbe, bolj virulentni sevi *A. t.* imajo več kopij *virG* gena.

Produkti *virB* operona se vežejo na desni strani T-DNA in v povezavi s produkti *virD* operona (eden od njih je D2, ki deluje kot endonukleaza, specifična za enojno verigo) omogočajo specifično cepitev enojne verige T-DNA v mejnih sekvencah. Mejne sekvence T-DNA so okoli 25 bp dolge sekvence na levi in desni strani T-DNA, s specifičnim mestom za endonukleazno cepitev enojne verige. Po odcepitvi enojne T-DNA se znotraj mejnih sekvenc sintetizira nova veriga. Odcepljena enojna T-DNA se akumulira v bakterijski celici in je zaščitena pred razgradnimi encimi (nukleazami) s proteini *virE* operona, D2 protein pa se veže na 5' koncu T-DNA, proces, ki je verjetno analogen prenosu plazmidov pri konjugaciji bakterij. Proces integracije T-DNA poteka s pomočjo rekombinacije in izgleda, da je vključevanje T-DNA pogostejše v območju rastlinske DNA, ki se prepisuje. Pri procesu integracije sodelujejo rastlinski encimi in proteini, vezani na T-DNA. V rastlinski genom se lahko vključi ena ali več kopij T-DNA (Stiekema in Visser, 1991; Zupan in sod., 2000).

2.3.2.2 Sistem Ti-plazmidnega vektorja za vnos genov v rastlinsko celico

Naravni transformacijski sistem *A. t.* se danes uporablja, kot metoda vnosa želenih genov v rastlino in v te namene so izdelani različni sistemi Ti-plazmidnega vektorja. Skupno tem sistemom je, da so iz naravne T-DNA odstranjeni geni za sintezo opinov in *onc* geni, tako da ostanejo samo mejne sekvence T-DNA. S to odstranitvijo genov ne pride do tvorbe rakastih celic in tvorbe opinov ter preostanek T-DNA obdrži sposobnost vključevanja v genom rastline. V območje mejnih sekvenc pa je mogoče vključiti tuje oz. zelene gene (Zambryski in sod., 1983).

Poznamo dve osnovni obliki vektorjev:

- integrirana oz. *cis* vektorska oblika ima T-DNA, ki jo želimo vnesti v rastlino in *vir* regijo na enem plazmidu ter deluje *cis*
- binarna oblika; bakterija vsebuje dva plazmida. Razoroženi plazmid, ki je sestavljen iz skoraj celotnega Ti-plazmida brez T-DNA in binarni plazmid, ki je manjši in vključuje T-DNA ter mejne regije.

V primeru binarnih T-DNA vektorjev tuje gene kloniramo v binarni plazmid, ki se lahko razmnožuje tako v *E. coli* kot tudi v *A. t.* (Bevan, 1984). Tako lahko z njim enostavno manipuliramo v *E. coli* in ga šele nato konjugirano v *Agrobacterium*, ki ima še drugi plazmid (razoroženi Ti-plazmid) z *vir* geni. To lahko naredimo zato, ker je plazmid bistveno manjši (≈ 25 kbp) od razoroženega Ti-plazmida (≈ 100 kbp), zaradi katerega so otežene molekulske in genske manipulacije.

Želene tuje gene je mogoče vnesti znotraj robnih sekvenc T-DNA. Strukturni geni sami po sebi niso dovolj. Da lahko pride do izražanja teh genov v rastlini, jih je potrebno opremiti z

ustreznimi promotorji (specifično zaporedje baz, ki uravnava transkripcijski mehanizem rastline). Promotor je sekvenca, ki se nahaja na 5' strani od zapisa za gen. V grobem jih delimo na konstitutivne in inducibilne. Prvi regulirajo gene, da se izražajo v vseh tkivih (npr. CaMV-35S promotor virusa, ki povzroča mozaik cvetače). Geni, regulirani z inducibilnimi promotorji, se izražajo samo v določenih tkivih ali organih (npr. gen za fazeolin se izraža le v semenu fižola) ali ob določeni fazi razvoja ali ob določenem dražljaju (Bohanec in sod., 2004). V rastlino lahko vnesemo gen kateregakoli organizma, če strukturnemu genu dodamo promotorsko sekvenco, ki bo prepoznavna za rastlinski transkripcijski mehanizem.

Novejši Ti-vektorji imajo rastlinski selekcijski gen lociran čim bolj proti levi robni sekvenci, da bi zagotovili čim boljši prenos zelenih genov. Ugotovili so namreč (Sheng in sod., 1996, cit. po Hellens in sod., 2000), da ima desna robna sekvenca pri prenosu T-DNA iz *A. t.* v rastlinsko celico prednost pred levo robno sekvenco. Pri razvoju binarnih vektorjev bo v prihodnje poudarek na takih, ki bodo uporabni v širšem spektru rastlinskih vrst in bodo imeli možnost odstranitve ali odsotnosti tistih delov prenešene DNA, ki niso nujni za ekspresijo vnešenih lastnosti v rastlini (Hellens in sod., 2000).

2.3.2.3 Selekcijski in testni geni

Pri uporabi metod vnosa genov v rastlinska tkiva ali celice se transformira le manjše število celic in zato je potrebna selekcija oz. detekcija transformiranih celic. Za selekcijski marker se uporabljajo geni za odpornost na antibiotike ali herbicide. Takšen selekcijski gen je vključen v plazmid skupaj z genom, ki ga transformiramo v rastlinsko celico. V uporabi je več različnih selekcijskih genov, predvsem bakterijski geni za odpornost na antibiotike in geni za odpornost na herbicide, ki so neobhodno potrebni pri transformacijah, posebno pri transformacijah z nizkim odstotkom uspešnosti vnosa.

Selekcijski geni bakterijskih plazmidov so večinoma geni za odpornost na določene antibiotike (kanamicin, higromicin, kloramfenikol). Najpogosteje se uporablja bakterijski gen, ki kodira encim NPT (neomicin fosfotransferaza) in je zmožen fosforilacije ter inaktivacije antibiotika kanamicina. Z vnosom tega gena postanejo rastline rezistentne na kanamicin, drugače pa so občutljive in propadejo. Enokaličnice so pogosto neobčutljive na razmeroma visoke koncentracije kanamicina (Wilmink in Dons, 1993). Možni so tudi drugi selekcijski geni. Geni, ki sprožijo odpornost na določene herbicide (*bar* oz. *pat*, *epsps*, *aroAcp4* ali *gox*), so lahko hkrati selekcijski geni in gospodarsko pomembni geni. Pogosto se antibiotske selekcijske gene zamenjuje z *xylA* genom, ki kodira ksilozno izomerazo, *manA* genom, ki kodira fosfomanozno izomerazo in špinačnim *badh* genom, ki kodira betain aldehyd dehidrogenazo (Bohanec B., 2004). Selekcijski geni omogočajo razvojno prednost celicam na gojišču s selekcijskim agansom, na katerem netransformirane celice ne uspevajo.

Uspešnost metode za vnos želenega gena v neko rastlino običajno testiramo s pomočjo markerskih oz. testnih genov. To so geni, ki jih vključimo v plazmidni konstrukt in kodirajo enostavno določljive substance ter nam povedo, ali je uspela vgradnja tuje DNA v rastlinsko celico. Kakšna je aktivnost gena in v katerih tkivih poteka ekspresija, je odvisno od uporabljenega promotorja. Starejši markerski gen je *gus* gen za sintezo encima β -glukuronidaza (GUS), kjer se tkivo z izraženim markerskim genom obarva temno modro. Slabost tega markerskega gena je ta, da pri tem proučevano tkivo uničimo. Novejši markerski gen, zeleno fluorescentni protein (GFP), je izoliran iz meduze *Aequorea victoria* in povzroča fluorescenco živega transformiranega tkiva, kar lahko opazujemo pod fluorescentnim mikroskopom. Markerski geni se večinoma uporabljajo pri študijah ekspresije genov, *gfp* gen pa lahko tudi nadomesti selekcijski gen, ker preprosto regenerante odberemo na osnovi izražene fluorescence (Bohanec B., 2004). V zadnjem času se uporablja tudi *DsRed* gen (sinteza rdeče fluorescentnega proteina), katerega produkte lahko zaznamo z mikroskopom. V primerjavi z *gus* genom imajo to veliko prednost, da je izražanje gena mogoče zaznati v živi celici (nedestruktiven test). Najbolj pogosto uporabljeni testni geni pri transformacijah rastlin so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Testni geni, ki se uporabljajo pri transformacijah rastlin (prirejeno po Henry, 1997)

| Lastnosti | β -glukoronidaza (GUS) | Luciferaza | Antiocianinski regulatorji | Zeleno fluorescentni protein (GFP) | Rdeče fluorescentni protein (DsRed) |
|--------------------|------------------------------|----------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Izvor | <i>E. coli</i> | kresnica | koruza | meduza | korala |
| Test | destruktiven | nedestruktiven | nedestruktiven | nedestruktiven | nedestruktiven |
| Stabilnost testa | visoka | nizka | nizka | visoka | visoka |
| Občutljivost testa | dobra | srednja | nizka | visoka | visoka |

2.4 GENSKE TRANSFORMACIJE TOBAKA

Rastlinske transformacije so se začele s tobakom, saj je tobak prva uspešna transformirana rastlina, v katero je bil leta 1983 vnešen bakterijski gen. Prav tako pa je bil leta 1986 kot prva transgena rastlina vključena v prvi poljski poskus. Leta 1992 je bil tobak, odporen na viruse, na Kitajskem prva industrijska transgena rastlina v tržni pridelavi (Raspor, 1996). Na tobaku je bilo narejenih že veliko transformacij z *A. t.*, transformirali so protoplaste (Horsch in sod., 1984), kalusne kulture (Komari, 1989) in listne diske tobaka (Horsch in sod., 1985; Fisher in Gultinan, 1995; Sunilkumar in sod., 1999).

