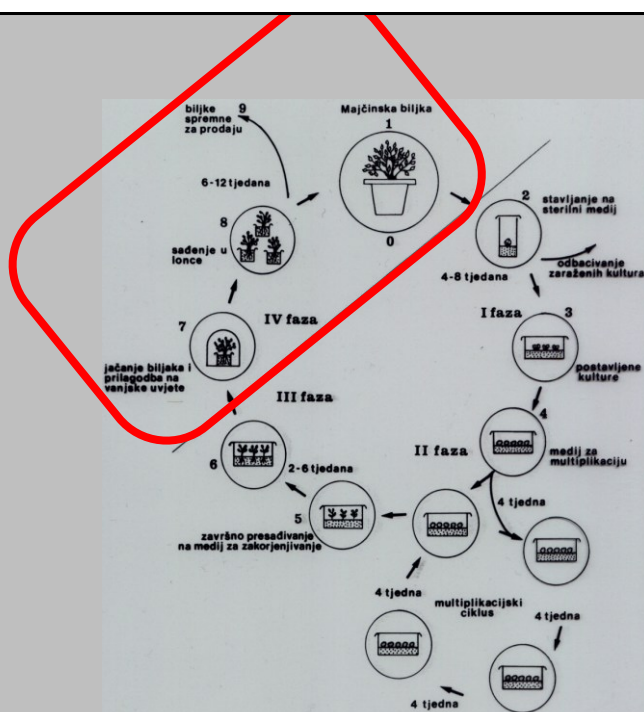


....KBT4 dio koji nismo stigli



Priprema biljaka za prijenos u vanjske uvjete



- U vanjske uvjete najčešće se prenose **kompletne biljke** koje imaju razvijeni korijen
- Boljem razvoju korijena pogoduje smanjenje razine anorganskih soli u mediju
- Smanjenje koncentracije **šćecera** može potaknuti fotosintezu u biljkama što će pomoći u fazi aklimatizacije
- Dodatak **ABA** može pomoći, jer potiče zatvaranje pući i osigurava brže uspostavljanje stomatalne regulacije.

AKLIMATIZACIJA BILJAKA IZ *In vitro* UVJETA NA VANJSKE UVJETE RASTA



- ❑ Biljke u uvjetima *in vitro* nemaju stomatalnu regulaciju – zbog visoke vlage u posudici za uzgoj pući su im širom otvorene. Pored toga **imaju vrlo tanku kutikulu i nisku razinu klorofila**, pa se biljke dobivene mikropropagacijom moraju postepeno prilagoditi na vanjske uvjete.
- ❑ Biljčice s korijenom se moraju prebaciti u vlažnu atmosferu (perlit ili sterilna zemlja natopljeni destiliranom vodom) u uvjete laganog osvjetljenja.
- ❑ Nakon što se izvade iz posudice za uzgoj potrebno je odstraniti hranjivi medij (agar) – biljčice se peru tekućom vodom

AKLIMATIZACIJA BILJAKA IZ *In vitro* UVJETA NA VANJSKE UVJETE RASTA

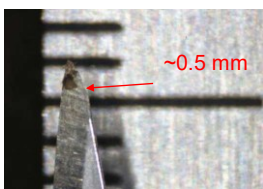
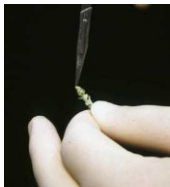


- U posudici za uzgoj možemo imati do nekoliko stotina biljčica.
- S biljčica se odstranjuju svi nekrotizirani i oštećeni dijelovi.
- Svaka pojedina biljčica se odvaja i sadi u vlažnu podlogu.
- Posađene **biljčice se uzgajaju prekrivene najlonom**, uz stalno zalijevanje. Nakon 3-4 dana postepeno se otkrivaju, 7. dan se pokrivalo miče.
 - Dotad bi trebale razviti korijen i uspostaviti stomatalnu regulaciju.
- Ukoliko se biljčice sade na danje svjetlo potrebno ih je prilagođavati vanjskim uvjetima osvjetljenja postepeno prilagođavajući valne duljine i pojačavati intenzitet svjetlosti.



Proizvodnja biljaka -primjer virusno oslobođene jagode

1. Izolacija vršnog meristema



2. Indukcija i umnažanje izdanaka, zakorjenjivanje.



3. Aklimatizacija biljaka na vanjske uvjete i uzgoj u stakleniku (super-elita).



4. Vriježe super-elite se sade za urod.

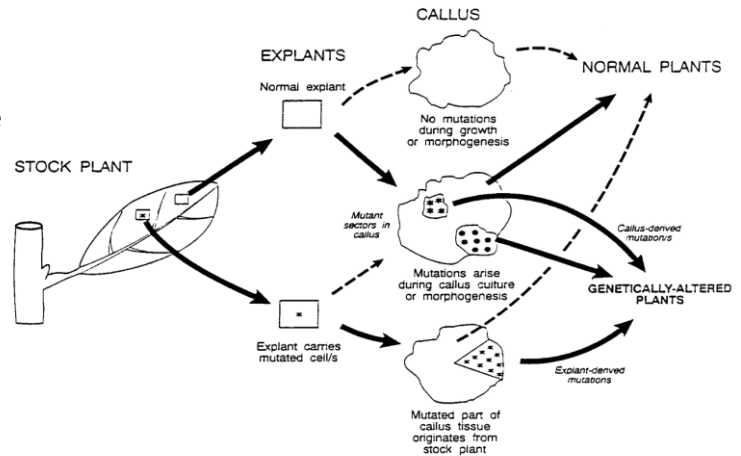


KBT5

Somaklonska varijabilnost

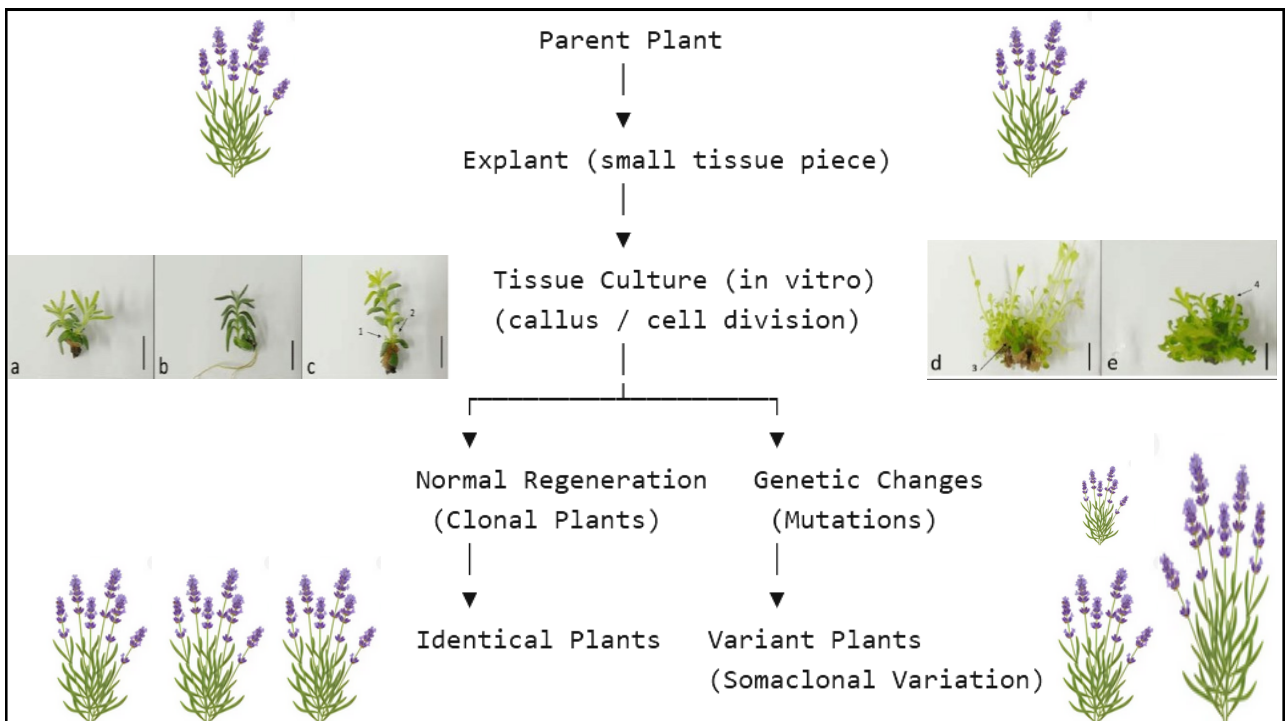
Somaklonska varijabilnost

- ❑ Diferencirane stanice često pokazuju citološke i genetičke promjene koje ne uzrokuju abnormalnosti tkiva i biljnog organizma, osim ukoliko do promjena ne dođe u zametnom sloju.
- ❑ Ako se tijekom uzgoja tkiva u kulturi promijenjene stanice podvrgnu dediferencijaciji i daljnjoj rediferencijaciji u izdanak ili somatski embrij regenerirane biljke neće biti klon matične biljke, već će se regenerirati SOMAKLONOVI.

