

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Innhold

Forord	4
Sammendrag	5
Abstract	6
1. Innledning.....	7
1.1 Plantebioteknologi og bruk av antibiotikaresistens - en 30 års historie	7
1.2 Bioteknologiske tilnæringer hos prydplanter	9
1.3 Genetisk modifisering av Poinsettia	10
1.4 <i>Nicotiana Tabacum</i> - en mye brukt modellplante i bioteknologisk forskning	12
1.5 Totipotens og vevskulturer	13
1.6 Stabil transformering ved bruk av <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
1.7 Genkonstruksjoner.....	16
1.7.1 Promotorer og terminatorer.....	17
1.7.2 Seleksjonsmarkører.....	18
1.7.3 Gener benyttet i plasmidkonstruksjonene	18
1.8 Molekylære nøkkelmetoder - for effektiv dokumentering av transgene planter	24
1.8.1 Polymerase Kjede Reaksjon.....	24
1.8.2 Southern blot analyse	25
2. Mål med oppgaven	27
3. Materialer	28
3.1. Plantemateriale	29
3.2. Elektrokompetente celler	29
3.3 Reagenser.....	30
3.4 Kit, Enzymer og Buffere	31
3.5 Næringsmedier.....	32
3.6. Primere.....	34

3.7 Antibiotika og hormoner	34
3.8. Teknisk utstyr	35
3.9. Programvare.....	35
4. Metoder	36
4.1 Forberedende molekylære teknikker	36
4.1.1 Plasmidkonstruksjoner og eluering av plasmid fra filtrerpapir.....	36
4.1.2 Kvantifisering av DNA	37
4.1.3 Transformasjon av <i>E.coli</i> og oppformering	38
4.1.4 Isolering av plasmid-DNA	38
4.1.5 Transformasjon med kompetente celler av <i>A. tumefaciens</i> ved elektroporering	40
4.1.6 Primerdesign	41
4.1.7 Polymerase kjedereaksjon (PCR)	41
4.1.8 PCR av bakteriekolonier og enzymkutting	43
4.2 Stabil transformering med <i>A. tumefaciens</i>	45
4.2.1 Generelle steg for transformering med <i>A. tumefaciens</i>	45
4.2.2 Transformering i tobakk.....	47
4.2.3 Transformering i julestjerne.....	48
4.3 Molekylære analyser.....	49
4.3.1 Isolering og screening av DNA fra plantevev.....	49
4.3.2 Screening av DNA	51
4.3.3 Southern blot analyse	51
5. Resultater og diskusjon	57
Del I – Arbeid med bakterier	58
5.1.1 Transformasjon av <i>E. coli</i> og oppformering	58
5.1.2 Elektroporering med kompetente celler av <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
5.1.3 Test av primere med gradient PCR.....	59
5.1.4 Transformering ved bruk av <i>A. tumefaciens</i>	60

Del II- Arbeid med planter og molekylære analyser	61
5.2.1 Transformering i tobakk.....	61
5.2.2 Isolering og screening av DNA i plantevev	62
5.2.3 Southern blot analyse	64
Del III – Transformering og arbeid med julestjerne.....	66
5.3.1 Transformering i julestjerne.....	66
Del IV- Videre diskusjon.....	69
5.4.1 Genetisk transformering og regenerering i tobakk versus julestjerne.....	69
5.4.2 Evaluering av metodene.....	69
5.4.3 Bruk av antibiotikaresistens i molekylær genteknologi.....	71
5.4.4 Alternative seleksjonsmetoder	72
5.4.5 Konklusjoner og fremtidige aspekter.....	74
6. Referanser.....	77

Forord

Denne masteroppgaven ble utført på Bioforsk plantehelse i Ås, og var del av et prosjekt finansiert av Norges Forskningsråds Natur- og Næringsprogram (NFR 199398/I10).

Oppgaven er et resultat av ett års arbeid, med varierte og til tider krevende stunder. I det man starter det praktiske arbeidet finner man fort ut at kunnskap, erfaring og nysgjerrighet er helt avgjørende for å komme seg fremover. Når ikke alle faktorer har vært på plass til enhver tid har det vært fint å få et puff i riktig retning av de som er eksperter i faget.

I den anledning vil jeg takke mine to dyktige veiledere, Dr. Jihong Liu Clarke og Dr. Trine Hvoslef-Eide. Jihong, du har tatt meg i mot på Bioforsk med åpne armer og fulgt opp arbeidet til enhver tid. Enda viktigere har du formidlet en stor tillitt jeg setter pris på. Din evne til å inkludere, rådføre og motivere er jeg veldig takknemlig for, og ditt positive vesen er til inspirasjon for mange. Trine, jeg er veldig takknemlig for samtalene vi har hatt, og det nøyaktige arbeidet du har lagt i rettingen.

Videre vil jeg takke alle på avdelingen som har hjulpet meg i det praktiske arbeidet.

Sissel Haugslie, takk for all opplæring og hjelp, kritiske spørsmål og uformelle samtaler. Jeg har til tider vært en fotfølgende labrador, men har til gjengjeld lært utrolig mye i samarbeid med deg. Hege Særvold Steen, tusen takk for alle gode innspill, samtaler og tjenester. Ashraf Islam, thanks for all the help and guidance during my stay at Bioforsk. Good luck with the final work on your PhD.

Jeg vil også bruke anledningen til å takke damene på SKP som har vist et inkluderende og trivelig arbeidsmiljø jeg kommer til å savne. Sist men ikke minst vil jeg takke familie og venner for oppløftende støtte og råd underveis, spesielt til Arne som har stått meg nærmest det siste året ved UMB.

Ås, mars 2013

Camilla Dehli Østerud

Sammendrag

Det blir stadig laget nye varianter av pryddplanter ettersom kjøpere blir fristet av nye variasjoner i farge, annet utseende, blomsterduft, og holdbarhet. Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotsch), kjent som julestjerne på norsk, er en svært ettertraktet potteplante som symboliserer julehøytid verden rundt. På grunn av sin popularitet er den et stort økonomisk bidrag i næringen, og blir produsert og solgt i Nord-Amerika, Europa, Asia og Australia, der Europa og Nord-Amerika er de ledende produksjonslandene. Bare i Norge blir det solgt i underkant av 6 millioner planter per år, som igjen tilsvarer en omsetning på 200 millioner NOK. Kjøpere ønsker små kompakte planter med lang holdbarhet. For å holde igjen vekst av stammestilk og forgreininger blir det brukt flere kjemiske vekstregulatorer. De fleste vekstregulatorer fungerer ved å stoppe et eller flere steg i biosyntesen til veksthormonet gibberellin, deriblant chlorocholinchloride (CCC), paclobutrazol, og daminozid, alle påvist som negative for helse og miljø. Gibberellin (GA) er en fellesbetegnelse på en rekke gibberelliner, et plantehormon som regulerer celledeling, avgjørende for plantevekst og fruktsetting. «Dvergete» planter som ikke uttrykker aktive GA - hormoner har en høy produksjon av enzymet *GA-2- oksidase (GA2ox)* som deaktiverer synteseveien, først oppdaget i erteplanter.

Plantetransformering innebærer en stabil introduksjon av et (eller flere) «fremmed(e)» gen inn i plantens genom, og har utgjort flere viktige roller opp gjennom årene innen alt fra medisin til planter med større avling per arealenhet (sultproblematikk). For genmodifisering av julestjerne ble det utført stabil transformering med den naturlige forekommende jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*, en av de mest brukte transformeringsmetodene i nyere genteknologi. Antibiotikaresistens i fremstilling av genmodifiserte produkter er mye brukt som seleksjonsmarkør, spesielt *nptII*, genet for Kanamycinresistens. Resistensgen er lite ønsket på markedet, og nye europeiske lover begrenser bruken av antibiotikaresistens i transgen mat eller fôr. Siden julestjerneplanten hverken inngår i mat eller fôr kan genteknologi tas i bruk for å utvikle en ny sort uten sprøyting av giftige kjemikalier. For å håndtere utfordringene er *Cre/loxP* rekombinasjonssystemet satt inn i plasmidet pC35sCre for å fjerne *nptII*-sekvenser mellom *LoxP*-seter i transgene linjer. I denne oppgaven ble det brukt tre forskjellige plasmid konstruert av Dr. Ow's samarbeidsgruppe i Kina, hvorav alle inneholdt seter for *LoxP* oppstrøms og nedstrøms for *nptII*. De første stegene i utviklingen av en ny julestjerne vil bli presentert her.

Abstract

New varieties of ornamental plants increases as buyers are tempted by increased variations in color, appearance, floral cent and flowering time. Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotsch), known as Christmas Star, is an attractive pot plant that symbolizes Christmas all around the world. The popularity makes the plant a major economic contribution to the industry, produced and sold in North-America, Europe, Asia and Australia, whereas Europe and North-America are the leading manufacturing countries. In Norway, almost 6 million plants are sold yearly, corresponding to 200 million NOK. The buyers prefer small compact plants, with longtime flowering. In order to restrain the growth of stem and branches, chemical growth regulators are used. Most growth regulators work by stopping one or more steps in the biosynthesis of the growth hormone gibberellin, including Chlorocholinchloride (CCC), Paclobutrazole and Daminozide, all proven negative on health and environment. Gibberellin (GA) is an umbrella term for a number of gibberellins, a plant hormone that regulates cell division, essential for plant growth and fruit set. "Dwarfy" plants that don't express active GA-hormones have a high production of the enzyme *GA 2-oxidase (GA2ox)* that's blocking the pathway synthesis, first detected in pea plants. Since the poinsettia plant is neither a non- food nor a feed plant, genetic engineering can be more accepted as the solution to a new breed, free of toxic chemicals. Plant transformation involves the stable introduction of one (or more) "foreign" gene(s) into the plant genome, and has played an important role in a variety of fields like medicine and hunger issues. For transformation of Poinsettia, the naturally occurring soil bacteria *A. tumefaciens* were used. This is one of the most used transformation methods in genetic engineering. Antibiotic resistance is often used as a selection marker, particularly Kanamycin resistance, coded by the gene *nptII*. Anyhow, resistance against antibiotics is an undesired trait, and new European laws greatly limit the release of genetically modified plants treated with resistance genes of clinical importance. To address these challenges several methods have been developed. *Cre/loxP*- recombination system is a method designed to remove DNA between specific sequences in the genome, and will be tested here. Three different plasmids were used, all constructed by Dr. Ow's Cooperative group in China. Each plasmid contained *LoxP* sites up- and downstream the gene of antibiotic resistance, *nptII*. The first steps in developing a new transgenic poinsettia will be presented here.

1. Innledning

Plantebioteknologien er et nyttig verktøy for å overvinne begrensninger knyttet til konvensjonell planteforedling. Over de to siste tiår har plantebioteknologien fungert som en motor til miljøvennlig produksjon av ulike produkter, blant annet innen mat, helse og biodrivstoff, som igjen har bidratt betydelig til innovasjon og økonomi. Et eksempel på dette er produksjon av en miljø- og helsevennlig julestjerneplante, der hensikten er å fjerne bruk av kjemiske vekstregulatorer (Clarke et al. 2008). Hovedmålet er å fremstille små, kompakte julestjerner med lang holdbarhet ved hjelp av plantebioteknologi. I tillegg til dette skal markørgener for antibiotikaresistens fjernes ved bruk av *Cre/loxP* rekombinasjonssystem. På lengre sikt vil ønsket sluttresultatet være en prydblant som oppfyller kjøpernes etterspørsel, i tillegg til en mer miljøvennlig produksjon og rimeligere drift for industrien. I denne oppgaven ble konseptet testet på modellplanten *Nicotiana tabacum*, som en indikasjon på at metodene og plasmidene fungerte.

1.1 Plantebioteknologi og bruk av antibiotikaresistens - en 30 års historie

Bruk av bioteknologi i industri og forskning er ansett som en relativt ung teknologi sammenliknet med andre. Siden 1980-tallet har bioteknologi vokst i både anvendelse og omfang, og innebærer bruk av levende organismer som bakterier, planter, dyr og humane celler til å forbedre eller skape noe nytt ved hjelp av molekylære teknikker. Som et resultat av dette strekker bioteknologi seg over et bredt spekter, i alt fra fremstilling av farmasøytiske produkter til matvareproduksjon og sultproblematikk. Organismer som har fått sine egenskaper endret ved hjelp av genteknologi omtales som GMO (Genmodifiserte Organismer), (Gachet et al. 1998) og i de senere år har det vært mange debatter med både for- og mot- argumenter til denne utviklingen. I bioteknologien er en transgen plante en GM-plante som har fått fremmed DNA integrert inn i sitt eget genom ved hjelp av genteknologi, for å uttrykke en eller flere ønskede egenskaper (Ow et al. 1986). Generelt er transformeringseffektiviteten i planter lav, og for å skille ut hvilke celler som er transgene er det vanlig å benytte seg av genetiske markører (Joersbo 2001). En mye benyttet markør er gener for antibiotikaresistens koblet nært til DNA-sekvensen man vil integrere i genomet. Ved å dyrke opp planter på næringsmedie med antibiotika kan man selektere ut hvilke som klarer å vokse tross antibiotika tilstede, altså hvilke planter som bærer gen for resistens (Deblock et al. 1984). Selv om dette er en effektiv seleksjonsmetode er transgene planter med antibiotikaresistens en uønsket egenskap på markedet (Iamtham & Day 2000). Årsaken ligger

i frykten for at resistensen skal spre seg til mikroorganismer og skape vanskeligheter i behandlingen av mennesker og dyr dersom det blir enda flere antibiotikaresistente bakterier (Lucca et al. 2001; Wang et al. 2000). For å håndtere disse utfordringene er det utviklet metoder med hensikt om å fjerne antibiotikaresistens i fremstilling av GM-planter. *Cre/LoxP* rekombinasjonssystem er en slik metode, og er brukt i denne oppgaven.

Siden det ikke eksiterer noen spesifikk oversikt over hvor sannsynlig det er med en spredning av resistensgener, men heller konsekvensene det kan medføre, oppstår det i stedet et forbud som en føre-var sikkerhet. Alle land med reguleringer på plass krever tillatelse for produksjon av genmodifisert mat eller fôr, og i Norge og flere andre land, må GM produkter med mer enn 1 % innhold av GMO tydelig merkes (Bioteknologinemnda 2009; EFSA 2006). I Norge er det Miljøverndepartementet som har ansvaret for lovverket, der drøfting av kostnad/nytteverdier og etiske problemstillinger blir behandlet. Denne myndigheten er for tiden delegert til direktoratet for naturforvaltning. Bioteknologinemnda, de relevante departementer, og andre berørte parter er høringsinstans for søknader om utsetting eller markedsføring av GMO i Norge. ELSA er eksempel på et organ som behandler etiske, rettslige og samfunnsmessige aspekter ved prosjekter i bioteknologi, i tillegg til nanoteknologi og nevroteknologi. ELSA er en forkortelse av engelsk for «ethical, legal and societal aspects» og inkluderer perspektiver fra ulike fagmiljøer i tillegg til å utgjøre flere roller, blant annet utforskning av problemstillinger knyttet til risiko, reguleringer, styringer, kulturer og verdier (Forskningsrådet 2008). ELSA ble opprinnelig dannet på initiativ av forskere selv som ønsket å vurdere alle aspekter og risikoer ved egne prosjekter. Da det på 1990-tallet ble startet et stort prosjekt på menneskets arvestoff, også kjent som «Human Genome Project», ble det bestemt at 3-5 % av finansieringen skulle bli tildelt ELSA (Collins 1999). I dag fungerer ELSA også som en bidragsyter for norske fagmiljøer til å holde kontakt med ledende internasjonale arenaer.

1.2 Bioteknologiske tilnæringer hos prydplanter

Det blir stadig laget nye varianter av prydplanter ettersom kjøpere blir begeistret over variasjoner i farge, utseende, blomsterduft, og levetid. Bare i 2006 ble det solgt prydplanter i USA for 20,8 billioner dollar (Potera 2007) og globalt er det estimert et beløp på 150 billioner dollar (Chandler & Brugliera 2011). I tillegg til julestjerne er noen av de mest populære prydplantene på verdensbasis roser, nelliker, hortensia, begonia, petunia, krysantemum, gladioler, tulipaner, liljer og orkideer. Over 30 ulike arter er allerede genetisk modifisert ved bruk av *Agrobacterium* eller genkanon (Casanova et al. 2005; Chandler & Brugliera 2011). Tradisjonelt er foredling av nye sorter en tidkrevende prosess som krever kryssing av beslektede arter eller individer som viser variasjoner i samme art (Lütken et al. 2012). Siden tidlig 90- tallet og frem til dags dato har det vært en aktiv utvikling og anvendelse av gentransformeringer for å endre på spesifikke egenskaper i stedet for tradisjonell foredling (Casanova et al. 2005). For eksempel har hverken rose eller nellik anlegg for blåfarge fra naturens side, men nye GM-varianter har gjort dette mulig ved å hente det blå pigmentgenet 3', 5'- *hydroxylase* fra petunia, og deretter transformert dette inn i vertsplantene av nellik og rose (Tanaka et al. 2010).



Figur 1.1. Genmodifisert nellik og rose. Bildene viser dyrking og blomster med blålilla kronblad som resultat av genmodifisering. Bildet hentet fra (Tanaka et al. 2010).

Dette er et eksempel på at genteknologi gjør det mulig å fornye prydplanter og gi egenskaper som ellers ikke hadde vært mulig med tradisjonell planteforedling. Ved å hente egenskaper fra andre plantearter eller organismer kan nye sorter bli utviklet og gi flere gleder, både for kjøper og foredler.

1.3 Genetisk modifisering av Poinsettia

Opphav og historie

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotsch), julestjerne på norsk, er en svært ettertraktet og godt likt potteplante som symboliserer julehøytid verden rundt. Den tilhører familien *Euphorbiaceae*, en artsrik plantefamilie. Opprinnelig stammer planten fra Mexico der den først ble dyrket av Aztekerne. Dette folkeslaget brukte planteveksten til utvinning av rødfarge og fremstilling av febermotvirkende medisin fra latexvæsken inni planten. Det var først i 1825 at julestjernen ble introdusert til USA av amerikaneren Joel Poinsett (Ecke et al. 2004). Han var botaniker og den første ambassadør i Mexico for USA. Poinsett begynte å distribuere planten til botaniske hager og venner i sitt område, og slik startet dyrkingen til en av verdens mest populære potteplanter.



Figur 1. 2. Joel Poinsett. Mannen som introduserte julestjerne til USA i 1825 (Ecke et al. 2004).

Fremstilling av julestjerne foregikk stort sett i USA frem til 1960-tallet. På denne tiden ble det introdusert en langtidssort i tillegg til veksthemmere som ga springbrett til Europa (Strømme 1993). Det var først i 1967 den typiske sorten vi kjenner igjen som julestjerne kom på markedet. Denne ble fremstilt og dyrket i Norge av gartner Thormod Hegg, som utover i sin karriere ble spesialist på feltet. Sorten 'Anette Hegg Red', er oppkalt etter Hegg sitt første barnebarn, og fikk ikke bare sitt gjennombrudd her hjemme, men ble også den mest populære på verdensbasis. 'Anette Hegg' gjorde stor suksess på 1970-tallet fordi dette var den første sorten med blomstrende sideskudd og mange forgreininger som gjorde den tett og buskete, i tillegg til blader som ikke var seige (Strømme 1993).



Figur 1. 3. Sorten 'Anette Hegg Red'. På bildet: Anette Hegg sammen med sorten 'Anette Hegg Red' (1967), som ble en verdenskjent sort, foredlet i Norge av Thormod Hegg (Strømme 1993).

Utseende

Slik det ble nevnt tidligere stammer julestjernen fra slekten *Euphorbia* med opphav i tropiske klima. I vill tilstand kan planten bli opp til 4 meter høy, som gir den et treliknende utseende (Figur 1.4). Selv om det finnes rundt 2000 arter i slekten har alle kjennetegn med gul blomst i midten bestående av mannlig og kvinnelig formeringsorgan, som gjør den selvpollinerende (Ecke et al. 2004). Blomsten er omkranset av karakteristiske høyblader i sterk rødfarge som ofte blir misforstått som en del av blomsten. Inni bladvevet og stilkene befinner det seg en hvit latexvæske som trolig er del av plantens forsvarssystem. Videre kjennetegn for dagens julestjerne er grønne brede blader og tette forgreininger. Julestjernen blir ikke benyttet i mat eller fôrproduksjon, og kan derfor være en godt egnet GM plante i de fleste land som er skeptisk til GM i mat, inkludert Norge.



Figur 1.4. Ville planter i slekten *Euphorbia*. Bildene viser hvordan plantene vokser som store busker i varmt klima, med karakteristiske røde høyblader rundt blomsten. (2013) (Rinkley 2010).

Produksjon

Siden julestjerne er en av de mest populære potteplantene er den følgelig også et stort økonomisk bidrag i næringen. I dag blir planten produsert og solgt i Nord -Amerika, Europa, Asia og Australia, der Europa og Nord- Amerika er de ledende produksjonslandene (Clarke et al. 2008; Ecke et al. 2004). Bare i Norge blir det solgt rundt 6 millioner planter per år, som igjen tilsvarer en omsetning på 200 millioner NOK (SSB/NGF 2009).



Figur 1.5. Produksjon av julestjerne i veksthus. (Rose 2012).

For å justere planten til potteplantestørrelse er det selektert og dyrket mange sorter gjennom tidene. Dyrkning i kontrollerte omgivelser med bestemte temperaturer, lyskvalitet, lysvarighet og kjemiske midler kalt vekstregulatorer er mye brukt for å håndtere høyde og vekst (Clifford C. Sean et al. 2004; Cockshull 1995). Vekstregulatorer er spesielt mye brukt i fremstilling av potte- og hageplanter siden de hverken inngår i mat eller fôr (Larsen & Lieth 1993), og er små organiske molekyler som enten blir laget naturlig i planten, eller fremstilt syntetisk (Giannakoula et al. 2012). De fleste vekstregulatorer fungerer ved å hemme et eller flere steg i biosyntesen til gibberellin, deriblant ChlorocholinChloride (CCC), paclobutrazol, og daminozid (Rademacher 2000), alle brukt i julestjerne. CCC er generelt mye brukt i prydplanter for å fremskynde blomstring (EPA 2007; Guo et al. 2010; H. Zhang et al. 2012). Selv om kjemikalet ikke er kjent som direkte giftig kan det ved overdreven kontakt irritere hud, øyne, lunger, og gi skade på lever (New Jersey Department of Health and Senior Services 1999). På grunn av disse bivirkningene er kjemikalet merket som svakt giftig av Verdens helseorganisasjon (WHO). Paclobutrazol er også brukt i mange prydplanter. Kjemikalet fungerer som en effektiv hemmer i tre oksidative steg av biosyntesen til veksthormonet gibberellin (Hedden & Graebe 1985). Daminozid var allerede i 1993 det mest brukte veksthemmende stoffet over en 25 års periode, og kjemikalet gir kompakte planter og fruktsett som modner mer på likt (Larsen & Lieth 1993). I dag er daminozid forbeholdt prydplanter fordi man er usikker på eventuelle helsesrisiki.

I denne oppgaven er det ønskelig å undersøke mulighetene for produksjon av julestjerner som ikke trenger vekstregulatorer for å oppnå samme kvalitet. Ved å unngå bruk av vekstregulatorer kan man skåne helse og miljø, så vel som å redusere produksjonskostnader.

1.4 *Nicotiana Tabacum*- en mye brukt modellplante i bioteknologisk forskning

Opphav og historie

N. Tabacum er en av mange arter i slekten *Nicotiana*, dyrket av mennesket i flere tusen år, først og fremst som en urteplante til avling og handel (Ren & Timko 2001). *Nicotiana* tilhører familien *Solanaceae*, og *N. tabacum* har i de siste 20 år tjent som modellplante i arbeid med cellekulturer og genetisk forskning grunnet god kunnskap om plantens opphav, vekstvilkår, struktur, og organisering i genomet (Ren & Timko 2001; Wang 2006). For allmennheten er planten mest kjent for sin rolle i tobakkindustrien, men nyere teknologi beviser at den også kan være en døråpner for andre og mer positive bruksområder.

Utseende

Tobakken har en hurtig vekst, er robust, og blir rundt 1-2 meter lang. Blomsten er selvpollinerende og omringet av tynne rosa blader (Figur 1.6). Langs stilken vokser store grønne blader, med en litt klebrig og seig overflate. Siden planten har en rask utvikling og er enkel å transformere egner den seg godt som modellplante, og vil ha dette formålet i oppgaven (videre omtalt som tobakk).



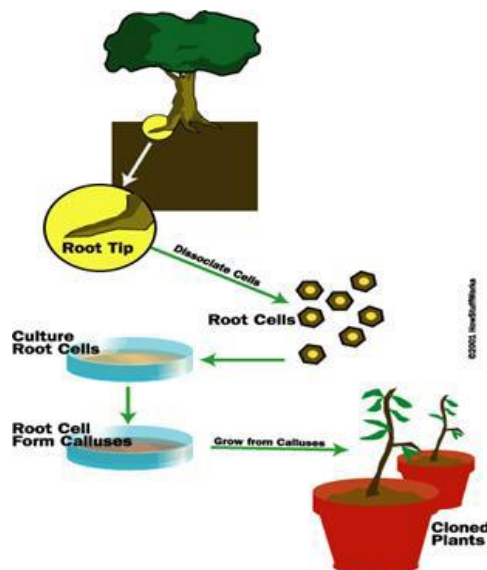
Figur 1.6. Blomstrende *N. Tabacum*. (SeedsPlants.net 2012).

