

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Natalija PAPEŽ

**MOLEKULSKA ANALIZA TRANSGENOV V
HMELJU**
(Humulus lupulus L.)

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Natalija PAPEŽ

MOLEKULSKA ANALIZA TRANSGENOV V HMELJU
(*Humulus lupulus* L.)

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

MOLECULAR ANALYSIS OF TRANSGENES IN THE HOP
(*Humulus lupulus* L.)

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. Branka Javornik
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.

Natalija Papež

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 633.791:631.532:577.2 (043.2)
KG	hmelj/nodij/transformacija/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /transgeni/ <i>gus</i> gen/ <i>nptII</i> gen/tkivne kulture/regeneranti/PCR
KK	AGRIS F30
AV	PAPEŽ, Natalija
SA	LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2007
IN	MOLEKULSKA ANALIZA TRANSGENOV V HMELJU (<i>Humulus lupulus</i> L.)
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	IX, 35 str., 4 pregl., 9 sl., 55 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V meristemske celice nodijskih izsečkov najbolj razširjene slovenske sorte hmelja 'Aurora' smo s posredno metodo z vektorskim sistemom <i>A. t.</i> LBA4404 in plazmidom pCAMBIA2201 transformirali testni <i>gus</i> in selekcijski <i>nptII</i> gen. Po dveh tednih se je na selekcijskem MSr gojišču s 50 mg/l kanamicina začela regeneracija, ki je bila pri manjšem številu nodijev direktna, medtem ko je pri večini nastal kalus in šele nato regeneranti. Na selekcijskem MSm gojišču s 50 mg/l kanamicina je preživel 15 regenerantov. Po treh tednih so se pri 14 regenerantih na bazi oz. v okolici začeli pojavljati novi poganjki. V povprečju so v skupku nastali 3 poganjki. 120 dni po okužbi smo z molekulske PCR analizo (verižna reakcija s polimerazo) in ustreznimi začetnimi oligonukleotidi potrdili prisotnost transgenov pri 74,5 % regenerantov. Od teh je celoten genski konstrukt z <i>gus</i> in <i>nptII</i> genom imelo vgrajen 14,9 % regenerantov, kar smo potrdili z namnoženimi fragmenti dolžine 408 in 650 bp in kar 55,3 % regenerantov je imelo samo <i>nptII</i> gen ter 4,3 % regenerantov je imelo samo <i>gus</i> gen. 25,5 % regenerantov ni imelo potrjenega transgena. Z namnoženimi fragmenti, značilnimi za določen transgen smo ugotovili, da poganjki znotraj genotipa oz. skupka niso vedno vsebovali enakih transgenov iz genskega konstrukta in da vsi niso bili transformirani.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 633.791:631.532:577.2 (043.2)
CX	hop/nodals/transformations/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /transgenes/ <i>gus</i> gene/ <i>nptII</i> gene/tissue culture/regenerants/PCR
CC	AGRIS F30
AU	PAPEŽ, Natalija
AA	LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY	2007
TI	MOLECULAR ANALYSIS OF TRANSGENES IN THE HOP (<i>Humulus lupulus</i> L.)
DT	Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO	IX, 35 p., 4 tab., 9 fig., 55 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p><i>Agrobacterium</i>-mediated transformation into meristematic cells of nodal explants was used for the introduction of <i>gus</i> marker gene and <i>nptII</i> plant selection gene into Slovenian commercial hop cultivar 'Aurora'. Regeneration started after two weeks on selective MSr medium with 50 mg/l kanamycin and was direct only with small number of nodals, while most of the nodals became callus first and then regenerants. On selective MSm medium with 50 mg/l kanamycin has survived 15 regenerants. After three weeks 14 regenerants started to show up new shoots at their base or in their surroundings. Regenerants had in average clusters with 3 shoots. 120 days after infection we have confirmed presence of transgenes in 74.5 % regenerants by PCR method (polymerase chain reaction) and convenient initial oligonucleotid primers. Of these only 14.9 % regenerants have had whole gene construct. We confirmed this with 408 and 650 bp long amplified fragments. 55.3 % regenerants have had just <i>nptII</i> gene and 4.3 % regenerants have had just <i>gus</i> gene. 25.5 % of shoots were missing both transgenes. We have found out, with amplified fragments, which are typical for defined transgenes, that shoots in cluster did not always include the same transgenes from gene construct and that all of them were not transformed.</p>

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HMELJ	3
2.1.1 Kromosomi hmelja	3
2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE	4
2.2.1 Neposredni vnos genov	5
2.2.2 Posredni vnos genov z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.2.2.1 Prenos T-DNA v rastlinsko celico	6
2.2.2.2 Sistem Ti-plazmidnega vektorja za vnos genov v rastlinsko celico	8
2.2.3 Seleksijski in testni geni	9
2.3 GENSKE TRANSFORMACIJE HMELJA	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	11
3.2 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČ	11
3.3 BAKTERIJA IN PLAZMID	13
3.4 VNOS <i>gus</i> IN <i>nptII</i> GENA V GENOM HMELJA Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
	14
3.5 MOLEKULSKA ANALIZA <i>gus</i> IN <i>npII</i> GENA V REGENERANTIH HMELJA	15
3.5.1 Izolacija DNA	15

3.5.2	Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom	16
3.5.3	Verižna reakcija s polimerazo	16
3.5.4	Analiza fragmentov DNA z agarozno elektroforezo	17
4	REZULTATI	19
4.1	REGENERACIJA MERISTEMOV PO OKUŽBI Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
		19
4.2	MIKROPROPAGACIJA REGENERANTOV	19
4.3	ANALIZA <i>gus</i> IN <i>nptII</i> GENA V POGANJKIH HMELJA S PCR METODO	20
		20
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1	RAZPRAVA	26
5.2	SKLEPI	28
6	POVZETEK	30
7	VIRI	32
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Najpogosteje uporabljeni testni geni pri transformacijah rastlin (prirejeno po Henry, 1997)	10
Preglednica 2: DNA sekvence parov začetnih oligonukleotidov za posamezen gen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta	17
Preglednica 3: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA2201 pri mikropropagiranih genotipih in poganjkih hmelja 'Aurora'	23
Preglednica 4: Število in odstotek transgenov pri hmelju 'Aurora' 120 dni po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA 2201	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prenos T-DNA v rastlinsko celico (prirejeno po Zhu in sod., 2003)	7
Slika 2: Inokulirani nodijski izsečki hmelja 'Aurora' na MSr gojišču	11
Slika 3: Mapa plazmida pCAMBIA2201 (Roberts in sod., 1997)	14
Slika 4: Regeneracija nodijskih izsečkov hmelja 'Aurora' na selekcijskem MSr gojišču 3 tedne po okužbi z <i>A. t.</i> pCAMBIA2201	19
Slika 5: Oblikovanje kalusa in poganjkov pri bazi regenerantov hmelja 'Aurora' na MSm gojišču	20
Slika 6: Število poganjkov znotraj posameznega genotipa hmelja 'Aurora' na selekcijskem MSm gojišču	20
Slika 7: PCR analiza testnega <i>gus</i> in selekcijskega <i>nptII</i> gena v poganjkih 'Aurora'; 1 do 22 - transformirane rastline, K - netransformirana kontrolna rastlina, S - slepi vzorec, P - plazmid pCAMBIA2201, M - velikostni standard	21
Slika 8: PCR analiza vključitve testnega <i>gus</i> in selekcijskega <i>nptII</i> gena v poganjkih hmelja 'Aurora'; 25 do 46 - transformirane rastline, K - netransformirana kontrolna rastlina, S - slepi vzorec, P - plazmid pCAMBIA2201, M - velikostni standard	22
Slika 9: PCR analiza testnega <i>gus</i> in selekcijskega <i>nptII</i> gena v poganjkih hmelja 'Aurora'; 47, 23, 24 - transformirane rastline, K - netransformirana kontrolna rastlina, S - slepi vzorec, P - plazmid pCAMBIA2201, M - velikostni standard	22

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
<i>B. t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV35S	cauliflower mosaic virus - mozaik cvetače
CTAB	cetil trimetil-amonijev bromid - kationski detergent
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GUS	β -glukoronidaza
HPT	higromicin fosfotransferaza
NAA	α -naftalen ocetna kislina - avksin
NPT	neomicin fosfotransferaza
PCR	polymerase chain reaction - verižna reakcija s polimerazo
pCAMBIA2201	komercialni plazmid družbe Cambia iz Camberre, Avstralija
TBE	tris borat-EDTA
T-DNA	transfer DNA
TE	tris-EDTA
Ti-plazmid	tumour inducing - plazmid iz <i>A. t.</i> , ki povzroča novotvorbe
UV	ultra vijolična svetloba

1 UVOD

Gensko spreminjanje rastlin je metoda žlahtnjenja oz. dopolnitev obstoječim metodam. Biotehnoške metode žlahtnjenja rastlin vključujejo vrsto znanj in tehnik, ki omogočajo izbiro genotipa, poznavanje regeneracijskih sposobnosti posamezne rastline v *in vitro* razmerah, izbiro genov, pripravo genskega konstrukta oz. genskih elementov, transformacijo oz. vnos genov, gojenje transformiranih rastlin in spremljanje transgenov na nivoju genotipa, kot tudi fenotipsko izražanje transgenov. Genske transformacije nam omogočajo vključitev željenih lastnosti v genom rastline, brez filogenetskih omejitev. S pomočjo genskih transformacij je izboljšanih že veliko rastlinskih lastnosti, katere so prispevale k večji odpornosti na razne bolezni in škodljivce, toleranci oz. popolni odpornosti na določene herbicide ter odpornosti na nekatere okoljske dejavnike. Izboljšane so tudi nekatere lastnosti pomembne za kakovost pridelkov, sprememba strukture škroba, upočasnjeno mehčanje plodov, sprememba razmerja maščobnih kislin v rastlinskih oljih itd. (Javornik, 2000).

Genske transformacije so najbolj uspešne s tržno pridelavo bombaža, soje, koruze, tobaka in paradižnika. Uveljavljajo se tudi pri drugih rastlinah, pri hmelju pa so raziskave šele na začetku. Poglavitne težave v hmeljevih nasadih so glivične in bakterijske okužbe, pred katerimi lahko hmelj delno zaščitimo s kolobarjenjem in fitosanitarnimi ukrepi. Ugodna rešitev bi bila nasaditev odpornejših sort hmelja, katere bi lahko pridobili z genskimi transformacijami.

Pogoj za učinkovit vnos zelenih genov v hmelj je visok odstotek regeneracije *in vitro*. Le nekaj avtorjev poroča o uspešni regeneraciji hmelja, največkrat preko oblikovanja kalusa na izsečkih divjih varietet (Batista in sod., 1996; Batista in sod., 2000) ali komercialnih sort hmelja (Gurriarán in sod., 1999). Regeneracija pri hmelju je zelo odvisna od genotipa (Gurriarán in sod., 1999), zato je potrebno razviti modificiran protokol regeneracije in nato transformacije za vsako sorto oz. genotip. V našem primeru sta bila s posredno metodo z vektorskim sistemom *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*) v nodije hmelja sorte 'Aurora' transformirana testni *gus* gen za sinteza encima β -glukuronidaza in selekcijski *nptII* gen za odpornost rastlin na antibiotik kanamicin. Štiri mesece po okužbi smo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v regenerantih testirali prisotnost transgenov.

