



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Neža KAPELJ

**UPORABA METOD GENETIKE IN  
BIOTEHNOLOGIJE ZA IZBOLJŠANJE LASTNOSTI  
ZDRAVILNIH RASTLIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2021

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Neža KAPELJ

**UPORABA METOD GENETIKE IN BIOTEHNOLOGIJE ZA  
IZBOLJŠANJE LASTNOSTI ZDRAVILNIH RASTLIN**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**USE OF GENETICS AND BIOTECHNOLOGY METHODS TO  
IMPROVE THE PROPERTIES OF MEDICINAL PLANTS**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2021

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jerneja Jakšeta.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: doc. dr. Jernej OGOREVC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum predavitve: 1.3.2021

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 606:631.528:633.88(043.2)
KG	zdravilne rastline, preurejanje genoma, metabolni inženiring, krioprezervacija
AV	KAPELJ, Neža
SA	JAKŠE, Jernej (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2021
IN	UPORABA METOD GENETIKE IN BIOTEHNOLOGIJE ZA IZBOLJŠANJE LASTNOSTI ZDRAVILNIH RASTLIN
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 20 str., 1 sl., 68 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Zdravilne rastline se v terapevtske namene uporabljajo že tisočletja. Z naraščanjem potrebe po večji raznolikosti in količini zdravilnih učinkovin, se na področju žlahtnjenja uporabljajo nove tehnike, ki vključujejo hitrejša postopke biotehnologije in genetike za podporo teh visoko uporabnih rastlin. Za načrtovanje učinkovitega programa vzreje novih in raznolikih zdravilnih rastlin je pomembna ocena genetske raznolikosti. Tako nam hitre in učinkovite metode, kot so DNA mikromreže, RNA sekvenciranje in črtno kodiranje DNA, omogočajo prepoznavanje ter odkrivanje genov za izboljšanje metabolnih poti. Po prepoznavi in klasifikaciji genov pa lahko z različnimi metodami tarčno vplivamo na željene gene in s tem povečamo produkcijo sekundarnih metabolitov ali pa povzročimo spremembo njihovega kemijskega profila. To dosežemo z optimizacijo medija gojenja rastlinskih tkivnih kultur, dodatki elicitorjev, spremembo jakosti svetlobe, gojenjem v bioreaktorjih, postopki transformacije z <i>Agrobacterium</i> sp., poliploidnim inženiringom ter metodami preurejanja genoma, kot so ZFN, TALEN ter CRISPR/Cas. Zaradi ogrožene rasti zdravilnih rastlin v naravnem okolju pa so za ohranjanje diverzitete genetskega materiala pomembne tudi tehnike krioprezervacije ter enkapsulacije v sintetična semena. V diplomskem delu so predstavljene zgoraj naštet metode, ki prinašajo oz. bodo prinesle izboljšave na področju uporabe cenjenih zdravilnih rastlin.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 606:631.528:633.88(043.2)
- CX medicinal plants, genome editing, metabolic engineering, cryopreservation
- AU KAPELJ, Neža
- AA JAKŠE, Jernej (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2021
- TI USE OF GENETICS AND BIOTECHNOLOGY METHODS TO IMPROVE THE PROPERTIES OF MEDICINAL PLANTS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VIII, 20 p., 1 fig., 68 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Medicinal plants have been used for therapeutic purposes for thousands of years. However, as the need for their greater diversity and quantity increases, new techniques are being used in the field of breeding, which include faster biotechnology and genetics processes to support these highly useful plants. Genetic diversity assessment is important for planning an effective breeding program for new and diverse medicinal plants. Thus, fast and efficient methods such as DNA microarrays, RNA sequencing, and DNA barcoding allows us to identify and detect genes to improve metabolic pathways. After the identification and classification of genes, we can use methods to target desired genes and thus increase the production of secondary metabolites or cause a change in their chemical profile. This is achieved by optimizing the culture medium of plant tissue cultures, elicitor additives, changing light intensity, cultivation in bioreactors, transformation processes with *Agrobacterium* sp., polyploid engineering and genome rearrangement methods such as ZFN, TALEN and CRISPR/Cas. Due to the endangered growth of medicinal plants in the natural environment, cryopreservation and encapsulation techniques into synthetic seeds are also important for maintaining the diversity of genetic material. The focus of this work is a review of methods presented above, which bring or will bring improvements of prized medicinal plants.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 ANALIZE GENSKE RAZNOLIKOSTI</b>	<b>2</b>
2.1 DNA MIKROMREŽE	2
2.2 RNA-SEQ	3
2.3 DNA-BARCODING	4
<b>3 PREKOMERNA PRODUKCIJA IN SPREMEMBA KEMJSKEGA PROFILA</b>	<b>5</b>
3.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKOV GOJENJA RASTLINSKIH TKIVNIH KULTUR	5
3.2 METABOLNI INŽENIRING	6
<b>3.2.1 Genetska transformacija z <i>Agrobacterium</i> sp.</b>	<b>6</b>
<b>3.2.2 Primer genetske transformacije <i>Trachyspermum ammi</i> z <i>Agrobacterium</i> sp.</b>	<b>7</b>
3.3 POLIPLODINI INŽENIRING	8
<b>3.3.1 Učinki poliplodije na produkcijo in kemično sestavo sekundarnih metabolitov</b>	<b>8</b>
<b>3.3.2 Primeri vpliva poliplodije na zdravilne rastline <i>Cymbopogon</i> spp. in <i>Papaver somniferum</i></b>	<b>9</b>
3.4 PREUREJANJE GENOMA	9
<b>3.4.1 ZFN in TALENs</b>	<b>11</b>
<b>3.4.2 CRISPR/Cas sistem</b>	<b>11</b>
3.4.2.1 Uporaba sistema CRISPR/Cas9 v <i>Dioscorea zingiberensis</i>	12
<b>4 POSTOPKI OHRANJANJA GENSKEGA MATERIALA</b>	<b>13</b>
4.1 KRIOPREZERVACIJA	13
<b>4.1.1 Krioprezervacija <i>Hypericum perforatum</i></b>	<b>13</b>
4.2 SINTETIČNA SEMENA	14

<b>4.2.1</b>	<b>Enkapsulacija <i>Althaea officinalis</i></b>	14
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČEK</b>	15
<b>6</b>	<b>VIRI</b>	15

#### KAZALO SLIK

		Str.
Slika 1:	Shematski prikaz različnih platform za urejanje genoma: (a) nukleaze cinkovih prstov (ZFN), (b) nukleaze transkripcijskih aktivatorjev (TALEN), (c) sistem CRISPR/Cas9 (prirejeno po Mahfouz in sod., 2014).	10

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BADH	betain aldehyd dehidrogenaza (ang. betaine aldehyde dehydrogenase)
Cas	gruče CRISPR povezanih genov (ang. clusters of CRISPR-related genes)
cDNA	komplementarna DNA (ang. complementary DNA)
CRISPR	gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
crRNA	crispr RNA (ang. crispr RNA)
DMSO	dimetil sulfoksid (ang. dimethyl sulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
gRNA	vodila RNA (ang. guide RNA)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high-performance liquid chromatography)
HR	homologne rekombinacije (ang. homologous recombination)
ISSR	medmikrosatelitne regije (ang. inter-simple sequence repeat)
ITS	jedrna notranje prepisana regija (ang. internal transcribed spacer)
MS	Murashige in Skoog medij (ang. Murashige and Skoog medium)
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (ang. next-generation sequencing)
NHEJ	nehomologno povezovanje koncev (ang. non-homologous end joining)
PAM	motiv ob protovmesniku (ang. protospacer adjacent motif)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PTC	rastlinske tkivne kulture (ang. plant tissue culture)
RAPD	naključno namnožena polimorfna DNK (ang. random amplification of polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. restriction fragment length polymorphisms )
RGENs	RNA-vodene nukleaze (ang. RNA-guided endonucleases)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
RNA-seq	RNA sekvenciranje (ang. RNA-sequencing)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (ang. reverse transcription polymerase chain reaction)



TALEN	efektorskim nukleazam podobni transkripcijski aktivator (ang. transcription activator like effector nuclease)
T-DNA	prenosna DNA (ang. transfer DNA)
tracrRNA	transaktivacijska crRNA (ang. trans-activating crRNA)
WPM	Woody plant medij (ang. woody plant medium)
ZFN	nukleaz cinkovih prstov (ang. zinc-finger nuclease)

## 1 UVOD

Rastline pogosto imenujemo "zelene kemične tovarne", saj proizvajajo široko paleto raznolikih snovi, s katero lahko podpirajo industrijo hrane, krme, zdravil in biomaterialov (Nogueira in sod., 2018).

