

# P6KBT

## II. Direktni unos DNA

- a. Bombardiranje mikročesticama zlata ili kositra** (0,5 do 2  $\mu\text{m}$  u promjeru) koje su obavijene s DNA i unesene u stanicu velikim brzinama. Stanice preživljavaju, dijele se i regeneriraju biljke.

\*Transport i nasumična integracija u jezgru ili ugradnja u kloroplaste homolognom rekombinacijom.

\*Razvijena zbog monokotiledona, a koristi se za sve tipove stanica/tkiva

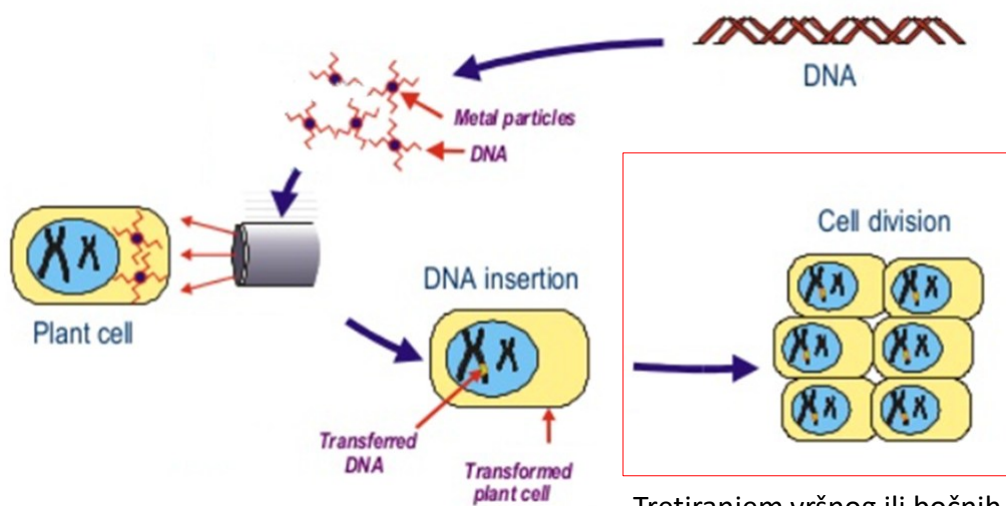
- b. Polietilen glikol (PEG) i elektroporacija** – unos DNA u protoplaste. Resinteza stanične stjenke, diobe i regeneracija.



## Helios Gene Gun



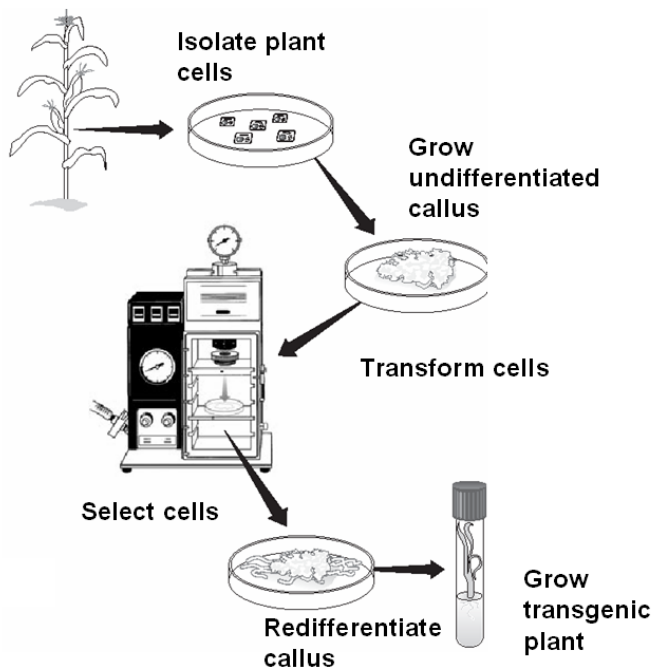
Za brzu transformaciju bez potrebe za kulturom tkiva