Tobak hitro in uspešno raste v tkivni kulturi in se je izkazal kot za genske transformacije zelo primerna rastlina. Zato se uporablja predvsem kot testna rastlina za postopek uvajanja transformacijskega sistema in nadaljnje preverjanje uspešnosti vnosa genov ter izražanja

lastnosti transgenov. Največ vnešenih selekcijskih genov je bilo za odpornost na kanamicin (Horsch in sod., 1984 in 1985; Caligari in sod., 1993; Sarma in sod., 1995; Fisher in Guiltinan, 1995), manj pa za higromicin in PPT (De Block in sod., 1987; Park in sod., 1998) z ali brez testnega *gus* gena. Transformirane celice, ki imajo vključen *gus* gen, lahko pretvorijo neaktivni citokinin glukoronid, ki ga dodamo v gojišče, v aktivni citokinin, ki stimulira njihovo regeneracijo, netransformirane celice pa se ustavijo v razvoju (Joersbo in Okkels, 1996).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Rastline tobaka 'Havana 38' so bile gojene na mikropropagacijskem MSm gojišču (Murashige in Skoog, 1962) v rastnih komorah pri 23 ± 1 °C, fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme ter osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. V teh razmerah je potekala tudi transformacija listnih izsečkov in regeneracija ter subkultivacija regenerantov.

Liste mikropropagirane tobaka 'Havana 38' smo v brezprašni komori s sterilno pinceto in skalpelom narezali na približno 1 cm velike izsečke. Nato smo jih po 10 inokulirali za 1 dan na regeneracijsko MSr gojišče s $100 \mu\text{M}$ acetosiringonom v petrijevke premera 9 cm in višine 1,5 cm (slika 4). Zaradi morebitne sekundarne okužbe in izhlapevanja gojišča smo pokrov in spodnji del petrijevke oblepili s parafilmom. Nastavljenih je bilo 24 petrijevok oz. 240 izsečkov s 4 obravnavaji (preglednica 2). V vsakem obravnavanju je bilo 6 petrijevok oz. 60 izsečkov.

Naslednji dan smo liste tobaka transformirali s posredno metodo z vektorskim sistemom bakterije *A. t.* sev LBA4404 in plazmidom pCAMBIA1301 s 4 obravnavaji (slika 1, 2 in preglednica 2). Po 15 oz. 16 min inkubacije listnih izsečkov z *A. t.* smo jih zračno osušili na sterilnem filtrskem papirju in jih za 3 dni inokulirali na isto MSr gojišče (slika 3A in B). Po 3 dneh kokultivacije smo bakterijske kolonije sprali z listov z raztopino 200 mg/l antibiotika timentin, jih zračno osušili na sterilnem filtrskem papirju in inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče z dodatkom ustreznega selekcijskega antibiotika 25 mg/l higromicina ter 150 mg/l timentina za preprečitev rasti *A. t.* Nastale regenerante smo subkultivirali na mikropropagacijsko MSm gojišče s 50 mg/l higromicina in 150 mg/l timentina v petrijevke premera 9 cm in višine 2 cm.

Naključno smo iz petrijevok izbrali 64 regenerantov, 16 za vsako obravnavanje, kateri so na selekciji propadali (slika 7A in B) in jih subkultivirali na MSm gojišče brez selekcije, z namenom ugotoviti, če se *gus* gen pri teh regenerantih fenotipsko izraža.

Pri vseh regenerantih na selekciji, kateri so imeli razvite korenine in nekaj listov ter pri regenerantih brez selekcije, smo s histokemičnim GUS testom testirali izražanje *gus* gena in to v listih, steblih in koreninah.

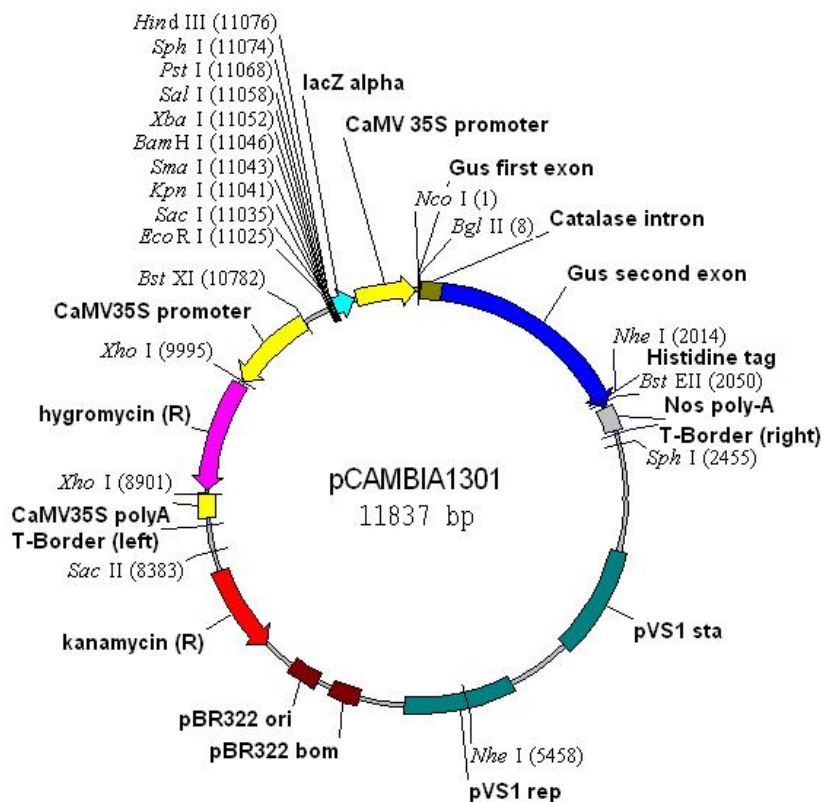
3.2 BAKTERIJA IN PLAZMID

Za vnos genov v listne izsečke tobaka smo izbrali komercialni sev *A. t.* LBA4404, v katerega je bil z elektroporacijo vnešen komercialni binarni plazmid družbe Cambia iz Canberre v Avstraliji z oznako pCAMBIA1301. Razdelitev sevov *Agrobacterium* za vnos

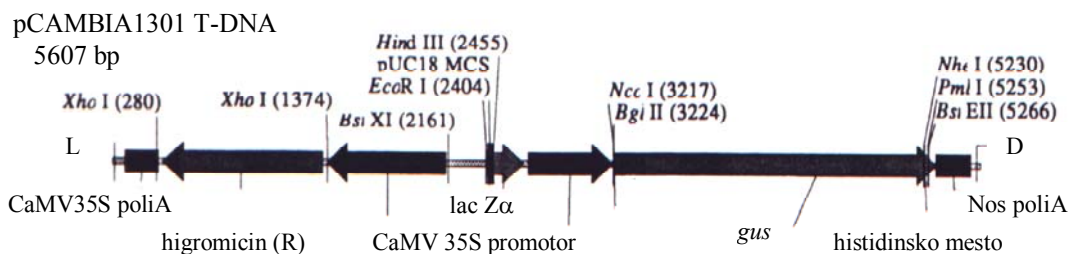
genov temelji na katabolizmu opinov in sev *A. t.* LBA4404 vsebuje oktopin. Ta sev ima TiAch5 kromosom, pAL4404 razoroženi Ti-plazmid, kateri vsebuje bakterijsko odpornost na antibiotik rifampicin 50 mg/l in binarni plazmid pCAMBIA1301, kateri ima bakterijsko selekcijo na kanamicin 50 mg/l in v T-DNA regiji *gus* gen za sintezo encima β -glukuronidaze ter rastlinski selekcijski *hptII* gen za odpornost na antibiotik higromicin (slika 1 in 2).

Uporabljeni binarni plazmid pCAMBIA1301 vsebuje funkcionalni *gus* (N358Q) testni gen za enostavno in natančno analizo prisotnosti ali izražanja gena v regeneriranih rastlinah z GUS analizo. N358Q mutacija omogoča tej verziji *gus* gena, da ohrani popolno aktivnost v rastlinski celici, tako da se veže na signalni peptid. Testni *gus* gen vsebuje tudi intron iz ricinusove katalaze, ki preprečuje izražanje *gus* gena v prokariontih, kot je *Agrobacterium* (Ohta in sod., 1990; Tanaka in sod., 1990). Ta intron pa se izreže pri evkariontih tako pri eno- kot dvokaličnicah. Plazmid vsebuje gene, ki omogočajo selekcijo transformiranih bakterij in selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv. Plazmid je stabilen v *Agrobacterium* tudi pri gojenju v neselektivnih razmerah zaradi prisotnosti *rep* (funkcija podvajanja plazmida) in *sta* (funkcija stabilnosti plazmida) regij iz plazmida pVS1 (Deblaere in sod., 1987). Plazmid vsebuje tudi restrikcijska mesta za izrez in vključitev željenih genov.