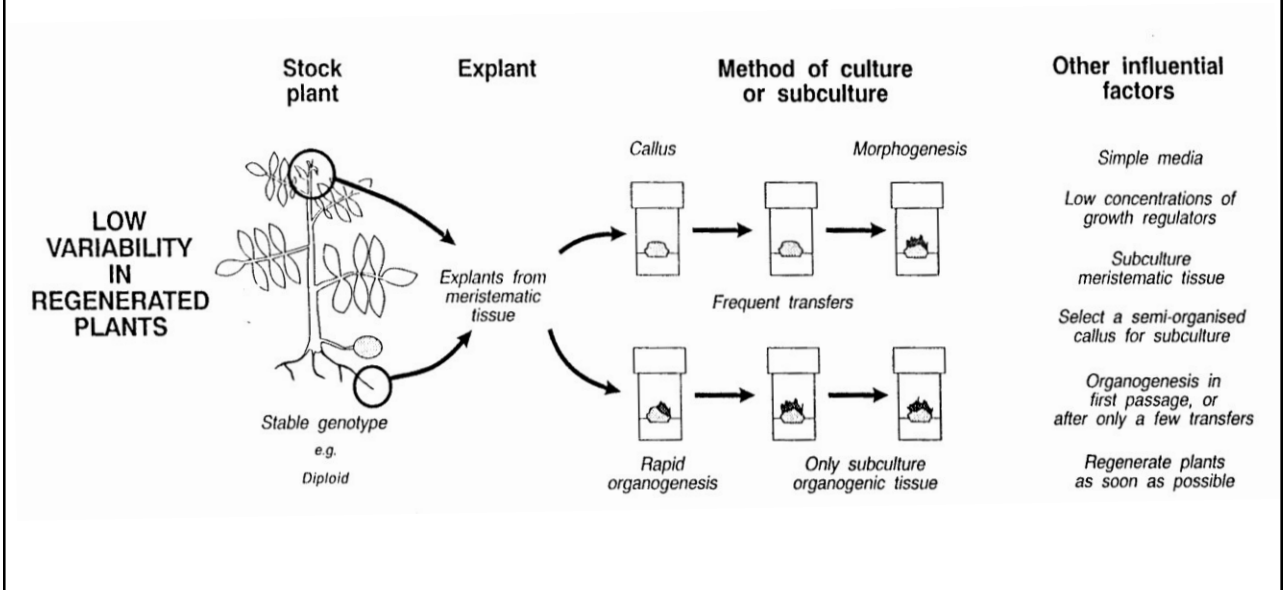


Sources of genetic variation in plants obtained through organogenesis in callus cultures. Events shown by broken lines occur less frequently.

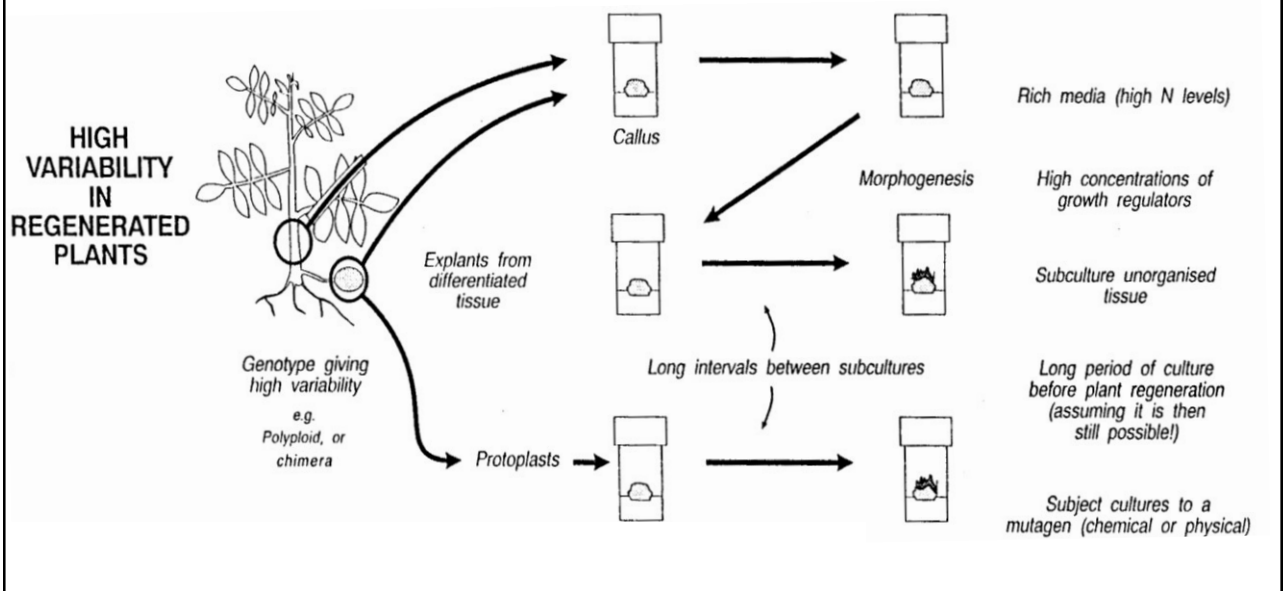
Somaklonska varijabilnost = varijacije u biljkama koje su proizvedene kulturom biljnog tkiva, a mogu biti genetičke ili epigenetičke prirode.



Genetička varijabilnosti regeneriranih biljaka



Genetička varijabilnosti regeneriranih biljaka



Somaklonska varijabilnost

Uzroci:

- Početni materijal ima mutaciju
- Vrsta tkiva koje se koristi za kulturu
- Metode vegetativnog razmnožavanja
- Upotreba regulatora rasta
- Broj supkultura



Mutacije također proizlaze iz procesa kulture tkiva: tijekom ranjavanja (rezanja eksplantata), tijekom sterilizacije, zbog ne prirodnog okoliša, neravnoteža komponenti medija kao što je visoka koncentracija regulatora rasta i dodatak šećera kao nadomjestka fotosinteze, svjetlosnih uvjeta, poremećenog odnosa visoke vlažnosti i transpiracije.

Somaklonska varijabilnost

- Nedostatak u metodama klonskog umnažanja
- Prednost u metodama oplemenjivanja

Somaklonsku varijabilnost potiču:

Dodatak
regulatora
rasta

- 2,4-diclorofenoksi octena kiselina (2,4-D)
- naftalene octena kiselina (NAA)
- BAP (6-benzilaminopurin)
- Sintetski derivati fenil ureae (4-CPPU, PBU and 2,3-MDPU)

Vrijeme
u kulturi
in vitro

- Ukoliko se (neorganizirano) tkivo dugo supkultivira ili su pasaže duge vjerojatnost somaklonske varijabilnosti je veća

Tip
eksplantata

- Upotreba eksplantata s terminalno diferenciranim stanicama, subkultivacija neorganiziranog kalusa

Somaklonska varijabilnost

Genetičke (Nasljedne promjene)

- Već postojeće varijacije u somatskim stanicama eksplantata
- Uzrokovane metodama *in vitro* kultivacije
- Uzrokovane mutagenima

Uzrokuju aneuploidiju, rearanžmane kromosoma, delecije i supstitucije baza u DNA. To dovodi do promjene u strukturi gena i posljedično može uzrokovati promjene, gubitak ili povećanu količinu proteina; ili promjene u građi, aktivnosti ili afinitetu proteina

Epigenetičke (Nenasljedne promjene)

- Varijacije prisutne tijekom kulture
- Uzrokuju privremenu promjenu fenotipa (plastičnost)
- Promjenjive, mogu doprinijeti mutacijama



Npr. Promijene u metilaciji DNA

Promijenjena metilacija utječe na razinu ekspresije gena i može utjecati na dostupnost količine proteina, ali i na kvalitetu proteina (alternativno izrezivanje introna)

Epigenetičke promijene mogu dovesti do genetičkih promjena (demetilacija transpozona može uzrokovati njihovu aktivaciju i rearanžman unutar genoma)

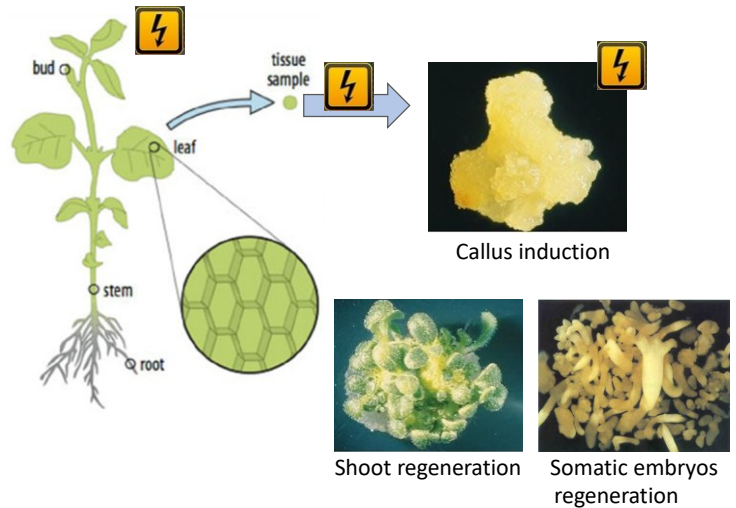
PROMJENE U METILACIJI DNA UTJEČU NA GENSKU EKSPRESIJU I MOGU POTAKNUTI MUTACIJE

- Kod biljaka metilacija u CG, CHG i CHH slijedu (H=A, T ili G). CG i CHG su simetrične i prilikom replikacije se održavaju. CHH se neprekidno uvodi *de novo*
- Enzimi demetilaze mogu ukloniti metilirane nukleotide, no metilaze mogu ponovo metilirati iste pozicije (reverzibilni proces)
- Promjene metilacije utječu na građu kromatina i dostupnost za transkripciju
 - Metilacija promotora najčešće dovodi do utišavanja ekspresije gena dok metilacija u kodirajućoj regiji može pojačati ekspresiju gena i česta je kod konstitutivnih gena
 - Metilacija sprečava transkripciju i aktivaciju transpozonskih elemenata. Uslijed demetilacije transpozoni se aktiviraju i premještaju unutar genoma što uzrokuje mutacije
 - Metilirana DNA je u heterokromatinu u kojem dolazi do kasne replikacije što može uzrokovati kromosomske lomove
 - Deaminacijom metil citozina nastaje timidin: mismech mutacija!