1.1 CILJ RAZISKAVE

Po transformaciji z *A. t.* in plazmidom pCAMBIA2201 v meristemske celice nodijskih izsečkov sorte hmelja 'Aurora' smo preverjali prisotnost transgenov v nastalih regenerantih, s ciljem ugotoviti uspešnost vgraditve oz. uporabljenega transformacijskega sistema za vnos gospodarsko pomembnih genov v genom hmelja.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavili smo, da se bo z metodo transformacije, ki je vključevala ultrazvok in vakuum, v genom večine regenerantov oz. poganjkov vgradil cel genski konstrukt oz. T-DNA z obema transgenoma. Predvidevali smo, da regenerantov z vgrajenim posameznim transgenom ne bo oz., da bo takih zelo malo in da bodo glede prisotnosti transgenov vsi nastali poganjki enega regeneranta oz. genotipa enaki.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ

Navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvokaličnica, trajna dvodomna ovijalka iz reda koprivovcev (*Urticales*) in družine konopljevok (*Cannabaceae*). Koreninski sistem je trajen in v globino sega 1,5 m. Nadzemni del (hmeljno steblo, listi, zalistniki, socvetja) je enoleten, zraste 2-3 m v višino in ga gojimo na hmeljni žičnici. Okoli opore se ovija s stebelnimi trihomi. Storzke (žensko socvetje) ali njihov ekstrakt uporabljajo v pivovarstvu in v manjšem obsegu v farmaciji (Petauer, 1993). Znano je, da so ga začeli gojiti kot kulturno rastlino že v 8. in 9. stoletju v Franciji in na Bavarskem. V Ameriko je bil prinešen v 17. stoletju (Moir, 2000). Masovno so ga začeli gojiti v 19. stoletju.

Slovensko hmeljarstvo se je začelo intenzivneje razvijati po letu 1870 na območju Savinjske doline. Na prelomu tisočletja so bili hmeljevi nasadi razširjeni tudi od Slovenj Gradca do Radelj ob Dravi ter v okolici Ptuja, Ormoža, Rač, Bistrice ob Sotli in Brežic. V letu 2001 so slovenska rodna hmeljišča obsegala 1800 ha, kar je predstavljalo 3 % svetovnih hmeljevih nasadov (Rode in sod., 2002). Danes so glavne proizvajalke hmelja ZDA, Rusija, Češka, Slovaška, Nemčija, Anglija, Slovenija in Francija (Petauer, 1993).

Hmelj, ki ga danes gojimo izhaja iz divje rastočih hmeljev Evrope in zahodne Azije. Divji hmelj se je prvotno razprostiral na severni polobli od 35 ° do 70 ° zemljepisne širine (Neve, 1991). V evoluciji se je s širjenjem prvotnih nahajališč razvilo več različnih tipov divjega in navadnega hmelja, ki jih uvrščamo v podvrste. Razlikujejo se po zgradbi listov in nekaterih drugih lastnostih. Geografsko skupine ločimo na evropski hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus*), ki prevladuje v Evropi, novomehiški hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *neomexicanus*) v Ameriki ter na Japonskem srčastolistni hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *cordifolius*). Študije kažejo, da se je evropska populacija prva ločila od azijske in severno-ameriške populacije in sicer pred 1,12 milijoni let, medtem ko je med azijsko in severno-ameriško populacijo do razhajanja prišlo pred približno pol milijona let. Severno-ameriška populacija je ohranila visoko stopnjo genetske raznolikosti, zato se predpostavlja, da sta iz Azije migrirali vsaj dve genetsko raznoliki populaciji hmelja (Murakami, 2003).

2.1.1 Kromosomi hmelja

Diploidni hmelj ima pri obeh spolih 20 kromosomov. Natančno morfološko študijo kromosomov so opravili že pred več kot 40-imi leti. Glede na lego centromer so razdelili kromosome kultiviranih evropskih, ameriških in japonskih hmeljev v tri glavne skupine. Vsi kariotipi so si bili podobni in niso odkrili razlik glede na geografsko poreklo hmelja (Haunold, 1991). Ker je hmelj dvodomna rastlina, so bili v preteklosti predmet intenzivnih

raziskav tudi spolni kromosomi, vendar niso odkrili kromosomov, ki bi določali spol. O pravih spolnih kromosomih govorimo tedaj, ko predstavljajo poseben par ali skupino kromosomov, ki se po strukturi in funkciji loči od ostalih avtosomov. Citološka študija je s pomočjo sodobne tehnike pretočne citomerije omogočila hitro in nedvoumno ločevanje triploidnih aneuploidov hmelja, ki so imeli 29 ali 31 kromosomov (Šesek in sod., 2000). Triploidi so z gospodarskega vidika zelo pomembni, saj $3n$ rastline naložijo v lupulinske žleze več alfa kislin in eteričnih olj kot diploidi in tetraploidi. Po vsebnosti alfa kislin, ki predstavljajo izvor grenčine piva se ocenjuje kvaliteta hmelja medtem ko so eterična olja vir arome (Peacock in sod., 1981; Peppard in sod., 1989).

2.2 GENSKE TRANSFORMACIJE

Genske transformacije so eden izmed velikih dosežkov v rastlinski molekularni biologiji, ki omogočajo spremembe genotipa in s tem tudi fenotipa rastlin z vnosom tujega gena oz. več genov v genom rastline. Osnovne metode biotehnologije so se razvijale v 60. letih pri bakterijah, od srede osemdesetih pa se jih je dalo uporabljati praktično pri 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 biolistika, ki se je razširila v prvi polovici devedesetih let, posebno za transformacijo žit, ker za enokaličnice *A. t.* ni bil učinkovit. Večina današnjih sevov, ki se uporabljajo v laboratoriju za transformacije, uspešno okužuje tudi enokaličnice (Bohanec in sod., 2004).

Do sedaj je bilo uspešno transformiranih že okoli 100 rastlinskih vrst. V poljske poskuse je bilo vključenih že več kot 70 rastlinskih vrst in okoli 15 različnih lastnosti. Gensko spremenjena soja je vodilna gensko spremenjena kultura, posejana na 54,4 milijonih ha oz. na 60 % zemljišč, sledi ji koroza z 21,2 milijoni ha oz. 24 %, bombaž z 9,8 milijoni ha ali 11 % in oljna repica s 4,6 milijoni ha oz. 5 % skupnih zemljišč. V obdobju od leta 1996 do 2004 je bil razvoj in pridelava gensko spremenjenih rastlinin (GSR) s toleranco na herbicide na prvem mestu s 58,6 milijoni ha, sledi odpornost na škodljivce s 15,6 milijoni ha, odpornost na herbicide in škodljivce s 6,8 milijoni ha, odpornost na viruse in drugo pa je leta 2004 obsegalo manj kot 0,1 milijon ha (Clive, 2005).

Tržno pridelovanje transgenih rastlin je v porastu. Prva dovoljenja za komercialno pridelovanje so bila izdana leta 1994, dve leti kasneje je bilo s transgenimi poljščinami posejanih 2,8 milijonov ha, leta 2003 so skupna zemljišča dosegla kar 67,7 milijonov ha. Leta 2004 je bilo 81 milijonov ha zemljišč posejanih z GSR, leta 2005 pa so zemljišča narasla na 90 milijonov ha (Clive, 2005). Leta 2004 je GSR pridelovalo 17 držav, v letu 2005 pa 21. V letu 2005 so se v pridelovanje vključile štiri države, Iran in tri evropske: Portugalska, Francija in Češka. Na Portugalskem in Franciji so po petletnem premoru

nadaljevali s posevki Bt-koruze, prvič pa se je pridružila tudi Češka. V EU se prideluje Bt-koruzo na skromnih površinah v Španiji, Nemčiji, Portugalski, Franciji in Češki (Clive, 2005).

Največja pridelovalka GSR so ZDA (60 %), sledi Argentina (20 %) in nato z manj kot 10 % Kanada, Brazilija, Kitajska ter druge države (Bohanec in sod., 2004). Največje povečanje pridelava GSR je bilo v letu 2005 v Braziliji za 4,4 milijonov ha, skupno 9,4 milijonov ha, sledijo ZDA z 2,2 milijoni ha, Argentina z 0,9 milijoni ha in Indija z 0,8 milijoni ha (Clive, 2005).

V Sloveniji so se genske transformacije za spremembo genotipa uporabljale v laboratorijskih razmerah pri krompirju za vnos genov za odpornost na koloradskega hrošča (Luthar, 1997; Štrukelj in sod. 1997), pri krompirju za odpornost na krompirjev virus PVYNTN, ki povzroča prstanasto nekrozo krompirja (Žel, 1998) in pri mikrosporah ječmena z večjo vsebnostjo lizina v semenih (Luthar, 1999). Preden se transgene rastline vključi v okolje je potrebno opraviti zahtevne postopke testiranja biološke varnosti.

2.2.1 Neposredni vnos genov

Z neposrednim (direktnim) načinom vnosa genov transformiramo izolirano plazmidno DNA v rastlinsko celico z elektroporacijo, obstreljevanjem rastlinskih tkiv (biolistika), ultrazvokom, kemično obdelavo (polietilen glikol) ter mikro in makro vbizgavanjem. Tehnike izberemo glede na uporabljen rastlinski material (mikrospore, embrioidi, ovule, ovariji, celične in kalusne kulture itd.) Osnovni princip direktnega vnosa genov je povečanje prepustnosti celične stene in jedrne membrane z elektroporacijo (rahlimi elektrosunki), ultrazvokom (tresenjem), kemično obdelavo (polietilen glikol); biolistiko (obstreljevanje celic ali tkiv s pospešenimi mikroprojektili, na katerih je biološko aktivna DNA) in mikroiniciranje (vbizgavanje DNA v celice z mikropipetami). Metode direktnega vnosa so se začele razvijati, ker so bile enokaličnice (žita) slabo dovzetne za okužbo z *A. t.* (Portykus, 1990; Songstad in sod., 1995).

V praksi se prednostno uporablja predvsem biolistika - obstreljevanje rastlinskih tkiv oz. celic z delci težkih kovin. Največji uspehi neposrednega vnosa so bili doseženi, ko je ameriška skupina znanstvenikov odkrila postopek biolistike z gensko pištolo (Bohanec in sod., 2004). To je postopek, ki temelji na nanosu plazmidne DNA na drobne delce zlata in volframa. Delce se nanese na membrane ali plastične izstrelke, ki jih nato močno pospešimo in ustrelimo v tarčno tkivo s pomočjo potisnega plina (helij ali dušik). Ta postopek omogoči premostitev biološke ovire rastlinskih celic za sprejem zunanjih molekul ter vključitev DNA v genom.

2.2.2 Posredni vnos genov z *Agrobacterium tumefaciens*

Pri posrednem (indirektnem) vnosu transformiramo DNA s pomočjo bakterijskih vektorjev *A. t.* in *Agrobacterium rhizogenes* (*A. r.*). Po prvem uspešnem vnosu bakterijskega gena v tobak leta 1983 je naravna sposobnost *A. t.* za vključevanje genov v rastlino postala najbolj razširjena metoda transformacij rastlin. Ta metoda je uporabna predvsem pri dvokaličnicah, vendar so že odkrili seve *Agrobacterium* z modificirano virulenco, ki uspešno okužujejo tudi enokaličnice, kar so prvič izvedli pri rižu (Hiei in sod., 1994) in koruzi (Ishida in sod., 1996, cit. po Galun in Breiman, 1998).