1.5 Totipotens og vevskulturer

Totipotens er et begrep innført av Haberlandt (1902) som innebærer at nesten hvilken som helst celle i en plante kan under rette forutsetninger starte celledeling og utvikle seg til en ny plante, eventuelt erstatte et tapt organ (Slater et al. 2008).

Vevskultur bygger på dette prinsippet om totipotensiale, ved at planteceller kan starte regenerering til en helt ny plante, der hele det genetiske potensialet fra foreldreplanten blir uttrykt. Dyrkingen foregår *in vitro* under sterile omstendigheter. Isolerte celler eller en bit av plantevev blir plassert på vekstmedium med rette næringsstoffer og hormoner i tillegg til lys og temperatur, som trigger frem celledeling og dannelse av kallus, adventivskudd eller brytning av aksillære knopper; som er første steg i utviklingen av en ny plante. Kallus er en masse med uspesialiserte celler som etter hvert differensierer seg når de mottar stimuli og signaler fra miljøet rundt. I en vevskultur kan man pause eller aktivere utviklingen på forskjellige stadier ut i fra hvilke næringsmedier man opererer med. Ved å dyrke kulturer på denne måten kan man nøye studere utviklingen til planten og lage identiske individer (klon) med ønskede egenskaper. Adventivskudd er plantens evne til å utvikle helt nye skudd fra cellevev som allerede er differensiert i stedet for vanlig vekst gjennom de originale vekstpunktene (apikalt meristem). Dannelsen av adventivskudd skjer gjerne i sårvev på stengler, blad, og stammer. Aksillære skudd er små skudd som til forskjell fra adventivskudd ikke trigges frem, men som eksiterer i regionene mellom stengel og blad. Disse består av celler fra meristem som er blitt igjen etter vekst av stengelen. Under rette

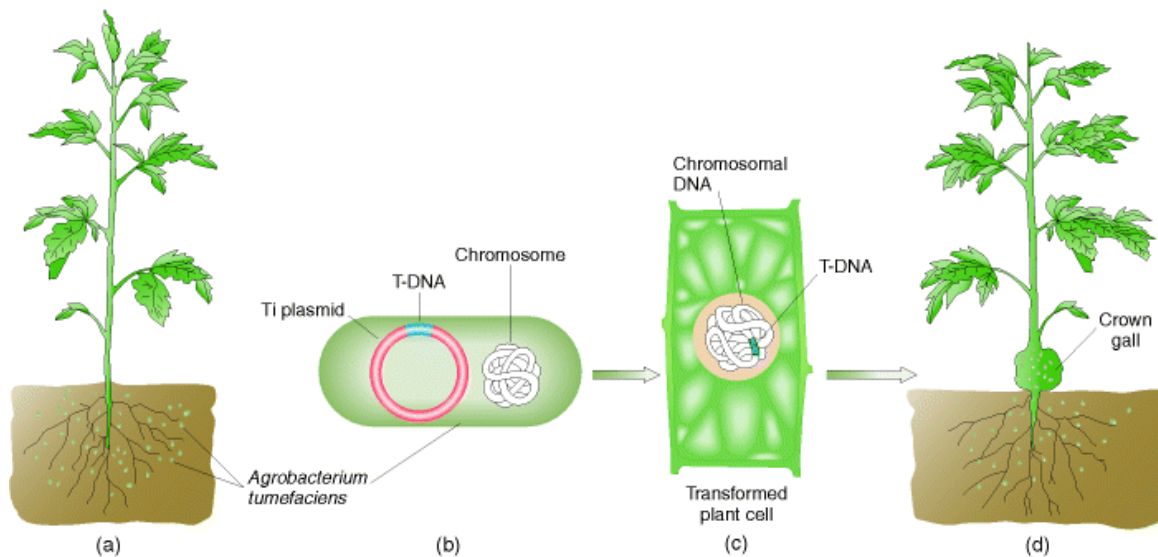
forutsetninger gir skuddene opphav til en ny stengel eller blomst. Alle disse metodene brukes i vevskultur, avhengig av hva man ønsker å oppnå, eller hva som er mulig. Regenerering fra enkeltceller er ønskelig når man transformerer planter fordi det gir individer med samme genetiske uttrykk. Dyrking av kallus er én måte der man kan få enkeltceller til å regenerere til nye planter.



Figur 1.7. Prinsippet for dyrking av vevskultur. Bildet demonstrerer oppdyrking av isolerte planteceller fra trees røtter, som på riktig næringsmedie utvikler kallus, og til slutt blir en ny plante (klon) av moderplanten (Parsley 2004).

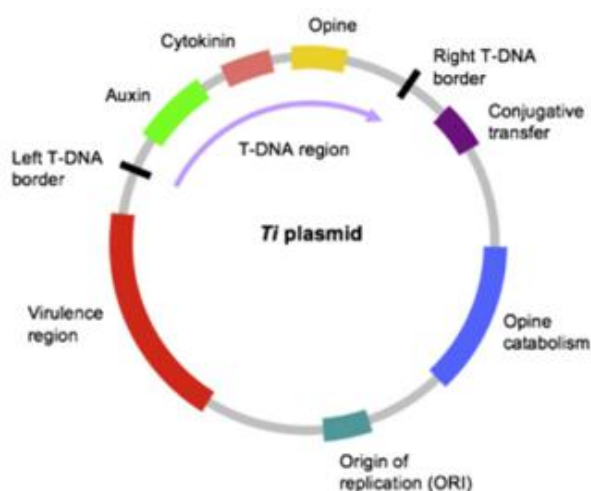
1.6 Stabil transformering ved bruk av *Agrobacterium tumefaciens*

Plantetransformering innebærer en stabil introduksjon av et (eller flere) «fremmed(e)» gen inn i plantens genom. Dette har blitt en mye brukt teknikk for å studere plantenes utvikling og hvordan de fungerer. Det kan også brukes til å introdusere og forbedre egenskaper i planteforedling. Det finnes flere metoder for å transformere DNA inn i plantens genom, og disse kan deles i to kategorier; direkte eller indirekte genoverføring. *A. tumefaciens* er en indirekte metode som tar utgangspunkt i metabolismen til en naturlig forekommende jordbakterie, *A. tumefaciens* (Bevan 1984). I kontakt med sårvev hos planter overfører bakterien sykdommen «kron -galle». Kron-galle oppstår når bakterien integrerer en region fra sitt plasmid-DNA inn i plantens genom. Genet som forårsaker svulster sitter på plasmidets T-region og det er denne regionen som blir ført inn i plantens cellekjerne (Schrammeijer et al. 2000). Dette er den mest brukte transformasjonsmetoden og kan i dag brukes i de fleste planter ettersom den er modifisert til også å infisere enfrøbladete planter (Hiei et al. 1997).



Figur 1.8. Prinsippene for kron-galle sykdom for *A. tumefaciens*. (a) planten blir infisert av *A. tumefaciens* via røttene i jorda (b) Nærbilde av *A. tumefaciens* med tydelig avgrenset Ti-plasmid (Ti for tumor induserende) fra resten av cellekjernen, med regionen T-DNA som bærer gen for kron-galle (c) T- DNA integrerer seg i plantens genom i cellekjernen (d) Planten uttrykker genene fra T-DNA og det utvikles svulster på stengelen (Griffiths 2000b).

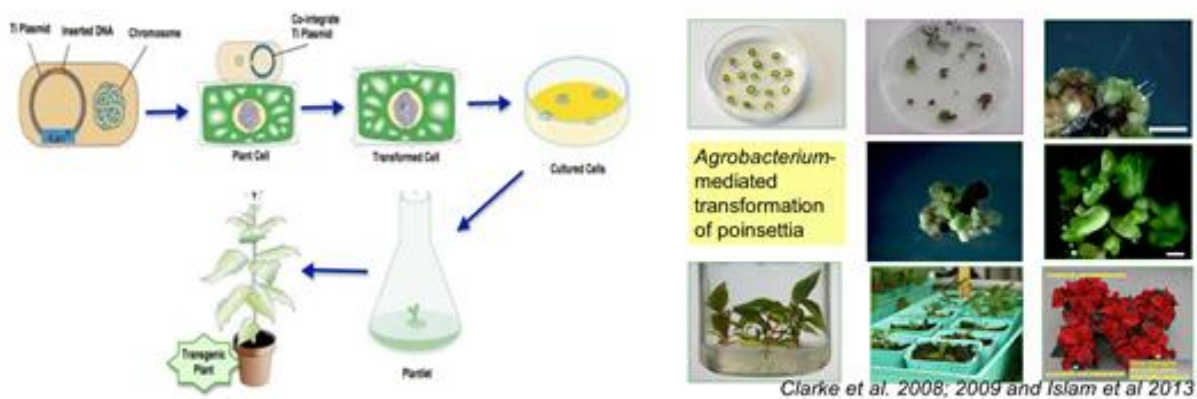
Når *A. tumefaciens* overfører sin T-DNA region integrerer sekvensen seg på en tilfeldig plass i genomet (De Groot et al. 1998). Prosessen for integrering avhenger av *vir*-regionen som også er plassert på Ti plasmidet. *Vir*-regionen produserer proteiner som setter overføringen i gang ved hjelp av signaler fra sårvevet som planten sender ut (jfr. Acetosyringone). Når T-DNA er på plass i planten uttrykkes genene som gir en overproduksjon av veksthormoner, som igjen danner svulster der bakterien formerer seg. I tillegg til dette bærer T-DNA proteiner som utviner energi fra plantederivater bare bakterien kan utnytte (Winans 1992).



Figur 1.9. Ti-plasmid fra *A. tumefaciens*.

Illustrasjonen viser Ti-plasmidet, med T-DNA regionen som integreres til plantegenomet. Virulens-region (*Vir*) gjenkjenner signaler fra sårvev og setter i gang overføringen av T-DNA (Păcurar et al. 2011).

Denne naturlig forekommende evnen til å overføre DNA fra en celle til en annen, har vært en interessant oppdagelse i genteknologien. Artikler fra tidlig 80-tallet viser stor interesse rundt mulighetene med oppdagelsen, og metoder har blitt utviklet for å hurtigere modifisere planter. Metodene baserer seg på å utvinne nye stammer av *A. tumefaciens*, der de patogene genene i T-regionen er byttet ut med gener av interesse, i tillegg til markørgen som antibiotikaresistens. Originalt kunne villtypen av *A. tumefaciens* bare bruke tofrøbladede vekster som vert (Rashid et al. 1996), men nå finnes også flere stammer med virulens overfor enfrøbladede vekster (Hiei et al. 1997). I tillegg til transformering i planter er det også påvist transgene gjærceller for den eukaryote organismen *Saccharomyces cerevisiae* behandlet med modifiserte stammer av *A. tumefaciens* (Bundock et al. 1995), samt i flere andre bakterier, sopper, og til og med dyreceller (Wang 2006) . I denne oppgaven ble teknikken utført på plantevev fra tobakk og julestjerne.



Figur 1.10. Prinsippene for stabil transformering med *A. tumefaciens* og vevskultur. Illustrasjon til venstre viser bakterie med Ti-plasmid og innsatt DNA av interesse som integreres i plantens genom ved kontakt. Det foregår en oppdyrking på vekstmedium med seleksjon, der sluttresultatet er en voksen plante som uttrykker en transgen egenskap. Bildeserien til høyre viser ekte utvikling a vevskulturer utført i julestjerne tidligere, der første steg er skiver på seleksjonsmedie til videre utvikling av embryo og skudd, til utvikling av røtter og til slutt regenerering av ny plante. Figur til venstre hentet fra (iGEM 2010), Figur til høyre hentet fra (Clarke et al. 2008).

1.7 Genkonstruksjoner

Det ble det brukt tre ulike genkonstruksjoner videre omtalt som plasmid. Plasmid designet til plantetransformering etterligner Ti-plasmidet, der fire grunnleggende funksjoner må være tilstede: 1) Plasmidet må kunne oppformeres i både *E.coli* og *A. tumefaciens* 2) plasmidet må inneholde sekvenser for markører som kan identifisere transgene planter 3) avgrensede sekvenser for kodende del må designes slik at riktig del av konstruktet føres inn i plantens

genom 4) genene som føres inn i genomet må kunne gjenkjennes av planten for å bli uttrykt, og må derfor inneholde passende sekvenser for promotor og terminator.

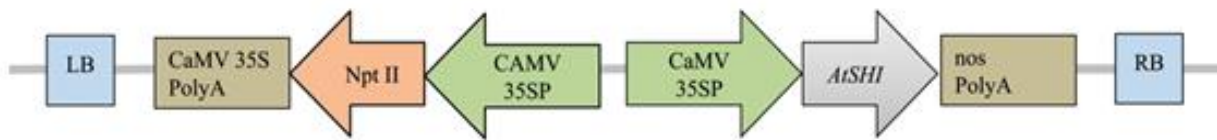
Siden Ti-plasmidet er så stort fra naturens side (ca. 200 Kbp), er dette en enklere måte for å overføre T-regionen til plantens genom (An 1986).

1.7.1 Promotorer og terminatorer

Kunnskap om hvordan gener reguleres er et nyttig verktøy i plantebioteknologien. For at et gen skal komme til uttrykk i både prokaryote og eukaryote organismer må det bli transkribert av et RNA polymerase enzym, og prosessen deles opp i tre faser; initiering, elongering og terminering (Watson et al. 2008).

Promotorer er DNA-sekvenser plassert oppstrøms for gener, og fungerer som et bindingssete for RNA polymerase molekylet, ofte sammen med andre initieringsfaktorer. Når det er dannet en kobling mellom promotor og polymerasekomplekset skjer den en strukturforandring som gjør at DNA i området rundt komplekset åpner seg og blir enkelttrådet. Maskineriet starter å lese av den ene enkelttråden i 5' til 3' retning. Denne startprosessen kalles initiering. Etter ~10 bp er initieringen ferdig, og elongeringen i gang. Elongeringen innebærer at transkripsjonsmaskineriet leser av templattråden nedstrøms og lager en mRNA tråd, samtidig som den lukker DNA tråden etter avlesning. Når polymerasen har avlest genet eller genene må den frigi sitt RNA-produkt, en prosess kalt terminering. Hos eukaryote finnes det en DNA-sekvens etter kodende gen som trigger terminering. Sekvensen koder for et Poly-A signal som fører til at visse proteinkomplekser kutter RNA fra polymerasekomplekset og starter å lage en repetert strekk av adeninbaser på 3' ende av RNA-tråden. Denne prosessen kalles polyadenylering. Poly-A strekken er med på å beskytte genet mot degradering (Watson et al. 2008).

Den mest brukte promotoren til uttrykking av gener i plantetransformering er 35S, opprinnelig fra mosaikkviruset 35S RNA i blomkål (CaMV35SP), av engelsk «Cauliflower Mosaic Virus» (Ow et al. 1987). Promotoren uttrykkes i nesten alle plantevev og er også brukt som promotor for plasmidene i denne oppgaven. Sekvensen som ligger avgrenset mellom LB og RB tilsvarer T-regionen på Ti-plasmidet i *A. tumefaciens*, og er delen som blir ført inn i vertens genom ved transformering. Nedstrøms for hvert gen ligger signalsekvens for dannelsen av Poly-A hale ved transkripsjon av mRNA.



Figur 1.11. Genkonstruksjon av pKanIntron-35S-SHI brukt til transformering med *A. tumefaciens* i julestjerne. Bildet er et eksempel på en DNA-sekvens integrert i DNA hos julestjerne, der genene som blir overført er avgrenset mellom høyre og venstre grense (LB, RB). Genene *NptII* og *AtSHI* blir avlest av plantens transkripsjonsmaskineri ved hjelp av promotorene CaMV35SP plassert oppstrøms for genene. På terminerende ende er det plassert PolyA-haler som beskytter kodende sekvenser (mRNA) for degradering. Figur hentet fra (Islam et al. 2013).

1.7.2 Seleksjonsmarkører

Slik det ble nevnt tidligere har markørgenen som hensikt å påvise transgene celler, der resistensgen for forskjellige antibiotika og ugressmiddel har blitt mye brukt, men er lite likt (Lucca et al. 2001). Nye europeiske lover begrenser i stor grad slipp av genetisk modifiserte planter behandlet med resistensgener som er klinisk viktige (Degenhardt et al. 2006). Det er utviklet flere alternativer for å erstatte seleksjonen til tryggere metoder. Et eksempel er sultseleksjon, basert på planters utnyttelse av karbohydrater. I julestjernekultur ved Bioforsk plantehelse i Ås er det allerede et pågående prosjekt der mannose er seleksjonsagent. Mannose er et enkelt suktermolekyl som planter ikke klarer å konvertere videre fra mannose-6-fosfat i sin naturlige metabolisme (Joersbo 2001; Wang et al. 2000). Ved å transformere planter med genet som koder for enzymet mannose-6-fosfat isomerase, kan suktermolekylet konverteres videre i glykolysen og gi energi til transgene planter som vokser på mannosemedium (Gao et al. 2005; Wang et al. 2000). Et annet eksempel er *Cre/LoxP* rekombinasjonssystem som ble benyttet i dette forsøket. Nærmere detaljer er beskrevet i eget kapittel.

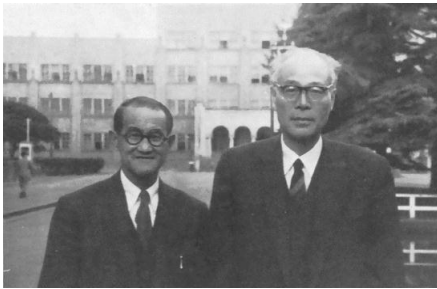
1.7.3 Gener benyttet i plasmidkonstruksjonene

1.7.3.1 Gibberellin

Gibberellin er en fellesbetegnelse på en hel rekke gibberelliner, og er et plantehormon som regulerer celledeling, avgjørende for plantevekst og fruktsetting. De kontrollerer blant annet frøspiring, skuddutvikling, blomsterutvikling og modning av frukt (Bhattacharya et al. 2012). Plantehormoner er definert som en gruppe organiske substanser som påvirker fysiologiske prosesser ved svært lave konsentrasjoner (Davies 2010). I dag er over 125 typer av gibberelliner blitt kjent, der mange er mellomprodukter i syntesen, snarere enn biologisk

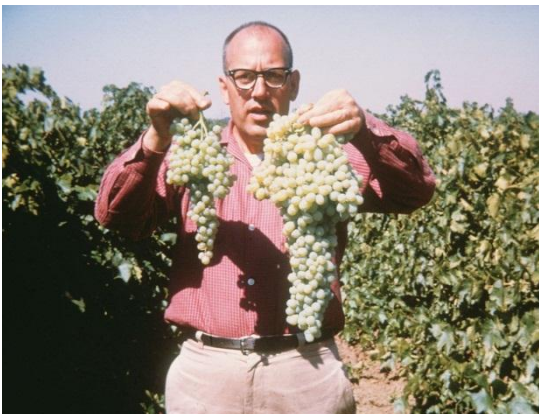
aktive (Berner 2012). Gibberellinene som er biologisk aktive, det vil si er sluttproduktet i syntesen, heter GA_1 , GA_3 , GA_4 , og GA_7 (Yamaguchi 2008) Figur 1.14. Alle de aktive gibberellinene er funnet i mange arter av planter, og omfatter en kaskadereaksjon med flere enzymer involvert før aktivt sluttprodukt.

Gibberellin ble beskrevet for første gang i 1938, da to forskere fant ut at en soppsykdom lenge kjent i risavlinger, ga lange tynne planter med liten avkastning (Wittwer & Bukovac 1958). I risplantene ble det dannet et sekret, og ut av dette sekretet ble gibberellin isolert som den aktive komponenten, oppkalt etter soppen *Gibberella fujikuroi*.



Figur 1.12 Oppdagerne av Gibberellin. Avbildet fra venstre, Dr. T. Yabuta og Y. Sumiki, Universitet i Tokyo. Bilde hentet fra (Wittwer & Bukovac 1958).

Gibberellinsyntese er lokalisert i flere områder av planten, og gir fysiologiske uttrykk man kan modifisere ettersom man forstår mer om dets funksjoner og effekter. Hormonet blir for eksempel brukt til å sprøyte drueplanter for å forlenge stilkene som gir større drueklaser (Berner 2012). GA_3 er mest brukt som veksthormon i kommersiell produksjon fordi den kan fremstilles i store mengder fra soppen *Gibberella fujikuroi*.

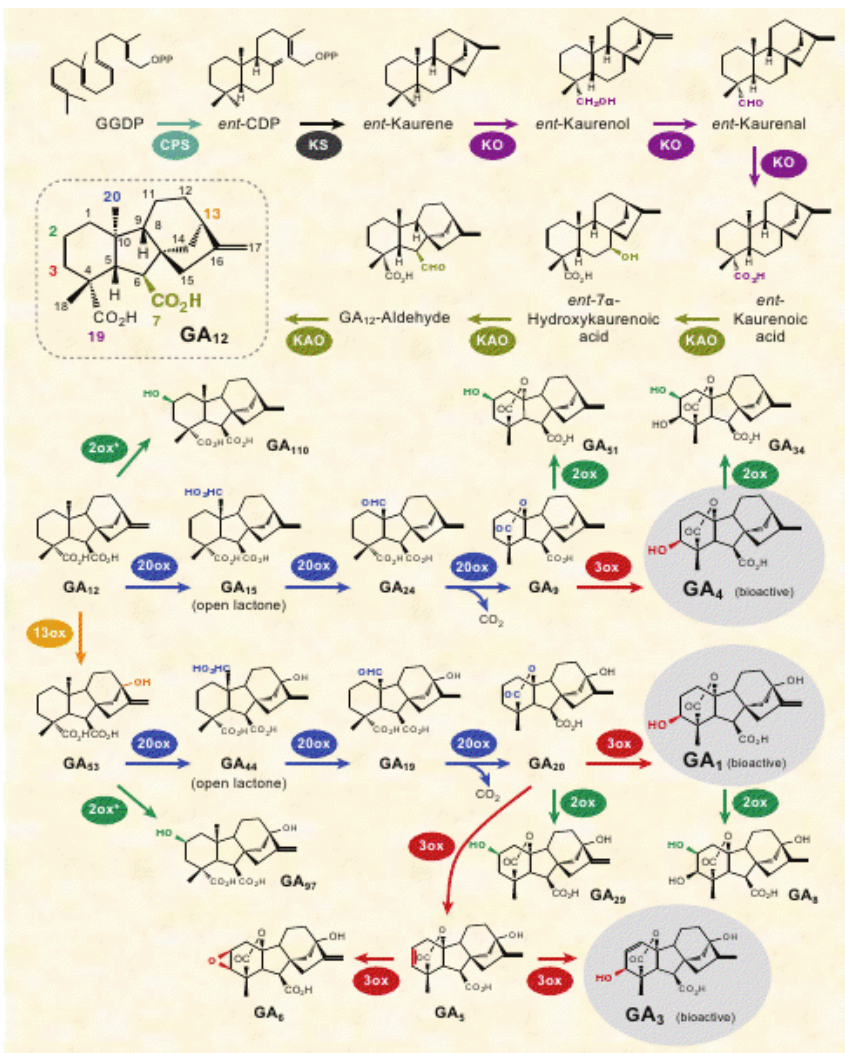


Figur 1.13. Effekten av gibberellin i drueklaser. Bildet viser morfologisk forskjell i drueklaser, der klase til høyre er sprøytet med biologisk aktiv gibberellinsyre (GA_3) og den andre ikke. Bilde hentet fra (Lincoln Taiz & Zeiger 2010).

Hvis ønsket er motsatt effekt, der plantene er kortere og mer kompakte, går teknikken ut på å blokkere et enzym i synteseveien som hindrer dannelse av gibberellin. GA biosyntese og katabolisme har blitt mye studert og er presentert i Figur 1.14. Gibberelliner blir alle syntetisert fra samme utgangspunkt, fra molekylet geranylgeranyldifosfat (GGDP). Fra dette

molekylet til GA_{12} skjer det en rekke kaskadereaksjoner med flere enzym involvert. Fra GA_{12} kan syntesen gå tre retninger og ende opp som GA_4 , GA_1 eller GA_3 . Enzymene som oksiderer molekylet videre til disse aktive formene kalles *GA-20-oksidas* ($GA20ox$) og *GA-3-oksidas* ($GA3ox$). Når planten uttrykker disse enzymene blir veksthormonene aktivert og planten strekker seg og vokser. Planter med lavere uttrykk av bioaktive gibberelliner kan ut i fra Figur 1.14 ha mindre produksjon av enzymene $GA20ox$ og $GA3ox$. Planter som ikke uttrykker aktive GA-hormoner i det hele tatt har en høy produksjon av enzymet *GA-2- oksidas* ($GA2ox$) som deaktiverer syntesen.

I denne oppgaven ble det benyttet plasmid med sekvensen for enzymet $GA2ox$, inaktiveringsenzymet for alle aktive gibberelliner. Uttrykk av enzymet gir et «dvergete» utseende, hvilket innebærer kortere og tettere plante, slik ønsket mål er for julestjerne.



Figur 1.14. Gibberelline (GA) biosyntesevei. Figuren viser en illustrasjon over alle trinnene i syntesen til GA. Merket med grått er aktive sluttprodukter. Fra GA_{12} ser man de ulike retningene til sluttproduktene, der $GA20ox$, $GA3ox$ og $GA2ox$ er reguleringsenzymene merket som blått, rødt og grønt. Figur hentet fra (Yamaguchi 2008).