Mutacije se mogu izazvati – poželjne u oplemenjivanju

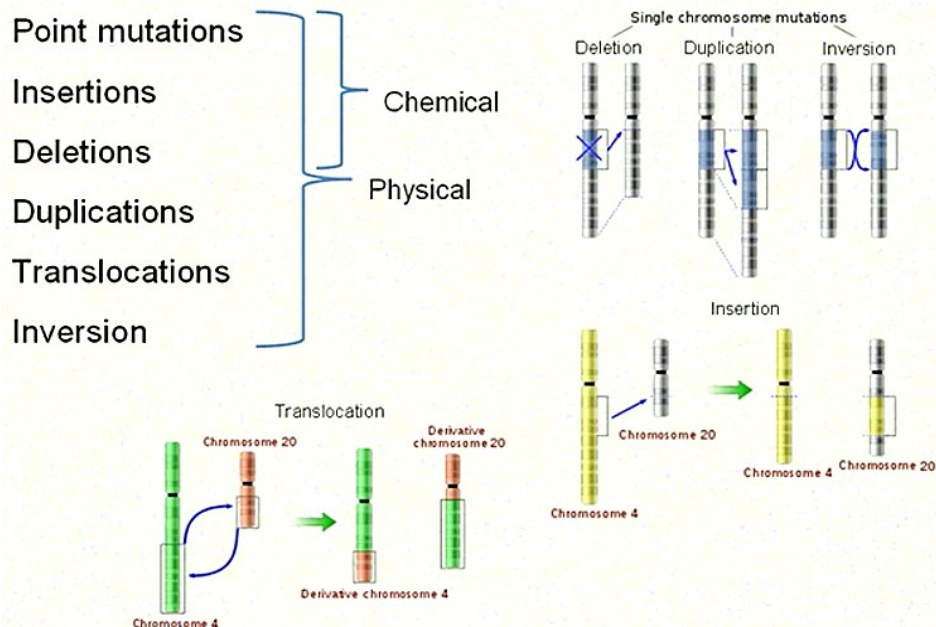
Vrste mutagena koji se koriste

- **Kemijski:** Sredstva za alkiliranje (MMS, EMS, MNU, ENU), natrijev azid, itd.
-tretman: biljni materijal potopiti u kemikaliju na određeno vrijeme
- **Fizikalni:** Ionizirajuće zračenje (gama zrake, X-zrake, brzi neutroni, ionizirajuće zračenje), UV svjetlo
-tretman: izložiti biljni materijal adekvatnoj dozi
- **Uvjeti/metode uzgoja u kulturi tkiva**
- **Metode editiranja genoma**

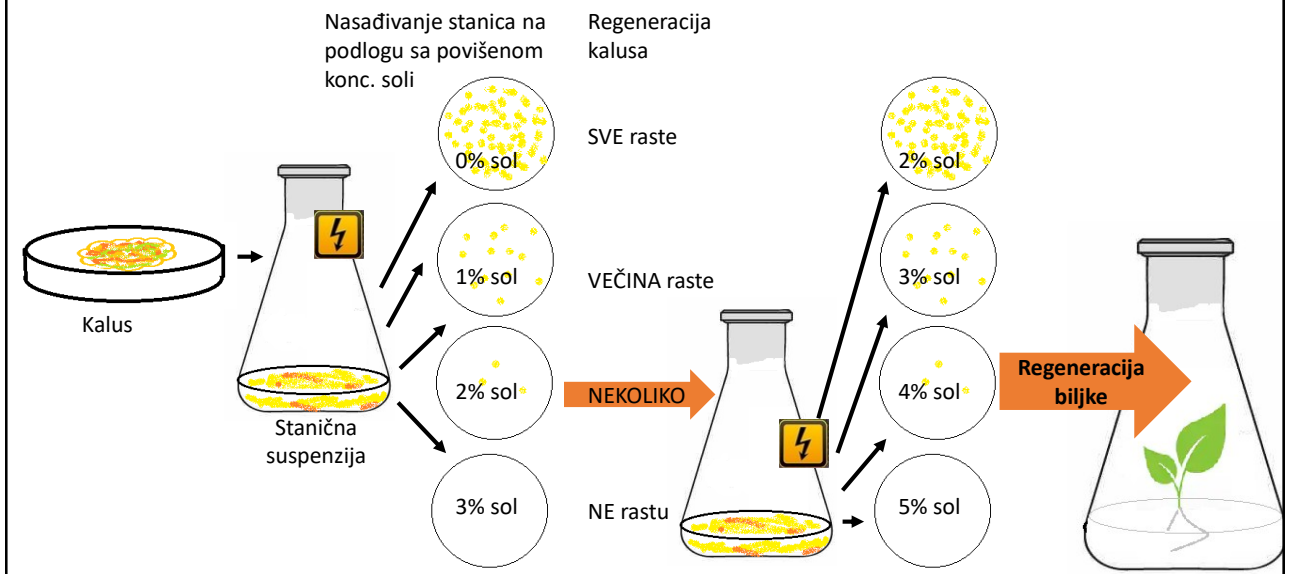


Inducirane varijacije: somaklonovi

Mutageni i vrste mutacija

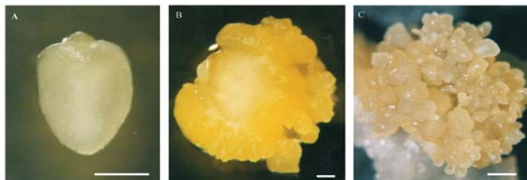


Oplemenjivanje somaklonskom varijabilnosti - npr. dobivanje biljaka otpornih na povišenu koncentraciju soli



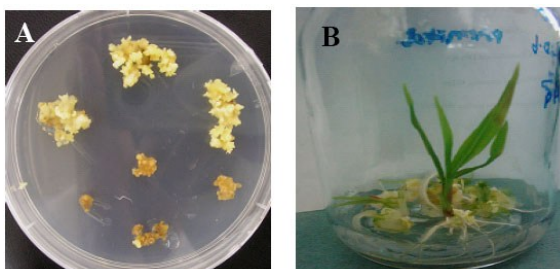
Indukcija somaklonske varijabilnosti – npr. dobivanje biljaka otpornih na sušu

Indukcija kalusa



Selekcija otpornih somaklonova.

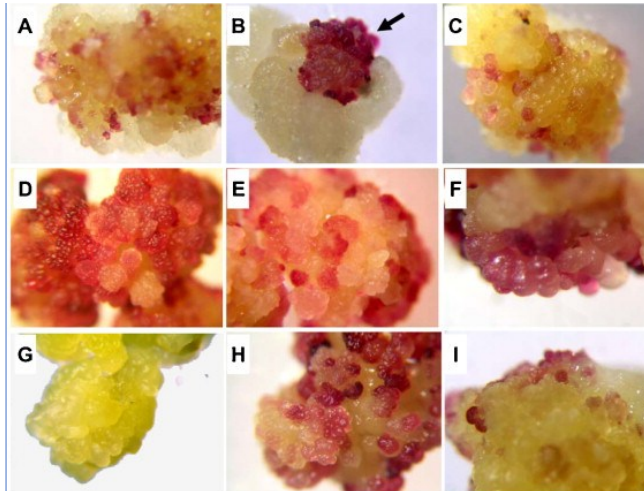
Hranjivi medij s manitolom (veliki osmotski potencijal).



Indukcija somaklonske varijabilnosti – npr. Indukcija sinteze sekundarnih metabolita

Indukcija kalusa s 2,4-D.

Selekcija protokalusa s najvećom sintezom željenog metabolita.