Medtem ko so velike količine primarnih metabolitov potrebne za osnovne procese v rastlini, kot so fotosinteza, celično dihanje, rast in razvoj, druge fitokemikalije oz. sekundarni metaboliti niso prisotni kot vmesni produkti zgoraj naštetih procesov. Rastlinski sekundarni metaboliti so v rastlinah proizvedeni v manjših količinah in se kopičijo v posebnih rastlinskih organih (Gandhi in sod., 2015).

Že tisočletja pr. n. št. so različne kulture po celem svetu začele prepoznavati in uporabljati produkte narave, rastline in glive, v terapevtske namene. V tem času so zdravilne rastline uporabljali le empirično, brez znanja o aktivnih komponentah. Šele kasneje v 19. stoletju so rastlinske produkte izolirali ter jim podrobneje določili aktivne komponente in funkcije. Povpraševanje po zdravilnih rastlinah in njenih metabolitih se je večalo, a količina rastlinskega materiala pridobljenega iz narave je omejena. Poleg tega postane omejena razpoložljivost še bolj problematična ko se ugotovi, da ima naravni proizvod rastlinskega izvora zelo obetavno aplikacijo pri zdravljenju določene bolezni. Prav tako je bila količina produkta pridobljenega iz rastlin relativno majhna, odvisna od sezone in letnega časa, kar je pomenilo primanjkovanje na tržišču. Zaradi pomankanja so razvili kemično sintetizirane učinkovine, ki so bile po funkciji podobne naravno izoliranim sekundarnim produktom. Tako so lahko proizvedli velike količine učinkovin, ki so zadoščale potrebam na trgu (Atanasov in sod., 2015).

A mnoge sekundarne metabolite rastlin, kot so taksol, artemisinin, forskolin, je težko kemično sintetizirati, saj so strukture naravnih produktov nadvse zapletene in bi bil proces sinteze predrag. Poleg tega pa genetsko raznolike rastline predstavljajo skoraj neskončen vir novih kemijskih struktur z različnimi farmakološkimi lastnostmi. Raznolikost struktur in funkcij pa je zelo pomembna za odkrivanje zdravil novih bolezni. Zaradi teh razlogov se znanstveniki ponovno zanimajo za odkrivanje zdravil na osnovi naravnih produktov (Gandhi in sod., 2015).

Čeprav ljudje zdravilne rastline uporabljamo že tisočletja, jih nismo kultivirali in gojili, kot smo ostale rastlinske vrste, ki so nam bile pomembne kot vir hrane, npr. pšenica, soja, koruza, riž, krompir in sončnica (Siahsar in sod., 2011). Kultivacija in udomačitev rastlin je dinamičen evolucijski proces. Ta z genskimi rekombinacijami in spremembami ustvarja nove in dragocene oblike rastlin iz divjih vrst. Te privedejo do močnejše rastline, večjih plodov ter zrn, izgube razpršenosti semen, zmanjšanja dormantnosti semen in manjše količine grenkih snovi v produktih rastline. Vse te spremembe se pojavijo med postopkom udomačitve rastlin in jih imenujemo sindrom udomačitve (Doebly in sod., 2006).

Zdravilne rastline so bile prikrajšane za ta sindrom. Tako je zaradi naraščanja povpraševanja po teh pomembnih metabolitih velika želja, da bi imeli rastline z večjimi plodovi ali drugimi organi in posledično večjo količino sekundarnih metabolitov. Prav tako problem predstavljajo dolga doba rasti, nenehno zmanjševanje razpoložljivih zemljišč za masovno gojenje rastlin ter uničevanje prosto živečih populacij, ki bi sintetizirale nove, še ne uporabljene strukture metabolitov (Gandhi in sod., 2015).

Ko je človek razširil uporabo zdravilnih rastlin na industrijsko področje, so se uporabljale klasične biotehnološke metode pri žlahtnjenju zdravilnih rastlin. Sedaj pa prihajajo tehnike, ki vključujejo hitrejše postopke biotehnologije in genetike za podporo žlahtnjenja teh visoko uporabnih rastlin, kot so postopki analize genetske raznolikosti, postopki ohranjanja, hitrega razmnoževanja in prekomerne produkcije željenih komponent.

V diplomskem delu želim prikazati zgoraj naštetе postopke, ki prinašajo oz. bodo prinesle izboljšave na področju uporabe cenjenih zdravilnih rastlin.

## **2 ANALIZE GENSKE RAZNOLIKOSTI**

Ocena genetske raznolikosti je pomembna za načrtovanje učinkovitega programa vzreje novih in raznolikih zdravilnih rastlin. S tem namenom se uporabljajo različni molekularni markerji prve generacije, kot so RFLP, RAPD, ISSR in drugi, za oceno variabilnosti vrst. A te metode so drage in predvsem počasne. Zato je za razjasnitev genske raznolikosti zdravilnih rastlin pomembna vzpostavitev hitrejših in učinkovitejših metod (Niazan, 2019).

DNA mikromreže so ena izmed metod, ki nam omogočajo razlikovanje med vrstami (Ishkanian in sod., 2004). Tudi metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS) nam lahko služijo kot hitra in stroškovno učinkovita orodja za odkrivanje in genotipizacijo tisočih markerjev v katerem koli genomu, ki nas zanima (Davey in sod., 2011). Gre za sodobne tehnologije sekvenciranja, ki omogočajo sekvenciranje DNA in RNA veliko hitreje in ceneje kot prej uporabljeno Sangerjevo sekvenciranje. Omogočajo sočasno sekvenciranje milijonov molekul DNA (Dijk in sod., 2014). NGS, z možnostjo hitrega in natančnega sekvenciranja genomov, v kombinaciji z drugimi tehnologijami ponuja možnosti za odkritje tarčnih genov, encimov, rekonstrukcijo biosintetskih poti in drugih faktorjev, ki vplivajo na sekundarni metabolizem zdravilnih rastlin.

### **2.1 DNA MIKROMREŽE**

Tehnologija DNA mikromrež je eno od najučinkovitejših orodij, ki omogoča analizo genske DNA, analizo izražanja genov in študije uravnavanja izražanja genov. DNA mikromreža je skupina mikroskopskih DNA molekul z znanimi nukleotidnimi zaporedji, ki so nanešena na trdo podlago. Tako tvorijo mrežo, s katero lahko preverjamo ekspresijo več genov na enkrat. Vsak gen je na mikromreži zastopan z vsaj eno skupino identičnih DNA

molekul. Mikromrežo nato izpostavimo fluorescentno ali radioaktivno označeni preizkusni DNA (sondi), pripravljene iz preiskovanih celic. Na mreži poteče postopek hibridizacije, ki temelji na komplementarnem parjenju baz A-T in G-C. Hibridizacijski signal na določenem mestu matrice nam izraža identiteto nukleotidnega zaporedja, velikost signala pa je merilo za količino izraženega genskega produkta (Juvan in Rozman, 2006).

Tehnika mikromrež je zelo koristna za študije genoma zdravilnih rastlin, saj njena primerjalna ocena omogoča prepoznavanje razlik v vzorcih različnih vrst. DNA mikromreža na osnovi silicija je bila zasnovana za prepoznavanje strupenih tradicionalnih kitajskih zdravilnih rastlin. Iz ribosomalne RNA 20 kitajskih rastlin je bilo oblikovanih 55 specifičnih oligonukleotidnih sond, ki so bile imobilizirane preko ditiolne povezave na silicijevem čipu. Z vzporednim genotipiziranjem je bilo odkritih več strupenih rastlinskih vrst, kar nakazuje da je tehnika DNA mikromrež ugodno in učinkovito orodje za nadzor kakovosti rastlinskih zdravil in prepoznavanje njihove variabilnosti (Carles in sod., 2005). Uporablja se lahko tudi za merjenje stopnje ekspresije določenih genov v različnih rastnih okoljih (Ishkanian in sod., 2004).

## 2.2 RNA-SEQ

Trenutno se tehnike NGS največ uporabljajo za raziskovanje transkriptoma zdravilnih rastlin, njihovo kartiranje in kvantificiranje, da bi zagotovili močan vir za odkrivanje genov za izboljšanje metabolnih poti (Niazian, 2019). Metoda, ki to omogoča, se imenuje RNA sekvenciranje (RNA-seq). Ta metoda poteka tako, da najprej dolge RNA molekule pretvorimo v zbirko fragmentov cDNA. Na vsak fragment se pritrdijo adapterji, pritrjeni na en ali oba konca. Tu nato nastopijo metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS), tako da se iz vsake cDNA sekvenira kratko zaporedje, dolgo 30–40 baznih parov. Nastala zaporedja se poravnajo z referenčnim genomom ali sestavijo *de novo* brez genomske sekvence. Tako nastanejo transkripcijski zemljevidi, ki jih sestavljajo transkripcijska struktura in raven izražanja vsakega gena (Wang in sod., 2009).

RNA-seq omogoča sekvenciranje celotnih transkriptomov v ciljnih populacijah. Analiza transkriptomov, ki temelji na NGS, je bolj zanesljiva od tehnike DNA mikromrež za ločevanje neznanih genov in tudi za ugotavljanje razlik v ekspresiji homolognih in paralognih kopij genov (Howyeh in sod., 2018).