1.7.3.2. IDA

I planter foregår det bestemte prosesser som gjør at multicellulære planteorganer som blader, blomster og frukt løsner fra resten av planten under kontrollerte betingelser (Butenko et al. 2003). Dette gjelder for eksempel blomster som løsner etter pollinering og befruktning, eller stressresponser fra miljøet som klimaendringer, sykdommer og patogener. Absisjon er en naturlig del av planters livssyklus. Områder hvor organ løsner heter absisjonssone og innebærer at celleveggen blir ødelagt i avgrensede regioner (Lee et al. 2008). Den komplette blomsten i julestjerne kalles Cyathium og består av det mannlige pollenproduserende organet, omkranset rundt det kvinnelige organet med fruktknute og egg kalt pistill (Ecke et al. 2004). Cyathium lager den gule fargen i midten av de røde bladene, som til sammen utgjør det klassiske kjennetegnet for dagens tradisjonelle julestjerne (Figur 1.15). Når julestjernen slipper blomsterorganet forsvinner den gule fargen og verdien som prydblade synker. På grunn av dette er det ønskelig å produsere julestjerner som kan holde blomsten over lengre tid. I julestjerne er absisjonstiden rundt 2-3 uker (Lee et al. 2008).

Det er allerede utført flere forsøk i julestjerne for å studere og forstå prosessen for absisjon, blant annet ved å beskjære blomsten på spesifikke områder for å ødelegge hormonbalansen. I 2002 ble det startet et prosjekt ved Universitet for miljø- og biovitenskap (UMB) med hensikt om å studere absisjon hos julestjerne, for å forstå prosessen bedre. I en doktorgradsavhandling utført i 2006, også ved UMB, ble kontrollert absisjon studert ved hjelp av spesifikk kutting som ga absisjon etter syv dager under vinterforhold i sorten Lilo. Forandringer i morfologi og opp- og nedregulering av genuttrykk ble observert ved å studere blomsten dag for dag i et 24-timers intervall, frem til absisjon (Hvoslef-Eide 2009). Gensekvensene forbundet med knopp- og blomsterfall ble isolert og sekvensert, og resultater fra dette arbeidet har gitt springbrett til videre forskning i samme felt.



Figur 1.15. Tradisjonell rød julestjerne med gul blomst(Cyathium) i midten. Figuren viser to bilder av julestjerne slik den er ønsket av kjøperne. Til venstre; julestjerne med gul blomst, hentet fra (Perry 2012). Til høyre; nærbilde av blomsten med mannlig og kvinnelig formeringsorgan, hentet fra (Smartcode 2012).

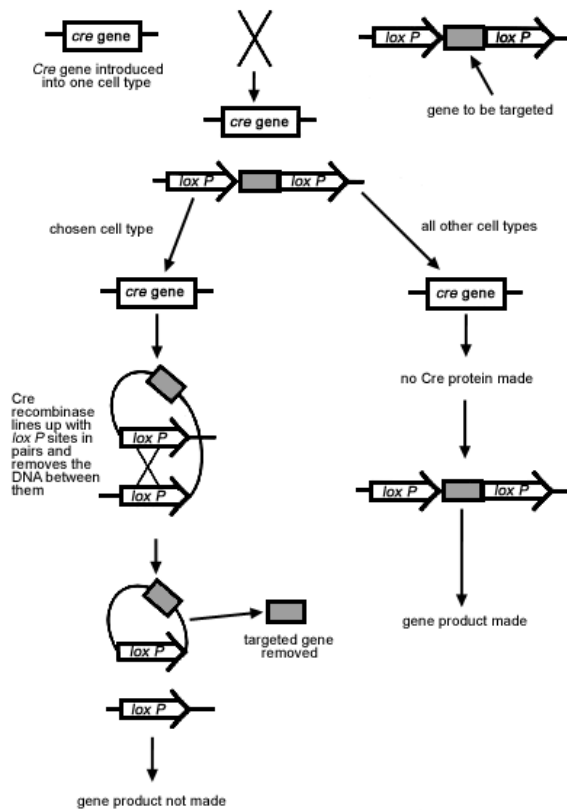
IDA er en forkortelse av engelsk for «Inflorescence Deficient in Abscission», og er ett av tre gen knyttet til absisjon, oppdaget og isolert fra modellplanten *Arabidopsis thaliana* (Butenko et al. 2003; Hvoslef-Eide 2009). Genet uttrykkes spesifikt i absisjonssone i blomstringsområdene, og er involvert i plantens evne til å slippe blomstrende organer ettersom modne frø løsner (Stenvik et al. 2006). Eksperimenter i *A. thaliana* viser at mutantversjoner av genet fungerer som en blokk for syntesen til modningshormonet etylen (Butenko et al. 2003). Det finnes til nå ingen kjente mutanter for absisjon i julestjerne, men det er påvist i erteplanter, og *IDA*' aktige gener finnes i flere plantearter. Med dette som utgangspunkt er det interessant å undersøke effekten av genet i julestjerne, selv om homologe gener til *IDA* enda ikke er avdekket (Hvoslef-Eide 2009). Mutantversjonen for *IDA* i *A. thaliana* gir defekter i absisjonssonen som gjør at blomsterorganer beholdes. I denne oppgaven blir det benyttet et plasmid inneholdende sekvens for RNAi*IDA*- kassett, der ønsket mål er å forsinke absisjon.

1.7.3.3 *Cre/loxP* rekombinasjonssystem - for produksjon av GM planter uten antibiotikaresistens

Cre er et protein som stammer fra bakteriofagen P1 som infiserer *E. coli* (Sauer 1987). Proteinet har en molekylvekt på 38 kiloDalton (kDa) og koder for et setespesifikt enzym som kan fremme rekombinasjon i både *E. coli* og *in vitro* (Sauer & Henderson 1988). Rekombinasjon forekommer når *Cre*-rekombinase gjenkjenner og fester seg til spesifikke seter kalt *loxP*. Når *loxP* har direkte repeterte seter på samme molekyl blir DNA'et mellom setene klippet ut, og de nye endene baseparet. Hele prosessen blir utført av *Cre* alene, og

krever ingen ytterligere proteiner. Setene for *LoxP* er sekvenser på 34 basepar (bp), som består av to omvendt repeterte sekvenser på 13 bp, skilt av en kjernesekvens på 8 bp (Corneille et al. 2001; Sauer 1987). Både *Cre* og *loxP* stammer fra P1 som bruker systemet til sin lysogene livssyklus. Lysogenisk livsstil innebærer formering av seg selv ved å integrere sitt eget DNA inn i bakteriens genom, og der i fra følge naturlig celledeling. Rekombinasjon kan skje inter- og intramolekylært, på lineært eller sirkulært DNA, og avhenger av orienteringen til *loxP* på DNA-molekylet. På grunn av evnen til å fjerne DNA-sekvenser er *Cre-loxP* systemet blitt et nyttig verktøy i genetisk arbeid, der vellykkede genmodifiseringer har blitt gjort i dyreceller (-mus), planter, gjær og bakterier (Kühn & M. Torres 2002). Ved å designe plasmid som inneholder seter for *Cre* og *loxP* gir det muligheten til å kontrollere genuttrykk ved å fjerne uønskede DNA-sekvenser.

I denne oppgaven er det ønskelig å fjerne antibiotikaresistens ved hjelp av *Cre/loxP* systemet, der plasmidene for *Ga2ox1* og *IDA* (Figur 3.1 og 3.2) er utstyrt med seter for *loxP* oppstrøms og nedstrøms for sekvensen som koder for Kanamycinresistens, *nptII*. Alle setene er orientert på plasmidet mellom høyre og venstre grense (RB og LB), regionen som blir integrert i plantens genom. Hvert plasmid i denne oppgaven ble transformert hver for seg i tobakk og julestjerne. For å fjerne antibiotikaresistens må positive transgene linjer krysses med individ som bærer genet for *Cre*, også kalt donoren. Slik det kom frem tidligere i innledningen er både julestjerne og tobakk selvpollinerende individer. For å få til krysning og utveksling av gener må voksne planter med uåpnede blomster bli beskåret på langs, hvorpå det mannlige formeringsorganet blir fjernet (emaskulering). Når dette er gjort blir modent pollen fra donoren overført ved å børste pollenknappene på det kvinnelige formeringsorganet kalt arr (Bayley et al. 1992). Ved å fremdrive en ny generasjon fra denne krysningen kan et nytt individ uten antibiotikaresistens bli skapt på grunn av homolog rekombinasjon (genetisk utveksling) under meiosen. I industrien er julestjerne en vegetativt formert plante, hvilket innebærer at flere tusen planter har samme genetiske uttrykk fordi alle er sådd som stiklinger fra samme moderplante. Ved å fremdrive en ny tett julestjerneplante, med lengre holdbarhet uten antibiotikaresistens, kan dette i fremtiden fungere som en ny moderplante til en ny og bedre produksjon.



Figur 1.16. Prinsippene for *Cre/loxP* rekombinasjon. Illustrasjonen viser hvordan en sekvens som uttrykker proteinet *Cre* blir introdusert til en utvalgt celletype med sete for *loxP* oppstrøms for genet som skal fjernes. DNA tråden blir kuttet og de homologe setene baseparer mens DNA'et mellom blir fjernet (T. B. Mephram et al. 1998).

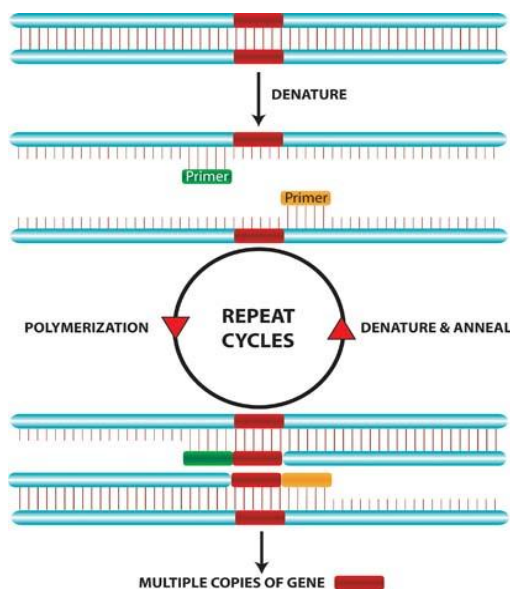
1.8 Molekulære nøkkelmetoder - for effektiv dokumentering av transgene planter

1.8.1 Polymerase Kjede Reaksjon

Polymerase Kjede Reaksjon (PCR av engelsk «Chain») er en metode benyttet til å produsere millioner av kopier av en ønsket DNA sekvens, som et gen eller deler av et gen, ved hjelp av primere. Formålet er å kunne synliggjøre og studere gener for å finne ut mer om deres funksjon, opphav, evolusjonsmønster, etc. og krever i tillegg til primere, templat-DNA, buffer, enkle nukleotider, og polymerase for syntese av DNA-trådene. Teknikken er rask, spesifikk, solid, og er derfor en av de mest anvendte metodene i molekylærbiologi.

I første steg blir dobbeltrådet DNA denaturert ved høy temperatur. Når hydrogenbindingene er brutt blir temperaturen senket slik at primerne søker til sine homologe sekvenser. Primere som er rundt 18-20 nukleotider lange skal etter tilfeldig forventning være en unik størrelse i et komplekst eukaryot genom (M. J. McPherson et al. 1995). Hvis temperaturen er for lav kan primerne feste seg mer uspesifikt, det vil si på regioner som ikke har perfekt homologi. På grunn av faren for uspesifikk binding må temperaturen for sammensmelting testes ut for primerne man ønsker å benytte. Det er vanlig å designe primere med et Guanin-Cytosin (GC) innhold på 40-60 % for å øke smeltetemperaturen. G-C nukleotidene er bundet sammen via

tre hydrogenbindinger og øker spesifisiteten sammenliknet mot adenin og tymin som er bundet sammen via to. Det er alltid to primere i reaksjonen, der den ene fester seg på «kodende tråd» i 3' ende, og den andre fester seg på «ikke-kodende tråd» i 3'ende. Når primerne har festet seg oppstår det en kort sekvens med dobbeltrådet DNA. Enzymet *Taq*-polymerase fester seg til primer-templat komplekset i 3' ende og forlenger DNA tråden ved bruk av frie nukleotider fra mediet. *Taq* polymerase stammer fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus* og er mye brukt i standard PCR siden reaksjonen foregår under høye temperaturer (Chien 1976). Når *Taq*-polymerase er ferdig med å binde nukleotider til enkeltrådet DNA, er mengde DNA doblet sammenliknet med utgangspunktet. Prosessen blir gjentatt i mange sykluser, og gir en eksponentiell vekst som igjen er veldig effektivt og krever svært små mengder DNA som utgangspunkt. Hele prosessen er oppsummert i Figur 1.17.



Figur 1. 17. Skjematisk illustrasjon av DNA ved PCR. Bildet viser en enkel illustrasjon for PCR med denaturering av DNA, oppamplifisering ved hjelp av primere og gjentagende sykluser (G-Biosciences 2012).

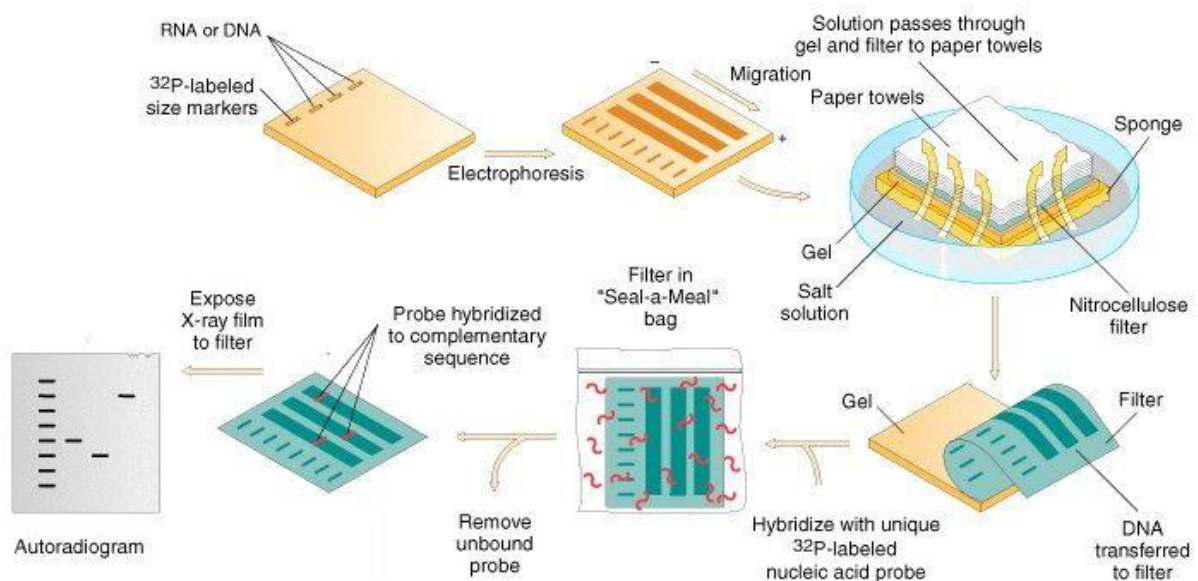
I denne oppgaven ble PCR brukt til å påvise gensekvenser fra isolert DNA behandlet med *A. tumefaciens*.

1.8.2 Southern blot analyse

Southern blot er en teknikk som ble utviklet i 1975 av Edward M. Southern, som gjør det mulig å detektere ett enkelt gen fra en stor kompleks prøve av isolert DNA (Schlickeiser & Pleyer 2007). Metoden blir utført på gDNA isolert fra transgent materiale, som en ekstra bekreftelse etter en positiv PCR analyse. I første del av metoden blir DNA kuttet opp til mindre fragmenter ved hjelp av restriksjonsenzymmer. Når DNA-prøvene er kuttet opp blir de utsatt for en gelelektroforese, hvorpå fragmentene blir dratt mot en positiv pol i en agarosegel

med små porer. Ut i fra størrelsen på DNA-båndene migrerer de ulikt nedover gelen, der de minste båndene vandrer lengst.

Etter elektroforese blir gelen utsatt for saltsyre (HCl) og natriumhydroksid (NaCl) for å fjerne bromfenolblått og separere dobbeltrådet DNA. En nylonmembran blir lagt i klem oppå gelen, og DNA blir dratt oppover av kapillarkrefter, som danner samme mønster på nylonmembranen som på gelen. For å spore opp DNA-sekvensen man søker, blir membranens utsatt for radioaktive prober, som er mange kopier av en enkeltrådet sekvens for genet av interesse. Når probene finner en komplementær sekvens å feste seg til blir det dannet dobbeltråd DNA som kan bli visualisert på egen røntgenfilm. Det er også mulig å gjøre metoden med enzymer som uttrykker farge i stedet for radioaktivitet. I denne oppgaven vil radioaktiv southern blot bli testet på isolert DNA fra plantevev, der ønsket er å detektere gen fra behandling med *A. tumefaciens*.



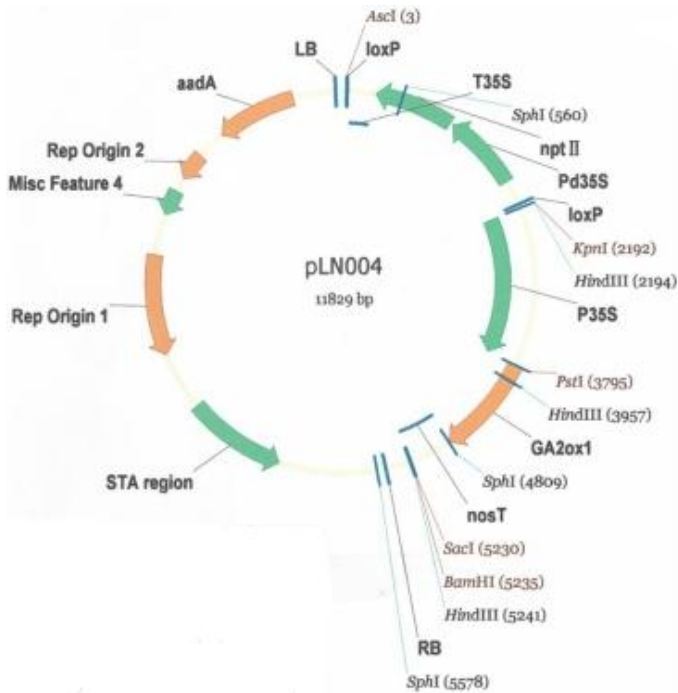
Figur 1. 18. Prinsippene for southern blot analyse med radioaktiv probe. Illustrasjonen viser prosessen for deteksjon av DNA, der prøvene først gjennomgår gelelektroforese og vandrer nedover gelen. Kapillærkrefter suger DNA fra gelen over til nylonmembran som blir utsatt for radioaktive prober. Probene fester seg på komplementære sekvenser og blir synliggjort på røntgenfilm. Prøvene som viser bånd med riktig størrelse bekrefter at genet er tilstede (Griffiths 2000a).

2. Mål med oppgaven

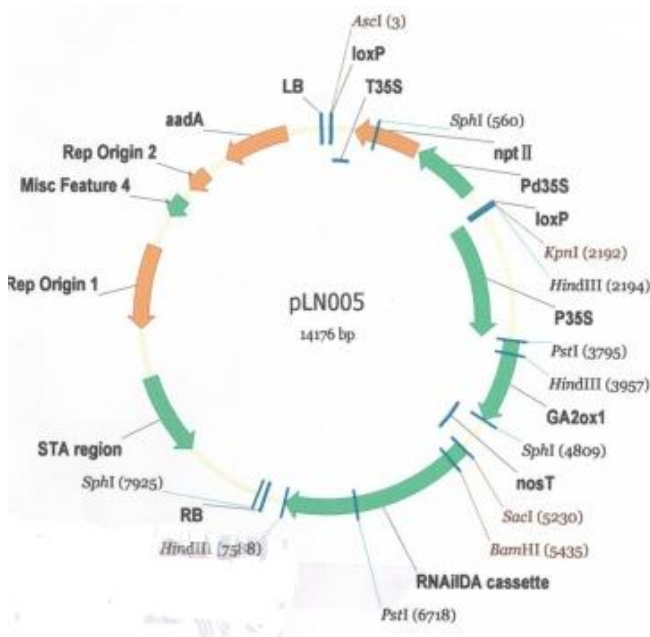
Hensikten med denne oppgaven var i) å tilegne kunnskap om molekulære metoder brukt i plantegenetisk transformasjon ii) å produsere transgene planter av tobakk og julestjerne fri for antibiotikaresistens ved bruk av markørsystemet *Cre/loxP rekombinase* iii) å få erfaring på forskning, selvstendig feilsøking og presentere oppgaven på faglige møter og konferanser.

3. Materialer

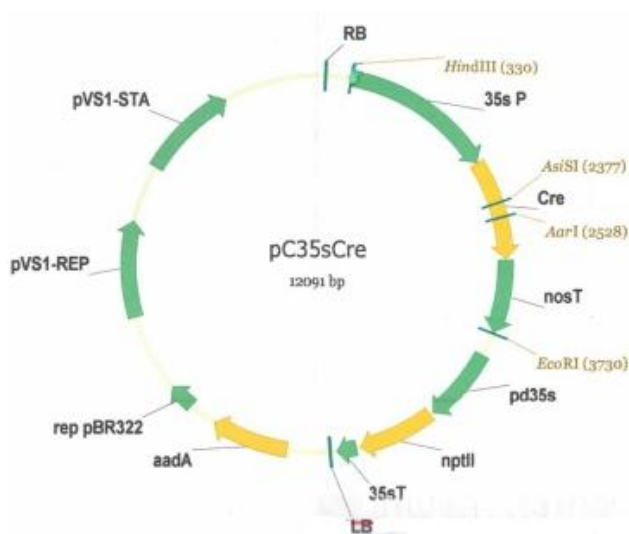
For transformering med *A. Tumefaciens* i julestjerne og tobakk ble det benyttet tre ulike plasmid presentert i Figur 3.1 til 3.3.



Figur 3.1. Plasmid 4. Figuren viser plasmid 4 i vektoren pLN004 med gen for *GA2ox* transkribert av promotor 35S. Regionen som ble overført til plantens genom er avgrenset mellom LB og RB. Videre inneholder plasmidet selektiv markør for Kanamycinresistens (*nptII*) mellom to seter for *LoxP* og flere restriksjonsenzymmer som *HindIII* og *BamHI*.



Figur 3.2. Plasmid 5. Figuren viser plasmid 5 i vektoren pLN005 med gen for *GA2ox* transkribert av promotor 35S i tillegg til RNAiIDA kassett. Regionen som ble overført til plantens genom er avgrenset mellom LB og RB. Plasmidet inneholder selektiv markør for Kanamycinresistens (*nptII*) mellom to seter for *LoxP*, og restriksjonsenzymmer som *BamHI* og *HindIII*.



Figur 3.3. Plasmid 6. Figuren viser plasmid 6 i vektoren pC35sCre med gen for enzymet *Cre* transkribert av promotor 35s P. Regionen som blir overført til plantens genom er avgrenset mellom LB og RB, og plasmidet inneholder selektiv markør for Kanamycinresistens (*nptII*) i tillegg til restriksjonsenzymmer som *EcoRI* og *HindIII*.

3.1. Plantemateriale

Tabell 3.1. Plantemateriale brukt i oppgaven.

Plante	Sort
Julestjerne	'Early Prestige', 'Polar Bear'
Tobakk	'Nicotiana Tabacum'

3.2. Elektrokompetente celler

Tabell 3.2 Elektrokompetente celler for elektroporering. Tabellen viser detaljer om stamme og produsent av elektrokompetente celler brukt i dette forsøket.

Navn	Stamme	Produsent
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Ferdiglaget på Bioforsk Invitrogen, UK
<i>Escherichia coli</i>	JM 109	Ferdiglaget på BioForsk

3.3 Reagenser

Tabell 3.3. Reagenser brukt på lab og deres produsenter. Tabellen lister alfabetisk oversikt over reagenser brukt i forsøket.

Navn	Produsent	By/Stat/Land
100 mM dNTP	Invitrogen	UK
1 kb størrelsesmarkør	New England BioLabs	Ipswich, MA, USA
100 bp størrelsesmarkør	NEB	Ipswich, MA, USA
Agarose(SeaKem® LE)	Sigma -Aldrich	St. Louis, USA
Bakto Gjærekstrakt TM	Becton, Dickinson & Co.	USA, Frankrike
Bromfenol Blå	Merck	Darmstadt, Tyskland
EDTA	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland
Ethidium bromid 0,07 %	VWR	Haasrode, Belgia
Etanol 96 %	Kemetyl Norge AS	Vestby, Norge
Fikseringsløsning G 354 - 0,5 L	AFGA Healthcare	Mortsel, Belgia
Fremkallingsløsning G 153 A – 1 L	AFGA Healthcare	Mortsel, Belgia
Fremkallingsløsning G 153 B – 0, 25 L		
Gelzan TM CM	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Glyserol	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland
Hydrogenklorid (HCl) 37 %	Merck	Darmstadt, Tyskland
Magnesiumklorid (MgCl)	Merck	Darmstadt, Tyskland
Murashige & Skoog medium	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Natriumhydrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid (NaCl)	Merck	Darmstadt, Tyskland
RNase fritt H ₂ O	Applied Biosystems	Foster City, USA
«Reaction Tube»	GE Healthcare	England
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland
Sukrose Krystallisert	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland
Tris-Cl	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland
Trypton	Duchefa Biochemie	Haarlem, Nederland

3.4 Kit, Enzymer og Buffere

Tabell 3.4. Viser oversikt over kit, enzymer og buffere med deres produsenter. Tabellen er tredelt, der første kategori er KIT, etterfulgt av Enzymer og Buffere.