Disease Resistant Success using Somaclonal Variation

Crop	Pathogen	Toxin
Alfalfa	Colletotrichum sp.	Culture filtrate
Banana	Fusarium sp.	Fusaric acid
Coffee	Colletotrichum sp.	Partially purified culture filtrate
Maize	Helminthosporium maydis	T-toxin
Oat*	Helminthosporium victoriae	Victorin
Oilseed Rape*	Phoma lingam	Culture filtrate
Peach	Xanthomonas sp.	Culture filtrate
Potato**	Phytophthora infestans	Culture filtrate
Rice*	Xanthomonas oryzae	Culture filtrate
Sugarcane**	Helminthosporium sp.	Culture filtrate
Sugarcane**	Helminthosporium sachari	Partially purified HS toxin
Tobacco*	Pseudomonas tabaci	Methionine-sulfoximine
Tobacco*	Alternaria alternata	Partially purified toxin

*Shown to be heritable through sexual propagation

**Shown to be stable through vegetative propagation

Somaklonsko/mutacijsko oplemenjivanje (sjeme i klijanci *in vivo*)

Općenito/Klasično:

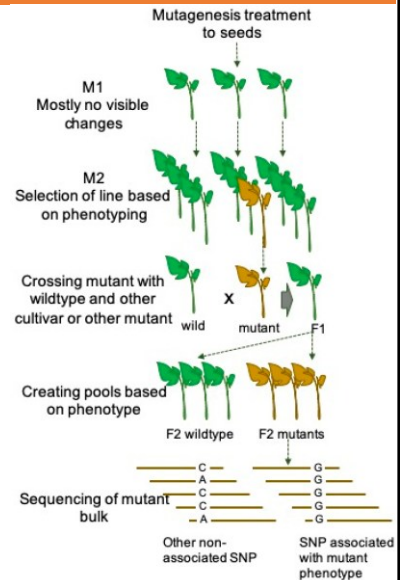
- Tretman sjemenki s mutagenom
- 50% ubijeno
- Rast M1 generacije
- Detekcija dominantnih mutacija je moguća ali ih je većina recesivnih....
 - Recesivne mutacije lako vidljive kod haploida!
- Rast M2 generacije
- Analiza mutanata i dokaz stabilnosti mutacije
- M3, M4,... M8=homozigoti za mutaciju

Prednosti:

- Rad sa velikom populacijom biljaka (ili stanica)

Nedostaci:

- Mnoge mutacije nisu nasljedne
- **Uz željene promjene događaju se i neplanirane mutacije - potreba za povratnim križanjima**
- Zahtjev za dominantnim mutacijama (ili dvostrukim recesivnim)



Indukcija somaklonskih varijanti

Otpornost na patogene

- Patogen ili toksin odgovoran za bolest može se koristiti kao selekcijsko sredstvo tijekom kulture.

Otpornost na herbicide

- Uzgoj stanica i regenerirane biljke na podlozi s dodatkom herbicida

Otpornost na okolišni stres

- Selekcija staničnih linija s visokom otpornošću na sol
- Selekcija staničnih linija otpornih na preplavlivanje i sušu
- Selekcija staničnih linija otpornih na temperaturni stres
- Selekcija biljaka otpornih na toksičnost minerala (uglavnom na toksičnost aluminija)

Povećani prinos: osobito za usjeve

Poboljšana kvaliteta: nutritivni sadržaj, okus i boja za voće i povrće

<i>Triticum aestivum</i>	NaCl (2.5, 5, 10 or 15 g/l NaCl)	Salt stress	Zair <i>et al.</i> 2003
<i>Solanum tuberosum</i>	NaCl (direct selection 60, 90, 120, 150, 300 or 450 mM)	Salt stress	Ochatt <i>et al.</i> 1999
<i>Solanum tuberosum</i>	NaCl (50, 100, 150 or 200 mM NaCl)	Salt stress	Queirós <i>et al.</i> 2007
<i>Saccharum</i> sp.	NaCl (0 or 68 mM NaCl)	Salt stress	Gandonou <i>et al.</i> 2006
<i>Nicotiana tabacum</i>	NaCl 175 mM	Salt stress	Rout <i>et al.</i> 2008
<i>Morus</i> sp.	NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00% NaCl)	Salt stress	Vijayan <i>et al.</i> 2003
<i>Medicago sativa</i>	NaCl (screened on 0-350 mol m ⁻³ NaCl finally 250 mmol m ⁻³ used further analysis)	Salt stress	Safarnejad <i>et al.</i> 1996
<i>Lycopersicon esculentum</i>	NaCl (raised from 0 to 15, 30 and finally 50 mM NaCl)	Salt stress	Kripky <i>et al.</i> 2001
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	NaCl and hydroxyproline (<i>in vitro</i> 350 mM and <i>in vivo</i> 550 mM NaCl; <i>in vitro</i> 3 mM and <i>in vivo</i> 10 mM hydroxyproline)	Frost and salt	Fuller <i>et al.</i> 2006
Winter barley	Hydroxyproline (10-20 mM)	Frost	Tantau <i>et al.</i> 2004
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.)	NaCl (300 mM)	Salt stress	Patnaik and Debata 1997
<i>Oryza sativa</i>	Al (0, 250, 500, 7500, 1000, 1250, 1500, 2000 µM of Al)	Aluminium	Jan <i>et al.</i> 1997
<i>Oryza sativa</i>	Al (0, 30 and 60 ppm of Al in the form of Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O)	Aluminium	Roy and Mandal 2005
			Penna <i>et al.</i> 2012

Analiza somaklonskih varijanti

Analiza morfoloških karakteristika

- Kvalitativni kriteriji: veličina biljke, veličina i oblik listova, razdoblje do cvatnje, boja i oblik cvjetova...
- Kvantitativni kriteriji: prinos biomase, prinos cvjetova, sjemenki, vrijednih metabolita...

Detekcija promjena na citološkoj razini

- Analiza staničnih dioba
- Analiza ploidnosti i detekcija kromosomskih promjena/rearanžmana

Analiza genoma

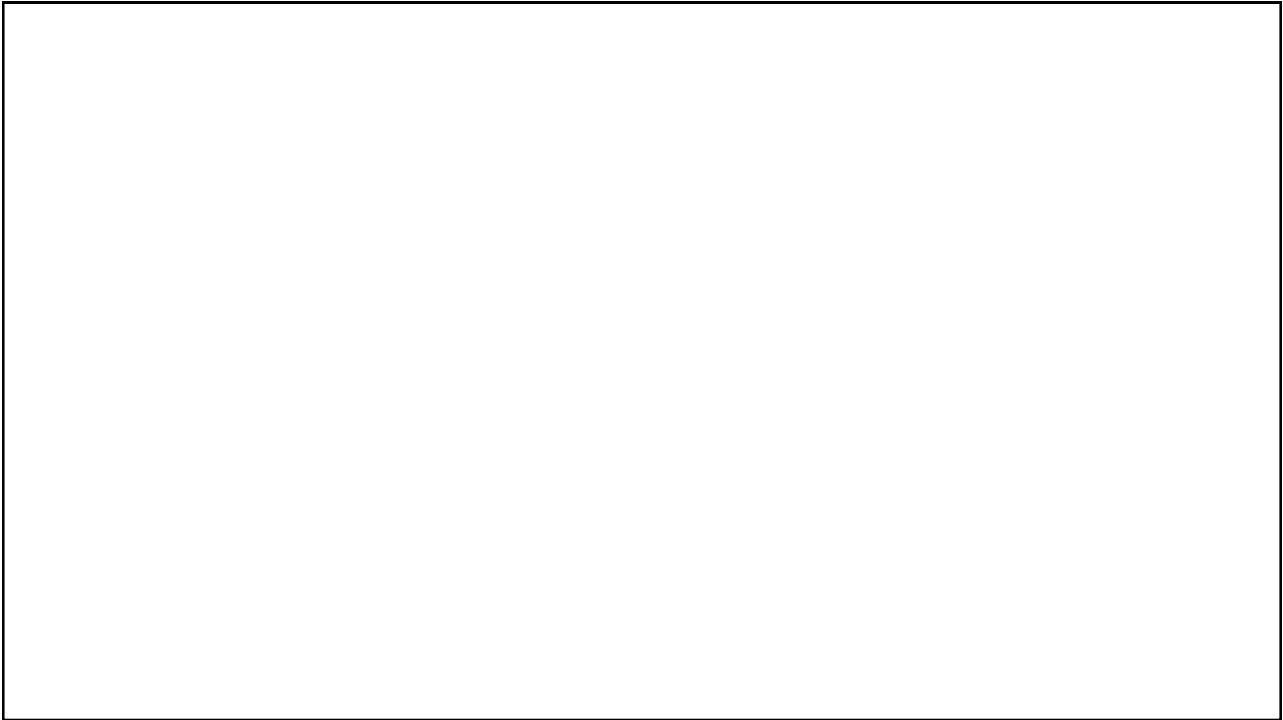
- Mjerenje količine DNA po stanici (protočna citometrija)
- DNA markeri: RFLP, RAPD

Analiza makromolekula i metabolita

- Promjena koncentracije enzima, proteina i drugih molekula poput pigmenata, alkaloida i aminokiselina