Ta metoda je bila uspešno uporabljena pri zdravilni rastlini *Trachyspermum ammi* (ajovan) za identifikacijo genov, vključenih v biosintezo monoterpenoidov. Gre za zdravilno rastlino, ki raste v sušnih in pol-sušnih predelih sveta, v Afganistanu, Egiptu, Indiji, Iraku, Iranu in Pakistanu. Za njen sekundarni metabolit timol (monoterpenoid) je dokazano, da ima protiglivične, antioksidativne, protimikrobne učinke, deluje kot sredstvo za zmanjševanje napenjanja, driske, bolečin v trebuhu, pomaga pri pomankanju apetita, astmi in motnjah menstrualnega cikla (Bairwa in sod., 2012). Za identifikacijo genov, ki sodelujejo pri

biosintezi timola in drugih monoterpenoidov, so sekvencirali transkriptome štirih različnih tkiv rastline ajovan, vsakega z različnim donosom timola. Odkrili so gene, ki kodirajo encime vmesnih faz biosintezne poti terpenoidov in njihovo različno izražanje glede na tkivo rastline. Poleg tega so bili identificirani tudi različno izraženi geni, ki kodirajo dehidrogenaze, transkripcijske faktorje in citokrom P450, za katere so sklepali da so lahko povezani s raznoliko koncentracijo terpenoidov v tkivih (Howyze in sod., 2018).

Take študije na zdravilnih rastlinah omogočajo razumevanje ključnih faktorjev vključenih v biosintezne poti in analizo genov, ki jih kodirajo.

### 2.3 DNA-BARCODING

Ena izmed metod, h kateri tehnologije NGS lahko prispevajo, je črtno kodiranje DNA (DNA-barcoding). Gre za metodo hitrega ocenjevanja genske raznolikosti zdravilnih rastlin na ravni rodov in vrst. Metode molekularnega črtnega kodiranja so zanesljivo orodje za identifikacijo zdravilnih rastlin, saj dajejo dosledne in zanesljive rezultate ne glede na starost, del rastline ali okoljske dejavnike (Teuchen in sod., 2014).

Tehnika za identifikacijo vrst uporablja kratko zaporedje DNA iz jedrnih genomov ali genomov organelov. Zaradi počasnega razvijanja mitohondrijske DNA, ta ni bila primerna za črtno kodiranje, saj ne bi omogočala razlikovanja med vrstami. Zato se pri rastlinskem DNA črtnem kodiranju uporablja kloroplastni in jedrni genom. Za prepoznavanje in ločevanje rastlin se lahko uporabljata kloroplastni regiji *matK* in *rbcL*. *RbcL* regija omogoča visoko univerzalnost, ločevanje med raznolikimi organizmi, a ne omogoča ločljivosti med podobnimi vrstami. Le-to pa doprinese *matK* regija, ki pa je manj univerzalna. Kombinacija teh dveh genov omogoča prepoznavanje in ločevanje med vrstami (A DNA barcode..., 2009). Poleg tega se lahko pri tesno sorodnih vrstah za boljše ločevanje doda tudi jedrna notranje prepisana regija - ITS (angl. Internal Transcribed Spacer) v kombinaciji z *matK* in *rbcL* kot rastlinsko črtno kodo, s čimer dosežemo najvišje stopnje identifikacije tudi pri sorodnih vrstah (Comparative analysis ..., 2011).

Čeprav je tradicionalna tehnika črtnega kodiranja DNA učinkovita metoda za identifikacijo zdravilnih rastlin, prihaja do so-uporabe tehnik NGS. Črtno kodiranje DNA sicer zahteva le kratka območja molekule DNA v genomu in ne popolnih podatkov o obsegu genoma. A poznavanje celotnega genoma z NGS lahko pripomore k identifikaciji novih potencialnih jedrskih genomskih regij za črtno kodiranje (Pillon in sod., 2013).

### 3 PREKOMERNA PRODUKCIJA IN SPREMEMBA KEMIJSKEGA PROFILA

Biotehnologija ponuja postopke, s katerimi lahko izboljšamo proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Rastlinske tkivne kulture (PTC) igrajo glavno vlogo pri metodah izboljševanja donosa zdravilnih rastlin. PTC služijo kot osnova pri indukciji poliploidije, ohranjanju *in situ* in *ex situ*, metabolnemu inženiringu, genski transformaciji z *Agrobacterium* sp., TALEN, ZFN in CRISPR/Cas metodah in pri izboljšanju produkcije z uporabo bioreaktorjev (Grzegorzcyk-Karolak in sod., 2018).

#### 3.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKOV GOJENJA RASTLINSKIH TKIVNIH KULTUR

Optimizacija postopkov gojenja rastlinskih tkivnih kultur lahko igra ključno vlogo pri povečanju željenih komponent v zdravilni rastlini.

Eden izmed dejavnikov, ki služi kot strategija za povečanje *in vitro* proizvodnje, je optimizacija medija. Služi predvsem za povečanje izločanja antioksidantov in drugih obrambnih sekundarnih spojin rastlin (Matkowski, 2008). Raziskave na različnih gojiščih (MS in WPM) z njihovimi različnimi koncentracijami na rastlini *Ocimum basilicum* (navadna bazilika) so pokazale povečano vsebnost metil evgenola, ki vpliva na vedenje žuželk in oprasavanje, na gojišču MS. Medij WPM pa je povečal količino linalola, ki se ga uporablja v kozmetiki kot dišavo (Monfort in sod., 2018).

Prav tako je svetloba pomemben okoljski dejavnik, ki lahko vpliva na proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Izpostavljenost rastline *Abelmoschus esculentus* (jedilni oslez) različnim jakostim svetlobe (40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ ) je pokazala povišano akumulacijo antocianina, fenolov, flavonoidov in antioksidantov pod intenziteto svetlobe 40  $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$  (Irshad in sod., 2018).

Dodatek elicitorjev, rastlinskih biostimulatorjev, lahko povzroči povečanje količine obrambnih sekundarnih spojin v rastlini (Tonk in sod., 2016). Suspenzijski kulturi zdravilne rastline *Mentha pulegium* (polaj), ki ima antibakterijske in antioksidativne učinke, so kot elicitor v medij dodali salicilno kislino in izvleček iz kvasovk, kar je povečalo količine limonena, mentona, mentola in  $\alpha$ -pinena (Darvishi in sod., 2016).

A prekomerna produkcija naravnih proizvodov v rastlini ni dovolj, saj gojenje velike količine rastlin lahko traja kar nekaj časa. Odvisna je lahko od sezone, zavzame veliko prostora, hkrati pa rastline zahtevajo določene pogoje gojenja, kar omejuje produkcijo njihovih učinkovin (Canter in sod., 2005).

Bioreaktorji so ekološka in trajnostna alternativa za pridobivanje dragocenih sekundarnih metabolitov zdravilnih rastlin v velikem obsegu (Werner in sod., 2018). Delujejo kot samostojni in neprekinjeni sistemi tekočih kultur, ki proizvajajo in omogočajo avtomatizirano izolacijo sekundarnih metabolitov z visoko kakovostjo (Máthé in sod., 2015). Da je gojenje v

bioreaktorjih bolj donosno kot pa v majhnih količinah, so preizkusili na rastlini *Leonurus sibiricus*, ki služi kot antibakterijsko sredstvo in se uporablja za zdravljenje diabetesa, bronhitisa in pri lažšanju menstrualnih težav (Sayed in sod., 2016). Primerjali so gojenje v 300 ml, 1 L, 3 L in 5 L bučkah s 5 L bioreaktorjem. Gojenje v bioreaktorju je povzročilo večji doprinos fenolnih kislin (klorogenska kislina, kofeinska kislina) v primerjavi z gojenjem v manjših količinah (Sitarek in sod., 2018).

## 3.2 METABOLNI INŽENIRING

Biotehnologija ponuja možnosti, s katerimi je mogoče spremeniti sekundarno presnovo zdravilnih rastlin. Glavni cilji metabolnega inženiringa sekundarnih presnovnih poti so proizvodnja novih metabolitov, prekomerna proizvodnja le-teh ter zmanjšanje proizvodnje strupenih ali neželenih snovi. Poleg tega je pomembno oblikovanje novih poti, ki bi omogočale cenejšo in obsežnejšo proizvodnjo rastlinskih sekundarnih metabolitov (Gandhi in sod., 2015).

Za metabolni inženiring moramo dobro poznati pot sekundarnega metabolizma. Biosintetski procesi v celici so med seboj močno povezani. Na vsakem koraku biosintetske poti se lahko zgodi na stotine možnosti, ki vplivajo na končni produkt in pogosto pride do nepredvidljivih rezultatov. Podatki iz transkriptomike, proteomike in metabolomike omogočajo znanstvenikom oblikovati nove presnovne poti ali izboljšati že obstoječe in s tem povečati možnost za predvidljive rezultate (Yang in sod., 2014).