Navn	Hensikt	Produsent, By, Land
Kit		
«DNeasy Plant Mini Kit»	Ekstrahering av genomisk DNA fra plantevev	Qiagen, Hilden, Tyskland
«NucleoSpin®Plasmid»	Isolering av plasmid-DNA fra bakteriekulturer	Macherey- Nagel, Düren, Tyskland
«Nucleic Acid and Protein purification. Nucleospin® Gel and PCR clean- up»	Isolering av DNA fra agarosegel	Macherey- Nagel, Düren, Tyskland
«ProbeQuant G- 50 Micro Columns»	Rense merket probe fra andre nukleotider i southern blot	GE Healthcare, England
«TaqMan ®Fast Universal PCR Master mix (2x), No AmpErase®UNG»	Ferdiglaget mastermiks til PCR for isolert DNA	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Enzymer		
<i>BamHI</i>	Restriksjonsenzym brukt til å kutte genomisk DNA	Alle enzym levert fra NEB, Ipswich, MA, USA
<i>EcoRI</i>	Samme som for <i>BamHI</i>	
<i>HindIII</i>	Samme som for <i>BamHI</i>	
Buffere		
1 x TE buffer	Brukt til elueringsbuffer, agarosegel og gelelektroforese. Løser opp DNA og beskytter mot degradering.	Se Tris-Cl og EDTA, Tabell 3.3.
Ampli Taq ® DNA polymerase 10 x buffer	Buffer brukt i egenblandet mastermiks for PCR	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Buffer 2	Tilhørende buffer til enzymene <i>HindIII</i> og <i>BamHI</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>EcoRI</i> buffer	Tilhørende buffer til <i>EcoRI</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
Prehybridiseringsbuffer	Brukt i southern blot for å blokkere overflaten av nylonmembranen og redusere uspesifikk binding av proben.	Se EDTA og SDS, Tabell 3.3.
Vaskebuffer	Brukt i southern blot for å fjerne prober som er bundet uspesifikt.	Se fosfat og SDS i Tabell 3.3.

3.5 Næringsmedier

Det ble laget flere typer næringsmedier gjennom eksperimentene. Oversikt over hvilke som ble brukt og hvordan de ble laget er gitt i Tabell 3.5.

Tabell 3.5 Oversikt over oppskrifter for ulike medier brukt i forsøket. Tabellen er tredelt, der første kategori er generelt, etterfulgt av spesifikke medier for tobakk og julestjerne.

Medium	Oppskrift – 1 L
Generelle medier	
Luria Bertani agar med antibiotika (Ebel J. & Hahlbrock k.)	10 g Trypton, 5 g gjærekstrakt, og 10 g NaCl ble blandet i 950 ml dH ₂ O. pH ble justert til 7, 5 ved bruk av 1 M NaOH. 15 g Gelzan ble blandet inn i løsningen og sluttvolumet oppjustert til 1 liter. Løsningen ble autoklavert og kjølt ned til ~ 60 °C før tilsetning av 50 µg/ml Kanamycin. Mediet ble fordelt på 9 cm petriskåler og oppbevart ved 4 °C.
LB løsning med antibiotika	Samme fremgangsmåte som LB agar, bortsett fra tilsetning av Gelzan. Ble oppbevart på 500 ml flasker ved 4 °C.
MS II vaskemedium	1 krukke (4,4 g) med Murashige & Skoog og 2 % sukker ble blandet i 1 L dH ₂ O. pH ble justert til 5,7- 5,8 med 1 M NaOH. Mediet ble fordelt i 500 ml flasker og oppbevart ved 4 °C.
Medier Tobakk	
Kallus Induserende Medium (CIM, av engelsk «callus»)	1 krukke med Murashige & Skoog ble blandet i 950 ml dH ₂ O, i tillegg til 2 % sukker. pH ble justert til 5,7- 5,8 med 1 M NaOH. 3,3- 3,4 g agar ble tilført, og sluttvolumet oppjustert til 1 liter. Etter autoklaving og avkjøling (~60 °C) ble det tilført hormonene: 0,1mg/l NAA 1,0 mg/l BAP Mediet ble fordelt på 9 cm petriskåler og oppbevart ved 4 °C.
CIM med antibiotika	Samme som over, i tillegg til 100 mg/ml Kanamycin og 500 mg/ml Cefotaxim. Antibiotika ble tilført etter autoklaving, når mediet hadde temperatur rundt 60 °C.

Rotningsmedie	1 krukke med Murashige & Skoog ble blandet i 1 l dH ₂ O, i tillegg til 3 % sukker. pH ble justert til 5,7- 5,8 med 1 M NaOH. 4 g agar ble tilsatt og medie satt til autoklaving. Etter autoklaving ble løsningen fordelt over i megabokser med lokk og oppbevart ved 4 °C.
---------------	---

Medier Julestjerne (Clarke et al. 2008)

CIM	1 krukke med Murashige & Skoog ble blandet i 950 ml dH ₂ O, i tillegg til 3 %. pH ble justert til 5,7- 5,8 med 1 M NaOH. 3,3- 3,4 g agar ble tilført, og sluttvolumet oppjustert til 1 liter. Etter autoklaving og avkjøling (~60 °C) ble det tilført hormonene: 0,2 mg/l CPA 0,2 mg/l BAP I tillegg til 1,0 mg/l av den kjemiske komponenten Acetosyringone. Mediet ble fordelt på små petriskåler og oppbevart ved 4 °C.
-----	--

CIM med antibiotika

Samme som for CIM nevnt over i tillegg til 400 mg/ml Cefotaxim. Etter autoklaving ble mediet fordelt på 9 cm petriskåler.

Somatisk Embryogenese induserende Medium (SEIM) med antibiotika	1 krukke med Murashige & Skoog ble blandet i 950 ml dH ₂ O, i tillegg til 3 % sukker. pH ble justert til 5,7- 5,8 med 1 M NaOH. 3,3- 3,4 g agar ble tilført, og sluttvolumet oppjustert til 1 liter. Etter autoklaving og avkjøling (~60 °C) ble det tilført hormonene: 0,3 mg/l NAA 0,15 mg/l 2iP I tillegg til antibiotika: 400mg/l Cefotaxim 10 mg/l Kanamycin. Mediet ble fordelt på 9 cm petriskåler og oppbevart ved 4 °C.
---	---

3.6. Primere

Det ble testet for flere primerpar gjennom forsøket, der beste par ut er presentert i Tabell 3.6. Alle primere testet i forsøket er designet i Primer 3 v.0.4.0, bestilt og levert fra Invitrogen.

Tabell 3.6. Oversikt over primerpar med DNA sekvenser brukt i forsøket.

Gen	Navn	Sekvens (5'-3')
<i>GA2ox</i>	GA Framover	TATGGTAGCAAGAGGATTGG
<i>GA2ox</i>	GA Bakover	ATTACCTGTAGAGCGTCACC

3.7 Antibiotika og hormoner

Det ble brukt flere typer antibiotika og hormoner i de forskjellige næringsmediene, alle listet opp i Tabell 3.7. Alle ble løst i sterilt Milli Q vann og sterilfiltrert gjennom et 0,2 µm filter før bruk.

Tabell 3.7. Oversikt over antibiotika og hormoner brukt på lab.

Navn	Hensikt	Produsent
Antibiotika		
Ampicillin	Angriper bakteriens cellevegg	Sigma-Aldrich
Cefotaxim	Angriper bakteriens cellevegg	ACS Dobfar Generics
Kanamycin	Forstyrrer proteinsyntese i bakterier	Sigma-Aldrich
Hormoner		
1 - «Indole -3- acetic acid»	Fremmer celledeling, cellevekst, adventiv knoppdannelse, kallusutvikling og rotdanning.	Sigma-Aldrich
1 - «Naphthaleneacetic acid» (NAA)	Fremmer rotdannelse	Sigma-Aldrich
4 - «Chlorophenoxy acetic acid» (CPA)	Versjon av hormonet Auxin som styrer plantevekst og utvikling.	Sigma-Aldrich
6 – Benzylaminopurine (BAP)	Fremmer celledeling, skuddannelse, aksillær knoppdannelse, forsinket alderdom og transport av hormonet Auxin.	Sigma-Aldrich
6- (gamma, gamma Dimetylallylamino) purin (2iP)	Versjon av hormonet Cytokinin som fremmer adventiv skuddannelse i blad og rot.	Sigma-Aldrich

3.8. Teknisk utstyr

Oversikt over tekniske hjelpemidler brukt i forsøket er presentert med kategori og detaljer i Tabell 3.8.

Tabell 3.8. Oversikt over teknisk utstyr benyttet i forsøket.

Teknikk	Modell, Produsent	By, Stat, Land
Sentrifugering	Biofuge Pico, Kendro	Langensfeld, Tyskland
	Biofuge A, Heraeus Sepatech	Tyskland
	Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG	Hamburg, Tyskland
	Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific	Tyskland
	Galaxy Mini, VWR	Korea
	Gyro – rocker SSLB Stuart, Sigma - Aldrich	St. Louis, USA
	Gyro – rocker SSL3 Stuart, Sigma – Aldrich	St. Louis, USA
Inkubering	DRI-BLOCK DB-2A, Techne	Cambridge, England
	Grant GD 120, Grant Instruments	Cambridge, England
	HB- 1000 Hybridization Oven, UVP Laboratory Products	California, USA
	Infors HT Ecotron	Sveits
	Termaks Cooling Incubator	Bergen, Norge
	Termaks Heating Incubator	Bergen, Norge
PCR	T100™ Thermal Cycler, BioRad	Singapore
	«The Clean Spot- A PCR/UV Work Station», COY	Michigan, USA
Sterilbenk	Hera Safe, Kendro	Tyskland
	Kojair Tech Oy	Vippula, Finland
Elektroporering	Electro Cell Manipulator® 630, BTX Harvard Apparatus	Holliston, USA
Gel visualiserer	Molecular Imager GelDoc XR system, BioRad Laboratories	California, USA
OD måler	Nanodrop2000 Spektrofotometer, Thermo Scientific	USA
	UV-1601 Spektrofotometer, Shimadzu	Columbia, USA
Annet	Magnetplate: RCT basic, IKA Labortechnik	Tyskland
	pH –meter: pH 7110, InoLab WTW	Tyskland
	Vekt: PG5002-S DeltaRange®, Mettler Toledo	Sveits

3.9. Programvare

Tekniske verktøy er presentert med detaljer i Tabell 3.9.

Tabell 3.9. Oversikt over programvarer brukt i oppgaven.

Navn	Produsent
Primer 3 v.0.4.0	Rozen. S, Skaletsky H, Cambridge, USA / URL: http://frodo.wi.mit.edu/
Nanodrop 2000/2000C	Thermo Scientific, Wilmington, DE 19810, USA
Quantity One 4.5.1	Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

4. Metoder

I dette forsøket ble det benyttet tre plasmid som enten inneholdt sete for *Ga2ox*, *IDA* eller restriksjonsenzymet *Cre Lox-rekombinase*. For å få en høyere konsentrasjon av hvert plasmid ble de først dyrket opp i kompetente celler av *E.coli* JM109 og deretter isolert ut av bakteriekoloniene. Etter isolering fra *E.coli* ble plasmid-DNA elektroporert inn i kompetente celler av *A. tumefaciens* LBA4404. Fra koloniene ble det laget agrosuspensjoner til å infisere bladvev av tobakk og julestjerne. For tobakk ble det brukt planter av arten '*N. tabacum*' som var dyrket *in vitro*, og for julestjerne ble det benyttet planter av sortene 'Early Prestige' og 'Polar Bear' dyrket i veksthus.

4.1 Forberedende molekylære teknikker

Det ble utført flere forberedende metoder for plasmid-DNA før transformering med *A. tumefaciens* i plantevev, blant annet transformering i *E.coli* med kulturer over natten, beregning av DNA-konsentrasjoner, elektroporering av plasmid-DNA i *A. tumefaciens* og oppdyrking av bakteriekolonier.

4.1.1 Plasmidkonstruksjoner og eluering av plasmid fra filterpapir



Plasmidene pLN004, pLN005 og pC35sCre ble eluert ut av papiret i 20 - 30 μ l 1 x TE buffer og undersøkt spektrofotometrisk ved hjelp av programvaren Nanodrop2000 (Thermo Scientific) for renhet og konsentrasjon.

I tillegg ble 1 μ l plasmid-DNA kjørt på 1 % Agarose gel (Tabell 4.4) i 40 minutter ved 80 Volt. 1Kilobase (Kb) stige ble brukt som størrelsesmarkør (Figur 4.4).

Figur4. 1. Genkonstrukt på filterpapir. Fotografi av tilsendt plasmid Pln004 på filterpapir.

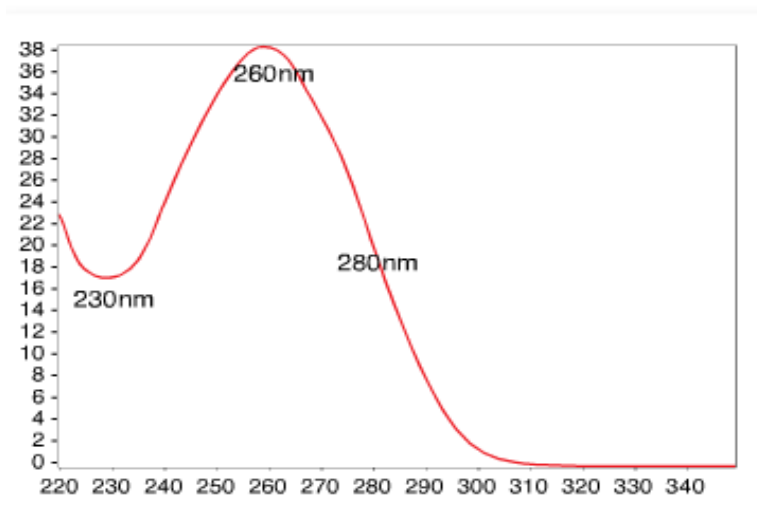
4.1.2 Kvantifisering av DNA

Nanodrop2000 fra Thermo Scientific er et spektrofotometer som kan måle konsentrasjon og renhet av DNA, RNA og proteinprøver. Måloområdet strekker seg over bølglengdene 190-840 nanometer (Deblock et al.) og trenger bare 0,5 µl prøve. Metoden er enkel, sparsommelig for prøvemateriale og måler i tillegg mellom 50 til 200 ganger mer konsentrert enn vanlig kyvettemåling (1 cm). Slik det er vist i Figur 4.2 ble dråpen med prøvemateriale pipettert på instrumentet og målt mellom to optiske fibre som holdt væsken på plass ved hjelp av overflatespenning. Et lys (xenon) ble ført gjennom søylen (10 mm) og ned i et internt spektrofotometer.



Figur 4.2 Spektrofotometrisk undersøkelse med Nanodrop2000. A) påføring av prøve B) prøven blir dratt som en søyle mens lys absorberes loddrett ned i spektrofotometeret C) prøven klemmes ned og er ferdigmålt, til sammen 5 sekunder. Bildene er hentet fra Thermo Scientific, NanoDrop2000.

Siden nukleinsyrer har en maksimum absorptans på 260 nm ble instrumentet først kalibrert med en blank som tilsvarte væsken prøven ble eluert i. Ved hjelp av programvare på datamaskinen kunne renhet og konsentrasjon i prøven vurderes ut i fra oppgitt konsentrasjon (µg/ml) og graf demonstrert i Figur 4.3



Figur 4.3 Programvare for Nanodrop2000. Eksempel på optimal måling av nukleinsyre ved 260nm der x-aksen viser bølglengde i nanometer og y-aksen absorptans ved 10 mm, hentet fra («Thermo Scientific, Nucleic Acid Booklet», 11/2010)

4.1.3 Transformasjon av *E.coli* og oppformering

Kompetente celler av *E. coli* JM 109 er en mye brukt stamme for å oppformere plasmid-DNA til høye konsentrasjoner. I dette forsøket ble metoden brukt til å oppformere plasmid pLN004, pLN005 og pC35sCre, videre omtalt som plasmid 4, 5 og 6. Det ble laget to rør per genkonstrukt, der 20 µl kompetente celler ble blandet med 2 eller 4 µl plasmid-DNA. Rørene ble plassert på is i 30 minutter, og deretter i vannbad i 45 sekunder ved 42 °C. Etter varmesjokket ble de satt på is i to minutter og deretter tilsatt 400 µl flytende næring i form av Luria Bertani medium (Tabell 3.5) før de ble satt til risting (Infors HT Ecton) i minimum en time ved 37 °C. Etter ristebehandlingen ble 200 µl av bakteriesuspensjon fordelt på 9 cm petriskåler og spredt utover LB agar med 50 µg/ml Kanamycin for seleksjon av transformerte bakterier. For å fremme kolonivekst ble petriskålene satt til inkubering (Termaks) i ett døgn ved 37 °C.

4.1.4 Isolering av plasmid-DNA

For denne isoleringsmetoden ble det brukt et kit kalt «Plasmid DNA Purification» Rev.07 (Macherey–Nagel). Bakteriekulturer av *E.coli* JM109 ble behandlet via metode 5.2 fra s. 16 i heftet kalt «Support protocol for NucleoSpin®Plasmid/Plasmid (NoLid): Isolation of low copy plasmids, P1 constructs, or cosmids»

Forberedelser av bakterier

Før isolering av plasmid-DNA ble det laget minikulturer med antibiotikaseleksjon fra kolonier på petriskåler. For plasmid 4, 5 og 6 bestod hver minikultur av 5 ml LB og 50 µg/ml Kanamycin siden alle hadde sete for *nptII* som gir Kanamycinresistens.

Rørene ble satt til risting, 180 rpm, i ett døgn ved 37 °C. Etter ett døgn ble minikulturene overført til 2 ml rør og spunnet ned til en pellet ved å sentrifugere i 30 sekunder på 11 000 rpm (Biofuge A, Heraeus Sepatech). Etter sentrifugering ble supernatanten kastet og prosedyren gjentatt for resterende pellet med væske i røret.

Lysering

For å løse opp cellene ble ulike buffere brukt. Det ble tilsatt 500 µl resuspensjonsbuffer A1, som løste opp pelleten ved bruk av vortexmaskin (Gyro- rocker SSLB, Sigma-Aldrich). Etter

oppløsning av pelleten ble 500 µl lyseringsbuffer A2 blandet sammen ved å vende røret opp og ned flere ganger.

Løsningen ble satt til inkubering i fem minutter ved romtemperatur før tilsetning av 600 µl nøytraliseringsbuffer A3, og ny sentrifugering i 10 minutter på 11 000 rpm.

Binde DNA

Supernatanten, 750 µl, ble gjennom to repetisjoner overført til en kolonne med silikonmembran plassert i et samlerør, og sentrifugert i ett minutt på 11 000 rpm. Væsken som passerte kolonnen og ned til samlerøret ble kastet.

Vask av membran

Vaskebuffer AW forvarmet til 50 °C ble tilført (500µl) for å skylle bort uønskede komponenter fra membranen. Røret ble sentrifugert i ett minutt på 11 000 rpm, og væsken i samlerøret kastet. Etter dette ble 600 µl vaskebuffer A4 (løst i etanol i forkant) tilsatt, og det hele sentrifugert på nytt. Overflødig væske i samlerøret ble igjen kastet.

Tørking av membranen

Kolonnen ble sentrifugert i to minutter på 11 000 rpm, og samlerøret deretter kastet.

Eluering av DNA

Kolonnen ble plassert i nytt 1,5 ml eppendorfrør og tilført 30µl 1 x TE buffer.

For å få DNA'et ned i eppendorfrøret ble det slutt sentrifugert i ett minutt på 11 000 rpm.

Konsentrasjonen og renheten til DNA'et ble undersøkt spektrofotometrisk via programvaren Nanodrop2000, der 1x TE buffer ble brukt som blank. DNA ble oppbevart ved -20 °C til senere bruk.

4.1.5 Transformasjon med kompetente celler av *A. tumefaciens* ved elektroporering

Elektroporering innebærer at fremmed DNA introduseres til cellens genom ved hjelp av en elektrisk spenning som skaper midlertidige porer i celleveggen og plasmamembranen. Når dette skjer tar cellen til seg plasmid-DNA som finnes i suspensjonen.

Før elektroporering ble genkonstruktene løst i saltholdig 1 x TE buffer rensset ut i dH₂O, siden saltholdige løsninger er med på å forstyrre den elektriske spenningen, og igjen svekker effektiviteten til metoden. Når prøvene var rensset ut i dH₂O ble de videre fortynnet til en konsentrasjon mellom 20- 100 ng/ml for optimal spenning mellom elektrodene i apparatet.

Plasmid-DNA, 2 µl, ble blandet i rør med 20 µl kompetente celler av *A. tumefaciens* LBA4404 på is. Fra røret med blandingen ble 21 µl overført til en nedkjølt glasskvyette (1ml) og utsatt for elektrosjokk etter verdiene: 2000 Volt, 200 Ω Resistans, 25 µF Kondensator (Electro cell manipulator® 630 BTX). Etter elektrosjokket ble 1000 µl flytende LB tilsatt øyeblikkelig, og suspensjonen satt til resting i to timer ved 28 °C. Etter to timer ble 200 µl av kulturene overført på petriskåler med LB agar og 50 µg/ml Kanamycin for seleksjon. Løsningene ble spredt utover agaren ved hjelp av en steril glasstav og satt til inkubering ved 28 °C i tre døgn.

På grunn av varierende resultater ble samme prosess gjentatt senere, der halvparten av prøvene ble oppformert i SOC medie (av engelsk; «Super Optimal Broth with Catabolite repression») i stedet for flytende LB. SOC inneholder i tillegg til ingrediensene i LB medium, mer næring i form av salter og sukker med kaliumklorid (2, 5mM), magnesiumklorid (10 mM) og glukose (20mM). Som positiv kontroll fulgte det med et kontrollrør fra Invitrogen som ble elektroporert inn i cellene på samme måte som for eget plasmid-DNA, og som negativ kontroll ble det dyrket bakteriesuspensjon på plater uten antibiotikaseleksjon.

Bakteriekulturene ble satt til oppdyrking ved 30 °C i ca. to timer før dem ble fordelt utover de 16 platene. Videre ble cellene satt i tre døgn ved 30 °C i stedet for 28 °C etter instruks fra protokollen som fulgte med.

4.1.6 Primerdesign

For å undersøke om behandlede bakterieceller inneholdt ønsket plasmid-DNA ble PCR primere laget for å identifisere positive kolonier. Primer3 Input versjon 0.4.0 ble brukt til å spesialdesignere primere for *Ga2ox*.

Primere har som hensikt å oppkopiere en ønsket gensekvens ved å inneholde nukleotidesequenser komplementære til gensekvensen av interesse. Primerne ble designet via nettsidens oppsett, med rundt 20 bp i lengde, komplementære til start/stopp sekvensen for *GA2ox*. Videre hadde de en GC nukleotidekonsentrasjon mellom 20 til 80 %, og en smeltetemperatur mellom 54- 58 °C. Optimal temperatur ble siden beregnet ved å summere de to gitte T_m- verdiene (av engelsk «Temperature Melting») for så å dele med 2.

Primerparet programvaren foreslo høyest på listen ble ansett som beste forslag og valgt videre til bestilling. Primere brukt i denne oppgaven ble levert av Invitrogen. Etter ankomst ble de fortynnet til 20 µM og testet på isolert plasmid-DNA i tillegg til en gradient-PCR for å se hvilken temperatur som fungerte optimalt. Alle primere ble lagret ved – 20 °C for videre oppbevaring.

4.1.7 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

For PCR ble det brukt to ulike oppsett gjennom forsøket. I starten ble Mastermiks blandet manuelt på lab, men på grunn av varierende resultat ble også HotStart mastermiks (Qiagen) benyttet.

Tabell 4.1 Oppsett for oppskrift på mastermiks, 25 µl PCR reaksjon.

Reaksjonsblanding	1 x
10 x buffer	2,5
dNTP (2,5 mM)	2,5
Taq Polymerase (0,5 U)	1
10 x BSA	2,5
GA Framlengs (20µM)	0,5
GA Baklengs (20µM)	0,5
Milli Q vann	13
DNA*	2
Totalt	25

*Som positiv kontroll ble det brukt 1 µl plasmid-DNA isolert fra *E.coli*. Som negativ kontroll ble det brukt villtype-DNA og MilliQ vann.

I de tilfeller det ble brukt HotStart mastermiks ble prosedyren fulgt etter oppsett i Tabell 4.2

Tabell 4.2 Oppsett for 20 µl PCR reaksjon med HotStart mastermiks. Tabellen viser konsentrasjon og mengde av ulike komponenter til PCR, der kolonne 2 tilsvarer volum i µl.

Reaksjonsblanding	1x
2 x Mastermiks	10
GA Framlengs (20 µM)	0,4
GA Baklengs (20 µM)	0,4
Milli Q Vann	7,2
DNA	2*
Totalt	20

* Ved positiv kontroll ble det benyttet 1 µl plasmid-DNA isolert fra *E.coli*. Som negativ kontroll ble det brukt villtype-DNA og MilliQ vann.

Etter at prøvene var ferdigblandet ble de satt i PCR maskin (T100™ Thermal Cycler) og kjørt på program i Tabell 4.3.

Tabell 4.3. Standard oppsett for PCR program.

Steg	Temperatur °C	Tid (min: sek)
Innledende denaturering	94	15: 00
Denaturering	94	0: 30
Sammensmelting	55*	0: 45
Forlengelse	72	1: 00
Avsluttende forlengelse	72	7: 00
Avkjøling	4	∞

* Smeltemperatur og antall sykluser kunne variere ved de ulike testene.