Common name	Species	Source of variation	Detection method
Tea	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	Embryogenic culture, genotype	RFLP, RAPD, microsatellite markers
Lemon	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm	Callus culture, gamma-rays	Chromosome count, RAPD
Coffee	<i>Coffea arabica</i> L.	Embryogenic culture	AFLP
Lemmon grass	<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nees ex Steud.) Will. Watson	Callus culture, 2,4-D, number of subcultures	RAPD
Jamrosa	<i>Cymbopogon</i> hybrid	Callus culture, 2,4-D	Morphology, RAPD
Strawberry	<i>Fragaria</i> L.	6-benzylaminopurine	Morphology, RAPD
Soybean	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Embryogenic culture, 2,4-D	RAPD
Cotton	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Callus culture, 2,4-D + kinetin, duration in culture	Chromosome count, RAPD, microsatellite markers
Wild barley	<i>Hordeum brevisubulatum</i> (Trin.) Link	Callus culture	Sequence-specific amplification polymorphism (S-SAP), AFLP, MSAP
Barley	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Callus culture	Inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), microsatellite markers





Biljna biotehnologija

Kultura biljnoga tkiva i stanica + tehnike
rekombinantne DNA (genetičko inženjerstvo)

CILJ: poboljšanje nasljedne osnove u smislu veće proizvodnosti

- Ogroman napredak u molekularnoj biologiji biljaka
- Omogućava razumijevanje osnovnih razvojnih procesa, tkivno-specifične ekspresije te transkripcijskih i translacijskih čimbenika koji utječu na različitu gensku ekspresiju u biljaka.

Povijesni pregled

1911. *Agrobacterium tumefaciens* izaziva "crown-gall"

1974. Plazmid **Ti** (tumor inducirajući)

1977. T-DNA prijenos u biljne stanice

1982. Transformirane biljke duhana

1984. Višestruki vektorski sustavi

1985-86. ekspresija poljoprivredno korisnih svojstava: otpornost na viruse, na kukce, na herbicide

1996. Tržišna proizvodnja transgeničnih poljoprivrednih kultura

Genetičke manipulacije biljaka u istraživanjima i proizvodnji GMO

- Pojačana ekspresija transgena
- Utišavanje endogenog gena
- Uništavanje (eliminacija ekspresije) endogenog gena
- Dodavanje privjeska (*eng. TAG*) endogenom proteinu
- Istraživanje aktivnosti promotora endogenog gena

Najčešće komercijalne GMO biljke



Glavna pitanja:

1. Kako nastaju transgenične biljke?
2. Koji su ciljevi biotehnoških tvrtki povezani s GMO?
3. Koji su rizici, a koja važnost?

Unos DNA

A. Metode unosa DNA

- I. *Agrobacterium tumefaciens* (prirodni patogen)
 - Ti plasmid odgovoran za infektivnost i transformaciju pomoću Agrobakterija
 - *In planta* transformacija
- II. Direktni unos DNA
 - a. bombardiranje mikroprojektilima (biolistic)
 - b. PEG i elektroporacija za unos DNA u protoplaste
 - c. mikroinjektiranje

B. Dva tipa transformacije

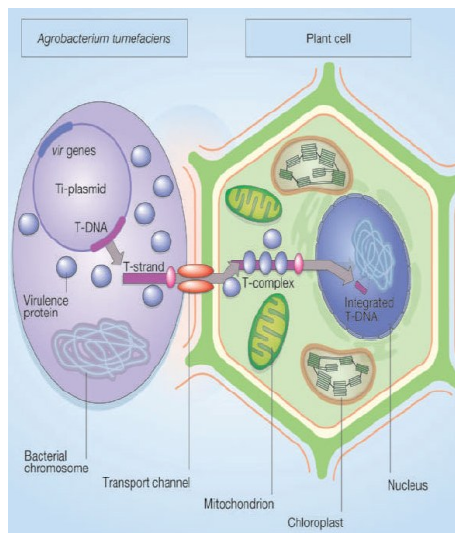
- I. Privremena transformacija
 - DNA se unosi u stanicu, ulazi u jezgru, geni se prepisuju i prevode.
 - Transgeni su aktivni iako nisu ugrađeni u kromosome
- II. Trajna transformacija
 - DNA se stabilno ugrađuje u genom (jezgru i/ili organele)

Transformacija agrobakterijama

Gram-negativna, pokretna, štapičasta bakterija iz tla.
Uzročnik tumora vrata korijena.



Neophodna *vir* regija te LB i RB



I. Transformacija posredovana Agrobakterijama –

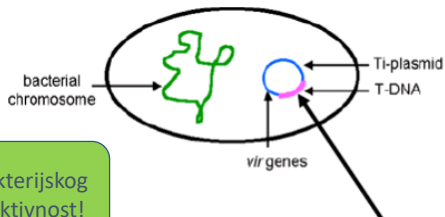
Biljni patogeni: *Agrobacterium tumefaciens* uzrokuje tumor vrata korijena (crown gall)

Agrobacterium rhizogenes uzrokuje kosmato korijenje (hairy root)

Unesena DNA integrira se u genom, replicira i nasljeđuje. Geni preneseni iz agrobakterija uzrokuje promijenjeni rast na mjestu rane.

Tri glavne grupe gena odgovorne su za transformaciju:

- (1) **T-DNA**
 - (2) **Vir geni**
 - (3) **kromosomalni geni** za virulenciju odgovorni za kemotaksiju i prihvatanje bakterija za st. stjenku biljne stanice
- smješteni na tumor inducirajućem plazmidu (*Ti*) plazmid (~180 kb)



Važnost bakterijskog soja za infektivnost!

Važnost *Ti* plazmida za infektivnost!

T-DNA gets inserted into plant chromosomes

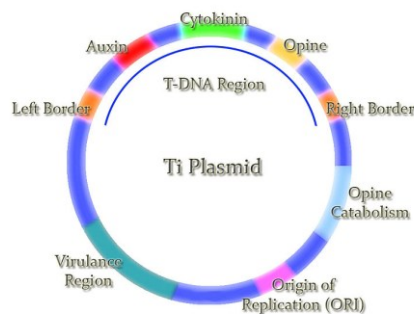
1. Prirodni, divlji tip Ti plazmida

- Ti plazmid sudjeluje u infekciji i transformaciji
- Ti plazmid sadrži regiju virulencije “vir” u kojoj su vir geni, čiji produkti posreduju pri infekciji, nakon aktivacije *vir* gena slijedi ekscizija T-DNA i transport u biljnu stanicu, te integracija T-DNA u genom biljke
- *Vir* regija je neophodna za transformaciju biljaka posredstvom agrobakterija

Samo se 1/10 plazmida Ti integrira u DNA biljne stanice taj se dio zove prijenosna ili transfer **T-DNA**

- T-DNA sadrži gene za sintezu opina i stvaranje tumora (biosinteza auksina i citokinina)
- **Jedino granični dijelovi T-DNA (25 pb) su neophodni za transformaciju, geni unutar lijeve i desne granice se mogu izbaciti i/ili promijeniti**