Glavni načini izboljšanja poti pri metabolnem inženiringu so prekomerno izražanje tarčne presnovne poti, ustavitev katabolne poti ob končani proizvodnji željenega sekundarnega produkta ter oviranje drugih poti, ki izrabljajo enake prekurzorje kot željena metabolna pot (Matveeva in Sokornova, 2018).

Za izboljšanje metabolizma zdravilnih rastlin je ključna strategija prekomernega izražanja genov vključenih v biosintezo pot z uporabo agrobakterij *Agrobacterium tumefaciens* in *Agrobacterium rhizogenes*.

### 3.2.1 Genetska transformacija z *Agrobacterium* sp.

*Agrobacterium* sp. so paličaste Gram negativne prstne bakterije, ki povzročajo bolezn rastlin s tvorbo tumorskega tkiva. Tako so tudi naravno zmožne prenesti lastno DNA v rastlinske celice dvokaličnic.

*A. tumefaciens* v rastlinske celice prenese Ti plazmid, ki na ranjenem mestu rastline povzročijo tumorje, v katerih se sintetizirajo opini, ki predstavljajo vir hrane za rast in razmnoževanje bakterije. Tvorba tumorja z *A. tumefaciens* je posledica izražanja genov, ki jih nosi Ti plazmid oz. regija T-DNA. Geni kodirajo proizvodnjo rastlinskih hormonov avksina in citokinina v transformiranih celicah. Pri *A. rhizogenes* pa se prenese Ri plazmid (Ri T-

DNA), ki inducira rast korenin. Tako se Ri T-DNA prenaša v rastlino in njihove potomce, kjer se izraža (Tepfer, 2017).

Ta naravni sistem prenosa genov se uporablja za prenos željenih genov v rastline. Z odstranitvijo genov za sintezo opinov in onco genov za sintezo avksinov in citokinov iz plazmida *Agrobacterium* sp. odstranimo glavne povzročitelje intenzivne rasti tumorjev oz. korenin. Ta mesta zamenjamo z željenimi geni, ki želimo da se v rastlini izrazijo. Poleg tega lahko v sekvenco vključimo tudi selekcijske gene z ustreznimi promotorji, ki nam bodo omogočili ločevanje med transformiranimi in netransformiranimi celicami. Tako lahko izvedemo transformacijo rastlinskih celic v kulturi, pri čemer *Agrobacterium* sp. okuži rastlino in vanjo vnese novo DNA (Tepfer, 2017).

### **3.2.2 Primer genetske transformacije *Trachyspermum ammi* z *Agrobacterium* sp.**

*Trachyspermum ammi* (ajovan) je zdravilna rastlina, ki raste v sušnih in pol-sušnih predelih sveta in se jo uporablja kot protiglivično in protimikrobno sredstvo, lajša pa tudi prebavne motnje, astmo in probleme menstrualnega cikla (Bairwa in sod., 2012).

Največji problem rastlin, ki rastejo v sušnih in poslušnih regijah je pomakanje vode in hranil. Negativni učinek suše se odraža v količini pridelka in njegovih lastnostih. A hkrati abiotični dejavniki, kot so pomankanje vode in povišana temperatura, lahko povečajo vsebnost sekundarnih metabolitov v različnih zdravilnih rastlinah. Le-ti izboljšajo rast in možnost za preživetje rastlin v stresnem okolju. Tako lahko z različnimi metodami vzgoje rastlin povečamo odpornost na abiotični stres, kar bi pomenilo boljše donose pri gojenju rastlin na sušnih območjih (Niazian in sod., 2019).

Izboljšanje tolerance na sušo in slanost v zdravilni rastlini ajovan so poskušali doseči z vgraditvijo gena za betain aldehyd dehidrogenazo (BADH). Ko so izpostavljene stresu zaradi povečanja slanosti ali suše, se nekatere rastline odzovejo s povečanim kopičenjem osmo-protektanta glicin betaina, ki ga v zadnji fazi nastanka katalizira encim BADH (Ishitani in sod., 1995). Uporabili so binarni vektor pBI121, ki vsebuje gen za odpornost na antibiotik kanamicin (*nptII*) in gen BADH v svoji regiji T-DNA. Izvedli so gensko transformacijo z različnimi gostotami (OD) seva *Agrobacterium* sp. in trajanjem inokulacije.

Uspešno integracijo in izražanje prenesenega gena so potrdili z uporabo PCR in RT-PCR metodama in dosegli 2,94 % uspešno transformiranih rastlin. Transformirane rastline so imele večjo toleranco na sušo in slanost v primerjavi z ne transformiranimi rastlinami. Prav tako so transformirane rastline bolje rastle, več časa zadržale vodo, vsebovale višje koncentracije prolina in timola, kar nakazuje na boljšo rast v sušnih in slanih območjih. Tako se pridobljene transgene rastline lahko gojijo v neugodnih okoljih, pri čemer dobimo več sekundarnih metabolitov in zdravilnih učinkovin (Niazian in sod., 2019).



### 3.3 POLIPLODINI INŽENIRING

Poliplodija je pojav, ko ima organizem tri ali več setov kromosomov. Samo podvajanje genoma doprinese k mnogim prilagoditvam in prednostim, kar je bil pomemben evlucijski dejavnik pri oblikovanju in razvoju novih rastlinskih vrst. Prav tako pa lahko ustvarjanje sintetičnih poliploidov omogoči razvoj novih in izboljšanih sort (Iannicelli in sod., 2020).

Mehanizma tvorbe poliploidov sta somatska podvojitev v zigoti ali mladem zarodku in tvorjenje nereduciranih spolnih celic ( $2n$  gamet) zaradi napak v mejozi. Združitev reduciranih in nereduciranih spolnih celic ali dveh  $2n$  spolnih celic privede do nastanka poliploidnih zarodkov. Poliploide običajno razvrstimo v dve glavni vrsti: avtopoliploidi, ki izvirajo iz podvajanja števila kromosomov iz iste vrste. Alopoliploidi pa izvirajo iz hibridizacije kromosomov med dvema osebkom dveh različnih vrst, ki pa sta si med seboj sorodna (Ramsey in Schemske, 1998).

#### 3.3.1 Učinki poliplodije na produkcijo in kemično sestavo sekundarnih metabolitov

Najbolj znan in splošen učinek poliploidizacije pri rastlinah je povečanje velikosti celic, pri čemer se lahko volumen tetraploidnih ( $4n$ ) celic podvoji, površina celice pa poveča za 1,5-krat. Zaradi povečanja velikosti celic se od prvotnih diploidov razlikujejo po svojih morfoloških in anatomskih značilnosti, kot so povečani listi, cvetovi in plodovi (Lavania, 2013). Poliploidnost prav tako lahko vpliva na spremembo celične stene (Corneillie in sod., 2019), odziv na oksidativni stres (Zhang in sod., 2010), ter spremembo metabolni poti. Zaradi tako imenovanega "genomskega šoka" (McClintock, 1983), ki ga celice doživljajo pri poliploidizaciji, prihaja do različnih učinkov na genom. Pod to štejemo genomske preureditve (nepravilne rekombinacije, izguba zaporedij DNA, aktivacije transpozonov), spremembe velikosti genoma in genetske spremembe (spremembe v regulaciji izražanja genov, izguba genov, pojav novih funkcij v določenih genih, epigenetske spremembe) (Yang in sod., 2011). Te genetske spremembe pri poliploidih lahko povzročijo spremembe v regulaciji sinteze sekundarnih metabolitov. Pride lahko do povečanja proizvodnje željenih ali zmanjšanja nastanka nezaželenih snovi.

Ena izmed glavnih slabosti poliploidnosti pa je zmanjšanje ali izguba plodnosti, ki je posledica težav v mejozi zaradi povečanega in neuravnoteženega števila kromosomov. To predstavlja problem pri vzpostavitvi in ohranitvi populacij (Madlung, 2013).

Zaradi genomskega stresa in dejstva, da povečanje količine genetskega materiala ne vedno pomeni večje proizvodnje sekundarnih metabolitov, ne moremo natančno napovedati, kakšne bodo značilnosti nove poliploidne rastline. Prav tako ne moremo napovedati vpliva na kemično sestavo in količino sekundarnih metabolitov. Zato je pomembno izvajanje številnih metaboličnih in transkripcijskih analiz zelo pomembno za boljše razumevanje posledic poliploidizacije (Iannicelli in sod., 2020).