Alle geler ble kjørt på 1 % agarose gel etter oppskrift i Tabell 4.4

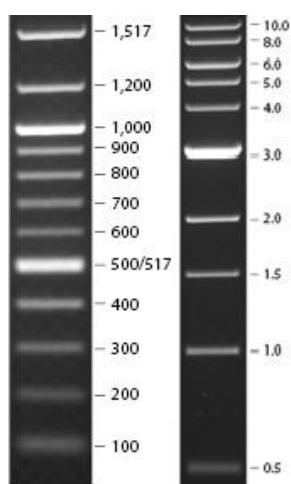
Tabell 4.4 Oppskrift på 1 % agarosegel.

Agarosegel
1 x TBE buffer
1 % Agarose
0,6 µg/ml Ethyliumbromid

Ut i fra antall prøver ble det laget mellom 50 - 300 ml gel med 1 x TBE buffer og 1 % agarose.

Gelen ble varmet i mikrobølgeovn til agarosepulveret smeltet og blandet seg med bufferløsningen. Etter oppvarming ble gelen avkjølt til ca. 60 °C før det ble tilsatt én dråpe ethyliumbromid pr. 50 ml volum. Løsningen ble helt over i et teipet kar med kammer for å lage brønner, og deretter satt til avkjøling i ca. 20-30 min. Etter avkjøling ble kammene fjernet og gelen plassert over i kar fylt med 1 x TBE buffer. Da gelen var plassert i karet ble prøvene lastet i brønnene med 6 x tyngdebuffer. Gelen ble kjørt mellom 40 - 90 minutter, og med en spenning på 80 - 110 volt ut i fra størrelse på gelen og fragmenter i prøvene.

For hver gel ble det benyttet størrelsesmarkører på enten 100 eller 1000 bp for å identifisere størrelse på DNA-båndene.



Figur 4.4. 100 basepar og 1 kilobase størrelsesmarkører. Til venstre 100 bp, til høyre 1 kb, brukt som markør til å bestemme størrelse på DNA bånd på agarosegel. Begge bilder er hentet fra New England BioLabs inc.

For å visualisere DNA-bånd ble gelen plassert i en GelDoc maskin (Molecular Imager GelDoc XR system) der den ble utsatt for UV-lys og presentert på dataskjerm ved hjelp av programvaren QuantityOne.

4.1.8 PCR av bakteriekolonier og enzymkutting

For å undersøke om koloniene inneholdt plasmidene av interesse etter elektroporering med *A. tumefaciens* ble det testet to metoder.

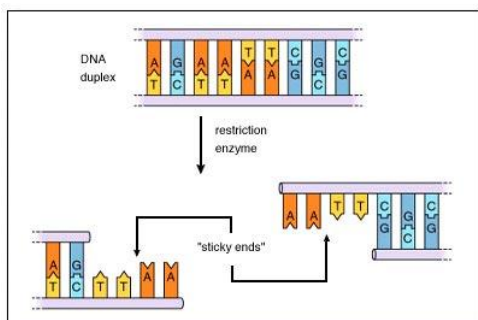
PCR av bakteriekolonier

En pipette ble dyppet i utvalgte kolonier og blandet i 15µl 1 x TE buffer, før de ble plassert på vannbad ved 95 °C i seks minutter. Etter dette ble rørene sentrifugert på maks hastighet i ca. tre minutter før 13 µl av supernatanten ble overført til nytt 1,5 ml eppendorfrør. 2 µl av supernatanten ble blandet etter oppsett for 25 µl PCR reaksjon gitt i Tabell 4.1, og utsatt for

PCR programmet i Tabell 4.3 PCR produkt ble kjørt på 1 % agarosegel i ca. 50 minutter ved 110 volt, der 100 bp stige ble brukt som størrelsesmarkør.

Enzymkutting

Hvert plasmid inneholdt restriksjonsenzymseter som var brukt for ligering av transgener for å kunne bli kuttet opp i ett eller flere fragmenter.



Figur 4.5 Kutting av DNA med restriksjonsenzym.

Bildet demonstrerer hvordan restriksjonsenzymet gjenkjenner spesifikke DNA-sekvenser og kutter DNA-tråden. Resultatet blir enkeltrådede ender som på engelsk kalles «Sticky ends». Hentet fra The McGraw-Hill Companies, inc.

Ved å behandle isolert plasmid-DNA fra *A. tumefaciens* med respektive kutteenzymer kunne fragmentstørrelse bli vurdert på gel uten bruk av primere eller andre kjemikalier.

Figur 3.1 - 3.3 viser at alle plasmid inneholdt sete for *HindIII*, i tillegg viser Figur 3.3 sete for *EcoRI*. Både *HindIII* og *EcoRI* med deres respektive buffer ble brukt videre, alle levert fra New England BioLabs. Det ble laget en 25 µl reaksjon med blandingsforhold av DNA, enzym og buffer presentert i Tabell 4.5.

Tabell 4.5. Oppskrift for enzymkutting.

Oversikt over konsentrasjoner og mengder for enzymkutting.

Komponent	Mengde (µl)
<i>EcoRI</i> (5U)	1
<i>HindIII</i> (5U)	1
Buffer 2/Buffer <i>EcoRI</i>	2,5
DNA	2
dH ₂ O	18,5
Totalt	25

Rørene ble satt til inkubering i fire timer ved 37 °C (DRI – BLOCK DB • 2A, Techne). Etter varmebehandlingen ble 10 µl enzymprodukt blandet med 2 µl tyngdebuffer og satt på 1 % agarosegel i 1,5 - 2 timer ved 80 Volt. For å ha noe å sammenlikne med ble det i tillegg laget kontroll av ubehandlet DNA, der 2 µl plasmid-DNA ble blandet med 3 µl Milli Q vann og 1 µl tyngdebuffer.

For å beregne størrelsen på DNA ble det benyttet 1 Kb stige. Gelen ble dokumentert i programvaren QuantityOne ved hjelp av GelDoc.

4.2 Stabil transformering med *A. tumefaciens*

Etter forberedende metoder i Kapittel 4.1 ble hoveddelen av oppgaven utført, der *A. tumefaciens* ble brukt til å introdusere plasmid-DNA inn i plantens genom. Arbeidet ble gjort parallelt i planter av tobakk og julestjerne, med noen få variasjoner i utførelsen.



Figur 4.6. Celler av *A. tumefaciens* festet på veggen til en plantecelle. Bildet hentet fra (Redorbit 2013).

4.2.1 Generelle steg for transformering med *A. tumefaciens*

Forberedelse av Bakterier

Kolonier av *A. tumefaciens* ble oppformert i bakteriekulturer etter følgende steg:

Første Minikultur

En steril pipettespiss ble dyppet i en koloni og lagt i glassrør med 5 ml LB og 50 µg/ml Kanamycin. Rørene ble satt til risting, 180 rpm, ved 28 °C i ca. 24 timer. For hver transformeringsrunde ble det laget to rør.

Andre Minikultur

Fra første minikultur ble 50 µl bakteriesuspensjon overført til nytt rør med 5 ml LB og 50 µg/ml Kanamycin. Rørene ble igjen satt til risting og inkubering som for første minikultur.

Første gang metoden ble gjennomført ble det i tillegg laget stammer i glyserol for langstidsoppbevaring av kulturene; 850 µl agrosuspensjon ble blandet med 150 µl glyserol (96 %) og oppbevart ved - 80 °C.

Maksikultur

Fra andre minikultur ble 50 µl agrosuspensjon overført til kolbe med 100 ml LB og 50 µg/ml Kanamycin. Kolben ble satt til risting, 150 rpm, ved 28 °C i 12-20 timer. For å undersøke om bakteriene var i den rette livsfasen for transformering ble det målt OD (av engelsk «Odensity»; Tetthet) for 1 ml av maksikulturen (UV-1601 Spektrofotometer, Shimadzu). Flytende LB ble brukt som blank for å nullstille spektrofotometeret. En absorbans mellom 0,6-1 tilsvarte rette bakteriefase og ble benyttet i denne metoden.

Andre forberedelser

Skiver av plantemateriale ble kuttet og plassert på petriskåler inneholdende filterpapir bløtlagt i MS-2 vaskemedium (Tabell 3.5) For å få gjennomført en best mulig transformering ble bakteriene forberedt parallelt med kutting av plantematerialet, for å unngå uttørking og andre faktorer som kunne gi en negativ innvirkning.

100 ml maksikultur (x 2) ble fordelt jevnt på fire 50 ml tuber og sentrifugert i ni minutter (Centrifuge 5810 R eppendorf, AG) ved 18 °C og 2 850 rpm. Supernatanten ble kastet og pelleten løst i MS-2 vaskebuffer. Tubene ble sentrifugert i fem nye minutter ved 18 °C og 2 850 rpm. Etter andre sentrifugering ble supernatanten kastet og pelleten løst i MS-2 vaskebuffer.

Transformering

Plantematerialet som var infisert i agrosuspensjon blandet med MS-2 vaskemedium ble overført på petriskåler med CIM uten seleksjon. Skålene ble pakket inn i sølvfolie for å gi *A. tumefaciens* tid til å infisere sårvevet i «naturlige» mørke omgivelser. For hver transformering ble det laget to kontrollskåler. Disse ble ikke utsatt for MS-2 med agrosuspensjon, men direkte overført fra kutting til skåler med CIM.

Etter mørkebehandlingen ble plantene overført til CIM med seleksjon og satt i lys. Temperaturen holdt kontinuerlig 23 °C. Skålene ble byttet jevnlig helt til plantene ble store nok til å settes på rotningsmediet, og til slutt pottet i jord. Fra plantene ble det høstet plantevev til PCR screening for å undersøke andelen positive transformanter som resultat av behandlingen.

4.2.2 Transformering i tobakk

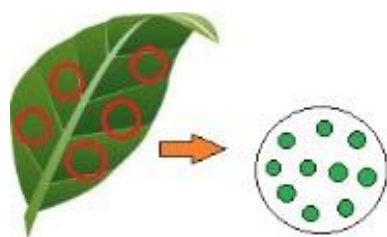
Mini- og maksikultur av agrosuspensjon ble laget etter oppskriften i Kapittel 4.2.1

Siden tobakksplantene var dyrket *in vitro* trengte de ingen behandling for desinfeksjon sammenliknet med julestjerne dyrket i veksthus.



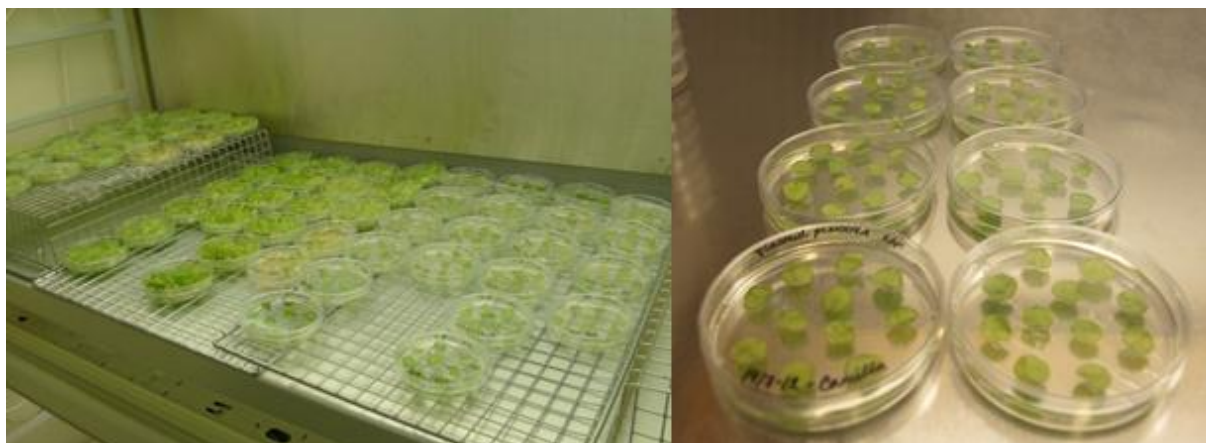
Figur 4.7. Transformering med *A. tumefaciens* i tobakk. Bildene viser dyrking av transgen tobakk i veksthus.

Skiver av bladvev (1 x 1 cm) ble kuttet direkte ut av bladet ved hjelp av korkbor, og plassert på petriskåler inneholdende filterpapir bløtlagt i MS-2 vaskemedium. Det ble laget ca. 10 skiver x 10 skåler, til sammen 100 planter per plasmid.



Figur 4.8. Forberedelse av plantemateriale til transformering. Illustrasjonen viser hvordan plantematerialet ble skåret ut med korkbor og fordelt på 9 cm petriskåler.

Etter sentrifugering av maksikulturen ble pelleten løst i 20 ml MS-2. Etter andre sentrifugering ble pelleten løst i 10 ml MS-2. Bladskivene ble infisert med 20 ml MS-2 med agrosuspensjon i 60 sekunder, og deretter ble de overført til 9 cm petriskåler med CIM uten antibiotikaseleksjon. Etter to døgn i mørket ble skålene overført til lys, $70\mu E m^{-2} s^{-1}$. Vevsbitene ble flyttet hver 10 dag i ca. tre uker, før de ble overført til rottingsmedium. Etter ca. tre uker ble det høstet plantemateriale til screening for å undersøke andelen positive transformanter som resultat av behandlingen.



Figur 4.9 Transformert tobakk. Bildene viser transformert tobakk på petriskåler med kallas-induserende næringsmedie med seleksjon ved 23 °C og lysstyrke $70\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.2.3 Transformering i julestjerne

Til transformeringen ble det benyttet sortene ‘Polar Bear’ og ‘Early Prestige’ sådd i veksthus mellom mars og mai 2012. Mini- og maksikultur av agrosuspensjonen ble laget etter oppskrift i Kapittel 4.2.1



Figur 4.10 Transformering med *A. tumefaciens* i julestjerne. Fra venstre: planter til transformering, sorten ‘Polar Bear’ og ‘Early Prestige’

Forberedelse av plantemateriale

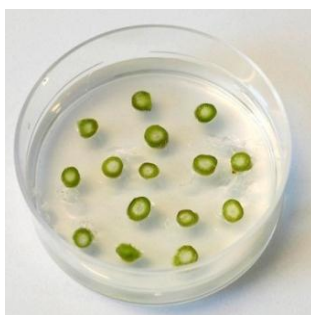
For hver transformering ble det høstet mellom 50 og 60 stiklinger. For å hindre forurensing av andre mikrobielle livsformer enn *A. tumefaciens* ble stiklingene desinfisert etter følgende steg;

1 minutt i 70 % etanol
5 minutter i 1 % Natriumkloritt (NaOCl)
3, 10 og 20 minutter i dH₂O

Etter desinfiseringen ble stiklingene kuttet i skiver på ca. 1- 1,5 mm fra toppen og ned for å bruke de mest optimale cellene i plantevevet.

Forberedelse av bakterier

Etter sentrifugering av maksikulturen ble pelleten løst i 20 ml MS-2. Etter andre sentrifugering ble pelleten løst i 8 ml MS-2 2 i tillegg til 8µl Acetosyringone (100µg/ml) for å øke transformeringseffektiviteten. Skiver av julestjerne ble infisert i 16 ml MS-2 med agrosuspensjon i 10 minutter, før de ble overført til små petriskåler med CIM uten antibiotikaseleksjon.



Figur 4.11. Skiver av julestjerne på CIM uten antibiotikaseleksjon. Bildet viser hvordan skivene infisert i agrosuspensjon ble fordelt på små petriskåler til mørkebehandling.

Etter 3 døgn i mørket ble skivene overført til CIM med seleksjon til lysstyrke $23\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Etter 10-14 dager på CIM med seleksjon ble plantene overført til Somatisk Embryo induksjonsmedie (SEIM) og satt på lysstyrke $28\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Etter overføring til SEIM ble platene skiftet hver tredje uke resten av oppholdet på lab.

4.3 Molekylære analyser

Etter transformering med *A. tumefaciens* i tobakk ble det utført videre analyser for å undersøke hvilke planter som var blitt transgene av behandlingen.

4.3.1 Isolering og screening av DNA fra plantevev

Isolering av DNA fra plantevev

Genomisk DNA ble isolert fra plantevev ved bruk av kit'et «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen). Plantevev fra transformert tobakk ble behandlet ved hjelp av protokollen DNeasy Plant Maxi Kit Handbook 08/2000 fra s. 15 til 17.

Forberedelse av plantemateriale

Ved hjelp av morter ble plantematerialet knust i flytende nitrogen (N_2), til det ble et fint pudderliknende pulver. For å unngå smelting av vev og degradering av DNA ble ca. 20 mg pulver øyeblikkelig overført til eppendorfrør på fryseblokk.

Lysering

For å åpne cellene og fordøye RNA ble 400 μ l buffer AP1 og 4 μ l (100 mg/ml) RNase stamløsning tilført i røret med knust plantemateriale. Etter vortexing ble rørene satt til inkubering ved 65 °C i 10 minutter, og snudd opp ned 2-3 ganger underveis.

Utfelling

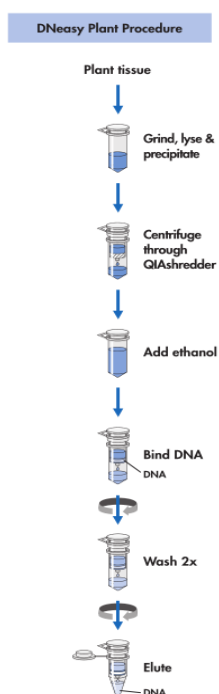
Rørene ble satt på maks sentrifugering i fem minutter for å skille ut andre komponenter som proteiner og polysakkarider. Supernatanten ble overført til kolonnerør med membran og sentrifugert i to minutter ved maks hastighet. Fra væsken som gikk gjennom kolonnen ble 450 μ l overført til nytt eppendorfrør og tilsatt 675 μ l av buffer AP3/E. Av blandingen ble 650 μ l igjen overført til ny kolonne og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Væske som havnet i oppsamlingsrøret ble kastet, og ny runde med resterende væske ble gjentatt.

Etter andre sentrifugering ble kolonnen overført til nytt oppsamlingsrør og tilsatt 500 μ l baskebuffer AW med påfølgende sentrifugering i ett minutt ved 8000 rpm. Væske som passerte kolonnen og ned i oppsamlingsrøret ble kastet.

Eluering

For å fjerne overflødig etanol ble 500 μ l AW buffer tilsatt og prøvene sentrifugert i to minutter ved maks hastighet. Oppsamlingsrøret ble kastet og kolonnen overført til nytt 1,5 ml eppendorfrør. Til forskjell fra protokollen ble det pipettert 30 μ l AE buffer direkte på membranen for å få mer konsentrert prøve. Røret ble satt til inkubering ved romtemperatur i ca. fem minutter før det ble sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm for å få all væske fra membranen og ned i røret.

For å undersøke om isoleringsmetoden var vellykket ble det utført en gelelektroforese. Det ble støpt en 1 % agarosegel, der hver brønn inneholdt: 2 μ l DNA, 1 μ l tyngdebuffer, 3 μ l Milli Q vann. Prøvene ble kjørt på 110 Volt i ca. 45 minutter og visualisert ved hjelp av GelDoc og QuantityOne. For videre oppbevaring ble prøvene lagret ved - 20 °C.



Figur 4.12. Isolering av DNA fra plantevev. Figuren viser hovedlinjene for isolering av DNA fra plantevev. Hentet fra DNeasy Plant Maxi Kit Handbook 08/2000

4.3.2 Screening av DNA

For å undersøke om tobakksplantene var transgene ble det gjennomført screening av isolert DNA med primere for *Ga2ox*. Det ble utført en standard PCR, der oppsett og program ble gjort som henvisst i Tabell 4. 2 og 4.3. Når PCR programmet var ferdig ble prøvene satt til gelelektroforese, der 10 µl PCR produkt ble blandet med 4 µl tyngdebuffer og lastet i brønner på 1 % agarosegel. Gelen ble kjørt i 45 - 60 minutter ved 80 - 110 volt, der 100 bp stige ble brukt som størrelsesmarkør. Alle geler ble utstyrt med:

Størrelsesmarkør

Positiv kontroll

Negativ kontroll

MilliQ vann

Som positiv kontroll ble det benyttet plasmid-DNA isolert fra *E.coli*, og som negativ kontroll ble det brukt villtype-DNA isolert fra ubehandlet plantemateriale. MilliQ vann ble benyttet som kontamineringskontroll. Gelen ble visualisert ved hjelp av GelDoc og programvaren QuantityOne.

4.3.3 Southern blot analyse

For denne metoden ble det valgt ut fem positive planter fra screening til videre analyse. Bladmateriale fra positive transformanter i veksthus ble høstet og behandlet etter prosedyren beskrevet under.

Del I

Isolering av DNA fra plantevev

For de fem prøvene ble det høstet bladmateriale til en ny DNA ekstrahering for å få en høy nok DNA-konsentrasjon (10 µg/ml) av genomisk DNA. Det ble brukt samme kit som i Kapittel 4.3.1 men i stedet ble «Protocol for Isolation of DNA from Plant Tissue with the DNeasy Plant Maxi Kit» fra s. 18-19 i protokollen «DNeasy Plant Maxi Kit Handbook 08/2000» brukt.

Forberedelse av plantemateriale

Ved hjelp av morter ble plantematerialet knust i flytende N₂, der ca. 1 g tørrvekt ble oppbevart i 50 ml tuber holdt i flytende nitrogen.

Lysering

I det knuste plantematerialet ble det tilført 5 ml AP1 buffer forvarmet til 65 °C, og 10 µl (100 mg/ml) RNase A stamløsning. Rørene ble satt til inkubering ved 65 °C i 10 minutter og snudd opp ned 2-3 ganger underveis i inkuberingsprosessen

Utfelling

Etter varmebehandlingen ble 1,8 ml AP2 buffer blandet i lyseringsmiksen og prøvene satt til ny inkubering på is i 10 minutter for å felle ut andre komponenter som proteiner og polysakkarider. Etter avkjøling ble rørene sentrifugert på maks hastighet (5000 rpm) i fem minutter ved romtemperatur. Supernatanten fra sentrifugeringen ble overført til nytt 50 ml kolonnerør med membran, og sentrifugert i fem minutter ved maks hastighet.

Fra væsken som gikk gjennom kolonnen ble 5 ml overført til nytt 50 ml rør og tilsatt 7,5 ml etanolholdig AP3/E buffer. Etter dette ble 15 ml av væsken overført til ny 50 ml kolonne oppbevart ved 4 °C. Prøvene ble sentrifugert i fem minutter ved maks hastighet. Væsken som passerte kolonnen ble kastet. Etter sentrifugering ble 12 ml vaskebuffer AW tilsatt og rørene sentrifugert i 10 minutter på maks hastighet for å tørke membranen og fjerne overflødig etanol.

Eluering

Etter sentrifugering ble kolonnen overført til nytt 50 ml oppsamlingsrør. Til forskjell fra protokollen ble det til slutt pipettert 30 µl dH₂O direkte på membranen for å få en høyere DNA-konsentrasjon. Rørene stod til inkubering ved romtemperatur i ca. fem minutter før de ble sentrifugert i fem minutt på maks hastighet for å eluere ut mest mulig væske fra membranen. Etter sentrifugering ble DNA'et overført til eppendorfrør.

For å undersøke DNA-konsentrasjonen og renheten i rørene ble 1 µl prøve testet med nanodrop og 2 µl DNA kjørt på 1 % agarosegel med blandingsforholdet: 2 µl DNA, 1 µl tyngdebuffer og 3 µl Milli Q vann.

Gelen ble kjørt på 100 volt i ca. 45 minutter og til slutt dokumentert ved hjelp av UV lys fra GelDoc og programvaren QuantityOne.

Del II

Behandling av DNA med restriksjonsenzym

For denne analysen var det viktig med tilstrekkelig mengde av genomisk DNA til fordøyning for å få et signal på sluttresultatet. Det ble laget en 20 µl reaksjon for restriksjonskutting, med to paralleller som en ekstra sikkerhet. Hver parallell ble behandlet med hvert sitt restriksjonsenzym. **Parallell 1)** DNA behandlet med *EcoRI* **Parallell 2)** DNA behandlet med *BamHI*. Enzymreaksjonen ble blandet etter forholdet:

11 µl Milli Q vann

2 µl Buffer

5 µl DNA

2 µl Enzym*

20 µl totalt

* maksimum 10 % av sluttvolumet

Blandingen av reagensene foregikk på is for å hemme biologisk aktivitet i røret, der enzym ble tilsatt til sist. Når alle komponenter var blandet ble prøvene ble satt ved 37 °C i fire timer for enzymkutting av DNA.

Forberedelse av Probe

I mellomtiden ble det laget en 300 ml agarosegel (1 %) og oppamplifisering av positiv kontroll, videre omtalt som probe, ved hjelp av PCR program i Tabell 4.3. Det ble for sikkerhets skyld laget tre paralleller for proben;

- 1) Ufortynnet DNA
- 2) 10 x fortynnet
- 3) 100 x fortynnet

PCR produkt av proben ble kjørt på 0,8 % agarosegel og skåret ut av gelen med skalpell under UV lys. Proben ble videre rensset ut av gelen ved hjelp av Kitet « Nucleospin® Gel and PCR clean-up» (Macherey-Nagel), protokoll 01/2012 s. 18-19.

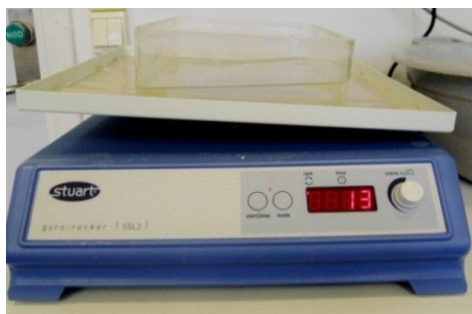
Behandling av DNA med restriksjonsenzym - fortsettelse.