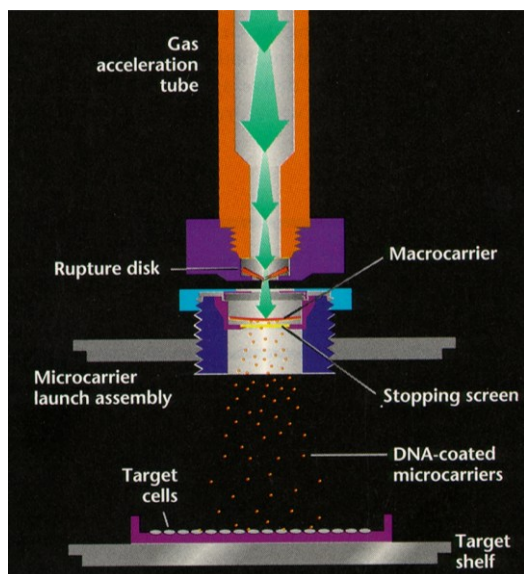
Tretiranjem vršnog ili bočnih meristema  
moguća regeneracija GMO izdanka

## Biolistik

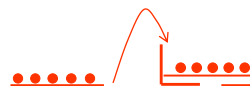
- Biolistik transformacija se koristi za biljke koje se ne mogu transformirati agrobakterijama
- Embrionalne stanice su otpornije na Agrobakterije pa je biolistik učinkovitiji za njihovu transformaciju
- Bombardiranje mikroprojektilima dovodi do kompleksne integracije DNA