Plazmid pCAMBIA1301 ima T-DNA, ki je dolga 5607 bp, celoten plazmid pa 11837 bp. Testni *gus* gen leži proti desni robni sekvenci T-DNA, *hptII* pa proti levi robni sekvenci T-DNA (slika 1 in 2). Vektor je bil uspešno testiran v družbi Cambia pri tobaku in pri rižu z obstreljevanjem s hitrimi delci in z *Agrobacterium* po metodah opisanih v Hajdukiewicz in sod. (1994) in Hiei in sod. (1994).



Slika 1: Plazmid pCAMBIA1301



L-leva robna sekvenca; D-desna robna sekvenca

Slika 2: T-DNA plazmida pCAMBIA1301 (prirejeno po Roberts in sod., 1997)

3.3 SESTAVA RASTLINSKIH IN BAKTERIJSKIH GOJIŠČ

M_{Sm} gojišče za rast in mikropropagacijo tobaka

| | |
|--|---------|
| MS (Murashige in Skoog, 1962) bazalno gojišče: | |
| makro- in mikroelementi | 4,3 g/l |
| tiamin | 2 mg/l |

| | |
|--------------------|--------|
| piridoksin | 1 mg/l |
| nikotinska kislina | 1 mg/l |
| saharoza | 30 g/l |
| agar | 8 g/l |
| pH 5,8 | |

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

| | |
|--------------------|----------|
| MS bazalno gojišče | 4,3 g/l |
| inozitol | 0,1 g/l |
| saharoza | 30 g/l |
| BAP | 1,0 mg/l |
| NAA | 0,1 mg/l |
| tiamin | 0,1 mg/l |
| Fe-EDTA | 0,1 mM |
| agar | 8 g/l |
| pH 5,8 | |

YEB gojišče za rast *A. t.* LBA4404:

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

Za posamezna gojišča smo stehali sestavine, jih pretresli v čašo ter prelili z bidestilirano vodo. Raztapljali smo jih z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Nato smo dodali vitamine in hormone iz založnih raztopin. Volumen smo določili z merilno bučko in vsebino prelili nazaj v čašo ter umerili pH vrednost med mešanjem z dodajanjem 1N KOH ali 1N HCl. V gojišče smo dodali še agar in ga sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C in pritisku 1,1 bar. Po avtoklaviranju smo gojišča ohladili na približno 40 °C in filtrsko dodali acetosiringon, antibiotike, temeljito premešali ter razdelili v sterilne petrijevke. Po 30 ml tekočega bakterijskega gojišča YEB smo prelili v 300 ml erlenmajerice in po avtoklaviranju filtrsko dodali 50 mg/l rifampicina in 50 mg/l kanamicina.

3.4 VNOS *gus* IN *hptII* GENA V GENOM TOBAKA Z *Agrobacterium tumefaciens*

Vnos genov v genom tobaka smo opravili s pomočjo vektorskega sistema z *A. t.* po nekoliko modificirani metodi transformacije listov tobaka (Horsch in sod., 1985; Fisher in Gultinan, 1995). *In vitro* razmnožene poganjke tobaka na MSm gojišču smo v sterilnih

razmerah narezali na listne izsečke, velikosti približno 1 cm, in jih za en dan inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče s 100 μ M acetosiringonom (slika 4).

V tekoče YEB gojišče z dodatkom 50 mg/l rifampicina in 50 mg/l kanamicina smo iz ene kolonije nacepili *A. t.* in jo gojili čez noč, pri temperaturi 28 °C in tresenju 120 obratov/min do optične gostote ($A_{600\text{ nm}}$) = 0,6 (približno 5×10^6 celic/ml).

Naslednji dan smo bakterijsko suspenzijo *A. t.* z vključenim plazmidom pCAMBIA1301 prelili v 25 ml centrifugirke in centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/min in 4 °C v centrifugi Beckman J2-MS. Nato smo odlili supernatant, pelet pa prelili s tekočim MS gojiščem za tobak. Vnos transgenov smo opravili s 4 postopki oz. obravnavanji. Izsečke smo 15 oz. 16 min inkubirali v bakterijski suspenziji *A. t.* in kombinirali pri 2. obravnavanju še 5 min vakuumu, pri 3. obravnavanju 5 min vakuumu in 1 min ultrazvoka ter pri 4. obravnavanju 1 min ultrazvoka (preglednica 2). Izsečke smo nato zračno osušili na sterilnem filterškem papirju in inokulirali v petrijevke na MSr gojišče z dodatkom 100 μ M acetosiringona (slika 3 in 4). Tobak smo kokultivirali z *A. t.* tri dni v rastni komori. Po treh dneh kokultivacije smo liste dvakrat sprali v raztopini antibiotika timentin 200 mg/l [100:1 (w/w) tikarcilin : klavulonska kislina] in jih zračno osušili na sterilnem filterškem papirju.



A



B

Slika 3: Vnos T-DNA v genom tobaka: A - inkubacija listnih izsečkov v bakterijski suspenziji *A. t.*; B - zračno sušenje listnih izsečkov po inkubaciji

Listne izsečke smo nato predstavili na selekcijsko MSr gojišče s 25 mg/l higromicina in 150 mg/l timentina. Po petih tednih inkubacije v rastni komori smo izsečke predstavili oz. subkultivirali na ustrezno sveže selekcijsko MSr gojišče. Nastale regenerante pa na selekcijsko MSm gojišče.



Slika 4: Listni izsečki tobaka na selekcijskem MSr gojišču

Preglednica 2: Postopki vnosa transgenov z *A. t.* v genom tobaka

| Oznaka obravnavanja | Opis obravnavanja |
|---------------------|---|
| 1 | 15 min bakterijska suspenzija |
| 2 | 5 min bakterijska suspenzija 5 min vakuum 5 min bakterijska suspenzija |
| 3 | 5 min bakterijska suspenzija 1 min ultrazvok 5 min vakuum 5 min bakterijska suspenzija |
| 4 | 7 min bakterijska suspenzija 1 min ultrazvok 7 min bakterijska suspenzija |

3.5 HISTOKEMIČNI TEST IZRAŽANJA *gus* GENA V REGENERANTIH TOBAKA

Približno 3 mesece po okužbi smo pri regenerantih, kateri so bili normalno razviti, zelene barve in imeli so vsaj 3 korenine, fenotipsko testirali prisotnost β -glukuronidaze v steblih, listih in koreninah. Izražanje *gus* gena smo testirali s histokemičnim GUS testom (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994) z barvilom X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronid). Encim β -glukuronidaza razgradi dodani X-Gluc in produkt se obarva modro. Z izbranih regenerantov tobaka smo odrezali liste, korenine in steblo, jih po potrebi razrezali na koščke, položili v valje 24 valjne plošče in jih inkubirali pri 37 °C eno uro v 50 mM fosfatnem pufri NaPO_4 [NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 , pH 6,8] z dodatkom Triton X-100 (slika 5). Puffer smo nato z mikropipeto odpipetirali in dodali svež fosfatni puffer z dodatkom barvila 1,0 mM X-Gluc in 20 % metanola. Reakcijsko zmes smo 5 min izpostavili vakuumu (≈ 100 mbar) in inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo modro obarvan produkt aktivnega *gus* gena vizualno pregledali. Modro se obarvajo le tiste

celice, tkiva oz. regeneranti, ki imajo v genom vključen in aktiven *gus* gen. Kot kontrola je bil uporabljen netransformiran tobak, katerega smo pripravili na enak način kot transformirane regenerante.



Slika 5: Fenotipsko testiranje *gus* gena pri regenerantih tobaka

Podatke histokemičnega GUS testa smo obdelali z računalniškim programom Excel.