Etter fire timer ved 37 °C ble prøvene lastet i brønnene på gelen etter oppsettet: **Brønn 1)** 6 µl 1 Kb størrelsesmarkør, **brønn 2)** Positiv kontroll, 3 µl dH₂O, 2 µl probe og 1 µl 6 x tyngdebuffer, **brønn 3 og utover)** DNA for parallell 1 og 2 bestående av 20 µl restriksjonsmik i 4 µl 6 x tyngdebuffer. Gelen ble kjørt på 37 volt over natten.

Del III

Vasking av gel og overføring til membran

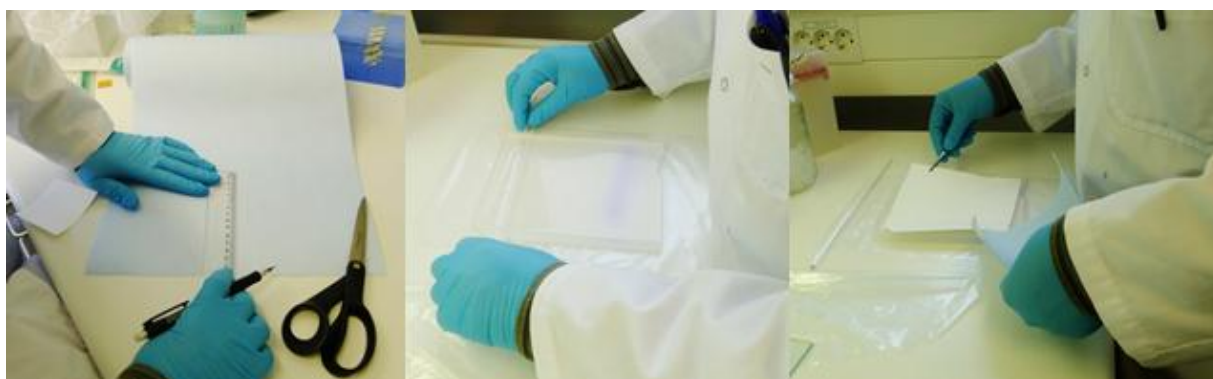
Etter ca. 12 timer ble gelen for restriksjonsjekk visualisert ved hjelp av GelDoc og QuantityOne. Overflødig gel ble fjernet og resten overført til plastkar med 0,25 N Saltsyre



(HCl) hvor den ble vasket i fem minutter i to omganger (Gyro-rocker SSL3 Stuart, Sigma- Aldrich). HCl ble fjernet og 0,4 M Natriumhydroksid (NaOH) ble tilsatt. Gelen ble vasket i to omganger i 15 minutter.

Figur 4.13. Gel til vask med HCl og NaOH. Bildet viser gel plassert på maskin som kontinuerlig roterer kar for vask.

Det ble klippet til en nylonmembran og 3 mm «Whatmann» papir litt større enn arealet på gelen. Etter vask ble nylonmembranen lagt dirkete på gelen, Figur 4.14.



Figur 4.14. Forberedelser av membran til southern blot analyse. Bildene viser prosessen fra nylonmembranen blir beregnet til den er plassert på gelen.

Over nylonmembranen ble det lagt to lag med Whatmannpapir etterfulgt av mange lag med tørkepapir. Øverst ble det lagt en glassplate og til slutt tunge bøker for å presse membranen godt ned i gelen.

Gelen stod til press på labbenken over natten i romtemperatur, og etter 12 timer ble membranen lagt til tørk i mørket. Gelen ble visualisert via GelDoc og QuantityOne for å se at all DNA var overført til membran.

Del IV

*Hybridisering**

Etter at membranen hadde tørket ble den vætet et par sekunder i prehybridiseringsbuffer (Tabell 3.4) forvarmet til ca. 65 °C. Membranen ble rullet sammen og overført til et 100 ml glassrør. Her ble 20 ml prehybridiseringsbuffer helt over i glassrøret, og deretter satt i en roteringsmaskin (HB – 1000 Hybridization Oven, UVP Laboratory Products) med varme (65 °C) i 15-20 minutter. Etter 15-20 min ble væsken helt ut og 15 nye ml med varmet prehybridiseringsbuffer tilført.

** På grunn av radioaktivitet ble arbeidet utført på isotoplab med vern mot stråling.*

Probemerking og rensing

I mellomtiden ble proben klargjort for radioaktiv merking med isotopen P³². For denne forberedelsen ble 8 µl probe-DNA blandet med 37 µl dH₂O, et totalvolum på 45 µl. Røret ble satt på varmeblokk ved 100 °C i fem minutter for å denaturere DNA. Etter varmebehandlingen ble røret plassert i fem minutter på is og deretter sentrifugert i to minutter på maks fart (13 000 rpm). En «reaksjonstube» ble satt på is og en G-50 kolonne fra «MicroColumns ProbeQuant™» ble plassert i et tomt eppendorfrør og spunnet ned ved å sentrifugere i ett minutt ved 3000 rpm. Fra røret med probe ble 45µl av blandingen pipettert over i «reaksjonstuben» og blandet. Etter blandingen ble 5 µl radioaktiv α- P³² dCTP tilført og satt ved 37 °C i 10 minutter etterfulgt av fem minutter på is. Fra røret ble 50 µl probe overført til eppendorfrør med kolonne og spunnet i to minutter på maks hastighet. Etter sentrifugering ble kolonnen kastet og røret satt ved 100 °C i fem minutter, etter fulgt av to minutter på is.

Etter at membranen hadde gjennomgått vask med prehybridiseringsbuffer ble 25 µl hybridiseringsprobe tilsatt og røret ble rotert over natten ved 65 °C.

Del V

Vasking av membran

Dagen etter ble membranen vasket i to omganger med vaskebuffer inneholdende 1 M fosfat og 10 % SDS (Tabell 3.4).

1. Skylling) 70-80 ml vaskebuffer i 25 minutter ved 65 °C.
2. Skylling) 50 ml vaskebuffer i 15 minutter ved samme temperatur.

Etter vask ble membranen pakket inn i plastfolie og overført til en metallkassett.

Det ble påført film på mørkerommet over hele membranen, og kassetten ble satt ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ over natt..

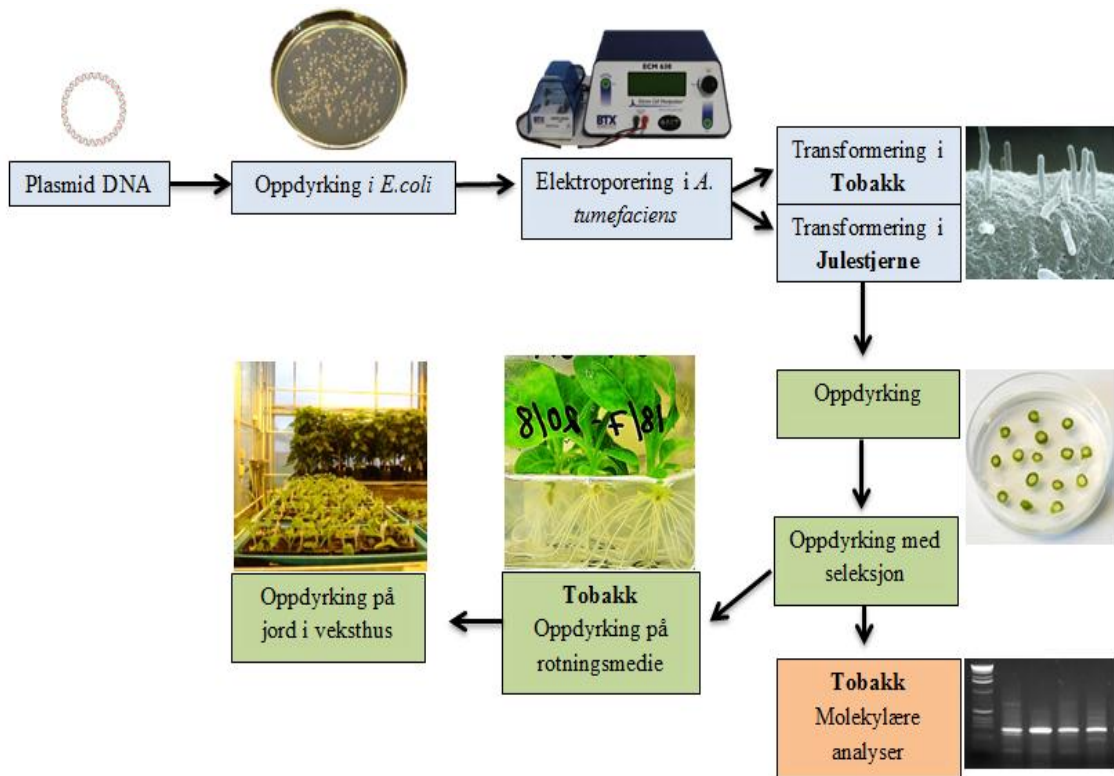
Fremkalling av film

(På mørkerom)

Filmen ble skylt i fremkallingsløsning (Tabell 3.3) i fem minutter, etterfulgt av et vannbad noen sekunder før den ble skylt i fikseringsløsning (Tabell 3.3) i fem nye minutter. Når fikseringen var ferdig ble lyset skrudd på og filmen utsatt for nytt vannbad før den ble hengt til tork.

5. Resultater og diskusjon

I denne oppgaven ble planter av tobakk og julestjerne utsatt for samme behandling med *A. tumefaciens*, der analyser fra bladvev i tobakk først og fremst vil bli presentert. Årsaken til dette er at kulturene av julestjerne vokste veldig sakte og ikke var kommet langt nok til å kunne testes når laboratoriearbeidet var nødt til å avsluttes. Der tobakksplanten brukte noen uker fra transformering til vekst og DNA-analyser, viste julestjernen et annet tempo, med flere måneder på seleksjonsmediet. På grunn av dette fungerte tobakksplanten som en modellplante for å teste ut metodene, og om plasmidene fungerte. Siden masteroppgaven hadde en gitt tidsramme ble resultatene fra praktisk labarbeid tilpasset disse begrensningene. I dette samlede kapittelet vil resultatene bli presentert og drøftet trinn for trinn, slik det kommer frem i Figur 5.1. Første del omfatter erfaringer gjort med bakterievekst og forberedelser til transformering ved bruk av *A. tumefaciens*. Andre del presenterer oppdyrking av tobakk og molekylære analyser gjort med transgent materiale. Tredje del presenterer transformering i julestjerne og oppdyrking på seleksjonsmedie. Siste og fjerde del tar et betraktende tilbakeblikk over utført arbeid, med videre diskusjon og fremtidige utsikter.



Figur 5.1. Oversikt over metoder utført i praktisk labarbeid. Figuren presenterer hovedlinjene for utført arbeid, der blå bokser er arbeidet gjort med bakterier, grønne bokser er arbeidet gjort med plantematerialet, og den oransje boksen er videre analyser av plantemateriale på molekylært nivå.

Del I – Arbeid med bakterier

5.1.1 Transformasjon av *E. coli* og oppformering

Plasmid 4, 5 og 6 ble oppformert ved hjelp av elektrokompetente celler av *E. coli* dyrket på skåler med LB agar og 50 µg/ml Kanamycin. I tillegg ble det laget to plater for negativ kontroll med celler uten plasmid-DNA.



Figur 5.2. Plasmid 5 i *E.coli* på LB seleksjonsmedie. Bildet representerer hvordan vekst av kolonier ble observert etter inkubering i ett døgn ved 37 °C.

Bakteriene viste godt vekst på platene med seleksjon for alle plasmidene. Negativ kontroll hadde kun én koloni på den ene platen. Dette skyldtes mest sannsynlig forurensing fra arbeid i sterilbenken. Rundt fire kolonier per plasmid ble isolert ved bruk av kit'et «Plasmid DNA Purification» (Macherey-Nagel), og ca. to kolonier per plasmid ble valgt ut til glyserolstammer for langstidsoppbevaring ved -80 °C.

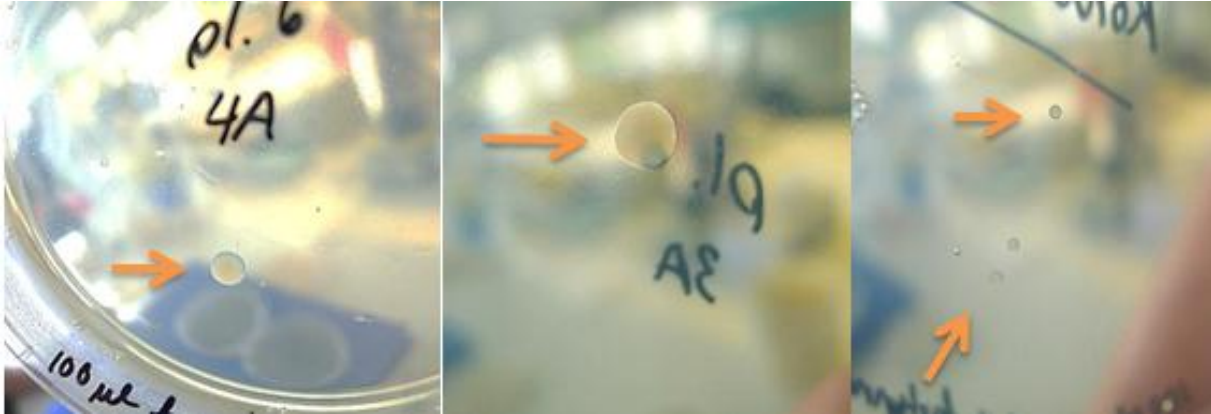
5.1.2 Elektroporering med kompetente celler av *Agrobacterium tumefaciens*

Plasmid 4 og 5 viste kolonier i *A. tumefaciens* etter tre døgn, men for plasmid 6 ble det ikke observert vekst, heller ikke på kontrollplater uten antibiotikaseleksjon. På grunn av dette ble det testet flere mulige løsninger for å fremme vekst:

- 1) lenger inkuberingstid
- 2) halvert antibiotikakonsentrasjon
- 3) dobling av plasmid-DNA til elektroporering
- 4) dobling av bakteriesuspensjon smurt utover platene
- 5) Ampicillin i stedet Kanamycin i tilfelle feilmerking på plasmidet

Da dette fortsatt ikke ga noen resultater ble det i stedet benyttet elektrokompetente celler fra Invitrogen, der punkt 2-4 ble gjentatt, i tillegg ble det laget en parallell oppformert i SOC-medie etter anvisning fra medfulgt protokoll. Som det kom frem i metod delen har SOC mer næring i form av salter og sukker enn LB agar. Dette gjør at bakteriecellene er mer osmotisk stabile og fortere kan uttrykke genene som koder for antibiotikaresistens etter varmebehandlingen.

Etter tre døgn ble det observert kolonier på fem plater fra bakteriene oppformert i SOC. Platene med LB ga liten til ingen vekst bortsett fra negativ kontroll som viste mye vekst. Det var heller ingen vekst på platene med Ampicillin, noe som indikerte at Kanamycin var riktig antibiotikum. Positiv kontroll viste små kolonier etter tre døgn på SOC.



Figur 5.3 Kolonivekst på plater for plasmid 6 med 50 µg/ml Kanamycin. Bildene viser piler som peker på rene, runde kolonier av *A. tumefaciens* på SOC medie etter tre døgn ved 30 °C. Bildet lengst til høyre viser små kolonier for positiv kontroll-DNA som fulgte med fra Invitrogen.



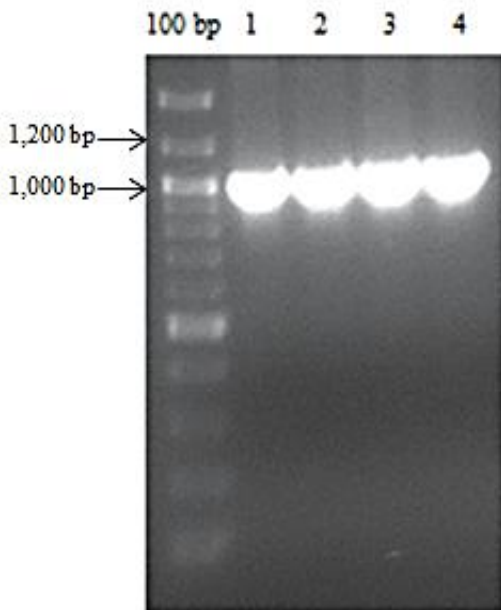
Figur 5.4 Negativ kontroll for plasmid 6 på LB medie uten antibiotikaseleksjon etter tre døgn ved 30 °C. Bildet viser hvordan bakteriesuspensjonen vokste tett over hele platen.

Når det siste plasmidet var oppformert i *A. tumefaciens* ble det laget en langstidsoppbevaring av cellekulturen ved -80 °C. På grunn av forsinkede resultater for plasmid 6 ble det parallelle arbeidet for alle tre plasmid forskjøvet. Dette vil komme frem i videre presentasjon av resultater.

5.1.3 Test av primere med gradient PCR

Primere designet etter DNA-sekvensen til *Ga2ox* i Primer 3 v.0.4.0, ble testet på isolert plasmid-DNA for plasmid 4 og 5 ved ulike temperaturer for å finne optimal sammensmeltingstemperatur. Det ble testet for fire temperaturer; 1) 55 °C 2) 56 °C 3) 57 °C 4) 58 °C, der PCR produktet for hver temperatur er presentert i Figur 5.5.

20 µM primer ble blandet i mastermiksen etter oppsettet i Tabell 4.2, og kjørt på PCR program etter oppsettet i Tabell 4.3 med unntak av ulik temperatur i steget for sammensmelting.



Figur 5.5. Primertest for sammensmelting ved ulike temperaturer. Bildet viser PCR produkt av *Ga2ox* med størrelse på rundt 1000 basepar, beregnet med 100 bp størrelsesmarkør. De ulike temperaturene er nummerert i rekkefølgen 1-4, med temperaturene 55, 56, 57, 58, der primerne viser sterke bånd ved alle temperaturer.

Ga2ox1 hadde en forventet størrelse på rundt 1kb. Ut i fra Figur 5.5 viser størrelsesmarkøren at fragmentene hadde riktig størrelse, og ble videre benyttet som positiv kontroll i arbeid med PCR og DNA-analyser.

5.1.4 Transformerings ved bruk av *A. tumefaciens*

Minikulturene fra Kapittel 4.2.1 ble laget i to runder for å fremme de beste cellene fra seleksjonspresset. Når maksikulturen hadde en OD_{600} mellom 0,6-1 ble videre vekst avbrutt for å ha flest mulig celler i suspensjonen med optimal livssyklus. Det ble observert at LBA4404 fra Invitrogen brukte halve inkuberingsprosessen (10- 12 timer) sammenliknet med elektrokompetente celler av *A. tumefaciens* laget på Bioforsk.

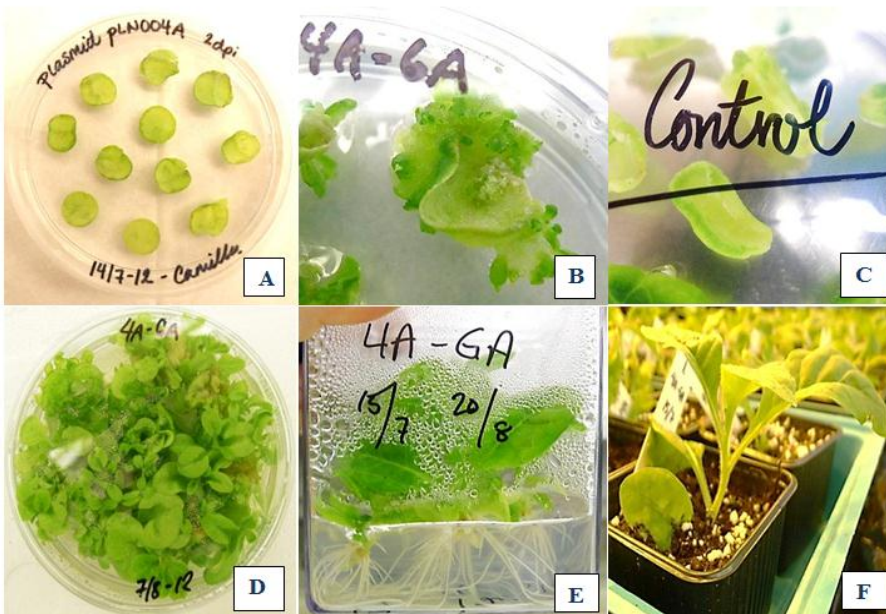
Maksikulturene ble behandlet etter oppskriften i Kapittel 4.2.1, der bakteriepelleten ble vasket og oppløst i MS-2 med hormoner (Murashige & Skoog, 1962) og 2 % sukker. For julestjerne ble det i tillegg tilsatt Acetosyringone (1 % av totalvolum) for å øke transformerings effektiviteten. Acetosyringone er et naturlig forekommende signalmolekyl som blir produsert i sårvev hos blomstrende planter. Dette molekylet er et av mange fenolmolekyler funnet i rot, skudd og vev hos voksende og utviklende planter (Ebel J. & Hahlbrock k. 1982). Molekylet fremprovoserer transport av genene som ligger i T-regionen på plasmidet, ved å reagere med proteinene som produseres fra *Vir*-regionen (Stachel et al. 1986).

For både julestjerne og tobakk ble det laget to kontrollplater per transformeringsrunde, der plantevev uten behandling med *A. tumefaciens* (villtype) ble utsatt for næringsmedie med 50 mg/ml Kanamycin. Hvert plasmid ble transformert i to runder for hver plante og sort, med en dags mellomrom.

Del II- Arbeid med planter og molekylære analyser

5.2.1 Transformering i tobakk

Plantene infisert i agrosuspensjon viste fort vekst og utvikling av skuddannelser da de ble plassert i lys på nytt næringsmedie med hormoner og antibiotika. Plantene var mellom 6-8 uker da de ble infisert. Slik det kom frem i metoddelen ble skivene dyrket på antibiotikafritt medie de tre første døgnene for at *A. tumefaciens* skulle få tid til å infisere sårvevet, før de ble utsatt for destruksjon. Etter tre døgn ble plantene flyttet til plater med CIM, og skålene ble byttet hver 10 dag. Etter 3-4 uker på mediet viste plantene utvikling av større blader og ble deretter overført til hormonfritt rotningsmedie (Tabell 3.5) for videre utvikling. Ved dette stadiet ble det i tillegg høstet plantemateriale for å undersøke hvilke planter som var transgene for *Ga2ox*, og hvilke som eventuelt var negative, ved hjelp av PCR. Når røttene var godt utviklet i rotningsmediet ble plantene overført til pottet med jord i veksthus, og ettersom plantene vokste seg større ble pottene byttet. Kontrollplatene for alle tre plasmid viste ingen signifikant vekst i prosessen, og ble gulbrune i fargen etter hvert som de døde av seleksjonspresset. Denne observasjonen var også en indikasjon på at plantene oppførte seg ulikt ut i fra behandlingen. Alle stegene for utvikling med morfologiske forandringer er presenter i Figur 5.6.



Figur 5.6. Livsløpet i transformert tobakk med *A. tumefaciens*. Bildene representerer transgen tobakk behandlet med *A. tumefaciens*. **A)** 2 dager etter infeksjon (dei) på CIM u/antibiotika **B)** 22 dei, på CIM med antibiotika **C)** 22 dei, kontrollplate, ingen utvikling på CIM med antibiotika **D)** 48 dei **E)** 55 dei, hormonfritt rotningsmedie i Magenta boks **F)** Plantene pottet på jord.

5.2.2 Isolering og screening av DNA i plantevev

Isolering

Bladmateriale av tobakk ble høstet og gDNA ble isolert. Som et representativt utvalg ble det høstet 24 planter per transformeringsrunde, til sammen 96 planter for plasmid 4 og 5.

Slik det er beskrevet i metoddelen ble DNA kjørt på 1 % agarosegel for å teste om isoleringen var vellykket, der hver brønn inneholdt: 2 µl DNA, 1 µl tyngdebuffer og 3 µl MilliQ vann.

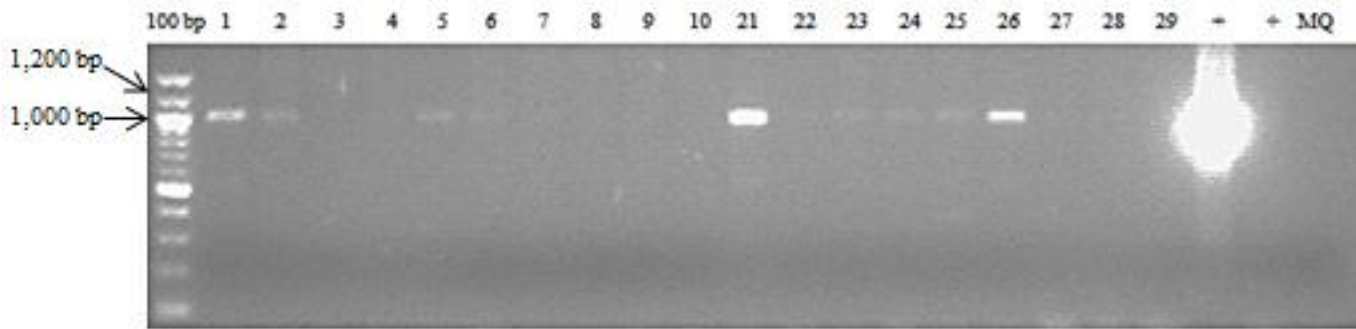


Figur 5.7. Sjekk av DNA etter isolering fra bladvev. Gelbildet viser DNA-bånd for prøve 1-24 (plasmid 4). Alle prøver viste en vellykket isolering, bortsett fra prøve 11 merket i rødt. Det ble brukt 1 kb størrelsesmarkør.