## Biolistic PDS-1000 Particle Bombardment sustav

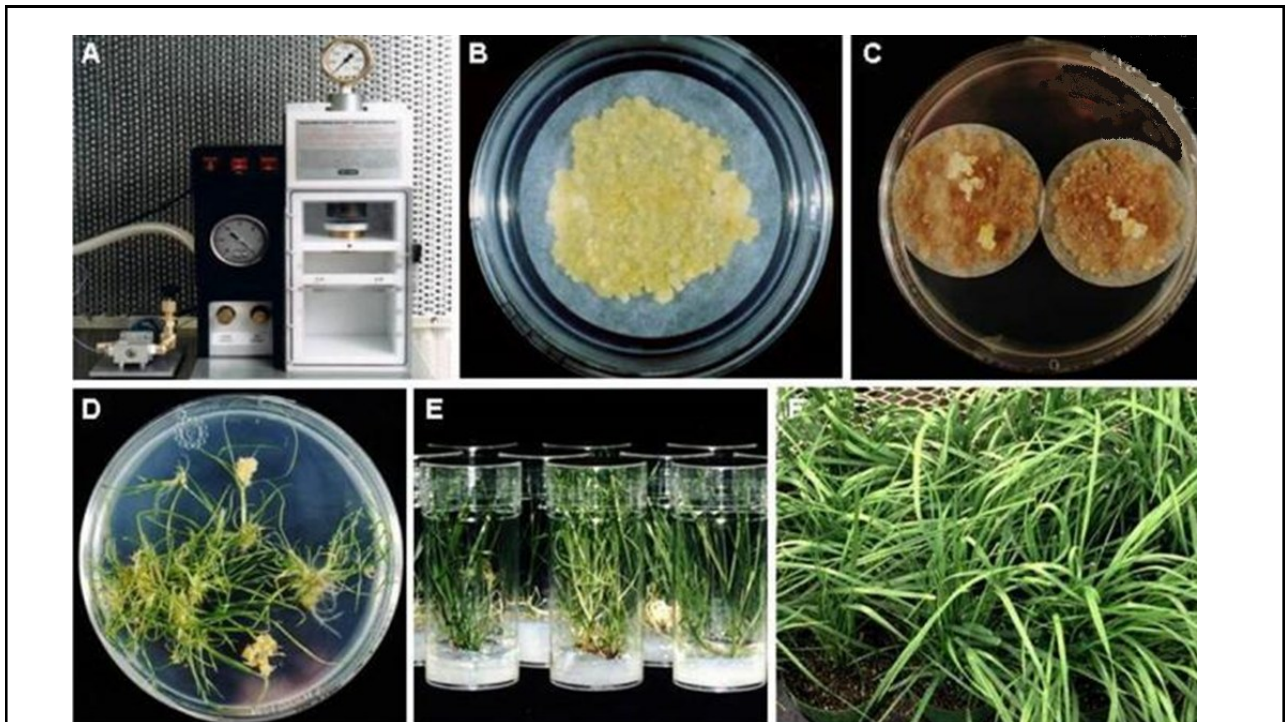


DNA coated particles



He



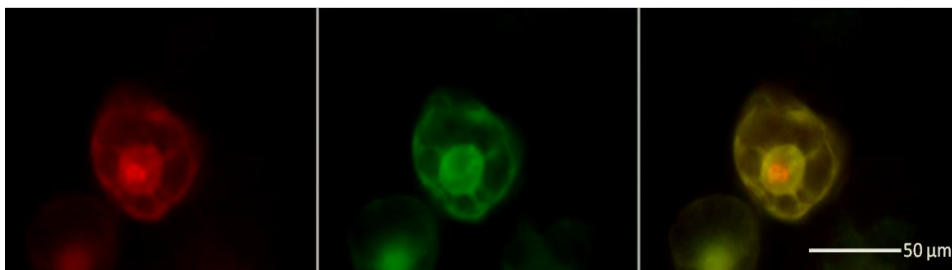


## Privremena transformacija

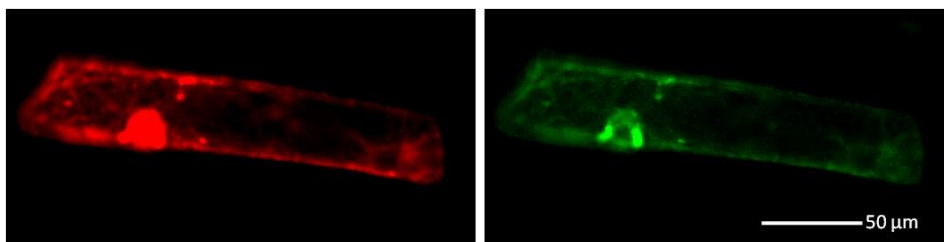
Subcelularna (ko)lokalizacija fluorescentnih proteina



BIOLISTIK TRANSFORMACIJA STANICA DUHANA BY2:

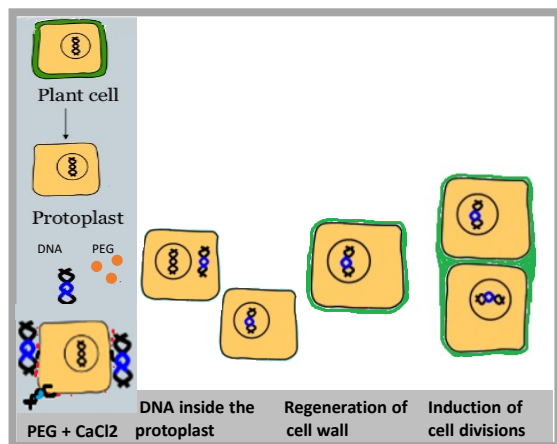


## BIOLISTIK TRANSFORMACIJA STANICA POKOŽICE LUKA

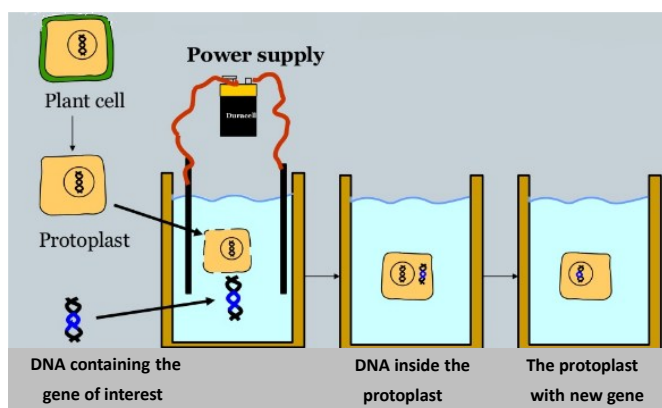


## Transformacija protoplasta

### Polietilenglikol (PEG) transformacija

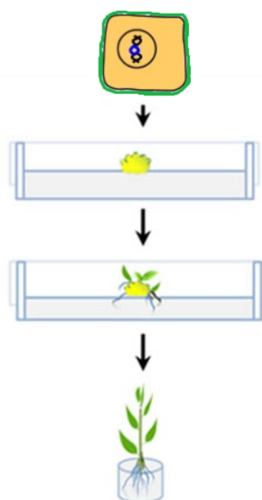


### Elektroporacija





## Regeneracija GMO biljaka nakon transformacije protoplasta

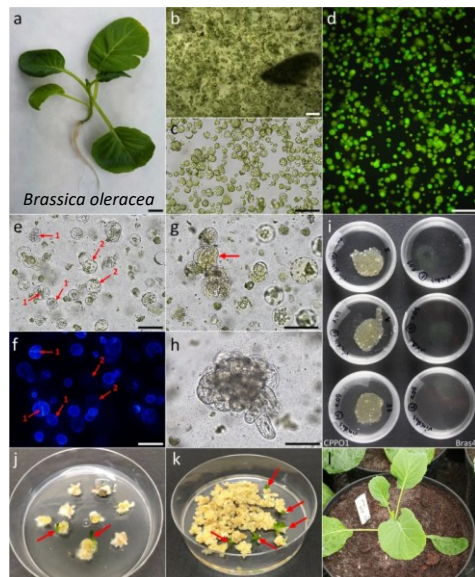


Transformacija protoplasta

Regeneracija stjenke i indukcija dioba (kalus)

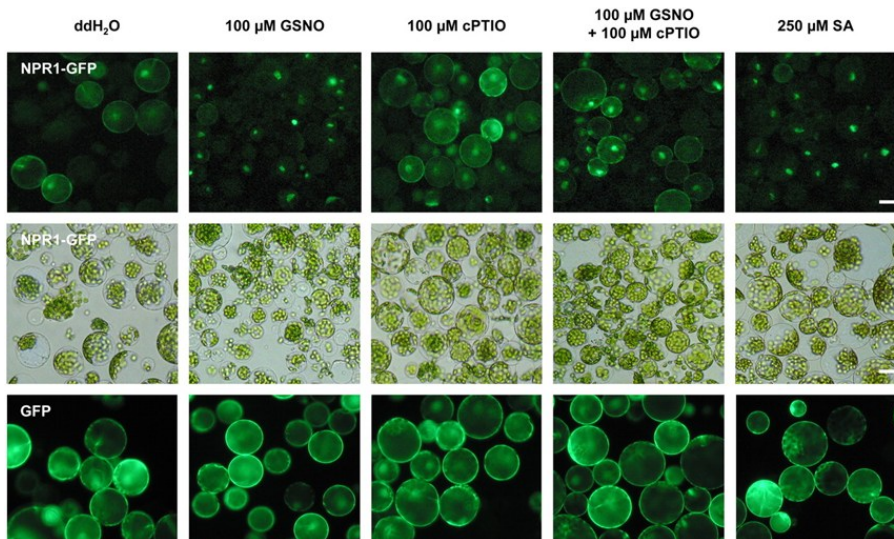
Organogeneza – indukcija izdanaka

Zakorjenjivanje i regeneracija GMO biljaka



## PRIVREMENA TRANSFORMACIJA PROTOPLASTA uročnjaka *A. thaliana* ili duhana

Protein NPR1 nakon dodatka induktora ulazi u jezgru:



## Svojstva komercijalnih GMO kultura

### 1. Modificiranje agronomskih svojstava:

- Tolerantnost na herbicide
  - Glifosat - *Roundup Ready*® ili *Roundup*
  - Glufosinat - *Liberty Link*®
- Otpornost na insekte – *Bt* kulture
  - *Bt* – *Bacillus thuringiensis* – *crystalline* – *Cry* gen
- Otpornost na viruse

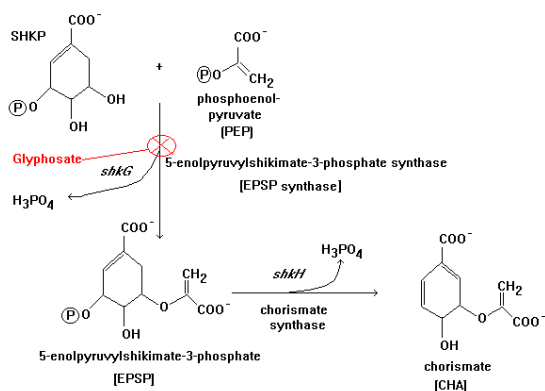
### 2. Poboljšana 'proizvodna' svojstva kulture:

- Odgođeno dozrijevanje
- Usporeno dozrijevanje
- Izmijenjeni, poboljšani sastav hranjiva