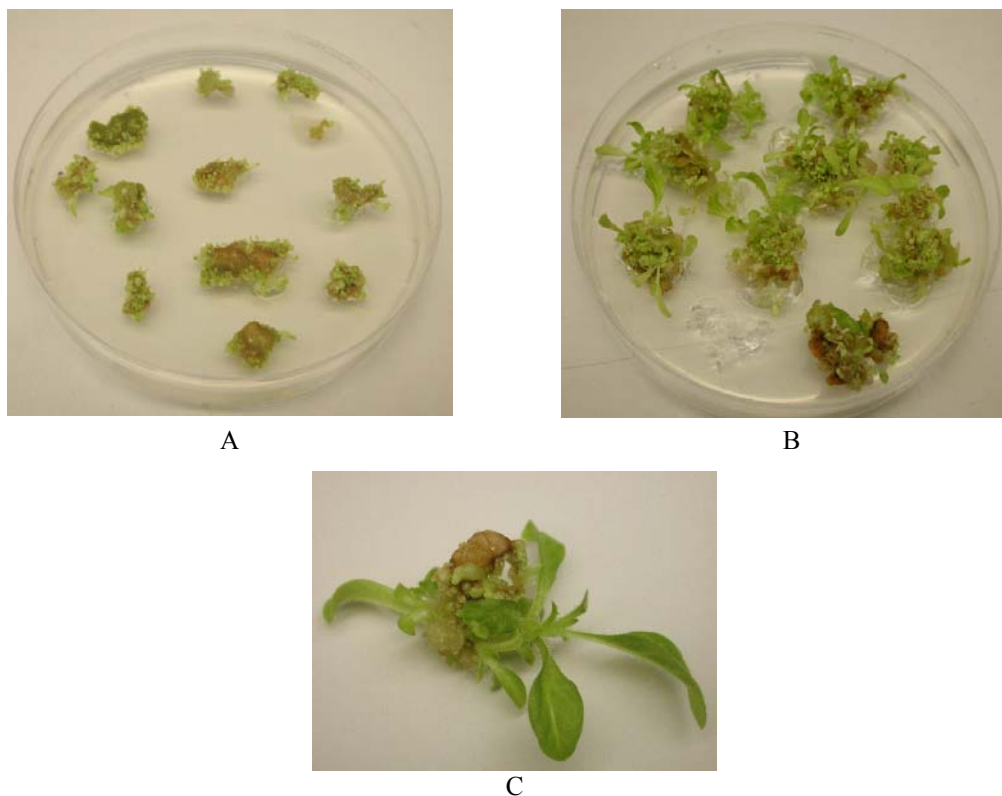
3.6 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA

Vzporedno s kokultiviranimi listnimi izsečki tobaka smo nastavili 2 kontrolna poskusa z neokuženimi izsečki, katere smo inokulirali na MSr gojišče z in brez selekcije. Za vsako kontrolo smo pripravili 4 petrijevke z desetimi izsečki v vsaki petrijevki. Neokužene izsečke smo gojili v rastni komori pod enakimi pogoji kot okužene izsečke.

4 REZULTATI

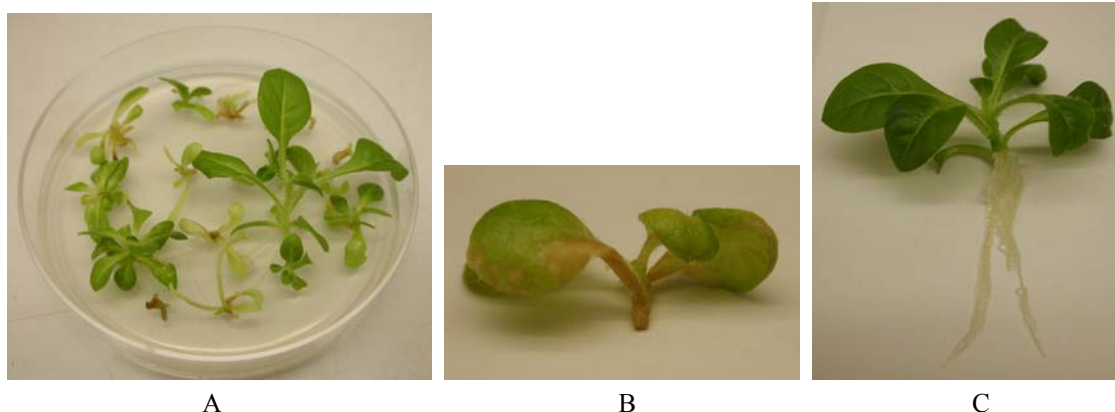
4.1 REGENERACIJA LISTNIH IZSEČKOV TOBAKA PO OKUŽBI Z *Agrobacterium tumefaciens*

Po enem tednu se je pri večini listnih izsečkov, katerih celice so bile transformirane, začel oblikovati kalus, ki je po približno dveh tednih prerastel transformirani del lista, ne glede na obravnavanje. Ponekod so se v tem obdobju že začele oblikovati globularne strukture, iz katerih so pozneje nastali regeneranti. Deli netransformiranih izsečkov so na selekcijskem MSr gojišču propadli (slika 6A). Po 2 tednih se je začela regeneracija, ki je bila pri večini izsečkov direktna, brez vmesne faze kalusa. Ti regeneranti so bili večji in imeli so manj anomalij (nepravilna rast in vitrifikacija) kot indirektno nastali regeneranti (slika 6B in C).



Slika 6: Regeneracija tobaka iz listnih izsečkov na selekcijskem MSr gojišču po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301: A - začetek regeneracije in propad netransformiranega tkiva; B in C - regeneranti

Regenerante, nastale na selekcijskem MSr gojišču s 25 mg/l higromicina, smo subkultivirali na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l higromicina. Nekaj regenerantov je po približno dveh do treh tednih na selekcijskem MSm gojišču začelo propadati, pri drugih so se oblikovale korenine (slika 7A, B in C).

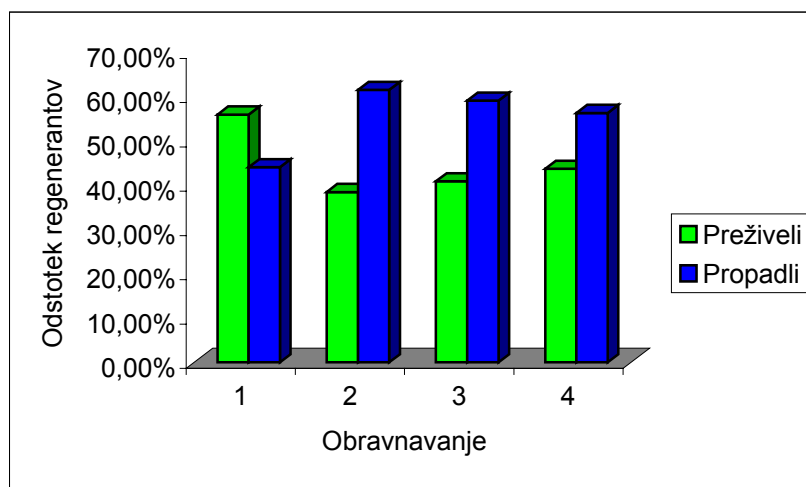


Slika 7: Regeneranti tobaka 3 tedne po subkultivaciji na selekcijskem MSm gojišču: A - normalna in upočasnjena rast ter propadanje regenerantov; B - nekroze na regenerantu od higromicina; C - transformiran regenerant

Preglednica 3: Število odzivnih izsečkov tobaka in propadlih ter preživelih regenerantov na selekcijskem MSm gojišču po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301

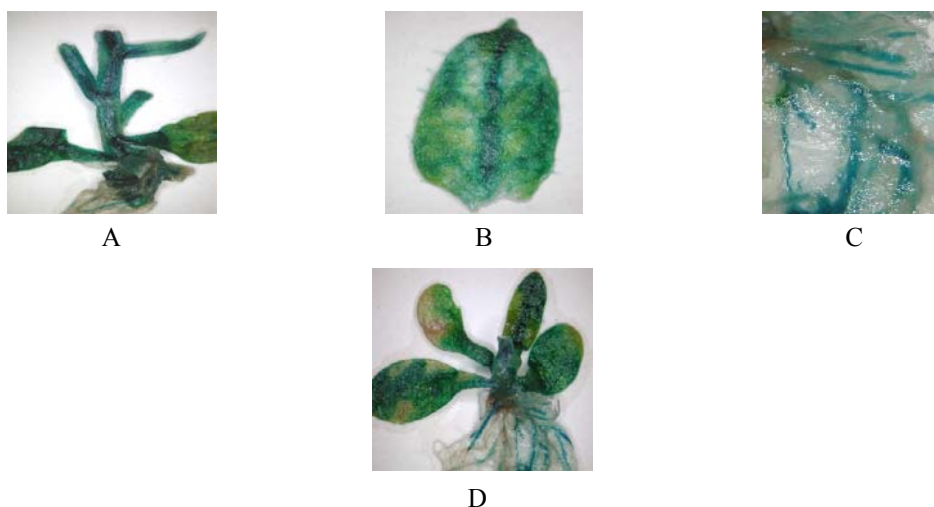
| Obravnavanje | Število | | | |
|--------------|-------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| | odzivnih izsečkov | nastalih regenerantov | propadlih regenerantov | preživelih regenerantov |
| 1 | 48 | 143 | 63 | 80 |
| 2 | 55 | 156 | 96 | 60 |
| 3 | 59 | 132 | 78 | 54 |
| 4 | 38 | 119 | 67 | 52 |

Največ, 59 odzivnih izsečkov od 60 inokuliranih, je bilo pri 3. obravnavanju, kjer sta bila poleg 10 min inkubacije v bakterijski suspenziji vključena 1 min ultrazvok in 5 min vakuum. Na njih je nastalo 132 regenerantov, kateri so bili subkultivirani na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l higromicina (slika 7A). Od teh jih je kar 59,09 % preživelo oz. je imelo funkcionalen *hptII* gen na selekcijskem MSm gojišču. Najmanj, samo 38 odzivnih izsečkov, je bilo pri 4. obravnavanju, kjer je bil poleg 14 min inkubacije v bakterijski suspenziji vključena samo 1 min ultrazvok. Na njih je nastalo 119 regenerantov. Po subkultivaciji je preživelo oz. je uspešno razgrajevalo selekcijski agens 56,30 % regenerantov. Največ, 156 regenerantov na 55 odzivnih izsečkih, je nastalo pri 2. obravnavanju, kjer je bil poleg 10 min inkubacije v bakterijski suspenziji vključen še 5 min vakuum. Po subkultivaciji je na selekcijskem MSm gojišču preživelo največ kar 61,54 % regenerantov. Pri 1. obravnavanju, kjer so bili izsečki samo 15 min inkubirani v bakterijski suspenziji, je bilo odzivnih 48 listnih izsečkov, na katerih je nastalo 143 regenerantov in po subkultivaciji je preživelo samo 44,05 % regenerantov (preglednica 3 in slika 8).