Alle DNA-prøver for plasmid 4 og 5 ble undersøkt på samme måte som i Figur 5.7, og viste DNA-bånd i de fleste tilfeller. I de tilfeller det kom negativt utslag, eks. prøve 11 Figur 5.7, ble det høstet nytt plantemateriale til ny isolering. I tillegg ble det isolert DNA fra villtype tobakk som negativ kontroll til PCR.

Screening

Etter isolering og påvising av DNA ble det utført PCR en rekke ganger for plasmid 4 og 5 med primere for *Ga2ox*. Det ble laget mastermiks etter Tabell 4.1, som i denne delen av forsøket ga få eller svake resultater på gel. Ved ett tilfelle kom det flere bånd i riktig størrelse for plasmid 4, men pga. kontaminering ble gelbildet lite representativt. For å unngå dette i videre arbeid ble det brukt ferdig mastermiks (Applied Biosystems, Tabell 4.2) og det ble utført nye runder med PCR, der 10 µl PCR produkt ble benyttet for hver brønn. Figur 5.8 og 5.9 representerer typiske geler for alle prøvene i denne delen av forsøket, med varierende resultater for positive og negative transgene planter.

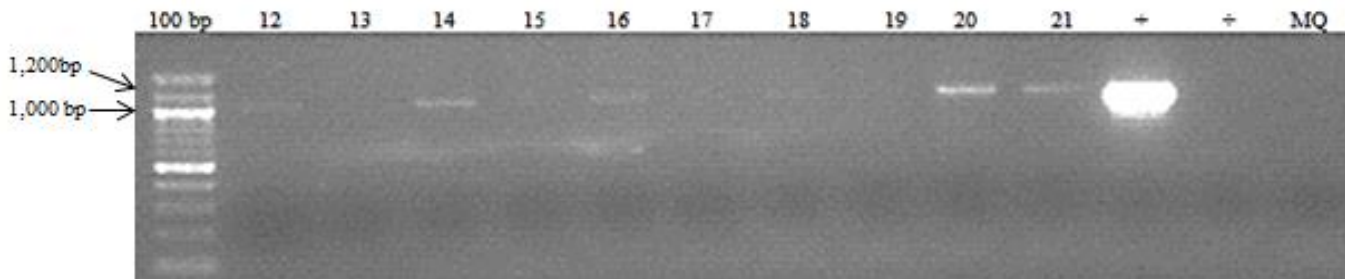


Figur 5.8. Screening for *Ga2ox* i tobakk, prøve 1-10 og 21-29, plasmid 4. Prøve 1, 2, 5, 6 og 21-26 viste positive bånd på rundt 1Kb beregnet ut i fra 100 bp stige.

På grunn av dårlig kvalitet på bildet er noen bånd i riktig størrelse vanskelig å få øye på. Positive planter som viste bånd for *Ga2ox* (~1000 bp) er 1, 2, 5, 6, og 21-26,28.

Positiv kontroll (+) ble ikke fortynnet og viser derfor veldig kraftig signal på denne gelen. For videre arbeid ble positiv kontroll alltid 100 x fortynnet.

Screening for prøvene 12-21 med 100 x fortynnet positiv kontroll er presentert i Figur 5.9.



Figur 5.9 Screening for *Ga2ox* i tobakk, prøve 12-21,plasmid 4. Prøve 12,14,16,18,20 og 21 viste positive bånd på rundt 1 Kb i størrelse, beregnet ut i fra 100 bp stige.

På grunn av varierende resultater for positive bånd ble det også høstet nytt bladmateriale fra eldre planter pottet på jord. Hensikten var å undersøke om dette kunne ha noen innvirkning på resultatet, men ingen signifikante forskjeller ble observert. Total oversikt over transformeringer og screening etter transgene planter er listet opp i Tabell 5.1 og 5.2.

Tabell 5.1. Oversikt over transformeringer gjort i tobakk med plasmid 4, 5 og 6.

Transformering	Planter pr skål	Antall skåler*	Sum transformerte
4A	10	10	100
4B	10	10	100
5A	10	10	100
5B	10	10	100
6A	10	10	100
6B	10	10	100
			600 totalt

* kontrollplater ikke medregnet

Det ble høstet 96 prøver fra petriskåler med nummerering 1-96. Av disse var 24 stykker fra hver transformeringsrunde merket som A/B, men ikke alle ble screenet. På grunn av dette er det vanskelig å lage en statistikk på hvor effektiv metoden var, men Tabell 5.2 gir en indikasjon, beregnet etter følgende kalkulering:

$$\frac{\text{Positive transgene}}{\text{Antall planter til screening}} \times 100$$

Tabell 5.2. Oversikt over transformeringsprosenten i tobakk, plasmid 4 og 5.

Transformering	Antall planter til screening	Antall positive for <i>Ga2ox</i>	Transformeringsprosent av testede planter
4A	24		
4B	5 + 12*	21	Ca. 51 %
5A	12		
5B	12	5	Ca. 21 %

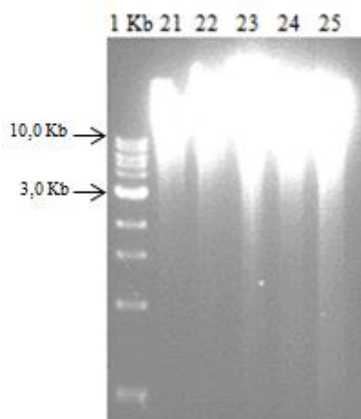
* der 12 stykk er høstet fra eldre blad i veksthus (ga bare 2 positive av 12 planter)

Sammenlagt ble det høstet og screenet flere planter for plasmid 4 enn 5, noe som ga høyere transformeringsprosent for plasmid 4. Ut i fra resultatene ble det valgt ut fem individer som viste positive bånd for *Ga2ox* slik at siste metode kunne utføres.

5.2.3 Southern blot analyse

Isolering av genomisk DNA fra plantevev

Nytt plantevev for klon 21-25 ble høstet til DNA-isolering slik det ble beskrevet i metodedelene. Når DNA var isolert ble konsentrasjon undersøkt med nanodrop i tillegg til elektroforese på 1 % agarosegel, for å dobbeltsjekke av det var nok DNA før behandling med restriksjonsenzymmer.

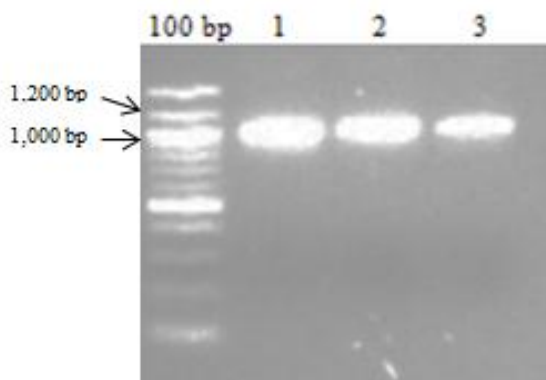


Figur 5.10. Sjekk av DNA-konsentrasjon for klon 21-25 før behandling med restriksjonsenzymmer. Gelbildet viser høye DNA-konsentrasjoner til fordøyning for alle prøver, der hver brønn inneholdt 2µl DNA, 1µl tyngdebuffer og 3µl MilliQ vann med 1 kb som størrelsesmarkør.

Figur 5.10 viser en vellykket ekstrahering med gode resultater for DNA-konsentrasjoner til enzymbehandling. Prøvene ble i tillegg undersøkt med nanodrop som en ekstra sikkerhet. På bakgrunn av dette ble DNA-prøvene brukt videre til behandling med restriksjonsenzym.

Forberedelse av probe

Før enzymbehandlet DNA kunne bli kjørt på gel måtte det lages en probe som positiv markør. Det ble laget tre paralleller av proben på en 0,8 % agarosegel. Proben ble isolert ut av gelen ved bruk av kit'et «Nucleospin®Gel and PCR Clean-up» (Macherey-Nagel).

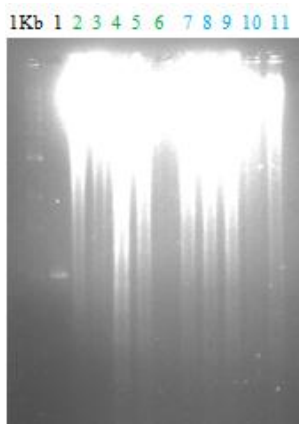


Figur 5.11. Forberedelse av probe til southern blot analyse. Bildet viser de tre parallellene av proben. 1) Ufortynnet 2) 10 x fortdynnet 3) 100 x fortdynnet. Alle viste riktig størrelse, på rundt 1000 bp med 100 bp størrelsesmarkør.

Gelen i Figur 5.11 viste sterke bånd for alle parallellene i riktig størrelse. For å være sikker på å få en sterk DNA- konsentrasjon ble alle tre bånd skåret ut og isolert fra gelen (Nucleic Acid and Protein purification, Macherey-Nagel).

Behandling av DNA med restriksjonsenzym

Når DNA var behandlet med enzym og proben var isolert ut av gelen, ble parallellene med DNA støpt på en 300 ml 1 % agarosegel og kjørt på 37 volt over natten.



Figur 5.12. Gel med DNA etter enzymbehandling med *EcoRI* og *BamHI*. Bildet viser hvordan DNA ble kuttet opp av enzymene og dratt nedover gelen ved 37 volt over natten. Brønnene ble lastet etter rekkefølgen: 1 kb størrelsesmarkør, probe, parallell I kuttet med *EcoRI*, Parallell II kuttet med *BamHI*

Figur 5.12 viser mye DNA som ikke ble kuttet. Mens det praktiske arbeidet foregikk på lab ble gelen behandlet videre slik det er utredet

i metodedelen. I ettertid ble det oppklart at prosessen for DNA og behandling med enzym burde blitt gjentatt før videre arbeid. Dette fordi gDNA var for lite kuttet til at proben kunne feste seg på mindre fragmenter og gi gode signal på sluttfilmen.

Fremkalling av film

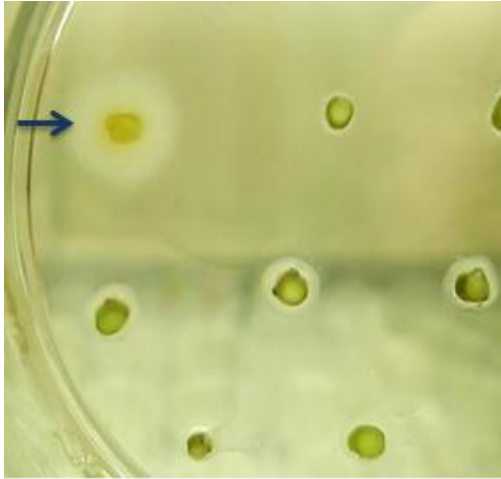
Fremkallingen av filmen på mørkerommet viste ingen gode resultater på grunn av dårlig enzymkutting av gDNA. Det eneste som ble observert av signal var proben. Resten av filmen viste skygger av store DNA-bånd øverst på gelen som ikke hadde vandret nedover i ulike fragmentstørrelser. Årsaken til dette skyldtes restriksjonsenzymet utgått på dato.

Southern blot analyse var den siste metoden i oppgaven, og samtidig en av de mest tidkrevende. Store deler av arbeidet ble utført på isotoplåben på grunn av håndtering av radioaktivt materiale, og kunne ikke utføres på egen hånd. Begge disse faktorene gjorde det vanskelig å gjenta hele prosessen, men en vellykket gjennomgang av metoden ble utført tidligere med en doktorgradsstudent ved samme avdeling. Ved sistnevnte tilfellet gjaldt arbeidet i julestjerne med genet *SHI* (av engelsk «Short Internodes») som også fungerer som en negativ regulator av veksthormonet gibberellin (Fridborg et al. 2001).

Del III – Transformering og arbeid med julestjerne

5.3.1 Transformering i julestjerne

Skiver av julestjerne infisert i agrosuspensjon viste et senere tempo enn vevskulturer av tobakk. Etter at plantene ble satt i lys på CIM med seleksjon, oppstod det ofte forurensninger på platene (Figur 5.13). Dette forekom selv om stiklingene hadde gjennomgått desinfeksjon i forkant med 70 % Etanol og 1 % NaOCl. Skivene ble undersøkt annenhver dag i ca. to- tre uker, og byttet i de tilfeller det ble observert forurensning for å unngå spredning. Det ble observert betydelig flere forurensninger for sorten 'Early Prestige' sammenliknet med 'Polar Bear'. Til forskjell fra tobakk dyrket *in vitro* ble stiklingene fra julestjerne høstet fra planter i veksthus. Infeksjonene som ble observert skyldtes mest sannsynlig oppblomstring av mikrober fra det åpne miljøet som overlevde desinfeksjonen i første del av arbeidet. Kulturer av treaktige planter er ofte vanskeligere å overflatesterilisere enn urteaktige planter på grunn av mikrober som eksiterer på stilk, blad, stamme, røtter, eller inni selve planten (Young et al. 1984).



Figur 5.13. Mikrobiell vekst på skive av julestjerne. Bildet viser en typisk forurensing som oppstod de første ukene etter transformering med *A. tumefaciens* på CIM med seleksjon.

Det ble ikke utført videre analyser av skivene, men alle tre plasmider ble transformert inn i begge sorter, oppsummert i Tabell 5.3.

Tabell 5.3 Oversikt over transformeringer gjort i julestjerne. Plasmid 4= 1A og B, plasmid 5 =2A og b, plasmid 6 =3A b.

Transformering	Planter pr skål	Antall skåler*	Sum transformerte
1A	20-25	~24	~ 580
1B	20-25	~24	~ 580
2A	20-25	~24	~ 580
2B	20-25	~24	~ 580
3A	20-25	~24	~ 580
3B	20-25	~24	~ 580
			Totalt ~ 3480

* To kontrollskåler per transformeringsrunde ikke medregnet.

Etter ca. 10-14 dager på CIM med seleksjon ble skivene flyttet over til SEIM med hormonene NAA og 2iP, som fremmer rot og skuddannelse, i tillegg til antibiotika Cefotaxim og Kanamycin. Platene ble skiftet hver tredje uke resten av tiden med praktisk labarbeid. Etter 3 1/2 måned på SEIM begynte det å oppstå små skudd på noen av skivene. Disse ble samlet på én plate og fotografert, presentert i Figur 5.14.



Figur 5.14. Julestjerne på SEIM, 107 dager etter infeksjon med *A. tumefaciens*. Bildene viser hvordan skivene startet å utvikle somatiske embryo på mediet med hormoner og antibiotika etter transformering med *A. tumefaciens*. Nærbildet nederst til høyre viser skiver fra kontrollskål som ikke hadde utviklet kallus eller skudd.

På grunn av forsinkede resultater og arbeid med planter som trengte tid til å vokse, ble videre analyser avsluttet ved dette stadiet. Plasmid 6 med genet for *Cre/LoxP* rekombinase var fortsatt i startfasen i begge planter da arbeidet ble avsluttet, men videre analyser og arbeid med plantene vil bli utført senere av prosjektet.

Del IV- Videre diskusjon

I denne oppgaven ble plasmidene først transformert inn i modellplanten *N. tabacum*, selv om julestjerne var den aktuelle vertsplanten. Ønsket sluttprodukt for prosjektet er julestjerneplanter fri for antibiotikaresistens og bruk av skadelige sprøytemidler. I masseproduksjon blir julestjerner dyrket tett og må konkurrere om lys. I England blir noen sorter stablet opp til 12 planter per m² (Clifford C. Sean et al. 2004). Under slike ugunstige forhold kan plantene utvikle seg ulikt, få dårligere kvalitet og fortere eldes. For å unngå konkurranse og avhengighet fra de ytre faktorene, kan genteknologi med utgangspunkt i indre forandringer være svaret for en mer effektiv produksjon.

5.4.1 Genetisk transformering og regenerering i tobakk versus julestjerne

Helt i fra starten krevde vevskulturer av julestjerne mer møysommelig arbeid, med desinfisering og kutting av små tynne stiklinger for å få ferskest mulig cellemateriale. Skiver av tobakk ble skåret direkte ut av bladvev i større biter, og trengte ikke å desinfiseres da de ble dyrket *in vitro*. Plantevev av julestjerne ble infisert i 10 minutter med agrosuspensjon, mens tobakk bare trengte ett minutt. Skivene av tobakk var generelt mer robuste og viste hurtig utvikling når de ble plassert i lys. Vevskulturene av julestjerne trengte mer oppfølging på grunn av forurensinger som måtte renses ut. Etter hvert som tiden gikk var det en klar forskjell mellom kontrollskåler og vanlige skåler for begge plantearter. Dette ble tolket som et positivt tegn med tanke på transformeringen og hvilke celler som hadde integrert gen for antibiotikaresistens.

På kort tid hadde bladvev fra tobakk regenerert seg til voksne planter med fullt utviklede organer og røtter. På samme tid var skivene av julestjerne på SEIM-medie nærmest uendret i utvikling. Denne observasjonen tydeliggjorde hvorfor tobakk fungerte bra som modellplante, med sin hurtige regenerering, og færre krav for vekst og utvikling.

5.4.2 Evaluering av metodene

Slik det kom frem innledningsvis er genetisk transformering ved bruk av *A. tumefaciens* en av de mest brukte teknikkene i molekylær genteknologi. Litteraturen formidler metoden som populær og enkel, men i praksis ble det erfart flere utfordringer.

Sammenliknet med elektrokompetente celler av *E.coli* JM109 var det generelt vanskeligere å dyrke opp kolonier av *A. tumefaciens* LBA4404. Dette gjaldt spesielt for det siste plasmidet,

hvorpå mange runder med forskjellige kriterier ble testet uten gode resultater. Problemene knyttet til bakterievekst viet mye tid til prøving og feiling.

Til alle transformeringer ble det benyttet elektrokompetente celler ferdiglaget av seksjonen på Bioforsk. Da det omsider ble besluttet å kjøpe celler fra Invitrogen dukket de første koloniene opp for plasmid 6. Selv om mange rør av *A. tumefaciens* fra Bioforsk ble testet, kan den fraværende responsen for vekst skyldes flere årsaker. Kanskje var cellene fra en dårlig batch, elektroporeringen lite optimal, eller materialet rett og slett foreldet.

Oppsummert ga utfordringene en solid innføring i hvordan man trigger frem bakterievekst, og hvilke vurderinger man må foreta. Selv om det opplevdes problematisk på daværende tidspunkt er det ikke dermed sagt at metoden er dårlig, men heller materialet man arbeider med, eventuelt mangel på erfaring. Tilfeldigheter kan avgjøre de negative utslagene, og hvis årsaken var ugunstige celler kan det forklare resultatene. Ut i fra erfaringene fra det praktiske labarbeidet kunne det blitt utført enda en seleksjonsrunde for koloniene fra petriskålene, hvorpå nye runder med koloni-PCR kunne blitt testet før transformering. Det kunne også blitt gjort helt nye transformeringer med nye kompetente celler for å se om dette ga noen tydelige forskjeller. Samtidig var dette tidkrevende og lite hensiktsmessig å gjenta da det praktiske arbeidet foregikk.

For alle transformeringene i tobakk ble det allikevel observert vekst og utvikling på skåler med seleksjonsmedie, der kontrollplatene skilte seg ut med lite til ingen vekst. Dette burde også være en indikasjon på at plantemateriale var transgent og at metoden fungerte. De gangene screeningen ga negative utslag ble det ved flere anledninger høstet nytt bladmateriale, både fra eldre planter og blomster, men dette ga ingen bedre resultater. Uansett ble det oppdaget flere positive planter med DNA-bånd for *Ga2ox* og det ble derfor utført en southern blot analyse for å verifisere resultatene fra screeningen. Southern blot analyse var en tidkrevende prosess som i tillegg ga et antiklimaks da enzymene viste seg å være foreldet. Selv om det ikke ble tid til å gjenta metoden vil forhåpentligvis nye og bedre resultater bli avdekket.

Slik det ble nevnt innledningsvis er også genkanon en mye brukt metode for å transformere planter. Genkanon er kategorisert som en direkte transformeringsmetode sammenliknet med *Agrobacterium*. Ved hjelp av genkanon blir gullpartikler dekt med «nakent» DNA skutt inn i bladvev. DNA'et løsner fra partiklene og vandrer inn i genomet hvor det blir uttrykt (Finer & McMullen 1990). Metoden ble utviklet i 1987 og mais med resistensgen for insektmiddel var den første genmodifiserte planten laget på denne måten (Slater et al. 2008). Genkanon har først og fremst blitt brukt på planter til kornavlinger som hvete, ris og soyabønner fordi

indirekte transformering med *Agrobacterium* ikke har fungert like bra på disse artene (Finer & McMullen 1990; Wang et al. 1988). Fordelen med genkanon er at plantevevet holder seg intakt (Finer & McMullen 1991), man slipper involvering av bakterier, og man er ikke avhengig av spesialiserte vektorsystemer (Altpeter et al. 2005). Ulempen er at genuttrykket ofte slås av ved høyt kopinummer av transgent DNA, i tillegg til forflytninger og destruksjon av DNA-sekvenser (Slater et al. 2008). Siden julestjerne er en plante mottakelig for *Agrobacterium* er denne transformeringsmetoden ansett som best egnede. Allikevel er begge metodene tidkrevende og kostbare i lengden. For å vite at man har et stabilt transgent avkom må gjerne flere hundre individer bli testet. Det finnes fortsatt ingen teknikker som kan fjerne tilfeldig DNA-integrering eller redusere frekvensen for innsettingen av transgene multi-kopier som gir upålitelige transgene genuttrykk (Ow 2004), men ettersom fler og fler gener blir identifisert i helgenom-undersøkelser hos mange forskjellige organismer vil mest sannsynlig nye teknikker dukke opp med tiden.

5.4.3 Bruk av antibiotikaresistens i molekylær genteknologi

Tobakk med Kanamycinresistens var den første transgene planten introdusert i 1983, med utgangspunkt i Ti-plasmidet fra *A. tumefaciens* (Fraley et al. 1983). Kanamycinresistens er det mest brukte seleksjonsgenet i GM-planter, der genet *neomycinphosphotransferase II*, forkortet som *nptII*, gir resistens for Kanamycin, Neomycin og G-418 (Bevan 1984; Fraley et al. 1986). Mange plantearter har siden introduksjonen av transgen tobakk blitt utstyrt med resistensgener, spesielt i jordbruk for å bekjempe ugressmiddel og skadedyr i storproduksjoner. Årsaken til at antibiotikaresistens ble introdusert til plantebioteknologien skyldtes at seleksjonsmetoden allerede var godt etablert i molekylærbiologien (jf. i arbeid med bakterier som *E. coli*) og ble et naturlig valg videre (Slater et al. 2008).

Slik det ble nevnt innledningsvis har bruk av antibiotikaresistens i GM planter blitt møtt med mye skepsis fordi man ikke kan forutsi spredningen av resistensgenet til andre dyr og organismer, men heller konsekvensene. Julestjerne er en produksjonsplante som hverken inngår i mat eller fôr, samtidig som den blir dyrket vegetativt i veksthus. Allikevel er det ønskelig å fjerne antibiotikaresistens også i julestjerne fordi det negative omdømmet står sterkt, og de fleste land forbyr dette. I forbindelse med problematikken knyttet til antibiotikaresistens har det vært mye fokus på utvikling av andre og mer trygge seleksjonsmetoder for å erstatte bruken.

5.4.4 Alternative seleksjonsmetoder

Markørgen har som hensikt å påvise integreringen av transgent DNA til verten. For å håndtere markørgenene knyttet til antibiotikaresistens finnes det to alternativer; 1) Fjerne seleksjonsmarkøren etter transformering 2) bruke en annen seleksjonsmarkør.

Når en transgen plante er selektert frem på næringsmedie med antibiotika har genet tjent sin funksjon og trenger i prinsippet ikke lenger å eksistere. Alternativ én tar utgangspunkt i setespesifikke rekombinasjonssystemer, og er blant annet brukt i denne oppgaven. Setespesifikke rekombinasjonssystemer ble først oppdaget i bakterier og gjær i forbindelse med integreringen av bakteriofagen til vertens genom (Wang et al. 2011). Det ble observert at setespesifikk rekombinasjon av DNA foregikk på bestemte sekvenser eller gjenkjennelseseter som førte til at nye DNA-sekvenser ble integrert og fjernet uten at sluttresultatet ga fler eller færre nukleotider.

Cre/loxP rekombinase er et setespesifikt enzym som klipper DNA mellom *LoxP*-setene i genomet slik det ble forklart innledningsvis. En tilsvarende analog variant er *FLP/frt* systemet, der *FLP* rekombinase klipper DNA mellom *frt*-seter, opprinnelig demonstrert i gjærsoppen *Saccharomyces cerevisiae* (Ng et al. 2001). *FLP* systemet er i senere tid utført vellykket i transgene bananfluer, dyreceller, mais og ris (Yoder & Goldsbrough 1994). Andre tilsvarende metoder er *pSR1* systemet til *Zygosaccharomyces rouxi* (Onouchi et al. 1991), *R-RS* systemet (Wang et al. 2011) og *Gin* rekombinasesystemet fra fagen *Mu* (Maeser & Kahmann 1991), der alle tar utgangspunkt i et enkelt peptidenzym som fremskynder rekombinasjon mellom to korte spesifikke DNA-sekvenser. Selv om det finnes flere alternativer er *Cre/LoxP* systemet mest brukt i planter (Yoder & Goldsbrough 1994), og er også brukt i denne oppgaven. Den første kommersielle planten laget ved hjelp av *Cre/loxP*-systemet var maisplanten LY038, produsert av firmaet Monsanto i 2006 (Lucas et al. 2007). Denne planten inneholdt et høyt innhold av lysin beregnet til foring av fjærkre (Ow 2007). Ulempen med denne metoden er at den i tillegg til å være tidkrevende ikke fungerer på arter som formerer seg aseksuelt (jf. potet) og er ikke hensiktsmessig på planter med lang generasjonstid, for eksempel trær.