## Neki od ciljeva genetičkog inženjerstva biljaka

- Biljke s promijenjenim agronomskim svojstvima
  - rast u uvjetima suše, hladnoće, slanosti, sa smanjenim unosom hranjiva
- Biljke sa svojstvima koja olakšavaju branje plodova
- Biljke s poboljšanim prehrambenim svojstvima
  - smanjena razina alergena (pšenica, kikiriki)
  - uklonjeni nepovoljni sastojci
  - sa svojstvima koja prije nisu imala, a ne mogu se postići klasičnim oplemenjivanjem
- Biljke kao vakcine

## Rezistencija na herbicid *Roundup* (Glifosat)

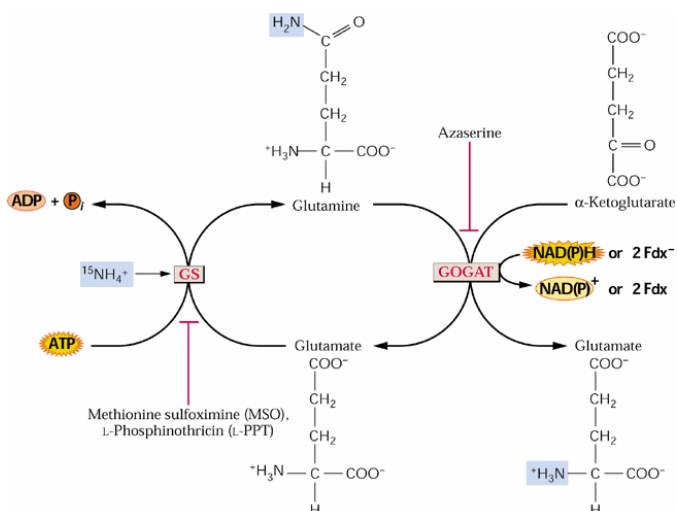


*Roundup* blokira sintezu aromatskih AK.

Rezistentne biljke imaju bakterijski EPSP enzim otporan na glifosat

## *Liberty Link*<sup>®</sup>: glufosinat amonijum / fosfinotricin / basta

- Inibira aktivnost glutamin sintaze
  - Otporne biljke degradiraju herbicid
- Blokira vezanje amonijevih iona
  - Akumulira se amonijak i smanjuje se konc. glutamina