Slika 8: Odstotek propadlih in preživelih regenerantov tobaka na selekcijskem MSm gojišču po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301

4.3 IZRAŽANJE *gus* GENA V REGENERANTIH TOBAKA



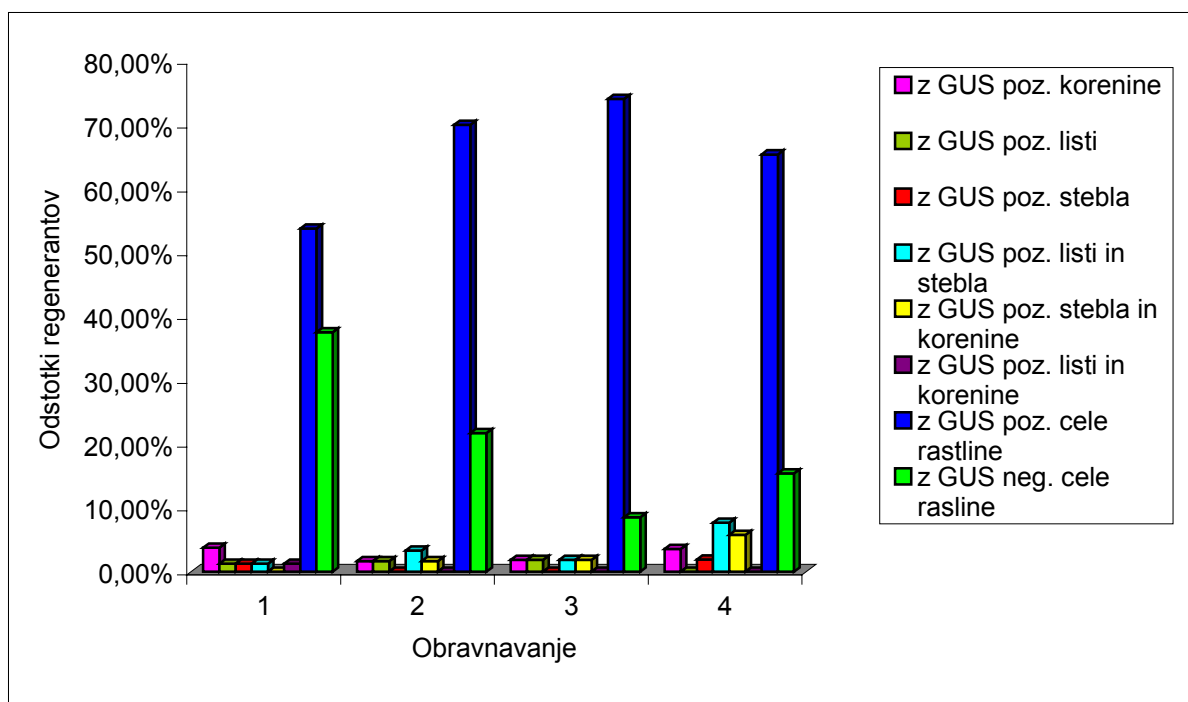
Slika 9: Izražanje *gus* gena v regenerantih tobaka: A - steblih; B - listih; C - koreninah; D - celi rastlini

Približno 3 mesece po okužbi listnih izsečkov z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301 smo s histokemičnem GUS testom preverili izražanje *gus* gena v steblih, listih in koreninah regenerantov. Modro se obarvajo le tiste celice, tkiva oz. regeneranti, ki imajo v genom vključen in aktiven *gus* gen. Ker je bil *gus* gen opremljen s CaMV-35S promotorjem, smo lahko spremljali izražanje testnega gena v vseh delih rastline (slika 9A, B, C in D).

Preglednica 4: Število GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301

| Obravnavanje | Število GUS pozitivnih regenerantov | | | | | | | Št. GUS negativnih regenerantov |
|--------------|-------------------------------------|-------|--------|----------------|-------------------|------------------|---------------|---------------------------------|
| | korenine | listi | steblo | listi + steblo | steblo + korenine | listi + korenine | cela rastlina | |
| 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 43 | 30 |
| 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 42 | 13 |
| 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 40 | 10 |
| 4 | 2 | 0 | 1 | 4 | 3 | 0 | 34 | 8 |

Skupno je bilo z GUS testom analiziranih 246 regenerantov. Te rastline so uspešno rase na selekcijskem MSm gojišču s 50 mg/l higromicina in so bile normalno razvite (slika 7C). Od teh je bilo 185 GUS pozitivnih in 61 je bilo GUS negativnih oz. pri njih se *gus* gen ni izražal v nobenem od proučevanih delov rastline (preglednica 4).



Slika 10: Odstotek GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301

Pri 3. obravnavanju je imelo kar 74,07 % regenerantov prisoten produkt *gus* gena v celi rastlini. Enak, 1,85 %, delež regenerantov je imelo potrjen produkt v koreninah oz. v listih, v kombinaciji listi in steblo ter v steblih in koreninah. Negativnih oz. takih, pri katerih z GUS testom nismo potrdili prisotnosti produkta, je bilo 18,52 %. Pri 2. obravnavanju je

bilo 70,00 % regenerantov GUS pozitivnih, pri katerih se je *gus* gen izražal po celi rastlini. Pri 1,66 % regenerantov je bil produkt *gus* gena potrjen samo v koreninah oz. samo v listih ter v kombinaciji steblo in korenine, medtem ko je imelo 3,33 % regenerantov produkt v listih in steblih. Negativnih je bilo 21,70 % regenerantov. Pri 4. obravnavanju je bilo 65,38 GUS pozitivnih, pri katerih se je *gus* gen izražal po celi rastlini, 3,85 % regenerantov je imelo prisoten produkt samo v koreninah, 1,95 % samo v steblih, 7,69 % v listih in steblih ter 5,77 % v steblih in koreninah. Negativnih regenerantov oz. takih, pri katerih se *gus* gen fenotipsko ni izražal je bilo samo 15,38 %. Pri 1. obravnavanju je bilo najmanj 53,75 % pozitivnih regenerantov, pri katerih se je *gus* gen izražal oz. smo fenotipsko zasledili produkt po celi rastlini. Pri tem obravnavanju je bilo tudi največ, 3,75 %, regenerantov, pri katerih je bil viden produkt samo v koreninah. Enak, 1,25 %, delež regenerantov je imelo *gus* gen izražen samo v listih oz. samo v steblih, v kombinaciji listi in steblo oz. v listih in koreninah. V kombinaciji steblo in korenine nismo zasledili produktov *gus* gena, kot tudi ne pri 37,50 % regenerantov, kjer po celi rastlini fenotipsko ni bil določen produkt (slika 10).



Slika 11: Različna intenzivnost in razporeditev izražanja *gus* gena v listih tobaka

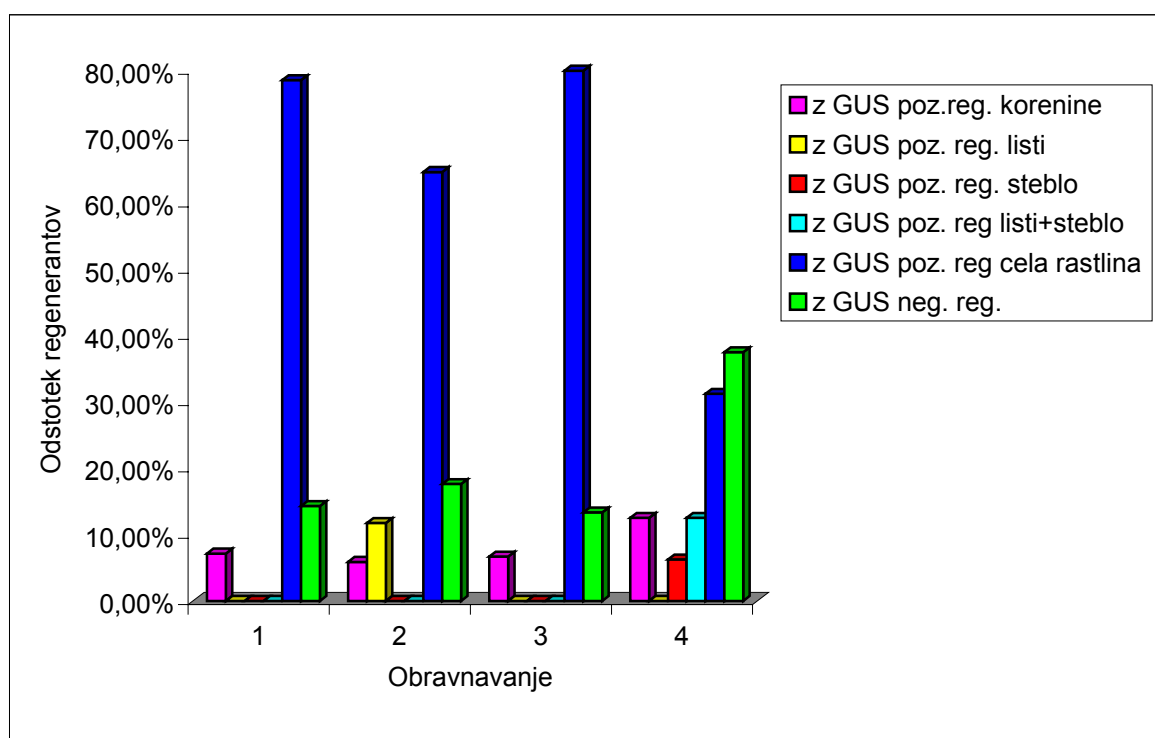
Produkt *gus* gena - modro obarvanje - smo v regenerantih tobaka zasledili v različni intenziteti in neenakomerno po posameznih organih oz. celih rastlinah (slika 11).