### 3.3.2 Primeri vpliva poliploidije na zdravilne rastline *Cymbopogon* spp. in *Papaver somniferum*

Spremembe velikosti celic lahko močno vplivajo na povečanje produkcije sekundarnih metabolitov in njihovo sestavo. Pri raziskavi zdravilne in aromatične rastline *Cymbopogon* spp. (limonska trava), ki se uporablja kot protivnetno sredstvo, za tvorbo protitumorskih in kemopreventivnih zdravil (Avoseh in sod., 2015), je pri poliploidnih rastlinah prišlo do spremembe kemijske sestave eteričnega olja. Ugotovili so, da diploidi, ki zahtevajo daljše presnovne korake, doživljajo več stresa pri pridobivanju virov za rast in sintezo produktov. Napram diploidnim kontrolnim rastlinam so novi tetraploidi imeli krajše presnovne poti, svoje vire so učinkoviteje porabili za rast in proizvodnjo sekundarnih metabolitov, poleg tega pa je bil končni produkt, eterično olje, bolj kakovosten (Lavania in sod., 2012).

*Papaver somniferum* (vrtni mak) se uporablja v farmacevtske in terapevtske namene. Opij, ki se pridobiva z zbiranjem mlečnega eksudata, je najpogosteje uporabljeno zdravilo v zgodovini. Glavni alkaloid v maku je morfin, ki v medicini velja za enega najmočnejših protibolečinskih zdravil. Poleg njega so prisotni tudi drugi alkaloidi: kodein, tebain, noskapin in papaverin (Baser in Arslan, 2014). V eni izmed študij na rastlini *Papaver somniferum* so izvedli indukcijo poliploidije z nanašanjem v kolhicin namočenega bombaža na meristem poganjkov. Celice tetraploidnih rastlin so bile v primerjavi z netrenirano kontrolo bistveno večje. Z RT-PCR metodo so v tetraploidih dokazali povečano izražanje genov, ki sodelujejo pri biosintezi morfina. To se je odražalo v povečani vsebnosti morfina, iz 25 % pri kontrolnih rastlinah na 50 % pri tetraploidih, kar so pokazali s HPLC metodo. Hkrati so pri rastlinah opazili zmanjšanje vsebnosti kodeina in tebaina, dveh drugih alkaloidov prisotnih v vrtnem maku. Povečana ekspresija genov za morfin je vodila v povečano sintezo tega. Hkrati pa je povečana sinteza vplivala na sintezni poti kodeina in tebaina in tako zmanjšala produkcije nezaželenih metabolitov (Mishra in sod., 2010).

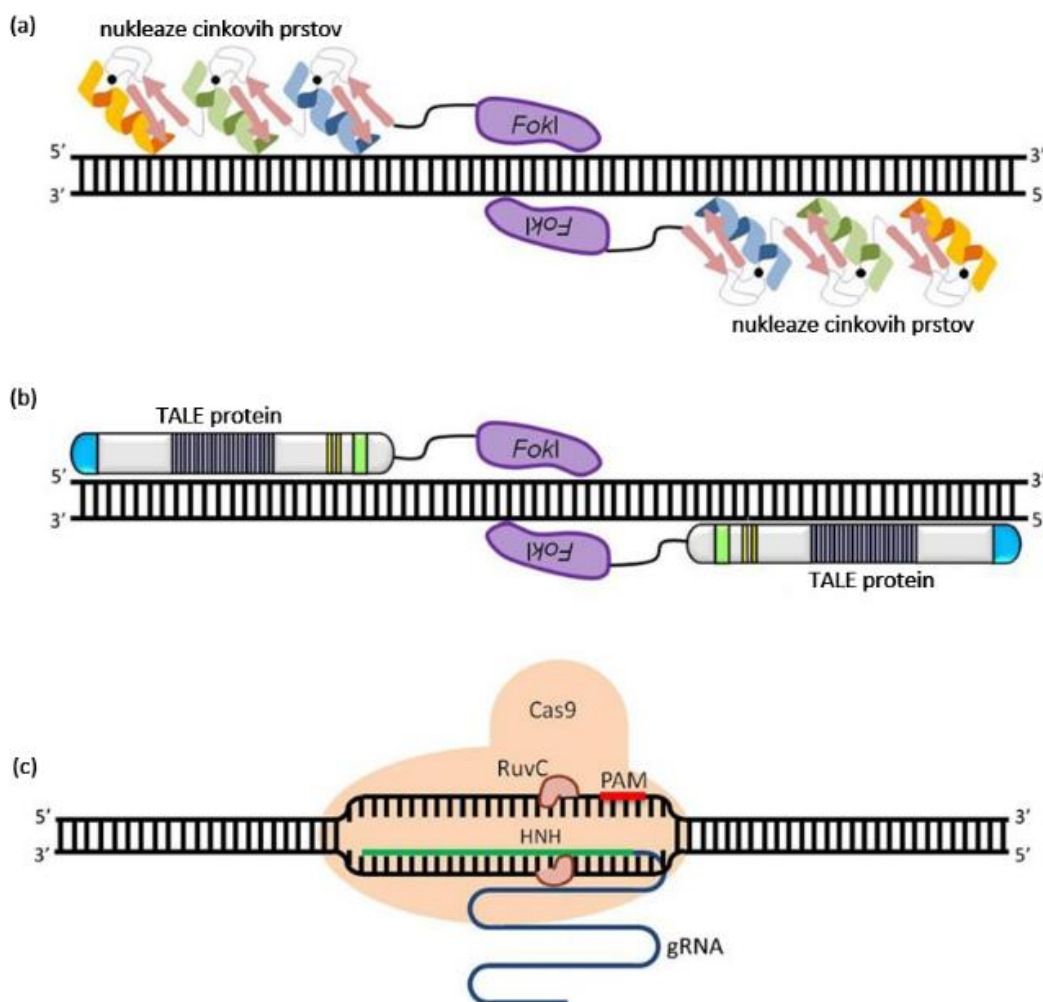
## 3.4 PREUREJANJE GENOMA

Z metodami poliploidije in transformacije z *Agrobacterium* sp. lahko povečamo produkcijo sekundarnih metabolitov in do neke mere spremenimo sestavo kemijskega profila. A te metode nam ne omogočajo velikih sprememb v DNA rastline. Zato te metode niso učinkovite za spremembo celotne presnovne poti v rastlinah (Naqvi in sod., 2010). V zadnjih dveh desetletjih so se razvile napredne genetske tehnologije, ki vključujejo sintetične promotorje, transkripcijske faktorje in orodja za preurejanje genoma, ki pomagajo pri hitrejšemu izboljšanju rastlin (Liu in sod., 2013).

Glavne metode genetskega preurejanje zajemajo regulacijo genov preko nukleaz cinkovih prstov (ZFN), efektorskih nukleaz podobnih transkripcijskim aktivatorjem (TALEN) in RNA-vodne nukleaze (RGENs), med katero spada metoda CRISPR/Cas. Vsi trije sistemi vključujejo za zaporedje specifično domeno, ki se veže na DNA, ter nespecifično cepitveno

domeno DNA (Gaj in sod., 2013). Nukleaze povzročijo dvojne verižne prelome (DSB) v ciljnih točkah DNA zaporedja, ki omogočijo homologne rekombinacije (HR) ali nehomologno povezovanje koncev (NHEJ). To vodi do ciljne genomske modifikacije. Slika 1 prikazuje vse tri omenjene metode, ZFN, TALEN in CRISPR/Cas, ki služijo kot genetske škarje za odpravo in urejanje genetskih napak (Kim in Kim, 2014).

Te metode nam pomagajo ugotoviti direkten vpliv genotipa na fenotip (Capecchi, 2005). Vzpostavitev usmerjene regulacije ekspresije genov nam omogoči regulacijo poti sekundarnega metabolizma v zdravilnih rastlinah. Ustvarimo lahko zaželen sistem metabolizma, ki nam daje večje donose sekundarnih metabolitov ali zmanjša količino nezaželenih/toksičnih produktov (Xu in sod., 2014).



Slika 1: Shematski prikaz različnih platform za urejanje genoma: (a) nukleaze cinkovih prstov (ZFN), (b) nukleaze transkripcijskih aktivatorjev (TALEN), (c) sistem CRISPR/Cas9 (prirejeno po Mahfouz in sod., 2014).

### 3.4.1 ZFN in TALENs

Nukleaza cinkovih prstov (ZFN) je fuzijski protein sestavljen iz dveh domen: vezavne domene DNA s ponavljajočimi se cinkovimi prsti in nespecifične endonukleazne domene, pridobljene iz restrikcijskega encima FokI, ki velja za enega najpogostejših motivov vezave DNA v evkariontskem genomu in ki ima sposobnost prepoznati katero koli zaporedje (Schildkraut in sod., 1998). Posamezen ZFN je po navadi sestavljen iz treh do šestih ponovitev cinkovih prstov. Vsak od teh vsebuje približno 30 aminokislin Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>. Posamezen cinkov prst lahko prepozna tri bazne pare DNA, tako da s šestimi cinkovimi prsti dosežemo specifičnost 9 do 18 baznih parov (Miller in sod., 1985).