Večina posrednih metod uporablja predvsem patogeno bakterijo *A. t.* oz. njenega sorodnika *A. r.*, ki živi v zemlji. Bakterija ima poleg kromosomske DNK tudi plazmidno DNA, ki sta ločena člena, kar omogoča neodvisno manipulacijo s sekvencami genov, ki so vključene na plazmid. *A. t.* ima plazmid imenovan Ti-plazmid, *A. r.* pa Ri-plazmid. Prednost posrednega vnosa genov pred neposrednim vnosom je, da ne vnašamo izolirano čisto DNA, temveč zavarovano z beljakovinami, ki olajšajo prehod skozi citoplazmo in vstop v jedro. Poleg tega pri tej metodi vnesemo relativno manjše število kopij genov, ki so pogosto tudi manj poškodovani, kar je zaželeno (Bohanec in sod., 2004).

Ti-plazmid ima *vir* gene za virulenco, za sintezo in razgradnjo opinov ter *onc* gene za tvorbo rakastih celic. V naravi pri dvokaličnicah lahko na poškodovanem mestu talna bakterija *A. t.* vključi v rastlino oz. v rastlinski kromosom del svoje DNA imenovane T-DNA z *onc* geni in geni za sintezo in razgradnjo opinov, kar povzroči rakaste tvorbe. *Onc* geni kodirajo encime, sposobne sinteze rastlinskih hormonov citokininov in avksinov, zaradi katerih prihaja v rastlini do stimulacije celičnih delitev in nastanka tumorja. Geni za sintezo in razgradnjo opinov so derivati aminokislin arginina in leucina, ki jih bakterija uporablja kot vir dušika in ogljika za svojo rast in razvoj (Zupan in sod., 2000).

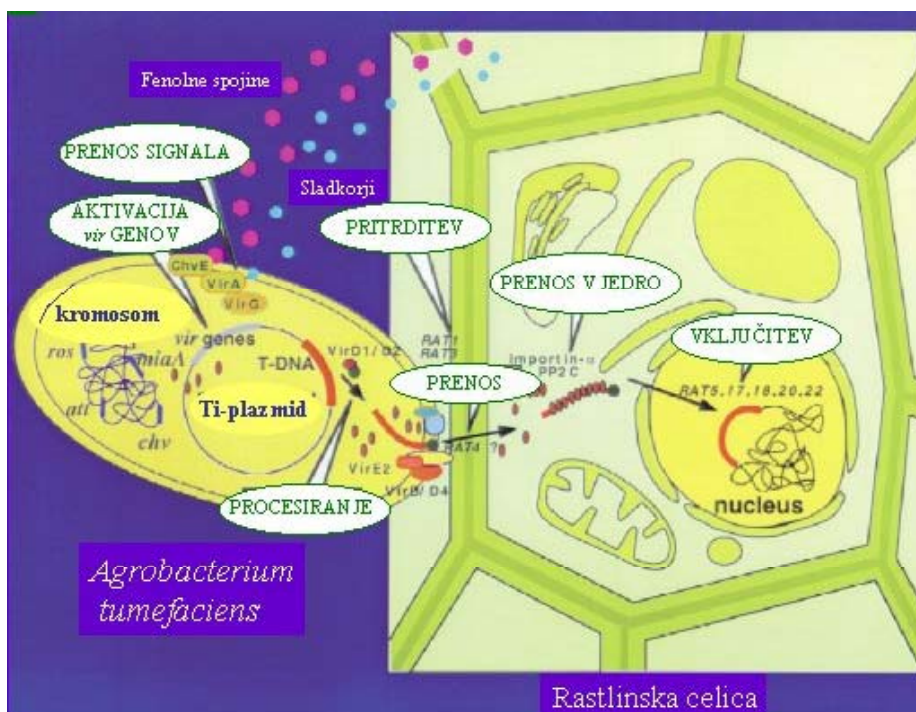
2.2.2.1 Prenos T-DNA v rastlinsko celico

Za prenos T-DNA v rastlinsko celico so potrebni geni za virulenco (približno 35 *vir* genov je organiziranih v 7 operonov, ki so označeni kot *virA*, *virB*,... *virG*), kateri se nahajajo v *vir* regiji na Ti-plazmidu in kromosomski virulentni geni (*chv* geni), kateri se nahajajo na bakterijskem kromosomu (Stiekema in Visser, 1991; Hellens in sod., 2000). *ChvA* geni kodirajo transportni protein, nujen za transport β -1,2 glukana v periplazmo - prostor med celično steno in plazmalemo, *chvB* geni kodirajo protein, ki sodeluje pri sintezi cikličnega β -1,2 glukana (Stiekema in Visser, 1991).

Geni *vir* regije so vključeni v prenos T-DNA iz bakterijske v rastlinsko celico. Potrebni so za izrez T-DNA iz Ti-plazmida, za prenos preko bakterijske membrane v rastlinsko celično

citoplazmo, transport v jedro in vključitev v rastlinski genom. Ob poškodbi rastline oz. ko bakterijska celica stopi v stik z rastlinsko celico, rastlina začne s sintezo in sproščanjem fenolnih komponent (acetosiringon in hidroacetosiringon), ki se vežejo z virA proteinom, ga aktivirajo in ta kompleks fosforilira virG protein v bakterijski citoplazmi. Modificiran virG protein deluje kot transkripcijski aktivator za ostale *vir* gene (slika 1).

Bolj virulentni 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. Produkti *virD* operona (D1 in D2 protein) omogočajo specifično cepitev enojne verige T-DNA v robnih oz. mejnih sekvencah. Robne sekvence T-DNA so približno 25 bp dolge sekvence na levi in desni strani T-DNA s posebnim mestom za endonukleazno cepitev enojne verige. Po odcepitvi enojne T-DNA se lahko znotraj robnih sekvenc sintetizira nova veriga. Izločena T-DNA se akumulira v bakterijski celici, pred razgradnjo z nukleazami pa je najverjetneje zaščitena z virE2 proteini, virD2 protein pa se veže na 5' koncu T-DNA (Zupan in sod., 2000; Stiekema in Visser, 1991). Proces vključitve T-DNA v rastlinski genom poteka s pomočjo rekombinacije in je pogostejši v območju rastlinske DNA, ki se prepisuje. Pri procesu integracije sodelujejo tako proteini vezani na T-DNA kot rastlinski encimi. V rastlinski genom se lahko vključi in ostane stabilna ena ali več kopij T-DNA (slika 1).



Slika 1: Prenos T-DNA v rastlinsko celico (prirejeno po Zhu in sod., 2003)

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

Naravni sistem *A. t.* uporabljamo danes za vnos zelenih genov v rastlino. V ta namen so izdelani različni sistemi umetno pripravljene Ti-plazmidnega vektorja: cis vektorski sistem in trans ali binarni vektorski sistem. Pri cis vektorskem sistemu so geni, ki jih želimo vnesti v rastlino, vključeni v pripravljeno T-DNA, ki je del Ti-plazmida; na istem plazmidu pa se nahaja tudi *vir* regija, potrebna za transport T-DNA. Pri trans ali binarnem vektorskem sistemu pa so zeleni geni vključeni med robne sekvence binarnega plazmida, ki je sposoben replikacije v *E. coli* in *A. t.*. V *A. t.* pa se nahaja še večji plazmid (vir plazmid), ki vsebuje *vir* gene za okužbo rastlinske celice (razoroženi Ti-plazmid). Skupno tem sistemom je, da so iz naravne T-DNA odstranjeni geni za sintezo opinov in *onc* geni, ki se zamenjajo z željenimi geni, ostanejo pa robne sekvence T-DNA. Z odstranitvijo *onc* genov v T-DNA je omogočena normalna diferenciacija transformiranih rastlinskih celic brez rakastih tvorb. Sposobnost vključevanja v genom rastline pa obdrži preostanek T-DNA (Zambryski in sod., 1983).

Molekulske in genske manipulacije so bile otežene zaradi velikosti razoroženega Ti-plazmida (približno 100 kbp). Zato je bil glavni napredek pri razvoju uporabnih vektorjev za transformacije odkritje, da se lahko T-DNA in *vir* regije nahajajo ločeno (trans) na dveh plazmidih brez izgube sposobnosti prenosa T-DNA v rastlinsko celico (Hoekema in sod., 1983, cit. po Perani in sod., 1986) in da so za prenos T-DNA pomembne robne sekvence T-DNA, ki delujejo cis, kar je omogočilo razvoj binarnih vektorjev za prenos tujih genov v rastlinski genom. V primeru binarnih T-DNA vektorjev tuje gene vključimo v binarni plazmid, ki se lahko razmnožuje tako v *E. coli* kot v *A. t.* (Bevan, 1984). Tako lahko z njim enostavno manipuliramo v *E. coli*, saj je plazmid manjši (približno 25 kbp) in ga šele nato konjugiramo v *Agrobacterium*, ki ima še razoroženi Ti-plazmid z *vir* geni.

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. CaMV35S promotor virusa, ki povzroča mozaik cvetače). Geni, regulirani z inducibilnimi promotorji pa se izražajo samo v določenih tkivih ali organih (npr. gen za fazeolin se izraža le v semenih fižola) ali ob določeni fazi razvoja ali ob določenem dražljaju (Bohanec in sod., 2004). V rastlino lahko torej vnesemo gen kateregakoli organizma, če strukturnemu genu dodamo promotorsko sekvenco, ki bo prepoznavna za rastlinski transkripcijski mehanizem.

Novejši binarni Ti-vektorji imajo rastlinski selekcijski gen lociran čim bolj proti levi robni sekvenci, da bi zagotovili čimboljši 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).

2.2.3 Seleksijski in testni geni

Tako pri bakterijskih, kot pri rastlinskih transformacijah je zaželen način, s katerim lahko preverimo, da je vključen gen res prisoten. Pri vnosu genov v rastlinsko tkivo se transformira le manjši odstotek rastlinskih celic. Za ločevanje transformiranih celic oz. regenerantov od netransformiranih je potrebno med mejne sekvence T-DNA vključiti poleg testnih oz. markerskih genov še seleksijski gen z ustreznimi promotorji. Seleksijski gen daje celicam, ki imajo vključen funkcionalen gen, določeno prednost pri razvoju. V ta namen vnašamo poleg tarčnega gena, ki je lahko testni oz. agronomsko pomemben gen tudi seleksijski gen. Seleksijski 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 kanamicin. 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 seleksijski geni. Geni, ki sprožijo odpornost na določene herbicide (*bar* oz. *pat*, *epsps*, *aroAcp4* ali *gox*), so lahko hkrati seleksijski geni in gospodarsko pomembni geni. Pogosto se antibiotične seleksijske gene zamenjuje s *xylA* genom, ki kodira ksilozno izomerazo, *manA* genom, ki kodira fosfomanozno izomerazo in špinačnim *badh* genom, ki kodira betain aldehyd dehidrogenazo (Bohanec in sod., 2004). Seleksijski geni omogočajo razvojno prednost celicam na substratu s seleksijskim agensom, na katerem netransformirane celice ne uspevajo.

Testni geni kodirajo lahko določljive substance, ki v rastlini endogeno niso prisotne in nam povedo ali je transgen aktiven oz. ali lahko zasledimo njegove produkte po celi rastlini ali samo določenem delu (fenotipsko izražanje). Napogosteje se uporablja testni bakterijski gen iz *E. coli*, imenovan *gus* ali *uidA* gen, za sintezo encima β -glukuronidaze, ki ga netransformirane rastline ne sintetizirajo oz. ne kažejo endogene aktivnosti GUS encima. Pogosto se uporabljata tudi testni *gfp* gen (sinteza zeleno fluorescentnega proteina), *DsRed* gen (sinteza rdeče fluorescentnega proteina), katerih produkte lahko zaznamo v živi celici s fluorescentnim mikroskopom. Testni oz. markerski geni se pogosto uporabljajo pri študijah ekspresije genov, *gfp* in *DsRed* gen pa lahko tudi nadomestita seleksijski gen, odbira regenerantov na osnovi izražene fluorescence (preglednica 1).