4.4 HISTOKEMIČNI TEST IZRAŽANJA *gus* GENA V REGENERANTIH TOBAKA BREZ SELEKCIJE

Nekateri regeneranti, kateri so nastali na transformiranih izsečkih, so po subkultivaciji na selekcijsko MSm gojišče začeli propadati. Regenerante, na katerih so se začele pojavljati nekroze, smo prestavili na MSm gojišče brez selekcije (slika 7A in B).

Preglednica 5: Število GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301, kateri so bili zaradi propadanja prestavljeni na MSm gojišče brez selekcije

| Obravnavanje | Št. GUS pozitivnih regenerantov | | | | | Št. GUS negativnih regenerantov |
|--------------|---------------------------------|-------|--------|----------------|---------------|---------------------------------|
| | korenine | listi | steblo | listi + steblo | cela rastlina | |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 11 | 2 |
| 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 11 | 3 |
| 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 12 | 2 |
| 4 | 2 | 0 | 1 | 2 | 5 | 6 |

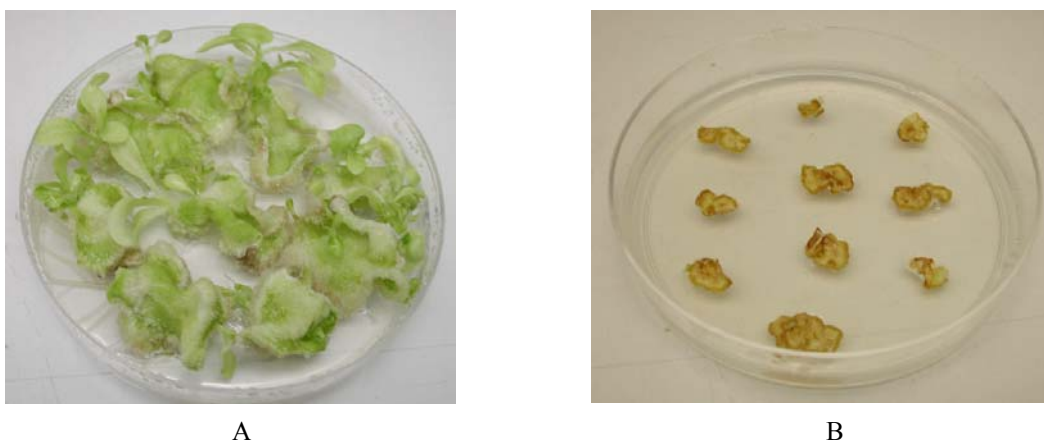


Slika 12: Odstotek GUS pozitivnih in negativnih regenerantov tobaka po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301, kateri so bili zaradi propadanja prestavljeni na MSm gojišče brez selekcije

Testiranih je bilo 64 regenerantov (16 za vsako obravnavanje), kateri so nastali na izsečkih, ki so bili okuženi z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA1301 s 4 postopki oz. obravnavanji (preglednica 2). Pri 1. obravnavanju je bilo največ, 78,57 %, GUS pozitivnih regenerantov, kateri so imeli izražen produkt *gus* gena po celi rastlini in 7,14 % samo v koreninah. V ostalih delih, samo listih oz. steblih, produkta nismo zasledili. Pri samo 14,29 % regenerantov z GUS testom nismo potrdili prisotnosti produkta. Pri 2. obravnavanju je bilo 64,71 % *gus* pozitivnih regenerantov, kateri so imeli izražen gen po celi rastlini, 11,76 % v

koreninah, 5,88 % v listih, pri ostalih 17,65 % regenerantov se transgen ni izrazil. Pri 3. obravnavanju je bilo 66,67 % regenerantov pozitivnih, 13,33 % regenerantov je imelo prisoten produkt v steblih, 6,67 % samo v koreninah. Pri 13,33 % regenerantov se *gus* gen ni izražal. Pri 4. obravnavanju je bilo 31,25 % pozitivnih regenerantov, pri katerih se je *gus* gen izražal po celi rastlini, 12,50 % regenerantov je imelo prisoten produkt gena samo v koreninah in enak odstotek jih je imelo v listih in steblih ter samo 6,25 % v steblih. Nnegativnih je bilo v primerjavi z ostalimi obravnavanji največ, in sicer 37,50 % (slika 12).

4.5 KONTROLNI POSKUS Z NEOKUŽENIMI LISTNIMI IZSEČKI TOBAKA



Slika 13: Kontrolni poskus z neokuženimi listnimi izsečki tobaka na MSr gojišču: A - brez selekcije; B - na selekciji s 25 mg/l higromicina

Neokužene listne izsečke smo gojili na MSr gojišču. Izsečki, kateri so bili inokulirani na gojišče brez selekcije, so bili zeleni, 2 do 3 krat so se povečali, oblikovali kalus in po 2 tednih se je začela regeneracija. Noben od 40 inokuliranih izsečkov ni propadel in skoraj na vseh so se po enem mesecu pojavili regeneranti (slika 13A). Neokuženi izsečki, inokulirani na selekcijsko MSr gojišče s 25 mg/l higromicina, se niso povečali, klorofil je razpadel in po dveh tednih so postali popolnoma rjavi. Vseh 40 inokuliranih izsečkov je propadlo in nobeden se ni regeneriral (slika 13B).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskave genskega inženiringa je bilo do danes vložena že veliko časa in napora, z namenom genetsko izboljšati rastline. Vključene so različne tehnologije, ki omogočajo vnos DNA v celico in vgraditev v kromosome, regeneracijo transformiranih celic, rast regenerantov in razmnoževanje transformiranih rastlin.

Iz *in vitro* gojenih raslin tobaka 'Havana 38' na MSm gojišču smo narezali listne izsečke in jih inokulirali na regeneracijo MSr gojišče s 100 μ M acetosiringonom. Naslednji dan smo listne izsečke inkubirali v *A. t.* suspenziji sev LBA4404 z binarnim plazmidom pCAMBIA1301, ki je vključeval testni *gus* gen in selekcijski *hptII* gen. V MSr gojišče smo dodali acetosiringon za pospešitev okužbe in izrez T-DNA iz plazmida ter uspešnejšo vgraditev v genom tobaka. Želeli smo ugotoviti, ali obstajajo razlike v uspešnosti transformacije tobaka med različnimi načini oz. obravnavanji okužbe z *A. t.* (preglednica 2). Po treh dneh kokultivacije smo izsečke predstavili na regeneracijsko MSr gojišče s selekcijskim antibiotikom higromicin 25 mg/l in antibiotikom timentin 150 mg/l, kateri je uspešno in hitro preprečil rast bakterije *A. t.*, ni oviral regeneracije iz listnih izsečkov in ni poškodoval regenerantov. O podobnem vplivu timentina na bakterijo *A. t.* in rastline poročajo Cheng in sod. (1998). Regeneranti z izraženim *hptII* genom na gojišču s timentinom so bili zelo vitalni in zeleni, zato smo utišanje transgena na selekcijskem MSm gojišču hitro fenotipsko opazili.

Približno en teden po transformaciji se je na reznih površinah izsečkov začel oblikovati kalus, ki je po približno dveh tednih prerasel transformirane dele listov in šele nato se je začela regeneracija. Večina regenerantov je nastala direktno iz globularnih struktur, katere so nastale iz transformiranih celic. Ti regeneranti so nastali približno teden prej in imeli so manj anomalij (nepravilna rast in hiperhidriranost) kot regeneranti na kalusu (slika 6A, B in C).

Regenerante, nastale na selekcijskem MSr gojišču s 25 mg/l higromicina, smo subkultivirali na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l higromicina. Z namenom, da potrdimo zanesljivo izražanje selekcijskega *hptII* gena tudi pri enkrat višji koncentraciji, kot je priporočena za tobak, ter tako izločimo regenerante, pri katerih se je *hptII* gen slabo oz. se ni izražal. Pravilno izbrana koncentracija selekcijskega agensa mora preprečiti regeneracijo in rast netransformiranih celic oz. regenerantov. Omogočiti pa mora rast in koreninjenje transformiranih regenerantov.