Prav tako kot pri ZFN, pri usmerjeni regulaciji preko transkripcijskih aktivatorjev (TALEN) domena cepitve DNA izhaja iz restrikcijskega encima FokI. Kjer je v ZFN-jih za vezavo na DNA odgovoren nabor beljakovin cinkovega prsta Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, je v TALEN-u za to odgovoren protein TALE. To so naravno prisotni proteini iz rastlinskih patogenih bakterij rodu *Xanthomonas* sp., sestavljeni iz serije 33–35 aminokislinskih ponovitvenih domen, kjer vsaka prepozna en sam bazni par (Deng in sod., 2012).

Endonukleazna domena ZFN-jev in TALEN-ov omogoča cepitev ene verige DNA, zato je potrebno pri uvajanju zlomov dvojne vijačnice uporabiti par nukleaz, pri čemer se vsak veže na svojo verigo DNA tako, da se FokI domeni približata. Do cepitve pride na odseku DNA med obema nukleaznima domenama. Dvojni zlom DNA nato zaznajo celični popraviljalni mehanizmi. Popravljanje lahko poteče preko nehomolognega povezovanja koncev (NHEJ), ki vodi do uvedbe delecij ali insercij, kar pogosto povzroči izgubo funkcije gena. Lahko pa pride do homologne rekombinacije (HR), s čimer lahko uvedemo specifične substitucije in insercije (Joung in Sander, 2013).

Vsestranskost ZFN-jev in TALEN-ov izhaja iz zmožnosti prilagoditve domene, ki veže DNA, tako da prepozna skoraj vsako zaporedje. Te DNA-vezavne module je mogoče kombinirati s številnimi efektorskimi domenami, da vplivajo na genomsko strukturo in delovanje, vključno z nukleazami in transkripcijskimi aktivatorji (Gaj in sod., 2013).

### 3.4.2 CRISPR/Cas sistem

CRISPR ali gruča enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev so ponavljajoči se elementi, ki pri bakterijah in arhejah zagotavljajo pridobljeno imunost proti vdoru tuje DNA (Wiedenheft in sod., 2012).

Lokus CRISPR je sestavljen iz gruče CRISPR povezanih genov (Cas) in naborom direktno ponavljajočih se zaporedij, prekinjenih s kratkimi segmenti tuje DNA, imenovani 'distančniki', dolgi 30–40 baznih parov. Geni Cas se prevedejo v proteine, nabori CRISPR pa

se preprišejo kot ena sama RNA, ki se nadalje procesira v kratke crRNA, dolge do 20 nukleotidov. Ti usmerjajo proteine Cas na tarčno zaporedje za vezavo (Jinek in sod., 2012).

V laboratorijih se za tehnike molekularnega kloniranja s sistemom CRISPR/Cas najpogosteje uporablja encim Cas9, v katerem je zasidrana nekodirajoča tracrRNA, ki hibridizira z iskalno crRNA, da nastane dvoverižni RNA hibrid ali vodilna RNA (gRNA) (Deltcheva in sod., 2011).

gRNA usmerja endokukleazo Cas9 na ustrezno mesto, kjer bo izvedena sprememba genetskega koda. Cas9 se ustavi na točno določenem mestu na genomu zaradi parjenja med vezano gRNA in genomsko DNA. Cas9 nato prepozna zaporedje PAM (motiv ob protovmesniku). Tu nastane dvojni prelom kromosoma. Po delovanju Cas9 na tarčni DNA nastaneta prosta konca, ki se zaradi dvoverižnega preloma ne moreta neposredno popraviti na podlagi ustrezne informacije komplementarne verige. Kot pri ZFN in TALEN metodah posredujejo popravljalni mehanizmi in zlom popravijo s homologno rekombinacijo (HR) ali z nehomolognim združevanjem koncev (NHEJ), pri čemer nastanejo mutacije (Jinek in sod., 2013).

CRISPR/Cas9 tako omogoča natančno in sistematično spreminjanje genoma. gRNA CRISPR/Cas je prilagodljiv zaradi svoje dolžine, ki jo sestavlja le 20 nukleotidov. In ker gRNA vodi endokukleazo Cas9 do tarčnega mesta, je lahko njegov cilj na katerem koli genu, ki nas zanima v izbranem genomu, in v njem izzove genetsko mutacijo, delecijo, vstavitev nove sekvence ali sproži aktivacijo/represijo transkripcijskih genov (Xu in sod., 2014).

#### 3.4.2.1 Uporaba sistema CRISPR/Cas9 v *Dioscorea zingiberensis*

*Dioscorea zingiberensis* (jam) je dobro znan po visoki vsebnosti diosgenina v koreniki. Le-ta se nahaja v številnih zdravilih za steroidne hormone in ima velik farmakološki potencial, vključno s protivnetnim, antioksidativnim, antialergijskim, antitrombotičnim, protitumorskim delovanjem. V eni izmed študij na tej rastlini so uporabili sistem CRISPR/Cas9 tarčno mutagenozo posredovano z *Agrobacterium tumefaciens*. gRNA je bila zasnovana tako, da se prilega genu *Dzfps*, ki je kritičen gen, vključen v sintezo sekundarnih metabolitov in nastanka diosgenina. V izoliranih mutantih se je raven prepisa *Dzfps* in vsebnost diosgenina zmanjšala za 1,6-krat od rastlin divjega tipa, kar nakazuje na pomembnost gena *Dzfps* za sintezo tega sekundarnega metabolita (Feng in sod., 2018).

Rezultati takih študij kot je ta kažejo na uporabnost sistema CRISPR/Cas9 v zdravilnih rastlinah, ki lahko preprosto in namensko spremeni kemični profil koristnih zdravilnih rastlin. Pokažemo lahko pomembnost vsakega gena na delovanje metabolizma, izločimo toksične metabolite in s tem pospešimo raziskave o genski funkciji rastlin.

## 4 POSTOPKI OHRANJANJA GENSKEGA MATERIALA

Potreba po zdravilnih rastlinah se zaradi njihovih učinkovin povečuje, a prekomerno nabiranje in neselektivna uporaba ogrožajo rast v naravnem okolju. Poleg tega njihov življenjski prostor zmanjšujejo krčenje gozdov, razvoj velikih kmetijskih površin, požari ter podnebne spremembe (Atanasov in sod., 2015). Zato ne zadostuje le *In situ* zaščita zdravilnih rastlin, torej gojenje rastlin v njihovem naravnem okolju. Za ohranjanje rastlin in njihovega dragocenega genetskega materiala se poslužujemo *Ex situ* konzervacije, shranjevanja materiala v genskih bankah, zbirkah *in vitro* ter s postopki shranjevanja – krioprezervacijo ter sintetičnimi semeni (Niazian, 2019).

### 4.1 KRIOPREZERVACIJA

Krioprezervacija je metoda, ki nam omogoča shranjevanje in ohranjanje germplazme oz. zarodne plazme z ohlajanjem pri nizki temperaturi, običajno v tekočem dušiku pri  $-196\text{ °C}$ . Pri tej temperaturi se ustavijo metabolni procesi in celične delitve, kar pomeni, da lahko tako teoretično hranimo material neomejeno dolgo brez spremembe (Engelmann, 2004). A po sami prezervaciji je zelo pomembna stopnja viabilnosti vzorcev, odstotek regeneracije ter genska in biokemična stabilnost (Niazian, 2019).

Klasične tehnike krioprezervacije zajemajo počasno zmrzovanje, približno  $0,5\text{--}2\text{ °C}$  na minuto, do približno  $-40\text{ °C}$  in nato zmrzovanje na  $-196\text{ °C}$  v tekočem dušiku. Celični material, kot so semena, ne vsebujejo veliko vode, zato jih lahko kropezerviramo brez predhodne obdelave. A večina vzorcev za krioprezervacijo, kot so kalusi ter embriji, vsebujejo veliko proste celične vode ter so tako zelo dovzetni za poškodbe pri zamrzovanju. Zaradi nastajanja ledenih kristalov pride do poškodb materiala, kar zmanjša odstotek regeneracije. Zato je boljše in učinkovitejše počasno (kontrolirano) zamrzovanje, kjer znižujemo temperaturo  $1\text{--}3\text{ °C}$  na uro. Najprej vzorce ohladimo na ledu, nato prenesemo naprej na  $-20\text{ °C}$ , nato na  $-80\text{ °C}$  ter v tekoči dušik (Engelmann, 2004).

Tvorbo kristalov lahko preprečimo z dodatkom krioprotektantov, kot so dimetil sulfoksid (DMSO), glicerol in etilen glikol, ki celice varujejo pred poškodbami ledenih kristalov. Prav tako izboljšamo viabilnost po regeneraciji s postopkom vitrifikacije, kjer rastlinskemu tkivu dodamo saharozo, nato pa izvedemo dehidracijo z visoko koncentrirano raztopino glicerola, npr. PVS2 (7,8 M) (Engelmann, 2004).