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljeni testni geni pri transformacijah rastlin (prirejeno po Henry, 1997)

Lastnost	β -glukuronidaza (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

2.3 GENSKE TRANSFORMACIJE HMELJA

Za učinkovit vnos genov je potrebno doseči visok odstotek direktne ali vsaj indirektne regeneracije transformiranih celic. Pri hmelju je omejujoč dejavnik visoka in stabilna regeneracija za uspešno transformacijo. Le nekaj avtorjev poroča o uspešni regeneraciji hmelja, najpogosteje preko oblikovanja kalusa na izsečkih divjih varietet (Batista in sod., 1996; Batista in sod., 2000) ali na izsečkih komercialnih sort hmelja (Gurriarán in sod., 1999; Šuštar-Vozlič in sod., 1999). Direktno regeneracijo dveh čeških sort hmelja sta dosegla Rakouský in Matoušek (1994). O uspešni regeneraciji in transformaciji katerekoli slovenske sorte oz. divje oblike hmelja še ni poročil. Sorta 'Aurora' se je v prejšnjih raziskavah izkazala za slabo odzivno sorto z nizko regenerativno sposobnostjo. Citokinini so najbolj vplivali na sposobnost regeneracije. Šuštar-Vozlič in sod., (1999) so dosegli največ 12,5 % regeneriranih izsečkov na gojišču z dodatkom 5 mg/l kinetina. Ferant in sod. (2001) poročajo o enakem odstotku regeneracije pri 'Aurori' na gojišču z dodatkom 3,5 mg/l citokinina 6-benzilaminopurin (BAP). Najpogosteje proučevani rastlinski hormoni za indukcijo in regeneracijo so bili indol-3-očetna kislina (IAA), indol-3-maslena kislina (IBA), kinetin, BAP, zeatin, zeatin ribozid ter tidiazuron (TDZ). Oboji poročajo, da so najbolj odzivni izsečki 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; Horlemann in sod., 2003).

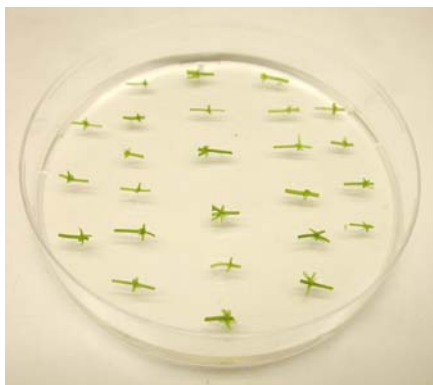
Regeneracija pri hmelju je zelo odvisna od genotipa (Gurriarán in sod., 1999), zato je potrebno razviti modificiran protokol regeneracije in posledično transformacije za vsako sorto. Le nekaj objav poroča o začetkih transformacij pri hmelju. Do sedaj so dosegli le prehodno izražanje testnega *gus* gena 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).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Mikropropagirane rastline hmelja 'Aurora' na MSm gojišču (Murashige in Skoog, 1962) smo v brezprašni komori s sterilno pinceto in skalpelom narezali na približno 1 cm nodijske izsečke. Morebitne stranske poganjke na nodijih smo pred inokulacijo porezali. Nodije smo za 1 dan inokulirali na MSr regeneracijsko gojišče z dodatkom 100 μ M acetosiringona v petrijevke premera 9 cm in višine 1,5 cm. Zaradi morebitne sekundarne okužbe in izhlapevanja gojišča smo pokrov in spodnji del petrijevke oblepili s parafilmom. Nastavljenih je bilo 15 petrijevok po 25 nodijev, skupno 375 nodijev (slika 2).

Naslednji dan smo nodijske izsečke pobrali z gojišča in za 31 min potopili v suspenzijo z *A. t.* ter jih zračno osušili na sterilnem filterškem papirju in kokultivirali na enakem gojišču tri dni. Četrty dan smo bakterijske kolonije sprali z nodijev z raztopino 200 mg/l antibiotika timentin in inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče brez acetosiringona in 50 mg/l kanamicina ter 150 mg/l timentina za preprečitev rasti *A. t.*. Na lateralne meristeme smo vplivali s hormonoma 2 mg/l thidiazurona (TDZ) in 0,025 mg/l indol-3-ocetne kisline (IAA), da so se regenerirali. 120 dni po transformaciji smo iz regenerantov izolirali DNA in s PCR (verižna reakcija s polimerazo) analizo testirali prisotnost transgenov.



Slika 2: Inokulirani nodijski izsečki hmelja 'Aurora' na MSr gojišču

3.2 SESTAVA IN PRIPRAVA 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	4,3 g/l
inozitol	0,1 g/l
glukoza	20 g/l
tiamin	0,1 mg/l
piridoksin	0,5 mg/l
nikotinska kislina	0,5 mg/l
TDZ	2,0 mg/l
IAA	0,025 mg/l
agar	8 g/l
pH	5,8

YEB gojišče za rast *A. t.* LBA4404:

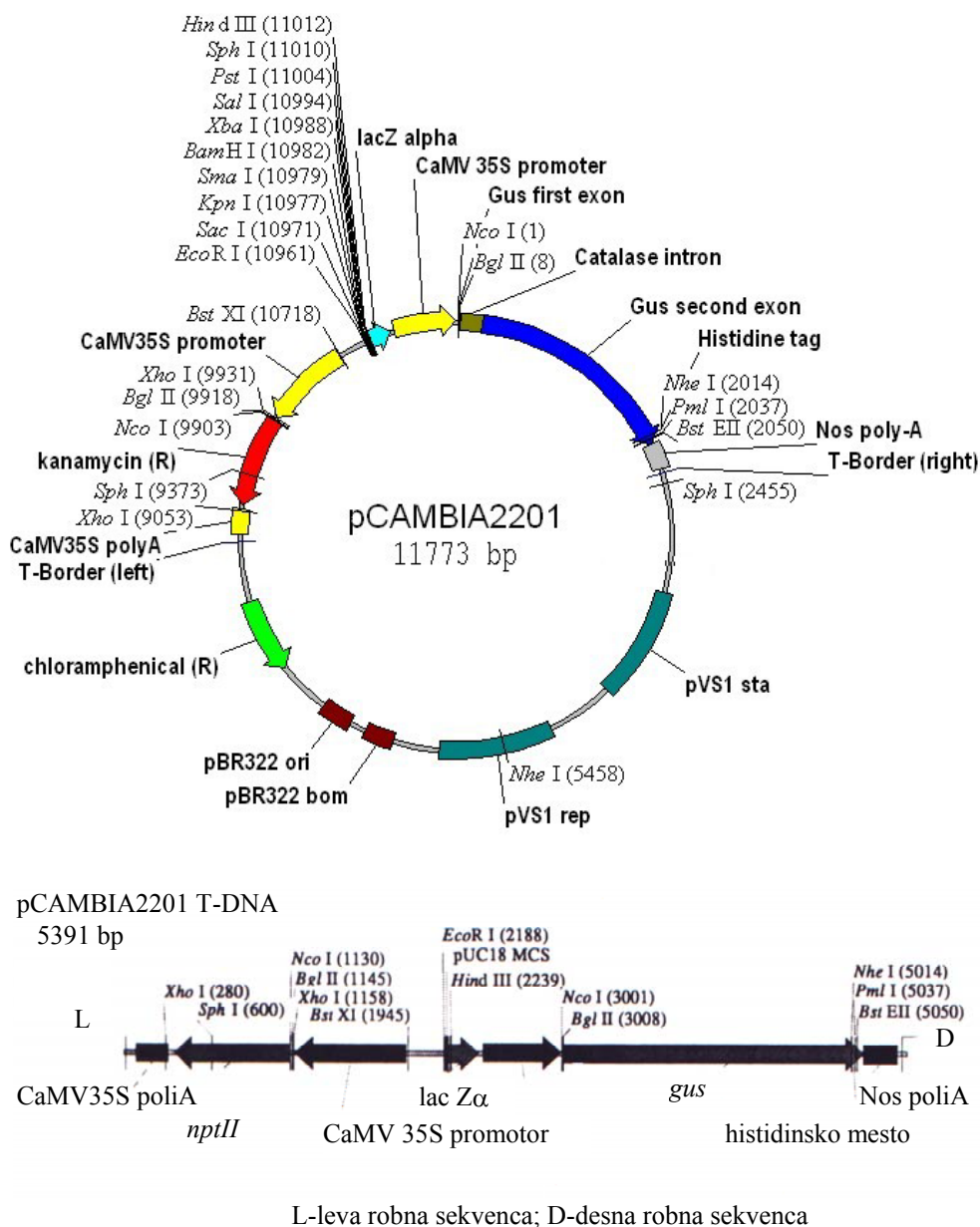
saharoza	5 g/l
pepton	5 g/l
goveji ekstrakt	5 g/l
kvasni ekstrakt	1 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g/l
agar	5 g/l
pH	7,0

Za posamezna gojišča smo zatehtali sestavine, jih pretresli v čašo ter prelili z bidestilirano vodo. Raztopili smo jih z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Nato smo dodali vitamine in hormone iz založnih raztopin. Volumen smo določili v merilni bučki in vsebino prelili nazaj v čašo ter umerili pH vrednost med mešanjem z dodajanjem 1N KOH ali 1N HCl. V gojišče smo nato dodali agar in 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 razdeli v sterilne petrijevke oz. v steklenice s polipropilenskim pokrovom premera 5,5 cm in višine 7,5 cm.

3.3 BAKTERIJA IN PLAZMID

Za vnos genov v nodijske izsečke hmelja smo izbrali komercialni sev *A. t.*) LBA4404 v katerega je bil z elektroporacijo vnešen komercialni binarni plazmid družbe Cambia iz Camberre, Avstralija z oznako pCAMBIA2201. 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, ki vsebuje bakterijsko odpornost na antibiotik rifampicin 50 mg/l in binarni plazmid pCAMBIA2201. Kateri vsebuje bakterijski selekcijski *cat* gen, odpornost na antibiotik kloramfenikol 10 mg/l in v T-DNA regijo je vključen testni oz. markerski *gus* gen, sinteza encima β -glukoronidaze ter rastlinski selekcijski *nptII* gen, odpornost na antibiotik kanamicin 100 mg/l. Oba gena sta opremljena z rastlinskim CaMV35S promotorjem, ki je bil izoliran iz virusa cvetačnega mozaika in je danes vključen v približno 80 % transgenih vrst na tržišču. T-DNA regija je dolga 5391 bp, celoten plazmid pa 11773 bp. *Gus* gen leži ob desni robni sekvenci, *nptII* gen pa ob levi robni sekvenci T-DNA (slika 3).

Testni *gus* gen ima N358Q mutacijo, ki omogoča tej verziji 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 prokariotih, kot je *Agrobacterium* (Ohta in sod., 1990; Tanaka in sod., 1990). Intron se učinkovito izreže pri evkariontih tako pri eno- kot dvokaličnicah. Plazmid vsebuje tudi restrikcijska mesta za izrez in vključitev željenih genov ter gene, ki omogočajo selekcijo transformiranih bakterij in selekcijo transformiranih rastlinskih tkiv. Plazmid je stabilen v *Agrobacterium* tudi pri gojenju v neselektivnih pogojih zaradi prisotnosti *rep* (funkcija podvajanja plazmida) in *sta* (funkcija stabilnosti plazmida) regije iz plazmida pVS1 (Deblaere in sod., 1987) (slika 3). 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 3: Mapa plazmida pCAMBIA2201 (Roberts in sod., 1997)

3.4 VNOS *gus* IN *nptII* GENA V GENOM HMELJA Z *Agrobacterium tumefaciens*

Vnos genov v genom hmelja 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 hmelja 'Aurora' na MSm gojišču smo v sterilnih pogojih narezali na nodijske izsečke, velikosti približno 1 cm in jih za en dan inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče s 100 μ M acetosiringonom.