Rezultati kontrolnih poskusov kažejo na to, da je bila izbrana koncentracija selekcijskega agensa, 25 mg/l higromicina za regeneracijo in 50 mg/l higromicina za mikropropagacijo,

primerna, saj je preprečila regeneracijo netransformiranih rastlin v kontrolnih poskusih. Hkrati pa je 50 mg/l higromicina v MSm gojišču zmanjšalo število netransformiranih regenerantov, ki so se razvili na transformiranih izsečkih zaradi detoksifikacijskega delovanja obdajajočih transformiranih celic (Park in sod., 1998). Selekcija 25 mg/l higromicina v MSr gojišču ni popolnoma zaustavila nastanka netransformiranih regenerantov, kar smo dokazali z reševanjem regenerantov na gojišče brez selekcije, kateri so propadali na selekcijskem gojišču. Kar velik delež regenerantov brez vgrajenega oz. utišanega *hptIII* gena je imelo funkcionalen *gus* gen (preglednica 5 in slika 12).

Rastline, ki so uspešno rasle na selekcijskem MSm gojišču vse tudi niso imele funkcionalnega *gus* gena. Največ, 74,07 %, pozitivnih regenerantov, pri katerih se je *gus* gen izražal po celi rastlini je bilo pri 3. obravnavanju, kjer sta bila poleg inkubacije izsečkov z *A. t.* vključena ultrazvok in vakuum. Pri tem obravnavanju je bilo 7,4 %, regenerantov takih pri katerih se je *gus* gen izražal v posameznih delih rastline. Najmanj, 53,75 %, GUS pozitivnih regenerantov z izraženim produktom po celi rastlini je bilo pri 1. obravnavanju, kjer so bili listni izsečki inkubirani samo v *A. t.* suspenziji. Pri tem obravnavanju je bilo 8,75 % regenerantov z izraženim produktom v posameznih delih. Pri 2. obravnavanju, kjer je bil poleg *A. t.* suspenzije vključen samo vakuum, je bilo 70 % pozitivnih regenerantov in 8,31 % z izraženim produktom v posameznih delih, medtem ko je bilo pri 4. obravnavanju, kjer je bil vključen ultrazvok, 65,38 % pozitivnih regenerantov in kar 19,26 % je imelo produkt v posameznih delih. Pri 1. obravnavanju so bili listni izsečki 15 min izpostavljeni samo bakterijski suspenziji in celice, razen na robovih, niso bile poškodovane, kar se je verjetno odražalo na najmanjšem odstotku rastlin z izraženim *gus* genom. Pri 3. obravnavanju je verjetno 1 min ultrazvok razrahlal celične stene in 5 min vakuum je lažje infiltriral T-DNA v celico oz. jedro. Pri 1. obravnavanju je bilo največ, 37,50 %, negativnih regenerantov, pri 4. obravnavanju najmanj, samo 15,38 %, pri 3. obravnavanju 18,52 % in pri 2. obravnavanju 21,70 % (preglednica 4 in slika 10). Kombinacija ultrazvoka in vakuuma je ugodno vplivala na celice izsečkov in uspeh transformacije. Izbrani čas, 1 min ultrazvoka je bil dovolj za razrahljanje celične stene in ni razbil oz. poškodoval celic. V kombinaciji s 5 min vakuumom se je vgradilo v celice izsečkov oz. v kromosome največ transgenov.

Nekaj regenerantov je po približno dveh do treh tednih na selekcijskem MSm gojišču propadalo. Ti so bili prestavljeni na MSm gojišče brez selekcije in nekaj jih je propadlo brez znanega vzroka. Preživelih 64 regenerantov smo testirali z GUS testom in kar visok odstotek regenerantov, ki je propadal na selekciji, je bil GUS pozitiven. Pri 1. obravnavanju je bilo največ, 78,57 %, GUS pozitivnih regenerantov, kateri so imeli izražen produkt *gus* gena po celi rastlini in 7,14 % samo v koreninah. Pri samo 14,29 % regenerantov z GUS testom nismo potrdili prisotnosti produkta. Pri 2. obravnavanju je bilo 64,71 % *gus* pozitivnih regenerantov, kateri so imeli izražen gen po celi rastlini in 17,64 % regenerantov je imelo izražen produkt v posameznih delih. Pri 3. obravnavanju je bilo

66,67 % regenerantov pozitivnih in 20 % regenerantov je imelo produkt v posameznih delih. Pri 4. obravnavanju je bilo 31,25 % pozitivnih regenerantov, pri katerih se je *gus* gen izražal po celi rastlini in kar 31,25 % v posameznih delih rastline (slika 10).

Možen vzrok propadanja je lahko, da kljub vgrajenemu transgenu niso bili sposobni razgraditi higromicina v gojišču in normalno rasti na selekciji. Neizražanje transgena je lahko posledica vgradnje v območje rastlinskega kromosoma, ki je transkripcijsko neaktivno, zaradi mutacij ali utišanja genov. Multiple insercije, preureditve ali delecije v integriranih tujih genih so bile odkrite pri rižu (Hiei in sod., 1997; Kohli in sod., 1999), jablani (Yao in sod., 1995), ameriški vijolici (Mercuri in sod., 2000). Pri regenerantih, ki so začeli propadati na selekcijskem gojišču, smo želeli ugotoviti, ali celoten genski konstrukt z obema genoma ne funkcioniira oz. se ne izraža. Ne glede na obravnavanje smo pri teh regenerantih dobili visoke odstotke GUS pozitivnih regenerantov, kljub temu, da so slabo rasli oz. so propadali na gojišču s higromicinom. To pomeni, da del genskega konstrukta s *hptII* genom ni funkcioniral, ker rastline niso bile sposobne razgraditi higromicina. Katera od navedenih težav je bila prisotna pri regenerantih je težko ugotoviti brez molekulske analize. Z zagotovostjo lahko trdimo, da je prišlo tudi do utišanja transgenom. Možno je tudi, da se je samo del genskega konstrukta s posameznim transgenom vgradil v genom celic, iz katerih so nastali regeneranti, lahko so jih endonukleaze, katere so jih prepoznale kot tujek, izrezale iz genoma transformiranih celic.

Različna intenzivnost modrega obarvanja in neenakomerna porazdelitev po tkivih so verjetno odvisni od mesta in števila kopij vgradnje ter od opremljenosti gena s promotorjem ali pa gre za himere. O modrem obarvanju pretežno vaskularnega tkiva s histokemičnim testom aktivnosti *gus* gena poročajo tudi zgoraj navedeni avtorji, kateri so imeli gen opremljen s enakim CaMV-35S promotorjem.

5.2 SKLEPI

Kalusno tkivo se je pri večini listnih izsečkov začelo oblikovati na reznih površinah po enem tednu in po 2 - 3 tednih se je začela regeneracija. Nekaj regenerantov je nastalo iz kalusnih celic, več je bilo direktne regeneracije iz nastalih globularnih struktur.

Uspeh transformacije listnih izsečkov z *A. t.* LBA4404 in plazmidom pCAMBIA1301 je bil odvisen od postopka vnosa oz. uporabljenega obravnavanja.

Gus gen, ki je vgrajen v plazmid pCAMBIA1301, je opremljen s promotorjem CaMV-35S, kar omogoča izražanje gena v listih, steblih in koreninah, torej po celi rastlini.

Največ, 74,07 %, transformiranih regenerantov z GUS testom je bilo pri 3. obravnavanju in najmanj, 53,75 %, pozitivnih regenerantov je bilo pri 1. obravnavanju.

Regenerantov, kateri so propadali na selekcijskem MSm gojišču, je bilo največ, 78,57 %, GUS pozitivnih pri 1. obravnavanju in najmanj, 31,25 %, pri 4. obravnavanju.

Iz rezultatov kontrolnih poskusov je izbrana koncentracija higromicina uspešno preprečila regeneracijo netransformiranih celic, hkrati pa je zmanjšala število netransformiranih regenerantov na selekcijskem MSm gojišču, kateri so se razvili na transformiranih izsečkih, zaradi detoksifikacijskega učinka.

Antibiotik timentin 150 mg/l je uspešno zavrl oz. preprečil rast bakterije *A. t.* in ni vplival negativno na regeneracijo ter rast in razvoj regenerantov.

Nekaj regenerantov ni imelo vgrajenega *hptII* gena oz. je bil le ta utišan, ker so propadali na selekcijskem gojišču, vendar pa so imeli funkcionalen *gus* gen.

Transformirane rastline tobaka bi lahko uporabili za nadaljnje raziskave prenosa vnešenih genov na potomce (stabilnost transformacije), molekulske študije, kam v genom tobaka oz. v kateri kromosom se je vgradila vnešena T-DNA, število kopij vgrajene T-DNA in morebitne povezave med mestom vgradnje vnešene DNA in izražanjem transgenov v rastlini.

6 POVZETEK

Genske transformacije so ena od metod žlahtnjenja. Glavne prednosti pred obstoječimi metodami žlahtnjenja so, da dobimo požlahnjene rastline veliko hitreje in izboljšujemo točno določene lastnosti. Predvsem pa nam je omogočeno zajemanje iz širšega genskega fonda, ker je omogočen prenos genov brez filogenetskih omejitev. Cilj genskih transformacij je modifikacija ekspresije v rastlini že obstoječih genov ali pa vnos novih agronomsko pomembnih genov, ki izboljšajo lastnosti kulturne rastline, pomembne za pridelovanje, transport, skladiščenje, kvaliteto pridelka in možno je tudi pridobivanje posebnih snovi za industrijo in farmacijo.