Divlji tip agrobakterija

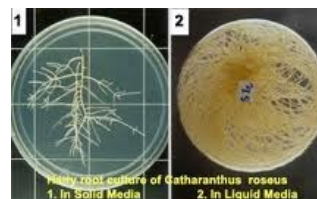


Agrobacterium tumefaciens: Ti
- oktopinski (TL i TR DNA),
nopalinski i agopinski

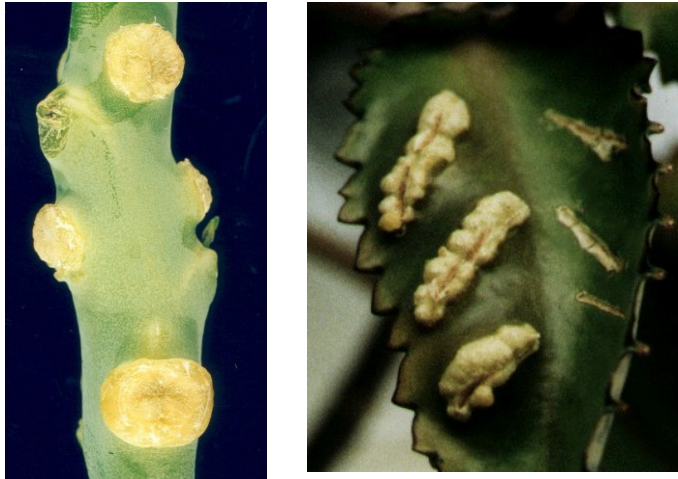
CROWN GALL
Tumor vrata korijena



Agrobacterium rhizogenes: Ri
- manopinski i agropinski



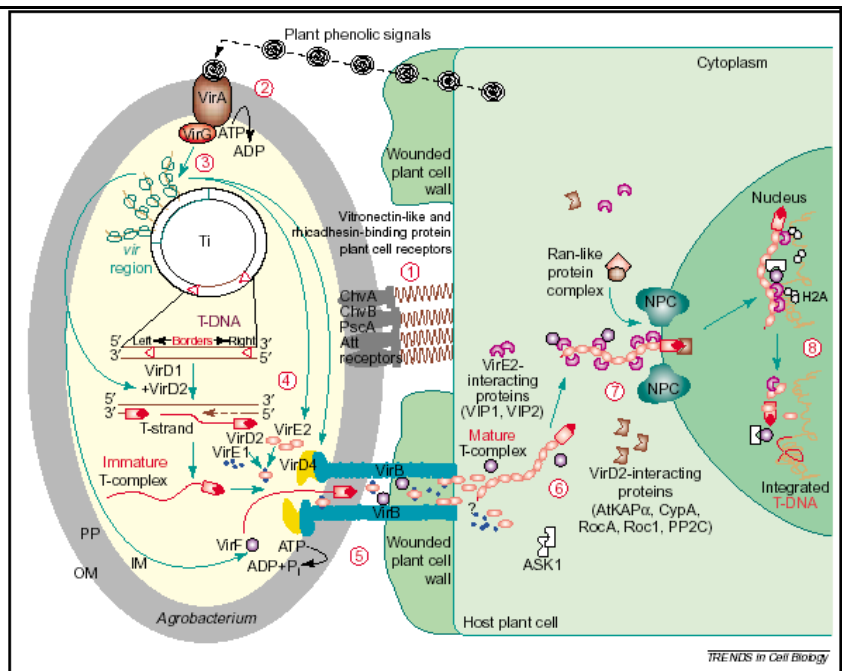
HAIRY ROOTS (Kosmato korijenje)



- Agrobakterije potiču proliferaciju biljnih stanica (zbog sinteze citokinina i auksina), te biljne stanice sintetiziraju opine.
- Opine kataboliziraju bakterije koje rastu u okolini tumora.

Infekcija i T-DNA prijenos u biljnu stanicu

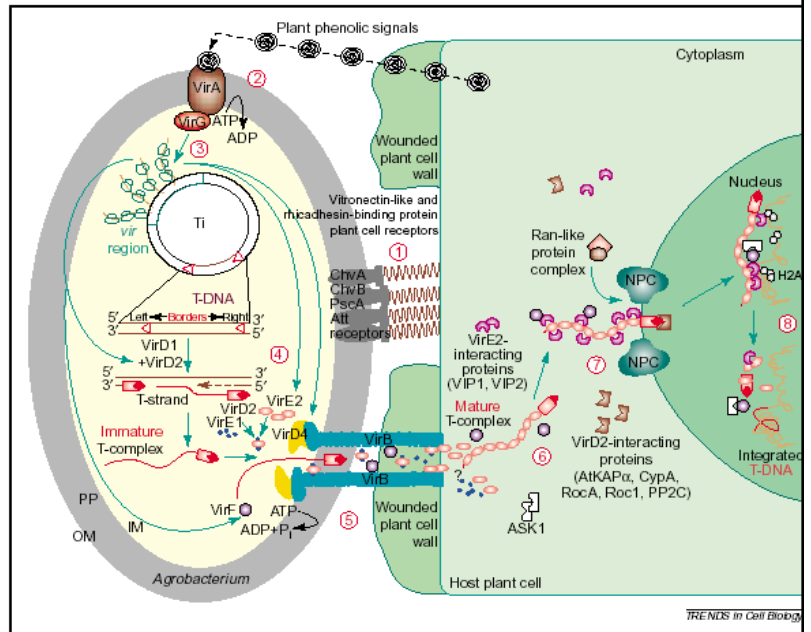
1. *Agrobacterium* prepoznaje i prihvaća se na stanicu domaćina
2. Osjet biljnih signala VirA-VirG dvokomponentnim receptorom
3. VirG posreduje signalizaciju i aktivaciju vir gena
4. Nastanak prijenosnog oblika T-DNA (VirD1 i VirD2), kompleks s Vir proteinima (VirD2 i VirE2)
5. Transport T-DNA s Vir proteinima putem VirB-VirD4



Tzfira and Citovsky (2002) Trends Cell Biol 12:121-129

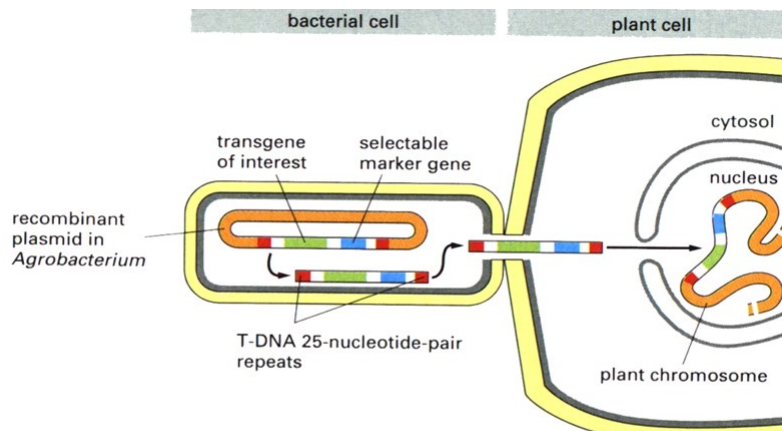
Infekcija i T-DNA prijenos u biljnu stanicu

6. Formiranje zrelog T-kompleksa, interakcija s biljnim proteinima
7. Unos T-kompleksa u jezgru biljne stanice
8. Rekombinacija i NASUMIČNA integracija T-DNA u biljni genom



Tzfira and Citovsky (2002) Trends Cell Biol 12:121-129

T-DNA se nasumično ugrađuje u biljni genom



DNA IS EXCISED FROM PLASMID AS A LINEAR MOLECULE AND IS TRANSFERRED DIRECTLY INTO THE PLANT CELL, WHERE IT BECOMES INTEGRATED INTO THE PLANT CHROMOSOME

Svaka transformirana stanica ima ugradnju na jedinstvenom mjestu (genetičke razlike među stanicama!)

Batat je prirodni GMO

PNAS

The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop

Tina Kyndt^{a,1}, Dora Quispe^{a,b,1}, Hong Zhai^c, Robert Jarret^d, Marc Ghislain^b, Qingchang Liu^c, Godelieve Gheysen^a, and Jan F. Kreuze^{b,2}

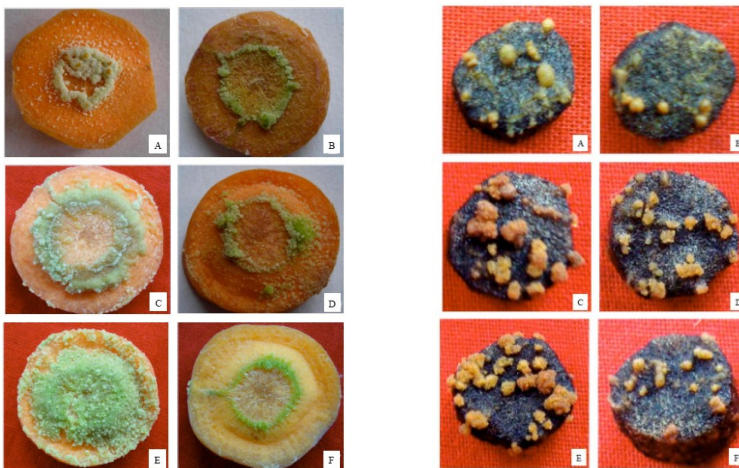
^aDepartment of Molecular Biotechnology, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium; ^bInternational Potato Center, Lima 12, Peru; ^cBeijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Laboratory of Crop Heterosis and Utilization, Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing, China, 100193; and ^dPlant Genetic Resources Unit, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Griffin, GA 30223

Edited by Eugene W. Nester, University of Washington, Seattle, WA, and approved March 16, 2015 (received for review October 13, 2014)



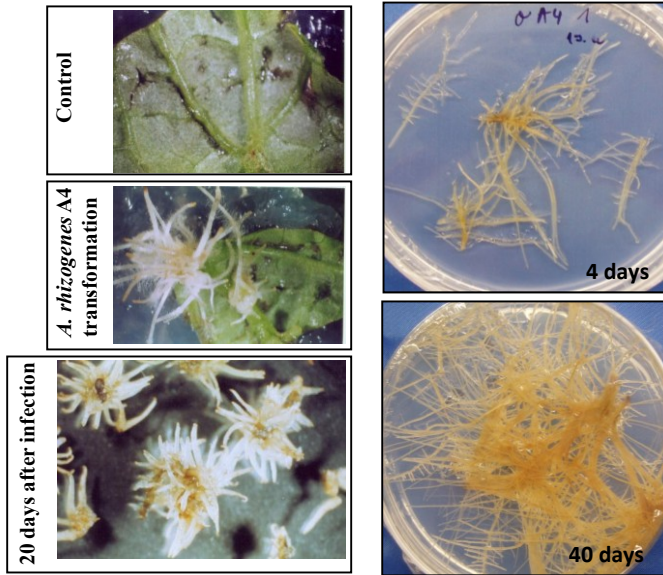
Transformacija s *Agrobacterium tumefaciens*

Tumor vrata korijena (eng. crown gall) potaknut s različitim sojevima agrobakterija na eksplantatima mrkve i krumpira



Tumorsko tkivo karakterizira brzi i dobar rast. Budući da samo sebi sintetizira hormone, nije potrebno dodavati hormone/regulatore rasta u hranjivu podlogu.