V tekoče YEB gojišče z dodatkom 50 mg/l rifampicina in 10 mg/l kloramfenikola smo iz ene kolonije nacepili *A. t.* in 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.* 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 polovičnim bazalnim MS gojiščem z dodatkom 10 g/l saharoze.

Nodijske izsečke smo za 10 min potopili v *A. t.* suspenzijo, nato 60 sekund izpostavili ultrazvoku in 10 min vakuumu ter nato še 10 min pustili v bakterijski suspenziji. Potem smo jih v brezprašni komori na sterilnem filterškem papirju zračno osušili in inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče z dodatkom 100 µM acetosiringona za tri dni. Četrti dan smo nodijske izsečke sprali z 200 mg/l timentina [100 : 1 (w/w) tikarcilin : klavulonska kislina] in osušili na sterilnem filterškem papirju ter inokulirali na regeneracijsko gojišče s 50 mg/l kanamicina in 150 mg/l timentina za preprečitev rasti *A. t.*. Nastale regenerante smo subkultivirali na MSm gojišče za mikropropagacijo hmelja s 50 mg/l kanamicina in 150 mg/l timentina. Gojili smo jih v rastni komori pri 16/8 h (svetloba/tema) fotoperiodi, temperaturi 24 ± 1 °C in osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.5 MOLEKULSKA ANALIZA *gus* IN *nptII* GENA V REGENERANTIH HMELJA

Štiri mesece po transformaciji smo z molekulske PCR analizo (verižna reakcija s polimerazo) testirali prisotnost transgenov v regenerantih. Iz vitalnih poganjkov, ki so rasli na selekcijskem MSm gojišču in kontrolne rastline smo izolirali celokupno genomske DNA. Nato smo s fluorometrom določili koncentracijo izolirane DNA. Specifično namnoževanje *gus* in *nptII* gena je potekalo v PCR reakciji s pomočjo začetnih oligonukleotidov v DNA cikličnem termostatu. Namnožene fragmente DNA smo ločevali v 1,4 % agaroznem gelu, ki je vseboval 0,05 % etidijev bromid, ki je omogočal detekcijo fragmentov DNA pod UV svetlobo. Spremljali smo prisotnost oz. odsotnost posameznega transgena v regenerantih hmelja.

3.5.1 Izolacija DNA

V brezprašni komori smo iz poganjkov, ki so bili transformirani z vektorskim sistemom *A. t.* pCAMBIA2201 in s kontrolne rastline odrezali ustrezno količino materiala iz katerega smo po metodi Kump in sod. (1992) izolirali DNA.

Svežemu rastlinskemu tkivu smo dodali 1 ml na 68 °C segretega CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid - kationski detergent, ki razgrajuje membrane in tvori kompleks z DNA) ekstrakcijskega pufra [2 % (w/v) CTAB: 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)] in zdrobili v terilnici. Nastalo suspenzijo smo prelili v označene mikrocentrifugirke in v vodni kopeli inkubirali 1,5 ure na 68 °C z vmesnim nekajkratnim mešanjem. Tako, da smo stojalo z mikrocentrifugirkami močno pretresli in s tem premešali vsebino centrifugirk ter postavili nazaj v kopel. Nato smo dodali 500 µl mešanice topil kloroform : izoamilalkohol 24 : 1, dobro premešali in faze skoncentrirali s centrifugiranjem 10 min pri 11000 obratih/min in 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant previdno odpipetirali v označene mikrocentrifugirke in dodali 0,1 volumen (50 µl) 3 M natrijevega acetata in 1 volumen (500 µl) ledeno hladnega izopropanola in dobro premešali. DNA se je začela oborjati in ločevati iz raztopine. Vzorce smo inkubirali 20 - 30 min v zmrzovalniku pri - 18 °C in ponovno centrifugirali 10 min pri 11000 obratih/min in 4 °C. Nato smo previdno odlili supernatant, dodali 500 µl 70 % etanola (čiščenje DNA) in pelet s tresenjem odlepili od mikrocentrifugirke. Po 20-ih min smo previdno odpipetirali etanol in DNA pelet sušili v sušilniku 2 x 3 min pri 40 °C. DNA peletu smo dodali 50 - 80 µl TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)]. Volumen dodanega TE pufra je bil odvisen od velikosti DNA peleta. Vzorce DNA smo premešali in shranili v hladilniku pri 4 °C, da se je DNA čim bolj porazdelila po TE puftru.

3.5.2 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom

Koncentracijo DNA v TE puftru smo izmerili z mini DNA fluorometrom TKO 100, po navodilih proizvajalca (Hoefer Scientific Instruments). Pri merjenju smo uporabili barvilo Hoechst 33258, ki smo ga dodali v prefiltriran (filter - velikosti por 0,45 µm) 1 × TNE puffer [0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,4)] v končni koncentraciji 0,1 µg/ml. Steklenico z delovno raztopino smo zavili v alufolijo, ker je barvilo občutljivo na svetlobo. Kot standard za kalibracijo fluorometra smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 × TNE puftru z barvilom oz. delovna raztopina). DNA vzorce smo razredčili na 20 ng/µl.

3.5.3 Verižna reakcija s polimerazo

Specifično namnoževanje *gus* in *nptII* gena v verižni reakciji s polimerazo (PCR) je potekalo s pomočjo začetnih oligonukleotidov GUS3for/GUS3rev in NPTIIa/NPTIIb, ki so bili narejeni za pomnožitev fragmentov dolžine 408 bp za *gus* oz. 650 bp za *nptII* gen (preglednica 2). PCR reakcijsko mešanico smo pripravljali v brezprašni komori in jo med delom hladili na ledu. V PCR mikrocentrifugirke (0,5 ml) smo odpipetirali 5 µl DNA vzorca, centrifugirali do 1000 obratov/min in dodali 20 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 1 × PCR puffer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8.3], 0,1 mM vsakega deoksinukleotid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 mM ustreznega

specifičnega začetnega oligonukleotida (preglednica 2) in 1 enoto encima Taq polimeraze (Fermentas, Nemčija) ter sterilno destilirano vodo. Reakcijsko mešanico, volumna 25 μ l, v kateri je potekalo namnoževanje DNA smo centrifugirali pri 1000 obratih/min. 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 minut pri 94 °C,
- 35 ponavljajočih se ciklov:
 - denaturacija DNA 1 minuto pri 94 °C,
 - prileganje začetnih oligonukleotidov 1 minuto pri 58 °C,
 - sinteza fragmentov DNA 1,5 minute pri 72 °C,
- končno izdolževanje fragmentov 5 min pri 72 °C.

Pred nadaljno analizo smo vzorce hranili pri 4 °C.

Preglednica 2: DNA sekvence parov začetnih oligonukleotidov za posamezen gen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta

Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5' - 3'	Pričakovana dolžina fragmenta
GUS3a	GGC GAA CAG TTC CTG ATT AAC	408bp
GUS3b	TTC GTT GGC AAT ACT CCA CAT	
NPTIIIa	GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG	650 bp
NPTIIIb	ATG GGG AGC GGC GAT ACC GTA	

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

3.5.4 Analiza fragmentov DNA z agarozno elektroforezo

Namnožene fragmente DNA smo ločevali v 1,4 % agaroznem gelu v horizontalni elektroforetski posodi. V steklenico (Schott-Duran) smo zatehtali 0,7 g agaroze in dolili 1 \times TBE pufer 50 ml [890 mM Tris, 890 mM borna kislina, 10 mM EDTA] in zmes topili v mikrovalovni pečici. Steklenico smo pod tekočo hladno vodo z enakomernim mešanjem hladili, da je raztopina dosegla 58 °C in dodali 2,5 μ l etidijevega bromid (10 mg/ml) in z enakomernim vrtenjem steklenice porazdelili etidijev bromida. Raztopino smo previdno prelili s selotejpom oblepljen model z vstavljenima glavnikoma, da se je enakomerno porazdelila. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavnike in selotejp ter položili v elektroforetsko posodo in prelili z 1 \times TBE pufrom.

PCR vzorcem z namnoženimi DNA fragmenti smo dodali 2 μ l nanašalnega barvila [12,5 % (w/v) ficol 400, 0,2 % (w/v) bromfenol modro, 6,7 % (v/v) 10 \times TBE], centrifugirali do 1000 obratov/min in 17 μ l vzorca nanesti na agarozni gel. Poleg vzorcev smo na gel nanesti še DNA izolirano iz kontrole (netransformirana rastlina 'Aurore'), slepi vzorec (vse

komponente reakcijske mešanice razen DNA, ki smo jo nadomestili s sterilno destilirano H₂O), ustrezni čisti plazmid pCAMBIA2201 (izoliran iz *E. coli*), 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 uro in 30 minut. Gel je vseboval 0,05 % etidijev bromid, ki je omogočal detekcijo fragmentov DNA pod UV svetlobo (302 nm). Za dokumentacijo smo gele fotografirali s polaroidnim fotoaparatom.

4 REZULTATI

4.1 REGENERACIJA MERISTEMOV PO OKUŽBI Z *Agrobacterium tumefaciens*

Po enem tednu na selekcijskem MSr gojišču s 50 mg/l kanamacina se je pri večini nodijev na rezanih površinah začel oblikovati kalus, ki je po 2-3 tednih prerasel nodij. Po 2 tednih se je začela regeneracija, ki je bila pri manjšem številu nodijev direktna, brez rasti kalusa na predelih s stranskimi meristemi, medtem ko je pri večini nastal kalus in šele nato se je začela regeneracija (slika 4).