#### 4.1.1 Krioprezervacija *Hypericum perforatum*

Primer zdravilne rastline, na kateri so uspešno izvedli krioprezervacijo, je *Hypericum perforatum* (šentjanževka), ki vsebuje številne floroglucinole, flavonoide in tanine ter fenilpropanoide. Uporablja se za zdravljenje tesnobe, blage do zmerne depresije in motenj razpoloženja (Belwal in sod., 2018). Z namenom genetske in biokemijske analize po

regeneraciji je bila izvedena krioprezervacija vrhov poganjkov diploidne *H. perforatum* z uporabo metode počasnega zamrzovanja. Poganjki, katerim so bili dodani glicerol, saharoza in DMSO kot krioprotektanti, so kazale na viabilnost 95 %. Poganjki, ki niso bili posebej obdelani pred zamrzovanjem, pa so imeli viabilnost le 10–50 %, kar kaže na učinkovitost kriooprotektantov. V rastlinah so tudi ocenili genetsko stabilnost na ravni DNA po predhodni obdelavi in po kriokonzervaciji. V primerjavi z neobdelano kontrolo niso zaznali nobenih sprememb pri številu kromosomov, v nekodirajočih regijah pa so odkrili le manjše spremembe sekvence. Tako je za *H. perforatum* uporaba tehnike počasnega zamrzovanja primerna in dobra, saj privede do velike viabilnosti po krioprezervaciji. Novi poganjki so genetsko in biokemično stabilni, kar je pomembno za pravilno delovanje aktivnih spojin (Urbanová in sod., 2006).

## 4.2 SINTETIČNA SEMENA

Sintetična ali umetna semena so alginatni kapsulirani somatski zarodki ter vegetativni popki, ki se lahko uporabljajo kot semena in kalijo v rastline v pogojih *In vitro* ali *In vivo*. Sposobni so ohranjati regeneracijski potencial po shranjevanju pri nizkih temperaturah. Poleg tega se tehnologija uspešno uporablja za krioprezervacijo z enkapsulacijo-dehidracijo za shranjevanje germplazme različnih rastlinskih vrst (Faisal in Alatar, 2019).

Rastlinski material je suspendiran v tekočem mediju brez kalcija, dopolnjenem z natrijevim alginatom. Ta je nato premeščen v tekoče gojišče, ki vsebuje visoko koncentracijo kalcijevega klorida. Tako poteče enkapsulacija rastlinskega materiala na osnovi reakcije med natrijevim alginatom in kalcijevim dikloridom. Kapsulirane eksplante nato predkultiviramo v tekočem mediju z visoko koncentracijo saharoze (0,5–1,25 M, najbolj pogosto 0,75 M), ki kot krioprotektor inducira dehidracijo na podlagi osmoze. Sledi še dehidracija tkiva s pomočjo zračnega sušenja z zračnim tokom laminarija ali dehidracija v zaprtih posodah s silikagelom (Gonzalez-Arno in Engelmann, 2006).

### 4.2.1 Enkapsulacija *Althaea officinalis*

*Althaea officinalis* (navadni slez) je ena izmed mnogih pomembnih indijskih zdravilnih rastlin, na kateri je bil izveden poskus shranjevanja poganjkov z enkapsulacijo. Zaradi prisotnosti dragocenih kemičnih sestavin, kot so asparagin, altein, flavonoidi, pektin, fenolna kislina, kumarini itd., se ta rastlina uporablja za pripravo zdravil proti kašlju, zaprtju, draženju prebavil, razjedam in okužbam sečil. Za eksplante te rastline so izvedli enkapsulacijo z uporabo različnih koncentracij natrijevega alginata in kalcijevega klorida kot postopek konzervacije ter jih nato hranili do šest tednov pri 4 °C. Viabilnost in sposobnost rasti rastline je bila po štirih tednih skladiščenja pri inkapsuliranih eksplanth 64,6 %, medtem ko je bila pri nekapsuliranih nižja (47,6 %). Pogostost tvorjenja rastlin iz sintetičnih semen se je postopoma zmanjševala, ko se je trajanje shranjevanja pri 4 °C povečalo nad štiri tedne, po petih tednih je bila viabilnost le še 38,6 %. Neinkapsulirani eksplanti so pokazali viabilnost le 18,0 % po

petih tednih shranjevanja, kar nakazuje na pomembnost in učinkovitost uporabe enkapsulacije z dehidracijo za shranjevanje rastlinskega materiala (Naz in sod., 2018).

## 5 ZAKLJUČEK

Potreba po zdravilnih učinkovinah se zaradi večanja populacije in novih bolezni povečuje. Čeprav nam sintezna kemija daje možnosti za razvoj povsem novih učinkovin, nam je evolucijski razvoj rastlin dal tisoče naravnih spojin, katerih si človek ne more zamisliti in jih sintetizirati. Zato je pomembno, da ohranimo izvorni material rastlin, iz katerega lahko z novimi tehnikami iščemo nove ali boljše molekule ter naravne produkte uporabljamo za zdravljenje bolezni.

Ohranjanje naravnega materiala lahko dosežemo s krioprezervacijskimi tehnikami. To nam omogoča ohranjanje vseh vrst rastlin kljub zmanjšanju njihove rasti v naravnem okolju. Tako se dragoceni in zelo raznoliki dedni material ne bo izgubil.

Zaradi povečanega zanimanja in potrebe po rastlinskih sekundarnih produktih se lahko poslužujemo tehnik analize genomov, ki zajemajo rastlinske markerje, mikromreže, RNA sekvenciranje in črtno kodiranje DNA, vse podprte s tehnologijami sekvenciranja naslednje generacije (NGS). Te nam pomagajo določiti gene, encime in faktorje, na katere moramo vplivati za izboljšanje sekundarnega metabolizma. S temi podatki lahko ciljamo željene gene ter povečamo produkcijo in donos metabolitov s tehnikami genetske transformacije z *Agrobacterium* sp., preurejanjem genoma z ZFN, TALEN in CRISPR/Cas, pa tudi s postopki poliplodije, gojenjem v bioreaktorjih ter optimizacijo vseh faktorjev rasti, kot so medij in svetloba.

Navedene tehnike lahko pomagajo zmanjšati vrzel med zdravilnimi in prehrabni rastlinami, ki so šle skozi proces udomačitve. Tako bomo lahko zagotovili dovolj zdravil za vse hitreje rastočo populacijo na Zemlji, hkrati pa odkrili nove produkte za novo nastajajoče bolezni.

## 6 VIRI

Atanasov A. G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E. M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E. H., Rollinger J. M., Schuster D., Breuss J. M., Bochkov V., Mihovilovic M. D., Kopp B., Bauer R., Dirsch V. M., Stuppner H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33, 8: 1582–1614

Avoseh O., Oyedeji O., Rungqu P., Nkeh-Chungag B., Oyedeji A. 2015. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules*, 20, 5: 7438–7453

Bairwa R., Sodha R.S., Rajawat B.S. 2012. *Trachyspermum ammi*. *Pharmacognosy Reviews*, 6, 11: 56–60



- Baser K.H.C., Arslan N. 2014. Opium poppy (*Papaver somniferum*). V: Medicinal and aromatic plants of the Middle-East. Yaniv Z., Dudai N. (ur.). Dordrecht, Springer: 305–332
- Belwal T., Devkota H. P., Singh M. K., Sharma R., Upadhayay S., Joshi C., Bisht K., Gour J. K., Bhatt I. D., Rawal R. S., Pande V. 2018. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). V: Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements. 1st ed. United Kingdom, Elsevier: 415–426
- Canter P. H., Thomas H., Ernst E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23, 4: 180–185
- Capecchi M. R. 2005. Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*, 6, 6: 507–512
- Carles M., Cheung M. K. L., Moganti S., Dong T. T. X., Tsim K. W., Ip N. Y., Sucher N. J. 2005. A DNA microarray for the authentication of toxic traditional Chinese medicinal plants. *Planta Medica*, 71, 6: 580–584
- A DNA barcode for land plants. 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 31: 12794–12797
- Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 49: 19641–19646
- Corneillie S., De Storme N., Van Acker R., Fangel J. U., De Bruyne M., De Rycke R., Geelen D., Willats W.G.T., Vanholme B., Boerjan W. 2019. Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiology*, 179, 1: 74–87
- Darvishi E., Kahrizi D., Bahraminejad S., Mansouri M. 2016. In vitro induction of  $\alpha$ -pinene, pulegone, menthol, menthone and limonene in cell suspension culture of pennyroyal (*Mentha pulegium*). *Cellular and Molecular Biology*, 62, 3: 7–9
- Davey J. W., Hohenlohe P. A., Etter P. D., Boone J. Q., Catchen J. M., Blaxter M. L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12, 7: 499–510
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471, 7340: 602–607
- Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.K., Shi Y., Yan N. 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 335, 6069: 720–723
- Doebly J. F., Gaut B. S., Smith, B. D. 2006. The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127: 1309–1321
- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Planta*, 40, 5: 427–433