Transformacija s *Agrobacterium rhizogenes*



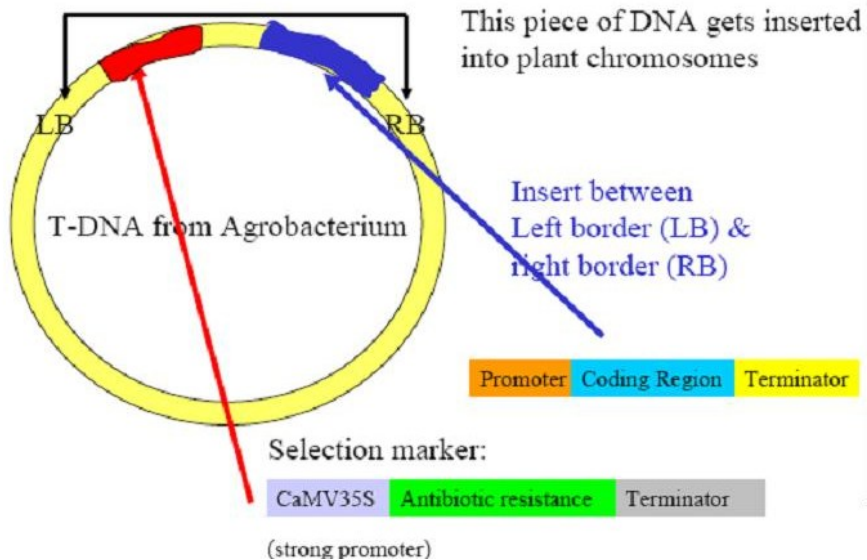
Kosmato korijenje

(eng. hairy roots)

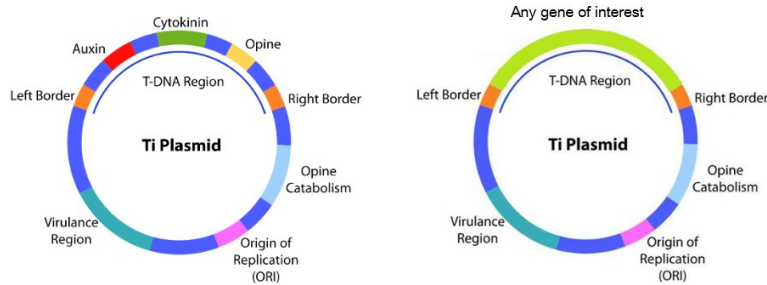
* Kosmato korijenje karakterizira brzi i dobar rast. Obično je deblje i bolje razgranato od adventivnog korijenja potaknutog regulatorima rasta. Najčešće nije potrebno dodavati hormone/regulatore rasta u hranjivu podlogu.

Geni smješteni između LB i RB regije prenose se u biljnu stanicu

Ugradnja kimernih gena u T-DNA vektor zajedno sa selekcijskim markerima

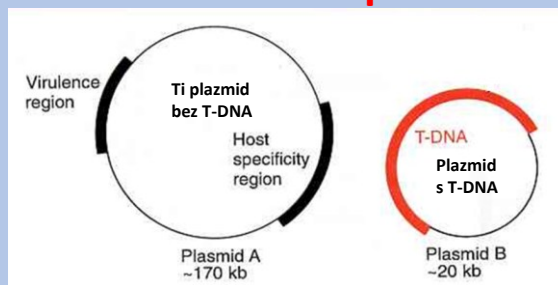


Razoružani Ti plazmidi



Primjer:
Praktikum: P19

Sustav binarnih plazmida



Primjer:
Praktikum:
sinteza betaina

**Najčešća metoda za
dobivanje GMO biljaka**

Binarni sustav vektora i razoružani Ti plazmidi

Manipulacija agrobakterijama za transformaciju biljne stanice

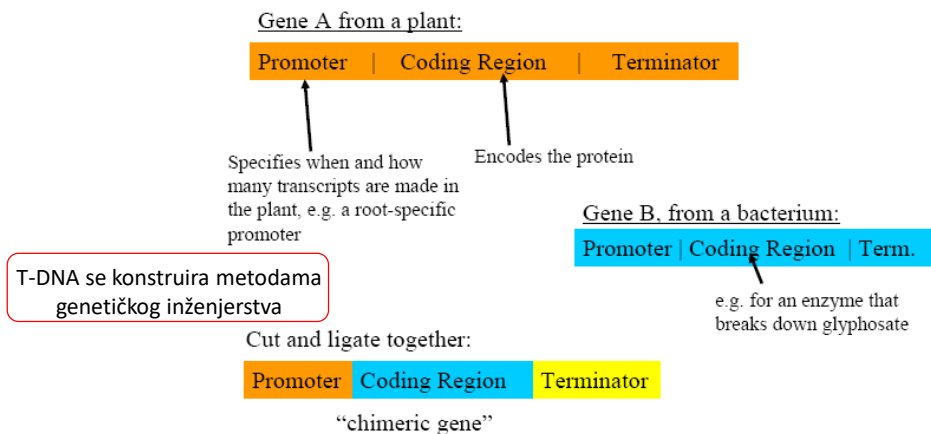
Razoružani Ti: umjesto gena za opine i regulatore rasta ugrađene su željene genske kazete

Binarni sustav: u transformaciji sudjeluju 2 plazmida (jednostavnija manipulacija!)

- Plazmid sa Vir regijom koji nema T-DNA,
- Plazmid sa T-DNA (bez gena za regulatore rasta) s odabranim genskim kazetama
 - T-DNA je u plazmidu koji se obrađuje u *E. coli*.
 - T-DNA plazmida (5 - 20 kb) sadrži: desnu i lijevu graničnu ponavljajuću sekvencu - 25 bp (left and right borders) između kojih je proizvoljna ekspresijska kazeta
 - Granice T-DNA su prepoznatljive produktima vir gena što omogućuje prijenos željenih gena u biljne stanice.

Izrada željenog konstrukta – ekspresijske kazete *promotor:gen*

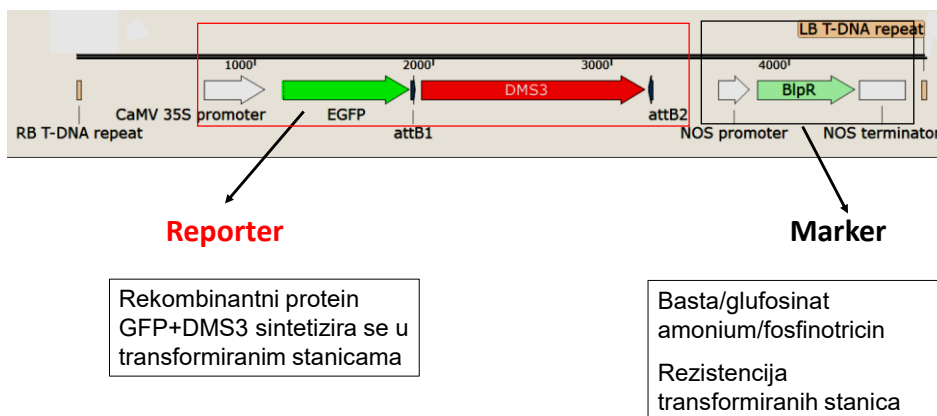
- istraživanje promotora
- istraživanje kodirajuće regije



Ekspresijska kazeta ugrađuje se u vektor

- obično više od jedne ekspresijske kazete
- npr. selektivni marker, reporter i željeni gen

Biljna ekspresijska kazeta



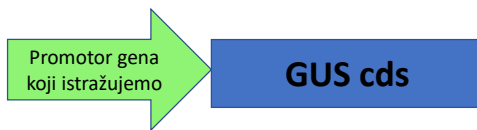
Istraživanje ekspresije gena

- Istraživanje aktivnosti promotora
- GUS (beta-glukuronidazni) reporterski sustav