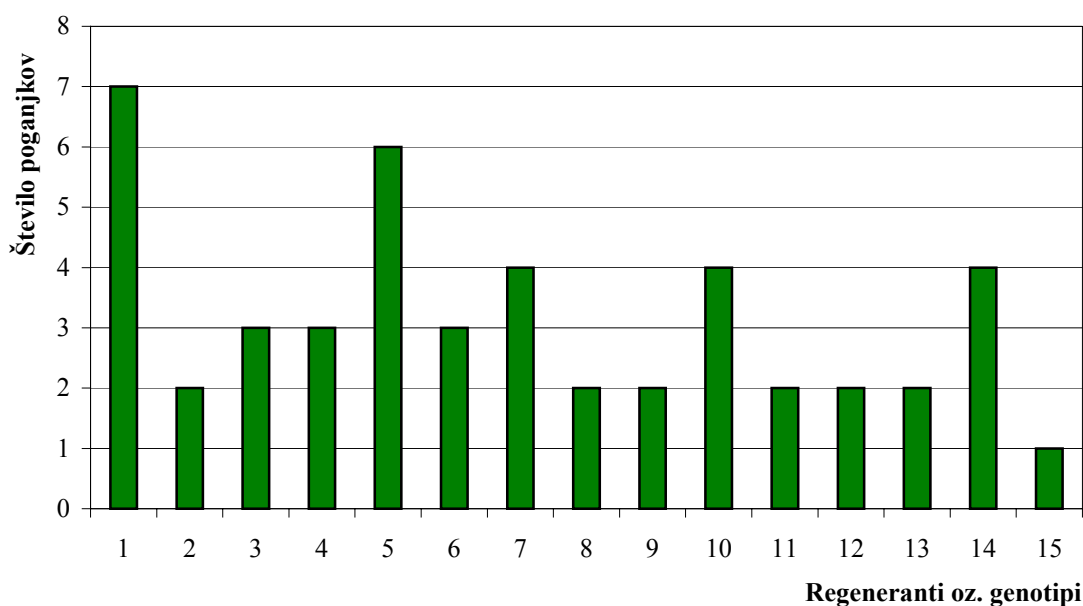
Slika 4: Regeneracija nodijskih izsečkov hmelja 'Aurora' na selekcijskem MSr gojišču 3 tedne po okužbi z *A. t.* pCAMBIA2201

4.2 MIKROPROPAGACIJA REGENERANTOV

Regenerante nastale na selekcijskem MSr gojišču smo subkultivirali na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l kanamicina. Nekaj regenerantov je po približno treh tednih propadlo. Pri večini se je po dveh tednih rast ustavila in na bazi se je začel oblikovati kalus. Po približno treh tednih so se na bazi začeli pojavljati novi poganjki. Samo regenerant oz. genotip z oznako 15 se ni razraščal. Pri ostalih 14 regenerantih je nastal 1 oz. največ 6 novo nastalih poganjkov pri bazi starega regeneranta. V povprečju so v skupku nastali 3 poganjki (slika 5, 6).



Slika 5: Oblikovanje kalusa in poganjkov pri bazi regenerantov hmelja 'Aurora' na MSm gojišču



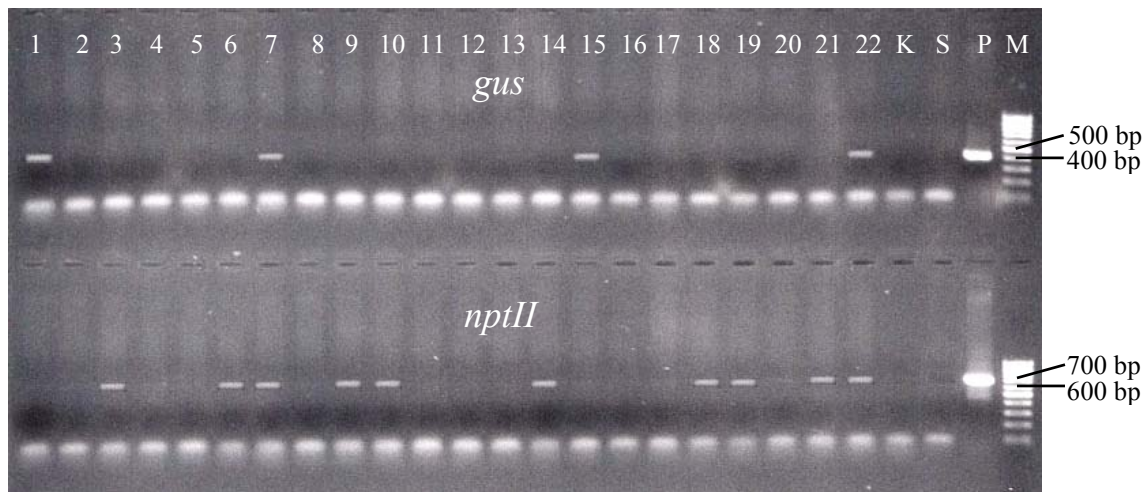
Slika 6: Število poganjkov znotraj posameznega genotipa 'Aurora' na selekcijskem MSm gojišču

4.3 ANALIZA *gus* IN *nptII* GENA V POGANJKIH HMELJA S PCR METODO

Pri posameznih poganjkih hmelja 'Aurora' je vnos transgenov uspel pri tistih, pri katerih smo s PCR analizo potrdili vključenost celotnega genskega konstrukta z *gus* in *nptII* genom ali samo del genskega konstrukta z *gus* oz. *nptII* genom.

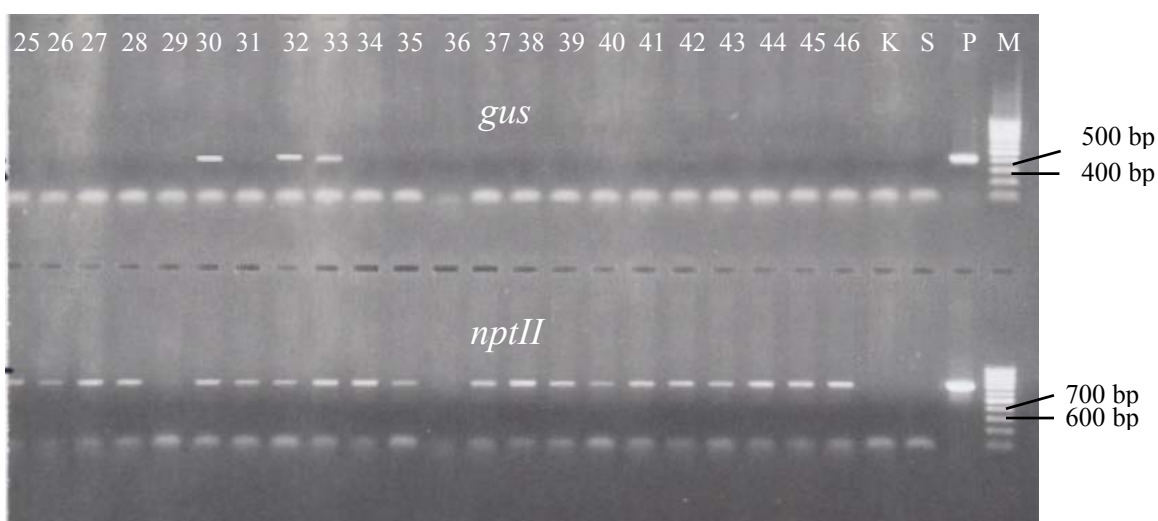
Elektroforetski gel je bil sestavljen iz dveh delov, ker je genski konstrukt vseboval dva transgena. Na zgornjo *gus* polovico (slika 7 in 8) oz. na levo stran gela (slika 9) smo nanegli DNA vzorce s parom začetnih oligonukleotidov za *gus* gen. Na spodnjo *nptII* polovico (slika 7 in 8) oz. na desno stran gela (slika 9) pa iste DNA vzorce s parom

začetnih oligonukleotidov za *nptII* gen. Pri *gus* genu so se namnožili fragmenti dolžine 408 bp in pri *nptII* genu 650 bp (preglednica 2).



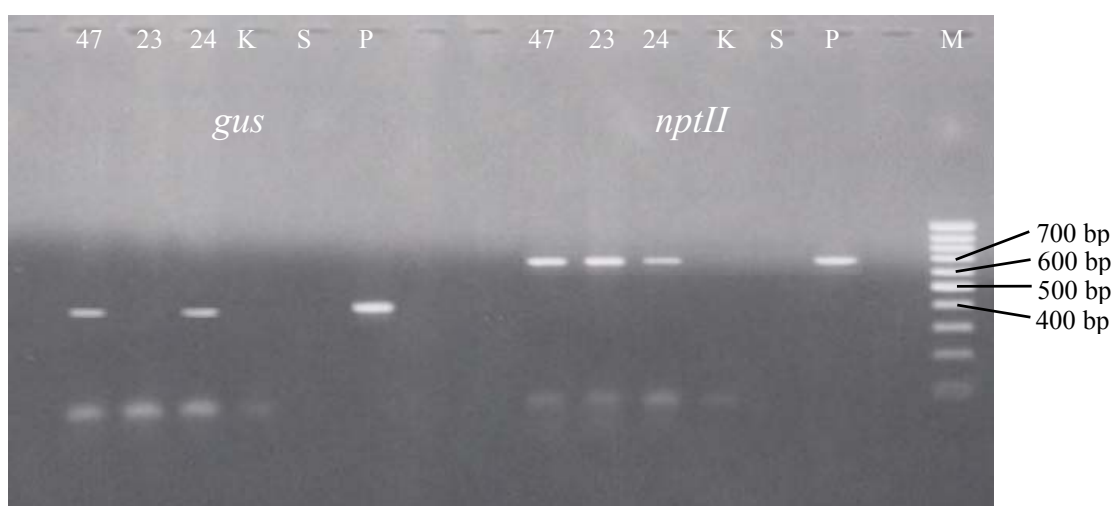
Slika 7: PCR analiza testnega *gus* in selekcijskega *nptII* gena v poganjkih hmelja 'Aurora'; 1 do 22 - transformirane rastline, K - netransformirana kontrolna rastlina, S - slepi vzorec, P - plazmid pCAMBIA2201, M - velikostni standard

Pri vseh vzorcih, ki so rasli na selekcijskem MSm gojišču s 50 mg/l kanamacina se fragment dolžine 650 bp s katerim bi lahko potrdili vgraditev *nptII* gena ni namnožil. Pri vzorcih z oznako 3, 6, 7, 9, 10, 14, 18, 19, 21 in 22 se je namnožil fragment dolžine 650 bp s katerim smo potrdili prisotnost *nptII* gena. Pri vzorcih z oznako 7 in 22 je bil prisoten tudi fragment s 408 bp s katerim smo potrdili vgraditev *gus* gena. Ta poganjka sta imela vključen celoten genski konstrukt z *gus* in *nptII* genom. Pri vzorcih z oznako 1 in 15 se je namnožil fragment dolžine 408 bp s katerim smo potrdili vključitev samo *gus* gena. Ta poganjka sta imela prisoten samo del genskega konstrukta. Pri vzorcih 2, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 16, 17 in 20 se noben od pričakovanih fragmentov ni namnožil (slika 7, preglednica 3).



Slika 8: PCR analiza testnega *gus* in selekcijskega *nptII* gena v poganjkih hmelja 'Aurora'; 25 do 46 - transformirane rastline, K - netransformirana kontrolna rastlina, S - slepi vzorec, P - plazmid pCAMBIA2201, M - velikostni standard

Pri vseh poganjkih, razen pri poganjkih z oznako 29 in 36, se je namnožil fragment dolžine 650 bp s katerim smo potrdili vključenost *nptII* gena. Poganjki z oznako 30, 32 in 33 so imeli prisoten tudi fragment dolžine 408 pb s katerim smo potrdili prisotnost *gus* gena. Pri teh poganjkih se je vgradil celoten genski konstrukt z *gus* in *nptII* genom. Pri poganjkih z oznako 25 - 28, 31, 34, 35, 37 - 46 se je namnožil samo fragment s 650 bp s katerim smo potrdili vključitev samo *nptII* gena oz. del genskega konstrukta. Pri nobenem od analiziranih poganjkov nismo zasledili samo *gus* gena (slika 8, preglednica 3).



Slika 9: PCR analiza testnega *gus* in selekcijskega *nptII* gena v poganjkih hmelja 'Aurora'; 47, 23, 24 - transformirane rastline, K - netransformirana kontrolna rastlina, S - slepi vzorec, P - plazmid pCAMBIA2201, M - velikostni standard

Pri poganjkih 24 in 47 sta se namnožila fragmenta dolžine 408 in 650 bp s katerima smo potrdili vgraditev celotnega genskega konstrukta z *gus* in *nptII* genom. Pri poganjku 23 se fragment s 650 bp ni namnožil, da bi lahko potrdili vgraditev *nptII* gena (slika 9, preglednica 3).