Želeli smo vzpostaviti učinkovit transformacijski sistem s pomočjo neposrednega vnosa transgenov. Pri tem smo uporabili komercialni sev *A. t.* LBA4404 in binarni plazmid pCAMBIA1301, s pomočjo katerega smo v sorto tobaka 'Havana 38' želeli vnesti markerski oz. testni *gus* gen za sintezo encima β -glukuronidaza in selekcijski *hptII* gen za odpornost transgenih rastlin na antibiotik higromicin. Iz mikropropagiranih rastlin, gojenih na MSm gojišču, smo narezali listne izsečke in jih transformirali s štirimi postopki oz. obravnavanji (preglednica 2) ter jih kokultivirali tri dni na regeneracijskem MSr gojišču s 100 μ M acetosiringonom za uspešnejši izrez T-DNA in vnos ter vključitev v tobakov genom. Po končani kokultivaciji smo jih sprali z raztopino antibiotika timentin (200 mg/l) in jih inokulirali na selekcijsko MSr gojišče z dodatkom antibiotika higromicin (25 mg/l) in antibiotika timentin (150 mg/l) za preprečitev rasti *A. t.* Izbrana koncentracija higromicina je uspešno preprečila regeneracijo netransformiranih rastlin, hkrati pa je zmanjšala število netransformiranih regenerantov na MSm gojišču. Regeneranti na gojišču s timentinom so bili vitalni, zeleni in se uspešno koreninili.

Kalusno tkivo se je na reznih površini listnih izsečkov začelo oblikovati po enem tednu in po dveh do treh tednih se je začela regeneracija. Regenerante, nastale na selekcijskem MSr gojišču, smo subkultivirali na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l higromicina in 150 mg/l timentina. Tri mesece po transformaciji izsečkov smo pri 246 regenerantih testirali izražanje *gus* gena. Nekaj regenerantov je približno po dveh do treh tednih na selekcijskem MSm gojišču začelo propadati. Iz vsakega obravnavanja smo naključno izbrali po 16 regenerantov in jih predstavili na MSm gojišča brez selekcije. Z GUS testom smo želeli ugotoviti, ali se bo v njih *gus* gen fenotipsko izrazil, ker *hptII* gen na selekcijskem MSm gojišču ni deloval oz. se ni vgradil v genom.

Izražanje *gus* gena smo testirali s histokemičnim GUS testom (Jefferson in sod., 1987; Hiei in sod., 1994). Modro se obarvajo z barvilom X-Gluc le tista tkiva oz. regeneranti, ki imajo v genom vključen in aktiven *gus* gen, ki je sposoben sinteze encima β -glukuronidaze.

Rastline, ki so uspešno rasle na selekcijskem MSm gojišču vse tudi niso imele funkcionalnega *gus* gena. Največ, 74,07 %, pozitivnih regenerantov, pri katerih se je *gus* gen izražal po celi rastlini je bilo pri 3. obravnavanju, kjer sta poleg inkubacije izsečkov z *A. t.* bila vključena ultrazvok in vakuum. Pri tem obravnavanju je bilo 7,4 % regenerantov takih pri katerih se je *gus* gen izražal v posamznih delih rastline. Najmanj, 53,75 %, GUS pozitivnih regenerantov z izraženim produktom po celi rastlini je bilo pri 1. obravnavanju, kjer so bili listni izsečki inkubirani samo v *A. t.* suspenziji. Pri tem obravnavanju je bilo 8,75 % regenerantov z izraženim produktom v posameznih delih. Pri 2. obravnavanju, kjer je bil poleg *A. t.* suspenzije vključen samo vakuum, je bilo 70 % pozitivnih regenerantov in 8,31 % z izraženim produktom v posameznih delih, medtem ko je bilo pri 4. obravnavanju, kjer je bil vključen ultrazvok, 65,38 % pozitivnih regenerantov in kar 19,26 % regenerantov je imelo produkt v posameznih delih. Pri 1. obravnavanju so bili listni izsečki 15 min izpostavljeni samo bakterijski suspenziji in celice, razen na robovih, niso bile poškodovane, kar se je verjetno odražalo na najmanjšem odstotku rastlin z izraženim *gus* genom. Pri 3. obravnavanju je verjetno 1 min ultrazvok razrahlal celične stene in 5 min vakuum je uspešno infiltriral T-DNA v celico oz. jedro. Pri 1. obravnavanju je bilo največ, 37,50 %, negativnih regenerantov, pri 4. obravnavanju najmanj, samo 15,38 %, pri 3. obravnavanju 18,52 % in pri 2. obravnavanju 21,70 % (preglednica 4 in slika 10). Izbrana kombinacija ultrazvoka in vakuuma je ugodno vplivala na uspeh transformacije.

Od 64 rastlin, ki so bile predstavljene na MSm gojišče brez selekcije, je bilo največ 78,57 % GUS pozitivnih pri 1. obravnavanju, najmanj 31,25 % pa pri 4. obravnavanju. Ne glede na obravnavanje je bil *gus* gen aktiven pri visokem odstotku regenerantov, pri katerih je bil *hptIII* gen utišán oz. se ni vgradil v genom.

Kontrolni poskus z neokuženimi listnimi izsečki je bil zasnovan z namenom, da preverimo, kako selekcijski antibiotik higromicin, ki se uporablja za selekcijo oz. ločevanje transformiranih od netransformiranih regenerantov, vpliva na transformirane rastline tobaka. Na selekcijskem gojišču netransformirane celice oz. regeneranti propadejo po 2 - 3 tednih. Rastejo in se ukoreninijo le transformirani regeneranti, ki imajo vključen in aktiven *hptIII* gen.

7 VIRI

- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: Gensko spremenjena hrana. Javornik B., Strel B, Bohanec B. (ur.) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 22: 8711-8721.
- Caligari P.D.S., Yapabandara Y.M.H.B., Paul E.M., Perret J., Roger P., Dunwell J.M. 1993. Field performance of derived generations of transgenic tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 875-879.
- 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.
- 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.
- Clive J. 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops. The international service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAAA) <http://www.isaaa.org/kc/bin/briefs34/es/index.htm> (5.12.2006).
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V., Rao Movva N., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO Journal*, 6, 9: 2513-2518.
- Deblaere R., Reynaerts A., Höfte H., Hernalsteens J.P., Leemans J., Van Montagu M. 1987. Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology*, 153: 277-292.
- 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.
- Galun E., Breiman A. 1998. Transgenic plants. With an appendix on intellectual properties & commercialisation of transgenic plants by John Barton. London, Imperial College Press: 376 str.
- Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 25: 989-994.
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 10: 446-451.
- Henry R.J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. London, Chapman & Hall: 258 str.
- 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.
- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223: 496-498.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- Javornik B. 2000. Gensko spremenjene rastline. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 6: 290-294.
- Javornik B. 2004. Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Javornik B., Strel B., Bohanec B. (ur.) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6, 13: 3901-3907.
- Joersbo M., Okkels F.T. 1996. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports*, 16: 219-221.
- Jones J.D., Goldsbrough P.B., Weller S.C. 1996. Stability and expression of amplified EPSPS genes in glyphosate resistant tobacco cells and plantlets. *Plant Cell Reports*, 15, 6: 431-436.
- 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.
- Komari T. 1989. Transformation of callus cultures of nine plants species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Science*, 60: 223-229.
- Luthar Z. 1999. Transformation of barley microspores by electroporation. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo*, 73: 15-21.
- 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.
- Murashige T., Skoog H. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
- 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.
- 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.
- Potrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology*, 8: 535-542
- Raspor P. 1996. Biotehnologija in razvoj. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 781-794.
- 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 (15.5.2007).
- 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.
- Songstad D.D., Somers D.A., Griesbach R.J. 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40: 1-15.
- Stiekema W.J., Visser L. 1991. Gene transfer and genes to be transferred. V: *Biotechnological innovations in crop improvement*. Jones L. (ed.). Oxford, Butterworth - Heinemann: 184-199.
- Stolarz A., Macewicz J., Lörz H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 137: 347-357.
- Sunilkumar G., Vijayachandra K., Veluthambi K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. *Plant Science*, 141: 51-58.
- Tanaka A., Mita S., Ohta S., Kyojuka J., Shimamoto K., 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.
- 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.
- 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 Journal*, 2, 12: 2143-2150.
- Zgodovina tobaka. 2004
<http://kadilci.net/o-cigaretah/> (15.5.2007).
- Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23, 1: 11-28.
- Žel J. 1998. Ali nam bo biotehnologija pomagala, da bomo ponovno jedli krompir priljubljene slovenske sorte? *Sodobno kmetijstvo*, 31, 10: 449-452.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Zlati Luthar za vso pomoč in nasvete pri delu in izdelavi diplomske naloge, ter za spodbudne besede, ki so mi vlile moč.

Zahvaljujem se prof. dr. Katji Vadnal in prof. dr. Borutu Bohancu za pregled diplomske naloge.

Zahvala gre tako tudi moji mami in prijateljem, ki mi niso pustili, da obupam na koncu študija.