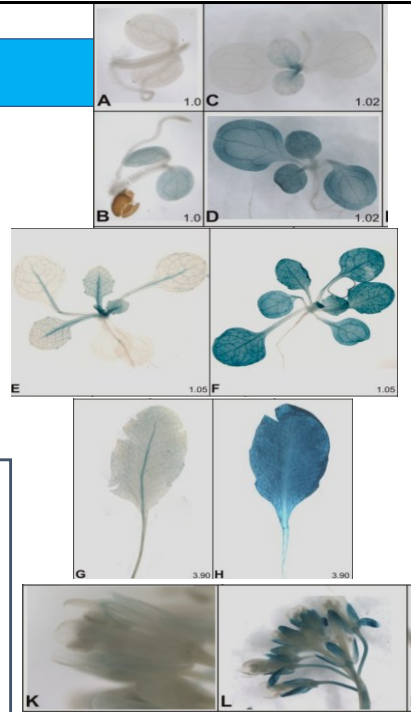
Nativni promotor:GUS

- Histokemijski se pokazuje mjesto aktivnosti određenog promotora

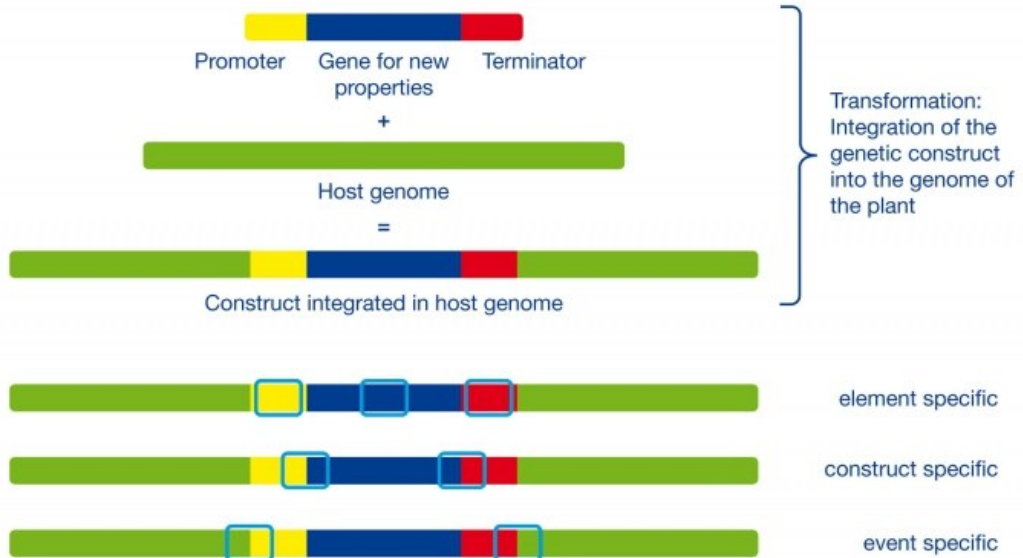
Kazeta za transformaciju:



Cds=coding DNA sequence



JEDINSTVENA UGRADNJA T-DNA U BILJNI GENOM: TRANSGENIČNE LINIJE

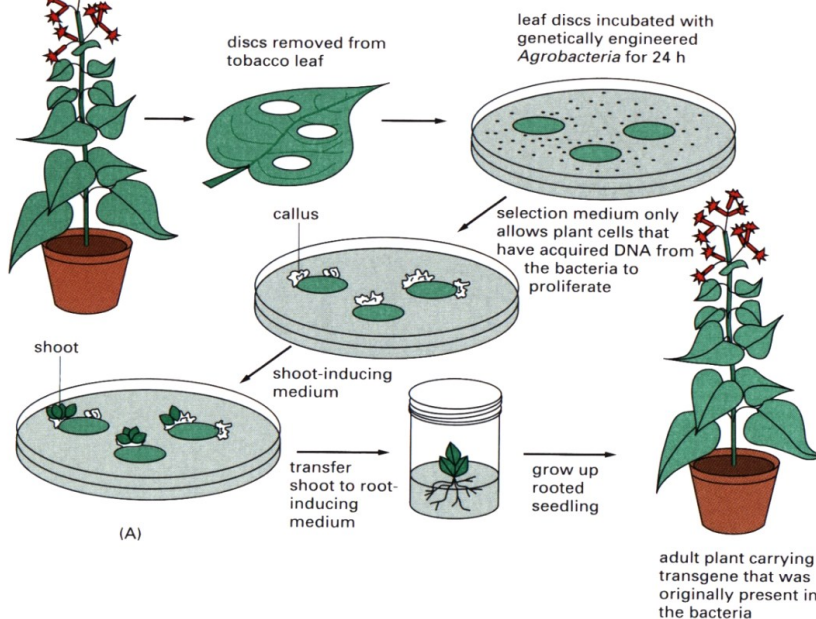


1. Kako napraviti transgeničnu biljku?

- Identifikacija gena (iz bilo kojeg organizma) koji će donijeti željeno svojstvo biljci
- Izrada konstrukta s željenim genom pod kontrolom odgovarajućeg (biljnog) promotora
- Ugradnja u odgovarajući vektor
- Transformacija biljne stanice
- Selekcija transformiranih stanica
- Regeneracija cijele biljke iz selektirane transformirane stanice

ZA USPJEŠNO DOBIVANJE GMO BILJKE POTREBAN JE DOBAR PROTOKOL ZA REGENERACIJU!

Kokultivacija biljnog tkiva i Agrobakterija

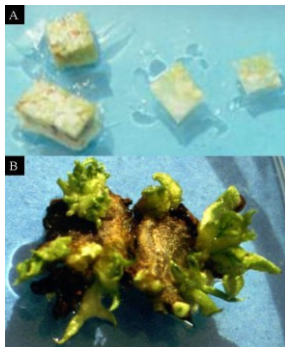




Indukcija transgenih organa

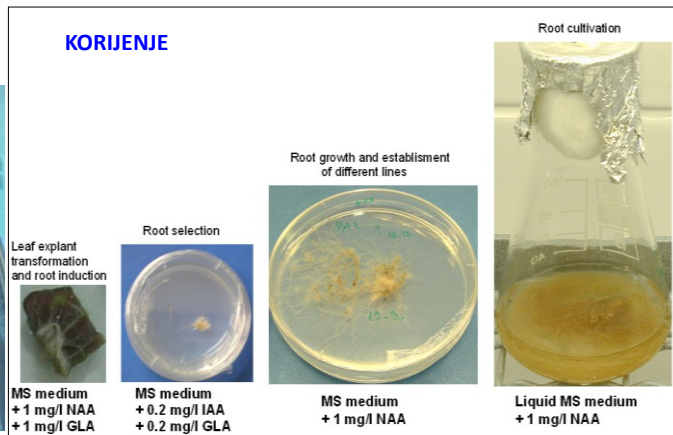
- upotreba razoružanih (bez gena za sintezu regulatora rasta) Ti plazmida
- 1. transformacija
- 2. regeneracija (organogeneza ili somatska embriogeneza)

IZDANCI



MS + 0.05 μ M NAA
+ 13.2 μ M BA

KORIJE

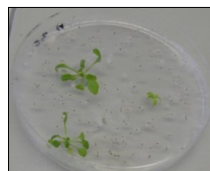


In planta (Floral dip) transformacija uročnjaka

Uročnjak *Arabidopsis thaliana*



Transformacija



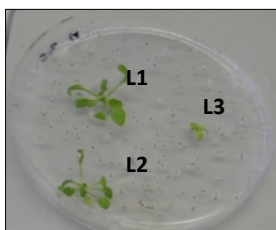
Selekcija



Uzgoj transformanata

- Cvjetne stapke s cvjetnim pupovima se inkubiraju s agrobakterijama
- Nakon T-DNA ugradnje, iz transgeničnih zigota se regenerira transgenična sjemenka
- Transgenične sjemenke se probiru na selektivnoj hranjivoj podlozi

T1 transformanti su heterozigoti i mogu imati transgen na više mjesta u genomu



L1

Činjenica: u T2 generaciji 27% sjemenki ne klije na selekcijskoj podlozi

Zaključak: insercija T-DNA na jednom mjestu u genomu (Tt x Tt= 25%TT+50%Tt+25%tt;divlji tip)

L2

Činjenica: u T2 generaciji nakon samooprašivanja 9,2% sjemenki ne klije na selekcijskoj podlozi

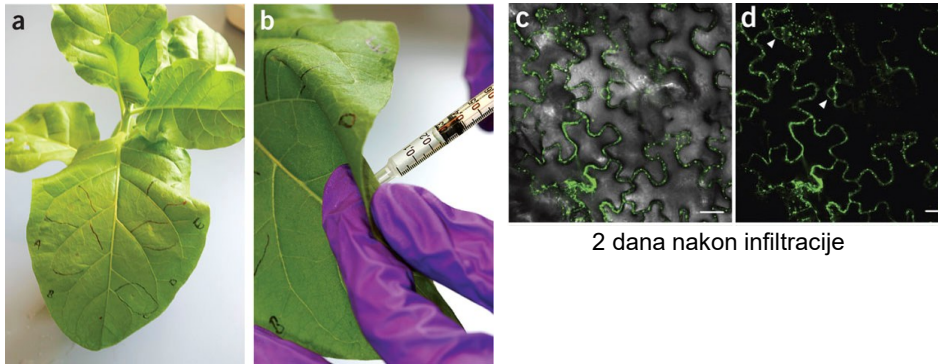
Zaključak: insercija T-DNA na dva mjesta u genomu (dihybridno križanje T1T2t1t2 genotipa)

L3

Činjenica: zakržljali rast, ne stvara sjemenke

Zaključak: ugradnja T-DNA u esencijalni gen uzrokuje poremećaj rasta

AGROINFILTRACIJA: brza, prolazna, ekspresija proteina u epidermalnim stanicama duhana *Nicotiana benthamiana*



- Infiltracija agrobakterija u listove duhana: T-DNA se prenosi u epidermalne stanice
- Nakon dva dana u stanicama su prisutni proteini inducirani s transgena