Znotraj regeneranta oz. genotipa z oznako 1 je nastalo sedem poganjkov. Samo pri enem je bil na podlagi PCR analize vgrajen celoten genski konstrukt z *gus* in *nptII* genom. Prav tako je bil pri enem poganjku potrjen samo del genskega konstrukta z *gus* genom. Pri dveh poganjkih je bil vključen samo *nptII* gen in trije so bili brez potrjenega transgena. Pri genotipu 2 je imel od dveh poganjkov en vgrajen samo *nptII* gen in drugi ni bil transformiran. Pri genotipu 3 je imel en od treh vgrajen samo *nptII* gen in dva poganjka sta bila brez transgenov. Pri genotipu 4 je en poganjek od treh imel vgrajen samo *gus* gen in en samo *nptII* gen ter en je bil netransformiran. Genotip 5 je imel šest poganjkov. Pri treh poganjkih je bil potrjen samo *nptII* gen in trije so bili netransformirani. Pri genotipu 6 sta dva poganjka od treh imela vgrajen celoten genski konstrukt in en je imel vgrajen samo *nptII* gen. Štirje poganjki pri genotipu 7 so imeli potrjen samo *nptII* gen. Pri genotipu 8 je en poganjek imel vključen celoten genski konstrukt in drugi je bil netransformiran. En poganjek pri genotipu 9 je imel vgrajena oba transgena in en poganjek je imel prisoten samo *nptII* gen. Pri genotipu 10 je imel en poganjek prisoten celi genski konstrukt in dva samo *nptII* gen ter en je bil netransformiran. Oba poganjka pri genotipu 11 sta imela vgrajen samo *nptII* gen, prav tako pri genotipu 12, in 13, medtem ko so pri genotipu 14 imeli štiri poganjki prisoten samo *nptII* gen. Genotip 15 je imel samo en poganjek in ta je imel vključen celi genski konstrukt (slika 7, 8, 9 in preglednica 3).

Preglednica 3: Namnoženi fragmenti DNA iz genskega konstrukta pCAMBIA2201 pri mikropropagiranih genotipih in poganjkih hmelja 'Aurora'

Genotip oz. regenerant	Poganjek	Transgen			
		<i>gus</i> + <i>nptII</i>	samo <i>gus</i>	samo <i>nptII</i>	brez obeh
1	1		+		
1	2				+
1	3			+	
1	4				+
1	5				+
1	6			+	
1	7	+			
2	8				+
2	9			+	
3	10			+	
3	11				+
3	12				+

se nadaljuje

nadaljevanje

Genotip oz. regenerant	Poganjek	Transgen			
		<i>gus + nptII</i>	samo <i>gus</i>	samo <i>nptII</i>	brez obeh
4	13				+
4	14			+	
4	15		+		
5	16				+
5	17				+
5	18			+	
5	19			+	
5	20				+
5	21			+	
6	22	+			
6	23			+	
6	24	+			
7	25			+	
7	26			+	
7	27			+	
7	28			+	
8	29				+
8	30	+			
9	31			+	
9	32	+			
10	33	+			
10	34			+	
10	35			+	
10	36				+
11	37			+	
11	38			+	
12	39			+	
12	40			+	
13	41			+	
13	42			+	
14	43			+	
14	44			+	
14	45			+	
14	46			+	
15	47	+			

Preglednica 4: Število in odstotek transgenov pri hmelju 'Aurora' 120 dni po okužbi z *A. t.* pCAMBIA 2201

Število genotipov / poganjkov	Transgeni							
	<i>gus in nptII</i>		samo <i>gus</i>		samo <i>nptII</i>		brez	
	število	%	število	%	število	%	število	%
15 / 47	7	14,9	2	4,3	26	55,3	12	25,5

Od 47 poganjkov jih je 74,5 % imelo vgrajen transgen. Od teh jih je imela večina, kar 26 oz. 55,3 % namnožen DNA fragment dolžine 650 bp s katerim smo potrdili vključenost

seleksijskega *nptII* gena. Celoten genski konstrukt z *gus* in *nptII* genom je imelo 7 oz. 14,9 % poganjkov in samo pri 2 oz. 4,3 % poganjkov je bil prisoten samo *gus* gen. Noben od proučevanih fragmentov se ni namnožil pri 12 oz. 25,5 % poganjkov (preglednica 4).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Iz *in vitro* gojenih rastlin hmelja 'Aurora' na MSm gojišču, smo narezali nodije in jih inokulirali na regeneracijsko MSr gojišče s 100 μ M acetosiringonom. Naslednji dan smo nodijske izsečke inkubirali v *A. t.* suspenziji sev LBA4404 z binarnim plazmidom pCAMBIA2201, ki je vključeval testni *gus* in selekcijski *nptII* gen. V MSr gojišče smo dodali acetosiringon za pospešitev okužbe in izrez T-DNA iz plazmida ter uspešnejšo vgraditev v hmeljev genom (Sunilkumar in sod., 1999). Z namenom, da bi izboljšali odstotek transformiranih rastlin smo nodijske izsečke v času inkubacije z *A. t.* izpostavili kombinaciji ultrazvoka, ki razrahlja celične stene in vakuuma, ki omogoči hitrejšo infiltracijo transgenov. Po treh dneh kokultivacije smo izsečke prestavili na regeneracijsko MSr gojišče s selekcijskim antibiotikom kanamicin 50 mg/l in antibiotikom timentin 150 mg/l, ki je uspešno in hitro zavrl oz. preprečil rast bakterije *A. t.*. Poškodb od timentina na nodijih, kalusu in regenerantih nismo opazili. Regeneranti na gojišču s timentinom so bili vitalni in zeleni, o podobnem učinku poročajo tudi Cheng in sod. (1998).

Pri hmelju je eden od omejujočih dejavnikov za uspešno transformacijo nizka in nestabilna oz. slabo ponovljiva regeneracija. 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. Po vnosu genov je zaželjena hitra in direktna regeneracija transformiranih celic. Ta nam omogoča, da v relativno kratkem času dobimo zadovoljivo število transformiranih regenerantov. Pri direktni regeneraciji, brez vmesne faze kalusa, je tudi manj možnosti nastanka dednih sprememb oz. mutacij. V našem primeru se je po enem tednu na selekcijskem MSr gojišču, po okužbi nodijskih izsečkov hmelja 'Aurora' z *A. t.* pCAMBIA2201, pri večini nodijev na reznih površinah začel oblikovati kalus, ki je po 2-3 tednih prerasel nodije. Po 2 tednih se je začela regeneracija, ki je bila pri manjšem številu nodijev direktna, brez rasti kalusa na predelih s stranskimi meristemi, medtem ko je pri večini nastal kalus in šele nato se je začela regeneracija (slika 4).

Regenerante nastale na selekcijskem MSr gojišču smo subkultivirali na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l kanamicina in 150 mg/l timentina. Nekaj regenerantov je po približno treh tednih propadlo brez znanega vzroka, tako kot propade določen odstotek rastlin v postopku mikropropagacije. Možen vzrok propadanja je lahko, da kljub vgrajenemu transgenu niso bili sposobni razgraditi kanamicin 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), afriški vijolici (Mercuri in sod., 2000).

Do utišanja genov lahko pride na transkripcijski ravni, zaradi homologije med sekvencami transgenov in endogenov ali postranskripcijski ravni, zaradi mehanizma razgradnje prepisane transgene RNA (Mondal in sod., 1997).

Pri večini regenerantov se je po dveh tednih rast ustavila in na bazi se je začel oblikovati kalus. Po približno treh tednih so se na bazi oz. v okolici začeli pojavljati novi poganjki. Samo regenerant oz. genotip z oznako 15 se ni razraščal. Pri ostalih 14 regenerantih je nastal 1 oz. največ 6 novo nastalih poganjkov pri bazi starega regeneranta. V povprečju so v skupku nastali 3 poganjki (slika 5, 6 in preglednica 3, 4).

Na molekulskem DNA nivoju smo s PCR analizo pri 15 genotipih oz. 47 poganjkih testirali vgraditev *gus* in *nptII* gena v genom hmelja 'Aurora'. Predpostavili smo, da se bo s transformacijo, ki je poleg inkubacije z bakterijo *A. t.* vključevala še ultrazvok in vakuum, v genom večine regenerantov oz. poganjkov vgradil cel genski konstrukt, da regenerantov z vgrajenim posameznim transgenom ne bo, oz. bo takih zelo malo in da bodo glede prisotnosti transgenov vsi nastali poganjki enega regeneranta oz. genotipa enaki. Celoten genski konstrukt oz. T-DNA plazmida pCAMBIA2201 z *gus* in *nptII* genom se je vgradil v genom pri 14,9 % poganjkov, kar smo potrdili z namnoženo dolžino fragmentov 408 in 650 bp za *gus* in *nptII* gen. Pri samo 4,3 % poganjkov se je namnožil fragment s 408 bp, s katerim smo potrdili prisotnost samo *gus* gena. Pri kar 55,3 % poganjkov se je namnožil samo fragment dolžine 650 bp, s katerim smo potrdili vgraditev samo *nptII* gena. Seleksijski *nptII* gen je bil lociran v T-DNA proti levi robni sekvenci, medtem ko testni *gus* gen proti desni mejni sekvenci (slika 3). Sheng in sod. (cit. po Hellens in sod., 2000) so ugotovili, da ima desna robna sekvenca pri prenosu T-DNA iz *A. t.* v rastlinsko celico prednost pred levo robno sekvenco. Zato bi lahko pričakovali, da bo poganjkov z vgrajenim *gus* genom veliko več kot tistih z *nptII* genom. Možen vzrok, da je bilo 12,5 krat manj poganjkov z *gus* genom je lahko ta, da so celice oz. poganjki z vgrajenim samo *gus* genom že na selekcijskem MSr oz. MSm gojišču propadle oz. propadli. V skupku genotipa 1 in 4 sta oba poganjka s samo *gus* genom imela v okolici poganjek oz. poganjke z *nptII* genom. Ti so lahko omogočili zaradi detoksifikacije gojišča nemoteno rast poganjkoma brez *nptII* gena. Pri 25,5 % poganjkov se noben od fragmentov ni namnožil, s katerim bi lahko potrdili, da so te rastline transformirane (slika 7, 8, 9 in preglednica 3).

Nekaj poganjkov znotraj posameznih genotipov oz. skupkov je na selekcijskem MSm gojišču počasi raslo in imeli so svetlo zelene liste. Pri kar 70,2% poganjkov se je namnožil fragment dolžine 650 bp s katerim smo potrdili vgraditev *nptII* gena. Pri nobenem od 15 genotipov oz. regenerantov niso bili vsi poganjki znotraj skupka brez *nptII* gena. Poganjek oz. poganjki enega genotipa, ki so imeli vgrajen *nptII* gen, so lahko zaradi detoksifikacijskega delovanja omogočili rast sosednjih poganjkov znotraj skupka, ki niso imeli vgrajen transgen oz. so imeli samo *gus* gen. 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 50 mg/l kanamicina je za polovico nižja, kot je priporočena za dvokaličnice. Koncentracija 100 mg/l kanamicina je negativno vplivala na regeneracijo in rast regenerantov, zato smo znižali koncentracijo.