- Faisal M., Alatar A. A. 2019. An Introduction to Synthetic Seeds: Production, Techniques, and Applications. V: Synthetic seeds: Germplasm regeneration, preservation and prospects. Switzerland, Springer Nature Switzerland AG: 1–20
- Feng S., Song W., Fu R., Zhang H., Xu A., Li J. 2018. Application of the CRISPR/Cas9 system in *Dioscorea zingiberensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 135, 1: 133-141
- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, 31, 7: 397-405
- Gandhi, S. G., Mahajan, V., Bedi, Y. S. 2015. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. Planta, 241, 2: 303–317
- Gonzalez-Arno M. T., Engelmann F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. Cryo-Letters, 27, 3: 155–168
- Grzegorzczak-Karolak I., Wiktorek-Smagur A., Hnatuszko-Konka K. 2018. An untapped resource in the spotlight of medicinal biotechnology: the genus scutellaria. Current Pharmaceutical Biotechnology, 19, 5: 358–371
- Howyze M.S., Noori S.A.S., Shariati V., Amiripour M. 2018. Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant *Trachyspermum ammi* L. Scientific Reports, 8, 1: 1–19
- Iannicelli J., Guariniello J., Tossi V. E., Regalado J. J., Di Ciaccio L., van Baren C. M., Pitta Alvarez S.I., Escandón A. S. 2020. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. Scientia Horticulturae, 260: 1–10
- Irshad M., Debnath B., Mitra S., Arafat Y., Li M., Sun Y., Qiu D. 2018. Accumulation of anthocyanin in callus cultures of red-pod okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Hongjiao) in response to light and nitrogen levels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 134, 1: 29–39
- Ishitani M., Nakamura T., Han S. Y., Takabe T. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. Plant Molecular Biology, 27: 307–315
- Ishkanian A. S., Malloff C. A., Watson S. K., DeLeeuw R. J., Chi B., Coe B. P., Snijders A., Albertson D.G., Pinkel D., Marra M.A., Ling V, MacAulay C., Lam W. L. 2004. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. Nature Genetics, 36, 3: 299–303
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. 2012. Dual-RNA-guided DNA endonuclease adaptive bacterial immunity. Science, 337, 6096: 816–821
- Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife, 2: 1–9
- Joung J. K., Sander J. D. 2013. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14, 1: 49–55
- Juvan P., Rozman D. 2006. Tehnologija DNA mikromrež in njena uporaba v medicini. Informatica Medica Slovenica, 11, 1: 2–15

- Kim H., Kim J. S. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15, 5: 321–334
- Lavania U. C. 2013. Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants. *Nucleus*, 56, 1: 1–6
- Lavania U. C., Srivastava S., Lavania S., Basu S., Misra N. K., Mukai Y. 2012. Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. *Plant Journal*, 71, 4: 539–549
- Liu W., Yuan J. S., Stewart C. N. 2013. Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nature Reviews Genetics*, 14, 11: 781–793
- Madlung A. 2013. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*, 110, 2: 99–104
- Mahfouz M. M., Piatek A., Stewart C. N. 2014. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 8: 1006–1014
- Matkowski A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - a review. *Biotechnology Advances*, 26, 6: 548–560
- Máthé Á., Hassan F., Kader A.A. 2015. In vitro micropropagation of medicinal and aromatic plants. V: Medicinal and aromatic plants of the world. Máthé, Á. (ur.). Dordrecht, Springer: 305–336
- Matveeva T.V., Sokornova S.V. 2018. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of plants for improvement of yields of secondary metabolites. V: Bioprocessing of plant in vitro systems. Pavlov A., Bley T. (ur.). Springer, Cham: 421–441
- McClintock B. 1983. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226: 792–801
- Miller J., McLachlan A. D., Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO Journal*, 4, 6: 1609–1614
- Mishra B. K., Pathak S., Sharma A., Trivedi P. K., Shukla S. 2010. Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *Papaver somniferum L.* *South African Journal of Botany*, 76, 3: 447–452
- Monfort L. E. F., Bertolucci S. K. V., Lima A. F., de Carvalho A. A., Mohammed A., Blank A. F., Pinto J. E. B. P. 2018. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products*, 116: 231–239
- Naqvi S., Farré G., Sanahuja G., Capell T., Zhu C., Christou P. 2010. When more is better: multigene engineering in plants. *Trends in Plant Science*, 15, 1: 48–56
- Naz R., Anis M., Alatar A. A., Ahmad A., Naaz A. 2018. Nutrient alginate encapsulation of nodal segments of *Althaea officinalis L.*, for short-term conservation and germplasm exchange. *Plant Biosystems*, 152, 6: 1256–1262

- Niazian M. 2019. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249: 953–973
- Niazian M., Sadat-Noori S. A., Tohidfar M., Galuszka P., Mortazavian S. M. M. 2019. Agrobacterium-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 132: 29–40
- Nogueira M., Enfissi E. M., Almeida J., Fraser P. D. 2018. Creating plant molecular factories for industrial and nutritional isoprenoid production. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 80–87
- Pillon Y., Johansen J., Sakishima T., Chamala S., Barbazuk W. B., Roalson E. H., Price D.K., Stacy E. A. 2013. Potential use of low-copy nuclear genes in DNA barcoding: a comparison with plastid genes in two Hawaiian plant radiations. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 1: 1–10
- Ramsey J., Schemske D.W. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 467–501
- Sayed M. A., Alam M. A., Islam M. S., Ali M. T., Ullah M. E., Shibly A. Z., Ali A., Hasan-Olive M. M. 2016. *Leonurus sibiricus* L. (honeyweed): a review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 12: 1076–1080
- Schildkraut I. R. A., Bitinaite J., Waht D. A., Aggar A. K. 1998. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 18: 10570–10575
- Siahsar B., Rahimi M., Tavassoli A., Raissi A. 2011. Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 11,3: 439–444
- Sitarek P., Kowalczyk T., Picot L., Michalska-Hejduk D., Bijak M., Białas A. J., Wielanek M., Sliwinski T., Skała E. 2018. Growth of *Leonurus sibiricus* L. roots with over-expression of AtPAP1 transcriptional factor in closed bioreactor, production of bioactive phenolic compounds and evaluation of their biological activity. *Industrial Crops and Products*, 122: 732–739
- Techen N., Parveen I., Pan Z., Khan I. A. 2014. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 103–110
- Tepfer D. 2017. DNA Transfer to plants by *Agrobacterium rhizogenes*: a model for genetic communication between species and biospheres. V: Transgenesis and secondary metabolism. Jha, S. (ur.). Cham, Springer: 3–44
- Tonk D., Mujib A., Maqsood M., Ali M., Zafar N. 2016. *Aspergillus flavus* fungus elicitation improves vincristine and vinblastine yield by augmenting callus biomass growth in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126, 2: 291–303
- Urbanová M., Košuth J., Čellárová E. 2006. Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. *Plant Cell Reports*, 25, 2: 140–147

- Van Dijk E.L., Auger H., Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30, 9: 418–426
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10, 1: 57–63
- Werner S., Maschke R., Eibl D, Eibl R. 2018. Bioreactor technology for sustainable production of plant cell-derived products. V: *Bioprocessing of plant *In vitro* systems*. Pavlov, A., Bley, T. (ur.). Cham, Springer: 413–432
- Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482, 7385: 331–338
- Xu T., Li Y., Van Nostrand J. D., He Z., Zhou J. 2014. Cas9-based tools for targeted genome editing and transcriptional control. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5: 1544–1552
- Yang D., Du X., Yang Z., Liang Z., Guo Z., Liu Y. 2014. Transcriptomics, proteomics, and metabolomics to reveal mechanisms underlying plant secondary metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 14, 5: 456–466
- Yang X., Ye C.Y., Cheng Z.M., Tschaplinski T.J., Wullschlegar S.D., Yin W., Xia X., Tuskan G.A. 2011. Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 387–397
- Zhang X. Y., Hu C. G., Yao J. L. 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167: 88–94

## ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju prof. dr. Jerneju Jakšetu za svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela.

Iskrena hvala tudi mami in očetu za vso podporo in finančno pomoč pri študiju, ter sestri, katere pogovori mi vedno dajo motivacijo za delo.

Hvala tudi sošolcem in prijateljem, ki ste mi vsa ta leta stali ob strani in bili najboljša družba skozi študijska leta. Vsekakor so bila le-ta zaradi vas bolj zanimiva in nasmejana.

Navsezadnje pa se za vso ljubečo podporo zahvaljujem tudi fantu. Hvaležna sem, da z veseljem poslušam moje razlage in mi svetuješ. Verjameš vame, ko sama ne, in me sprejemaš tako kot sem.