Alternativ to omfatter bruk av andre gener uten involvering av antibiotika. Innledningsvis ble det nevnt et eksempel med sultbasert mannoseseleksjon, der teknikken går ut på å utnytte plantens manglende evne til å omdanne energi fra enklere karbohydrater. Transgene celler som uttrykker genet *fosfomannose isomerase (PMI)* kan konvertere mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat, et sukker planten enkelt kan metabolisere videre som energikilde (Lucca et

al. 2001). Metoden er påvist som vellykket i flere planter, som sukkerrør, mais, ris, hvete og eple (Degenhardt et al. 2006; Gao et al. 2005) I tillegg finnes det andre sultbaserte seleksjoner med samme prinsipp, som benzyladenin N-3-glukuronid i tobakk, xylose i potet, tobakk og tomat (Wang et al. 2000).

Seleksjonsmetoder der planter uten transgent innhold blir luket ut ved destruksjon kalles negativ seleksjon. Visuell seleksjon innebærer bruk av proteiner som avgir signaler som farge hos transgene individer. Grønt fargeprotein (*GFP*) er det mest brukte fargeprotein, opprinnelig isolert fra maneter (*Aequorea Victoria*) og er brukt i en rekke plantetransformeringer, blant annet i ris, bygg, hvete, papaya med flere (Wei et al. 2012). GFP er ikke avhengig av andre substrater for å uttrykke farge, og kan bli testet *in vivo*, uten at plantevevet blir skadet. Selv om GFP viser seg som en god markør er det foreløpig ingen rapporter der markøren er brukt ene og alene til seleksjon i plantetransformering (Wei et al. 2012). Andre eksempler på fargeproteiner er *Luciferase* isolert fra ildflue, brukt i blant annet genmodifiserte orkideer, hvete og bygg, i tillegg til β -galaktosidase (*GUS*) (Degenhardt et al. 2006). Felles for alle er at de ofte er brukt til å identifisere transgene individer, framfor å virke som seleksjonsmetode (Wei et al. 2012).

Et annet alternativ for genmodifisering av planter er kloroplasttransformering. Kloroplaster er små organeller funnet i bladvev hos planter, og huser mange metabolske prosesser som syntese av aminosyrer, proteiner og lipider, i tillegg til karbonfiksering og fotorespirasjon fra sollyset (Grierson 1991). Kloroplastorganellene består av egne sirkulære genom og maskinerier til å utføre transkripsjon og translasjon (Maliga 2004). Transformering i kloroplastgenomet er en metode utviklet for å overkomme utfordringene knyttet til vanlig kjernetransformering. Metoden blir ansett som tryggere for både plante og miljø, og utelukker spredning av transgent materiale til beslektede arter via pollen og frøspredning ettersom kloroplast-DNA ikke sprer seg videre via pollen (Daniell et al. 2001b). Kloroplasttransformering har blitt utført i en rekke planter som salat, sukkerrør, tomat, potet, hodekål mm. I dette prosjektet vil transgene linjer bli krysspollinert til en ny generasjon uten antibiotikaresistens. Av disse årsaker ville kloroplasttransformering vært ugunstig.

5.4.5 Konklusjoner og fremtidige aspekter

Fra det praktiske arbeidet ble det erfart at vevskulturer av tobakk og julestjerne regenererte seg svært ulikt, men med tilsvarende like prinsipper. Med en nokså begrenset tid til rådighet er det vanskelig å trekke konkrete konklusjoner fra arbeidet. Ikke minst dristig når flere forsøk og analyser fortsatt gjenstår. Fremover må skiver av julestjerne fortsette utviklingen på næringsmedie, prøver av kallus- og skuddmateriale må høstes og screenes, transgent materiale må verifiseres gjennom molekylære analyser, transgene planter må regenereres til voksne individer med utviklede blomsterorganer, morfologiske endringer må studeres, blomstene må emaskuleres og krysspollineres på tvers av de transgene linjene, nye stabile avkom må bli oppdrevet der ønsket genotype må kartlegges, med mer.

Selv om hovedlinjene videre gjenspeiler mye labarbeid, ble alle metodene denne oppgaven hadde som mål gjennomført. Varierende, men også positive resultater ble oppnådd. Alle plasmidene brukt til transformering ble før eller siden påvist i tobakk, som forhåpentligvis lover dette godt for videre analyser i julestjerne. Enda viktigere fungerte arbeidet på lab som en kunnskapsberikelse og døråpner til større tema innad moderne genteknologi. Hovedfokuset i denne oppgaven var å benytte *Cre/LoxP*-rekombinasjonssystemet til å fjerne antibiotikaresistens, noe som forhåpentligvis vil gi gode resultater fremover. Litteraturen viser mye forskning gjort for å fjerne antibiotika i fremstilling av GM produkter, der spesielt *Cre/LoxP*-rekombinasjonssystem er mye positivt omtalt.

Selv om det finnes mange blandede meninger og motforestillinger vil bruk av GM i plantebioteknologien høyst sannsynlig ekspandere med tiden, både i Norge og globalt. Som en respons på motstand og skepsis er det en stadig utvikling og testing av alternative metoder med enda større fokus på miljø og bærekraft. Allikevel er det en tidkrevende prosess på grunn av kompleksiteten til alt levende materiale, og debatten har foregått siden genteknologiens virkelige oppblomstring på 1990-tallet. I jungelen av argumenter er det vanskelig å stille seg konsekvent for eller i mot utviklingen. Som for alle andre ting finnes det både fordeler og ulemper som vekter like mye i hver sin retning. Det som er spennende er at teknologien ikke er begrenset til ett felt, men viser et mangfold av bruksområder. Mange viktige mat- og jordbruksplanter som bomull, soya, mais og raps har blitt genmodifisert og økt avlingene til bønder betraktelig. Bare fra 1996 til 2007 hadde den globale inntekten til bøndene steget med 44,1 billioner dollar som resultat av nye GM-sorter (Wang et al. 2011). Større avlinger har igjen ført til mer mat og bidratt positivt til den globale sultproblematikken, selv om denne

allikevel øker kontinuerlig. Nye teknikker som erstatter tradisjonell planteforedling gjør at nye sorter kan oppstå forttere, der menneskeliv kan reddes i prosessen. Allikevel er det mange aspekter som må vurderes underveis, både når det gjelder fremstilling av sorten og eksponering i naturen.

Andre bruksområder hvor plantebioteknologien har utgjort en stor debatt er utvinningen av biodrivstoff, som et svar på en mer bærekraftig løsning enn fossilt brennstoff. Det meste av biodrivstoffet som brukes i dag er etanol fremstilt av mais, og i USA går 25-30 % av maisavlingene med til fremstillingen (Verma et al. 2010). Dette har gjort at prisøkningen på visse matvarer har steget i tillegg til en negativ innvirkning på den globale matmangelen. Sluttparadokset er at det er det påvist høyere produksjon av klimagasser til atmosfæren enn ved bruk av fossilt brennstoff. Det er ved slike anledninger bioteknologien kan svikte tillitten til allmennheten, i tillegg til å øke skepsisen. Allikevel er det mye som er vanskelig å forutsi før det blir testet i praksis. På grunn av disse negative erfaringene er det testet nye og mer lovende metoder, der etanol fremstilt fra cellulosen til kompost og andre planter som ikke inngår i matplanteindustrien har påvist bedre resultater, med mindre utslipp til atmosfæren enn både elektrisitet og hydrogen (Verma et al. 2010). Andre positive bruksområder i plantebioteknologien er blant annet i fremstillingen av medisiner, vaksiner og farmasøytiske produkter, der planter blir omtalt som såkalte «grønne fabrikker». Planter har blitt brukt til medisinske formål av mennesker i tusenvis av år, men genetiske teknikker knyttet til moderne bioteknologi får planter til å produsere spesifikke komponenter. Den store biomassen gjør det økonomisk rimeligere å fremstille f. eks industrielle proteiner til bruk i vaksiner enn andre mer tradisjonelle metoder, jf. Bruk av bakterier. Forskjellige typer antibiotika har blitt fremstilt i blant annet tobakk, hvete, ris og soyabønner i tillegg til humane proteiner som veksthormoner, kollagen, koagulasjonshemmende protein etc. (Daniell et al. 2001a). Ved å transformere genet av interesse inn i plantens kloroplastgenom kan det gi opp til 10 000 kopier per celle, som igjen utgjør 47 % av det totale oppløselige proteinet (Daniell et al. 2002).

Planter er en av de viktigste fornybare kildene vi har på jorda, og utgjør en viktig rolle i industrien, ved siden av å fø mennesker og dyr. Selv om GMO er møtt med mye motstand og skepsis har det igjen sine positive sider. Det engasjerer flere, gjerne ufaglærte, til å opptjene kunnskaper rundt store temaer som økologi, biologi, botanikk, og politikk, der de økonomiske aspektene og nytteverdiene blir debattert og vurdert; hvem gagnar det? Forskningen blir nødt til å tilpasse, eventuelt erstatte teknikkene ut i fra den allmenne responsen, der fokuset på biosikkerhet står aller høyest, en grunnleggende sunn verdi.

For julestjerneplanten som hverken inngår i mat eller fôr kan gjennombruddet for en ny GM-sort uten antibiotikaresistens skje fortere. Siden julestjernen bare fungerer som en prydblade kan også flere land som stiller seg skeptiske anerkjenne den. En julestjerne «skreddersydd» etter kjøpernes kriterier, flettet sammen med bedre vilkår for produksjon, helse og miljø vil forhåpentligvis spre enda mer glede for enda flere i fremtiden.

6. Referanser

- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P., et al. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, 15 (3): 305-327.
- An, G. (1986). Development of Plant Promoter Expression Vectors and Their Use for Analysis of Differential Activity of Nopaline Synthase Promoter in Transformed Tobacco Cells. *Plant Physiology*, 81 (1): 86-91.
- Bayley, C., Morgan, M., Dale, E. & Ow, D. (1992). Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-lox site-specific recombination system. *Plant Molecular Biology*, 18 (2): 353-361.
- Berner, E. j. (2012). *Gibberelliner*: Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/gibberelliner>
- Bevan, M. (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation *Nucleic Acids Research*, 12 (22): 8711-8721.
- Bhattacharya, A., Ward, D. A., Hedden, P., Phillips, A. L., Power, J. B. & Davey, M. R. (2012). Engineering gibberellin metabolism in *Solanum nigrum* L. by ectopic expression of gibberellin oxidase genes. *Plant Cell Reports*, 31 (5): 945-953.
- Bioteknologinemnda. (2009). Genmodifiserte planter og mat. 1-4. Tilgjengelig fra: http://www.bion.no/filarkiv/2010/07/temaark_genmodifiserte_planter_mat.pdf.
- Bundock, P., Dendulkas, A., Beijersbergen, A. & Hooykaas, P. J. J. (1995). Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* *Embo Journal*, 14 (13): 3206-3214.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G.-E., Amundsen, S. S., Mandal, A. & Aalen, R. B. (2003). Inflorescence efficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell Online*, 15 (10): 2296-2307.
- Casanova, E., Trillas, M. I., Moysset, L. & Vainstein, A. (2005). Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnology Advances*, 23 (1): 3-39.
- Chandler, S. & Brugliera, F. (2011). Genetic modification in floriculture. *Biotechnology Letters*, 33 (2): 207-214.
- Chien. (1976). *Journal of Bacteriology* ISSN: 0021-9193 Vol: 127 (3) 1976 Page: 1550 Publisher: American Society for Microbiology (ASM).
- Clarke, J., Spetz, C., Haugslie, S., Xing, S., Dees, M., Moe, R. & Blystad, D.-R. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to Poinsettia mosaic virus. *Plant Cell Reports*, 27 (6): 1027-1038.

- Clifford C. Sean, Runkle S. Erik, Langton F. Allen, Mead A. , Foster A. Shirley, Pearson Simon & Royal, H. D. (2004). Height Control of Poinsettia Using Photosensitive Filters. *HortScience*, 39 (2): 383-387.
- Cockshull, K. E., Langton, F.A. and Cave, C. .R.J. (1995). Differential effects of different DIF treatments on Chrysanthemum and Poinsettia. *Acta Hort. (ISHS)* (378): 15-26.
- Collins, F. S. (1999). Medical and Societal Consequences of the Human Genome Project. *New England Journal of Medicine*, 341 (1): 28-37.
- Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z. & Maliga, P. (2001). Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. *The Plant Journal*, 27 (2): 171-178.
- Daniell, H., Streatfield, S. J. & Wycoff, K. (2001a). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6 (5): 219-226.
- Daniell, H., Wiebe, P. O. & Millan, A. F.-S. (2001b). Antibiotic-free chloroplast genetic engineering – an environmentally friendly approach. *Trends in Plant Science*, 6 (6): 237-239.
- Daniell, H., Khan, M. S. & Allison, L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*, 7 (2): 84-91.
- Davies, P. (2010). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. I: Davies, P. (red.) *Plant Hormones*, s. 1-15: Springer Netherlands.
- De Groot, Bundock, Hooykaas & Beijerbergen. (1998). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16 (9) (839 -842).
- Deblock, M., Herreraestrella, L., Vanmontagu, M., Schell, J. & Zambryski, P. (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny *Embo Journal*, 3 (8): 1681-1689.
- Degenhardt, J., Poppe, A., Montag, J. & Szankowski, I. (2006). The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports*, 25 (11): 1149-1156.
- Ebel J. & Hahlbrock k. (1982). *The Flavonoids, Advances in research*. New York: Chapman and Hall
- Ecke, P., III, Faust, J. E., Higgins, A. & Williams, J. (2004). *The Ecke poinsettia manual*. Batavia: Ball Publishing. xv + 287 pp. s.
- EFSA. (2006). Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and fee use. *The EFSA Journal* 1-115 s.
- EPA. (2007). *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Chlormequat Chloride*

- Finca Tropical. (2013). *Euphorbiaceae Botanical garden*. Tilgjengelig fra: <http://www.la-palma-tourismus.com/en/euphorbiaceae/module/family.htm>.
- Finer, J. & McMullen, M. (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 8 (10): 586-589.
- Finer, J. & McMullen, M. (1991). Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 27 (4): 175-182.
- Forskningsrådet. (2008). *Etiske, rettslige og samfunnsmessige aspekter ved bioteknologi, nanoteknologi og nevroteknologi - ELSA* Tilgjengelig fra: http://www.forskningsradet.no/prognett-elsa/Om_programmet/1224698247054 (lest 13.12).
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., et al. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (15): 4803-4807.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B. & Gelvin, S. B. (1986). Genetic transformation in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 4 (1): 1-46.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Robertson, M. & Sundberg, E. (2001). The Arabidopsis protein SHI represses gibberellin responses in Arabidopsis and barley. *Plant Physiology*, 127 (3): 937-948.
- G-Biosciences. (2012). *Using Polymerase Chain Reaction to Identify Different Strains of an Organism*. Tilgjengelig fra: <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/155569/Using-Polymerase-Chain-Reaction-to-Identify-Different-Strains-of-an-Organism>.
- Gachet, E., Martin, G. G., Vigneau, F. & Meyer, G. (1998). Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (11-12): 380-388.
- Gao, Z., Xie, X., Ling, Y., Muthukrishnan, S. & Liang, G. H. (2005). Agrobacterium tumefaciens-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotechnology Journal*, 3 (6): 591-599.
- Giannakoula, A. E., Ilias, I. F., Dragišić Maksimović, J. J., Maksimović, V. M. & Živanović, B. D. (2012). The effects of plant growth regulators on growth, yield, and phenolic profile of lentil plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28 (1): 46-53.
- Grierson, D. (1991). *Plant genetic engineering*. Glasgow: Blackie. x + 267 pp. s.
- Griffiths. (2000a). *Analysis of DNA by the Southern Blot technique*. Tilgjengelig fra: <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr12-18.html>.
- Griffiths. (2000b). *Induction of Crown Gall Disease by the Ti plasmid*. Tilgjengelig fra: <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr13-14.htm>.

- Guo, X.-l., Jia, C.-h., Zhao, E.-c., Xu, Y.-j., Han, L.-j. & Jiang, S.-r. (2010). Dissipation and Residues of Chlormequat in Wheat and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84 (2): 221-224.
- H. Zhang, Fengge LI, Xiaoyan LI, Xuewen LI & YAO, W. (2012). Determination of Chlormequat and Mepiquat Residues in Tomato Plants Using Accelerated Solvent Extraction-Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Advances in Natural Science*, 5 (2).
- Hedden, P. & Graebe, J. (1985). Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. *Journal of Plant Growth Regulation*, 4 (1-4): 111-122.
- Hiei, Y., Komari, T. & Kubo, T. (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 35 (1-2): 205-218.
- Hvoslef-Eide, A. K. (2009). Molecular Aspects Of Postharvest Biology. *Acta Hort (ISHS)* (847): 67-74.
- Iamtham, S. & Day, A. (2000). Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnology*, 18 (11): 1172-1176.
- iGEM. (2010). *How Agrobacterium Transforms Plants*. Tilgjengelig fra: http://2010.igem.org/Team:Nevada/Agrobacterium_Transformations.
- Islam, M. A., Lütken, H., Haugslie, S., Blystad, D.-R., Torre, S., Rolcik, J., Rasmussen, S. K., Olsen, J. E. & Clarke, J. L. (2013). Overexpression of the *AtSHI* Gene in *Poinsettia*, *Euphorbia pulcherrima*, Results in Compact Plants. *PLoS ONE*, 8 (1): e53377.
- Joersbo, M. (2001). Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes. *Physiologia Plantarum*, 111 (3): 269-272.
- Kühn, R. & M. Torres, R. (2002). Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting. I: Clarke, A. (red.) *Methods in Molecular Biology*, b. 180 *Transgenesis Techniques*, s. 175-204: Springer New York.
- Larsen, R. U. & Lieth, J. H. (1993). Shoot elongation retardation owing to daminozide in chrysanthemum: I. Modeling single applications. *Scientia Horticulturae*, 53 (1-2): 109-125.
- Lee, Y., Derbyshire, P., Knox, J. P. & Hvoslef-Eide, A. K. (2008). Sequential cell wall transformations in response to the induction of a pedicel abscission event in *Euphorbia pulcherrima* (*poinsettia*). *The Plant Journal*, 54 (6): 993-1003.
- Lincoln Taiz & Zeiger, E. (2010). *Commercial Uses of Gibberellins*. 5 utg. Plant Physiology Online.
- Lucas, D., Taylor, M., Hartnell, G., Nemeth, M., Glenn, K. & Davis, S. (2007). Broiler performance and carcass characteristics when fed diets containing lysine maize (LY038 or LY038× MON 810), control, or conventional reference maize. *Poultry science*, 86 (10): 2152-2161.

- Lucca, P., Ye, X. & Potrykus, I. (2001). Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breeding*, 7 (1): 43-49.
- Lütken, H., Clarke, J. & Müller, R. (2012). Genetic engineering and sustainable production of ornamentals: current status and future directions. *Plant Cell Reports*, 31 (7): 1141-1157.
- M. J. McPherson, B. D. Hames & Taylor, G. R. (1995). *PCR 2 - A practical Approach*: Oxford University Press.
- Maeser, S. & Kahmann, R. (1991). The Gin recombinase of phage Mu can catalyse site-specific recombination in plant protoplasts. *Molecular and General Genetics MGG*, 230 (1-2): 170-176.
- Maliga, P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 289-313.
- New Jersey Department of Health and Senior Services. (1999). New Jersey Department of Health and Senior Services, Hazardous Substance Fact Sheet. 1- 6.
- Ng, P., Beauchamp, C., Eveleigh, C., Parks, R. & Graham, F. L. (2001). Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Molecular Therapy*, 3 (5): 809-815.
- Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K. & Machida, Y. (1991). Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Research*, 19 (23): 6373-6378.
- Ow, D. W., Wood, K. V., Deluca, M., Dewet, J. R., Helinski, D. R. & Howell, S. H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant-cells and transgenic plants
Science, 234 (4778): 856-859.
- Ow, D. W., Jacobs, J. D. & Howell, S. H. (1987). Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (14): 4870-4874.
- Ow, D. W. (2004). Transgene management via multiple site-specific recombination systems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 40: 20A-20A.
- Ow, D. W. (2007). GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2): 115-120.
- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C. & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76 (2): 76-81.

- Parsley, L. (2004). *Transgenic Plants: A Budding Controversy Stems from Consumer Concerns*: Journal of Young Investigators. Tilgjengelig fra: <http://www.jyi.org/issue/transgenic-plants-a-budding-controversy-stems-from-consumer-concerns/>.
- Perry, L. (2012). *Poinsettias for the Holidays*: University of Vermont.
- Potera. (2007). *Nature Biotechnology*. 25 (9).
- Rademacher, W. (2000). Growth retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51 (1): 501-531.
- Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K. & Hinata, K. (1996). Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Reports*, 15 (10): 727-730.
- Redorbit. (2013). *Agrobacterium tumefaciens* Tilgjengelig fra: http://www.redorbit.com/education/reference_library/health_1/bacteria/2584106/agrobacterium_tumefaciens/.
- Ren, N. & Timko, M. P. (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 44 (4): 559-571.
- Rinkley, R. (2010). *Festive Flower*.
- Rose, O. o. S. (2012). *Rose of Sharon Floral Design*.
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the Cre-Lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Molecular and Cellular Biology*, 7 (6): 2087-2096.
- Sauer, B. & Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 (14): 5166-5170.
- Schlickeiser, S. & Pleyer, U. (2007). Western, Northern, and Southern Blotting. I: Patel, H. R. H., Arya, M. & Shergill, I. S. (red.) *Basic Science Techniques in Clinical Practice*, s. 48-57: Springer London.
- Schrammeijer, B., Beijersbergen, A., Idler, K. B., Melchers, L. S., Thompson, D. V. & Hooykaas, P. J. J. (2000). Sequence analysis of the vir-region from *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Journal of Experimental Botany*, 51 (347): 1167-1169.
- SeedsPlants.net. (2012). *Seeds Plants.net*. Tilgjengelig fra: <http://seeds-plants.net/exotic-seeds-plants-tropical/6-tobacco-plant-nicotiana-tabacum-200-seeds.html>.
- Slater, Scott Nigel W & Fowler Mark R. (2008). *Plant Biotechnology, the genetic manipulation of plants*.
- Smartcode. (2012). *Poinsettia the Christmas Star flower Sc 1.1*. Tilgjengelig fra: <http://poinsettias-the-christmas-star-flower-sc.smartcode.com/screenshot.html>.

- SSB/NGF. (2009). *Produksjonsverdi for norsk gartneri og hagebruk for 2009*. Tilgjengelig fra: <http://www.obp.no/no/produksjon/statistikk/>.
- Stachel, S. E., Timmerman, B. & Zambryski, P. (1986). Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature*, 322 (6081): 706-712.
- Stenvik, G.-E., Butenko, M. A., Urbanowicz, B. R., Rose, J. K. C. & Aalen, R. B. (2006). Overexpression of inflorescence deficient in abscission activates cell separation in vestigial abscission zones in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 18 (6): 1467-1476.
- Strømme, E. (1993). *The Scientific Basis of Poinsettia Production*. The Agricultural University of Norway: NLH.
- T. B. Mepham, Robert D. Combes, Michael Balls, Ottavia Barbieri, Harry J. Blokhuis, Patrizia Costa, Robert E. Crilly, Tjard de Cock Buning, Véronique C. Delpire, Michael J. O'Hare, et al. (1998). The Use of Transgenic Animals in the European Union - The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 28. *ATLA*, 26: 21-43.
- Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., Senior, M., Dyson, B., Nakamura, N., Katsumoto, Y. & Chandler, S. (2010). Flower Color Modification by Engineering of the Flavonoid Biosynthetic Pathway: Practical Perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (9): 1760-1769.
- Verma, D., Kanagaraj, A., Jin, S., Singh, N. D., Kolattukudy, P. E. & Daniell, H. (2010). Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (3): 332-350.
- Wang, A. S., Evans, R. A., Altendorf, P. R., Hanten, J. A., Doyle, M. C. & Rosichan, J. L. (2000). A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. *Plant Cell Reports*, 19 (7): 654-660.
- Wang, K. (2006). *Agrobacterium protocols*: Springer.
- Wang, Y.-C., Klein, T., Fromm, M., Cao, J., Sanford, J. & Wu, R. (1988). Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Molecular Biology*, 11 (4): 433-439.
- Wang, Y., Yau, Y.-Y., Perkins-Balding, D. & Thomson, J. G. (2011). Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Reports*, 30 (3): 267-285.
- Watson, Baker, Bell, Gann, Levine & Losick. (2008). *Molecular Biology of the Gene*, b. 6. 1301 Sansome Street, San Francisco, CA 94111: Benjamin Cummings.
- Wei, Z., Wang, X. & Xing, S. (2012). Current progress of biosafe selectable markers in plant transformation. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 4 (1): 1-8.
- Winans, S. C. (1992). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , *Two-way chemical signaling in Agrobacterium - plant interactions*. , b. 56.

- Wittwer, S. H. & Bukovac, M. J. (1958). The effects of gibberellin on economic crops. *Economic Botany*, 12 (3): 213-255.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. I: Annual Review of Plant Biology, b. 59 *Annual Review of Plant Biology*, s. 225-251.
- Yoder, J. I. & Goldsbrough, A. P. (1994). Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio-Technology*, 12 (3): 263-267.
- Young, P. M., Hutchins, A. S. & Canfield, M. L. (1984). Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants. *Plant Science Letters*, 34 (1-2): 203-209.