S PCR analizo in namnoženimi fragmenti, značilnimi za določen transgen smo ugotovili tudi to, da poganjki znotraj genotipa ne vsebujejo vedno enakih transgenov iz genskega konstrukta (slika 7, 8, 9 in preglednica 3, 4). Možno je, da pri prenosu biološke informacije ob delitvi celic endonukleaze prepoznajo transgene sekvence, kot tujek in jih izrežejo iz DNA molekule. Če se zgodi to v mitozni oz. v zadnjih fazah mitoze vse hčerinske celice ne vsebujejo transgenov. Tako nastanejo regeneranti, katerih celice določenega tkiva ne vsebujejo transgenov. Z mikropropagacijo lahko razmnožimo rastline z ali brez transgenov.

Okužba nodijev z *A. t.* in sami postopki vnosa (ultrazvok 60 sec in vakuum 10 min), ki smo jih vključili v postopek transformacije, z namenom izboljšati vnos genov, so lahko tudi negativno vplivali na regeneracijo. Zato je zelo pomembno, da je regeneracija visoka in stabilna. Nekateri rastlinski vrste oz. posamezni genotipi, med njimi je tudi hmelj, so slabo odzivni v tkivni kulturi, kar dodatno otežuje oz. negativno vpliva na uspeh transformacije (Hiei in sod., 1997).

5.2 SKLEPI

Kalusno tkivo se je pri večini nodijev na rezanih površinah začelo oblikovati po enem tednu in po 2-3 tednih je preraslo nodij. Po 2 tednih se je začela regeneracija, ki je bila pri manjšem številu nodijev direktna, brez rasti kalusa na predelih s stranskimi meristemi, medtem ko je pri večini nastal kalus in šele nato se je začela regeneracija.

Nekaj regenerantov je približno po treh tednih propadlo. Pri večini se je po dveh tednih rast ustavila in na bazi se je začel oblikovati kalus. Po približno treh tednih so se na bazi oz. v okolici začeli pojavljati novi poganjki. V povprečju so v skupku nastali 3 poganjki.

120 dni po okužbi z *A. t.* LBA4404 in plazmidom pCAMBIA2201 smo s PCR analizo potrdili pri 74,5 % poganjkov oz. regenerantov prisotnost transgenov.

Celoten genski konstrukt z *gus* in *nptII* genom je bil vgrajen pri 14,9 % regenerantov. Samo *nptII* gen je imelo 55,3 % regenerantov in samo *gus* gen 4,3 % regenerantov. Pri 25,5 % regenerantov nismo potrdili transgenov.

S PCR analizo in namnožnimi fragmenti, značilnimi za določen transgen, smo ugotovili, da vsi poganjki znotraj genotipa oz. skupka niso vsebovali vedno enakih transgenov iz genskega konstrukta oz. pri vseh nismo potrdili prisotnost transgenov.

Koncentracija 100 mg/l kanamicina je negativno vplivala na regeneracijo stranskih meristemov. Zato smo v MSr in MSm gojišče dodali samo 50 mg/l kanamicina. Pri tej koncentraciji se je preživetje nodijskih izsečkov in regeneracija ter mikropropagacija izboljšala.

Antibiotik timentin 150 mg/l je uspešno in hitro zavrl oz. preprečil rast bakterije *A. t.*. Poškodb na nodijih, kalusu in regenerantih nismo opazili. Regeneranti na gojišču s timentinom so bili vitalni in zeleni.

6 POVZETEK

Novejše biotehnološke metode med katerimi so tudi genske transformacije, predstavljajo dopolnitev obstoječemu žlahtnjenju hmelja, ki je dolgotrajen postopek zaradi specifičnih lastnosti (dvodomna trajnica). Genske transformacije omogočajo relativno hitro vključitev željenih lastnosti v genom že obstoječih sort hmelja, ne da bi se pri tem spremenile njihove kvalitativne agronomsko pomembne lastnosti.

V našem poskusu smo poskušali vzpostaviti učinkovit transformacijski sistem s pomočjo posrednega vnosa genov z bakterijo *A. t.* pri najbolj razširjeni slovenski sorti hmelja 'Aurora'. Iz mikropropagiranih rastlin gojenih na MSm gojišču smo narezali nodijske izsečke in jih za en dan inokulirali na MSr regeneracijsko gojišče s 100 μ M acetosiringonom. Na lateralne meristeme smo vplivali s kombinacijo 2 mg/l citokinina TDZ in 0,025 mg/l avksina IAA, da smo spodbudili regeneracijo. Koncentracija 100 mg/l selekcijskega antibiotika kanamicin je negativno vplivala na regeneracijo stranskih meristemov, zato smo v MSr gojišče za regeneracijo dodali samo 50 mg/l kanamicina. Pri tej koncentraciji se je preživetje nodijskih izsečkov in regeneracija izboljšala.

V tekoče YEB gojišče smo nacepili bakterijsko kolonijo *A. t.* sev LBA4404 s plazmidom pCAMBIA2201, ki je vključeval testni *gus* in selekcijski *nptII* gen. Naslednji dan smo nodijske izsečke za 10 min potopili v bakterijsko suspenzijo, nato smo jih 1 min izpostavili ultrazvoku in za 10 min vakuumu ter še 10 min pustili v bakterijski suspenziji. Po 31 min smo jih zračno posušili na sterilnem filterškem papirju v brezprašni komori in jih inokulirali na enako MSr gojišče za tri dni. Četrty dan smo bakterijske kolonije sprali z raztopino 200 mg/l antibiotika timentin, zračno osušili in inokulirali na selekcijsko MSr gojišče s 50 mg/l kanamicina in 150 mg/l timentina za preprečitev rasti *A. t.*. Antibiotik timentin je uspešno in hitro zavrl oz. preprečil rast bakterije *A. t.*. Poškodb na nodijih, kalusu in regenerantih nismo opazili. Regeneranti na gojišču s timentinom so bili vitalni in zeleni.

Po enem tednu na selekcijskem MSr gojišču se je pri večini nodijev na reznih površinah začel oblikovati kalus, ki je po približno 2-3 tednih prerasel nodij. Po dveh tednih se je začela regeneracija, ki je bila pri manjšem številu nodijev direktna, medtem ko je pri večini nastal kalus in šele nato se je začela regeneracija (slika 4). Regenerante nastale na selekcijskem MSr gojišču smo subkultivirali na selekcijsko MSm gojišče s 50 mg/l kanamicina. Nekaj regenerantov je po treh tednih propadlo. Pri večini se je po dveh tednih rast ustavila in na bazi se je začel oblikovati kalus. Po približno treh tednih so se na bazi začeli pojavljati novi poganjki. Samo genotip z oznako 15 se ni razrašal. Pri ostalih 14 genotipih je nastal 1 oz. največ 6 poganjkov. Povprečno so v skupku nastali trije poganjki (preglednica 3 in slika 5).

Štiri mesece po transformaciji smo z molekulske PCR analizo testirali vključenost *gus* in

nptIII gena v genomu hmelja. Po transformaciji smo iz regeneriranih poganjkov in kontrolne rastline izolirali celokupno genomsko DNA po metodi Kump in sod. (1992). Nato smo s fluorometrom določili koncentracijo izolirane DNA in jo razrečili na 20 ng/ μ l. Specifično namnoževanje *gus* in *nptIII* gena je potekalo v PCR reakciji s pomočjo začetnih oligonukleotidov (preglednica 2) v DNA cikličnem termostatu. Namnožene fragmente DNA smo ločevali v 1,4 % agaroznem gelu, kateri je vseboval 0,05 % etidijev bromid, ki omogoča detekcijo fragmentov DNA pod UV svetlobo. Elektroforetski gel smo razdelili na dva dela, ker je genski konstrukt vseboval dva transgena. Na zgornjo *gus* polovico gela (slika 7 in 8) oz. na levo stran (slika 9) smo nanegli DNA vzorce s parom začetnih oligonukleotidov za *gus* gen. Na spodnjo *nptIII* polovico gela (slika 7 in 8) oz. na desno stran (slika 9) pa iste DNA vzorce s parom začetnih oligonukleotidov za *nptIII* gen. Pri *gus* genu so se namnožili fragmenti dolžine 408 bp in pri *nptIII* genu fragmenti s 650 bp (preglednica 2).

Uspešno transformirani poganjki so bili tisti pri katerih smo s PCR analizo potrdili vključenost celotnega genskega konstrukta z *gus* in *nptIII* genom ali samo del genskega konstrukta s posameznim transgenom. Pri 74,5 % poganjkov oz. regenerantov so se namnožili značilni fragmenti s katerimi smo lahko potrdili prisotnost transgenov. Od teh je imelo 14,9 % regenerantov vgrajen celoten genski konstrukt z *gus* in *nptIII* genom, samo *nptIII* gen je imelo 55,3 % regenerantov ter samo *gus* gen je bil prisoten pri 4,3 % regenerantov. 25,5 % regenerantov ni imelo potrjeno vgrajenega nobenega transgena. Ugotovili smo tudi, da vedno vsi poganjki znotraj enega genotipa niso vsebovali enakih transgenov iz genskega konstrukta oz. vsi niso bili transformirani.

7 VIRI

- 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. Brewes 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.
- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 22: 9711-9721.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- 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.
- 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).
- 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.
- 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.
- Guirriarán 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.
- 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.
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Luthar Z. 1997. Transformation of potato cv. Desiree by *Agrobacterium tumefaciens*. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo*, 69: 121-125.
- 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.
- Moir M. 2000. Hops - a millenium review. *American Society of Brewing Chemists*, 58: 131-146.
- 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. 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., 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.
- Potrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology*, 8: 535-542
- 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).
- Rode J., Zmrzlak M., Kovačević M. 2002. Hmeljna rastlina. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 21-30.
- 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.
- 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.
- Šesek P., Šuštar-Vozlič J., Bohanec B. 2000. Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. *Pflügers Archiv*, 439: 016-018.
- Štrukelj B., Jongsma M.A., Lenarčič B., Gruden K., Turk V., Kregar I. 1997. Equistatin: isolation, molecular cloning, expression and production of insect-resistant transgenic potato plant. V: Proceedings of the 1st Congress of the Genetics Society of Slovenia, Sept. 2nd-5th 1997. Dovč P., Bohanec B., Peterlin B., Filipič M. (ur.). Ljubljana, Slovensko genetsko društvo: 45-46.

- Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Bohanec B. 1999. Studies of Somaclonal Variation in hop (*Humulus lupulus* L.). *Phyton-Annales Reiss Botanica*, 39: 283-287.
- Tanaka A., Mita S., Ohta S., Kyojuzuka 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.
- 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.
- 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.
- Zhu Y., Nam J., Humara Y. M., Mysore K. S., Lee L., Cao H., Valentine L., Li J., Kaiser A. D., Kopecky A.L., Hwang H., Bhattacharjee S., Rao P. K., Tzfira T., Rajagopal J., Yi H., Veena, Yadav B.S., Crane Y. M., Lin K., Larcher Y., Gelvin M. J. K., Knue M., Ramos C., Zhao X., Davis S. J., Kim S., Ranjith-Kumar C.T., Choi Y., Hallan V. K., Chattopadhyay S., Sui X., Ziemienowicz A., Matthyse A. G., Citovsky V., Hohn B., Gelvin S. B. 2003. *Plant Physiology*, 132, 494-505.
- 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.
- Žel J. 1998. Ali nam bo biotehnologija pomagala, da bomo ponovno jedli krompir priljubljene slovenske sorte? *Sodobno kmetijstvo*, 31, 10: 449-452.
- 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.

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Zlati Luthar za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter za prijazne besede, ki so mi bile v spodbudo.

Zahvaljujem se prof. dr. Katji Vadnal in prof. dr. Branki Javornik za pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Suzani Škof za pomoč pri praktičnem delu naloge ter vsem, ki so mi kakorkoli stali ob strani in jih nisem omenila.