## Zlatna riža

Nedostatak vitamina A – zdravstveni problemi

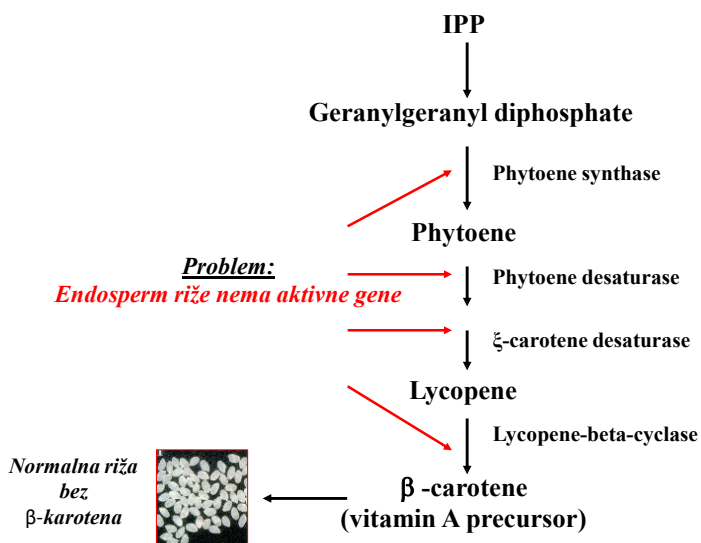
- slijepilo, ospice, smrt

>100 miliona djece pati od nedostatka vitamina A

CILJ: povećati sadržaj vitamina A u hrani



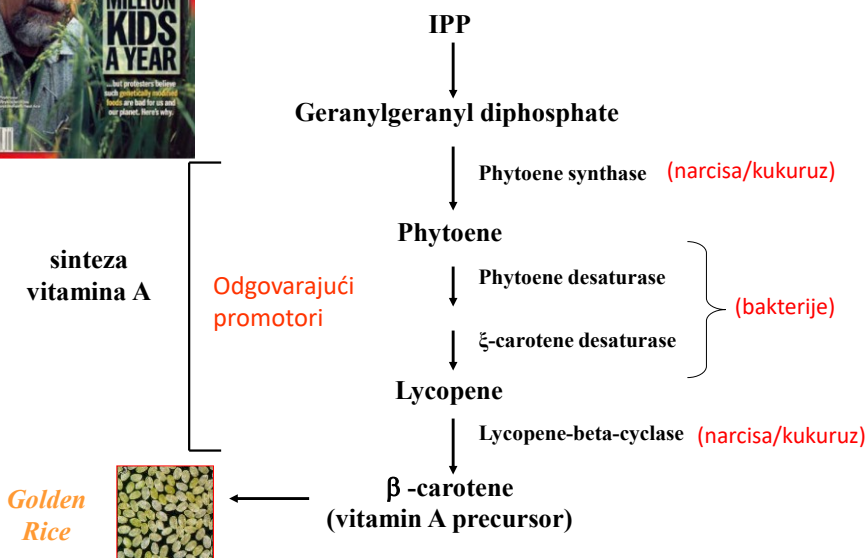
## Sinteza $\beta$ -karotena u biljaka



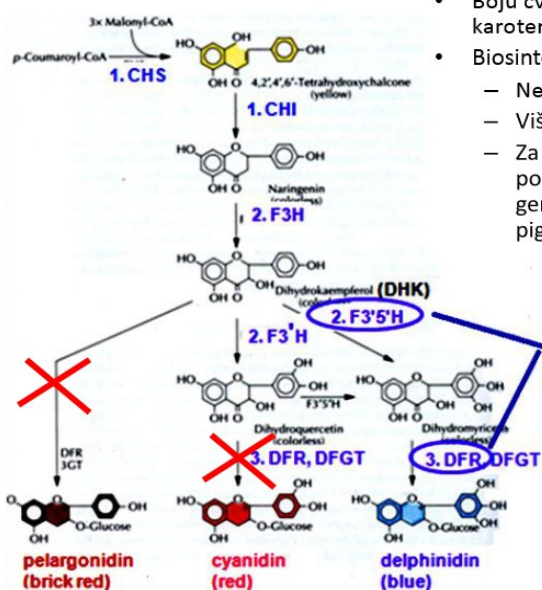


## The Golden Rice Solution

### $\beta$ -Carotene Pathway Genes Added



## Plava boja cvjetova

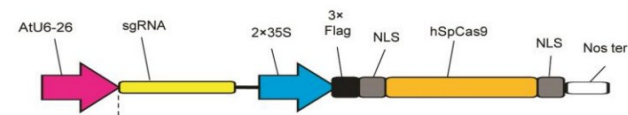


- Boju cvijetovima daju antocijanini (vakuola) i karotenoidi (kromoplasti)
- Biosinteza antocijanina
  - Neobojeni prije DFR
  - Više OH skupina : boja je plavija
  - Za sintezu delphinidina (plavi pigment) potrebna ekspresija dva gena i utišavanje gena koji sudjeluju u sintezi crvenih pigmenta



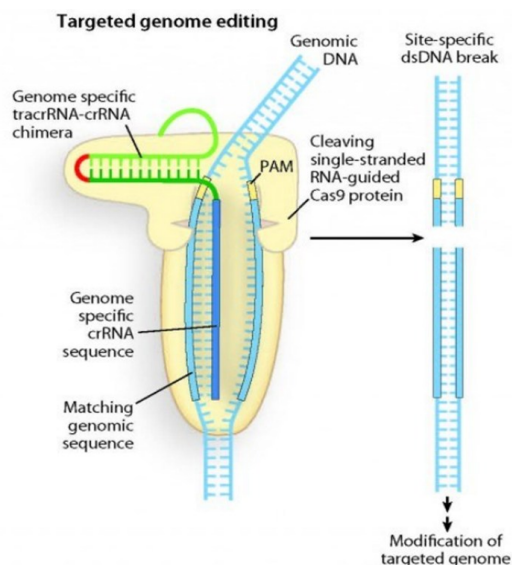
Suntory Ltd. Japan  
Florigene Australia

## Editiranje genoma CRISPR/Cas sustavom



Transgen (T-DNA) za unos u biljne stanice

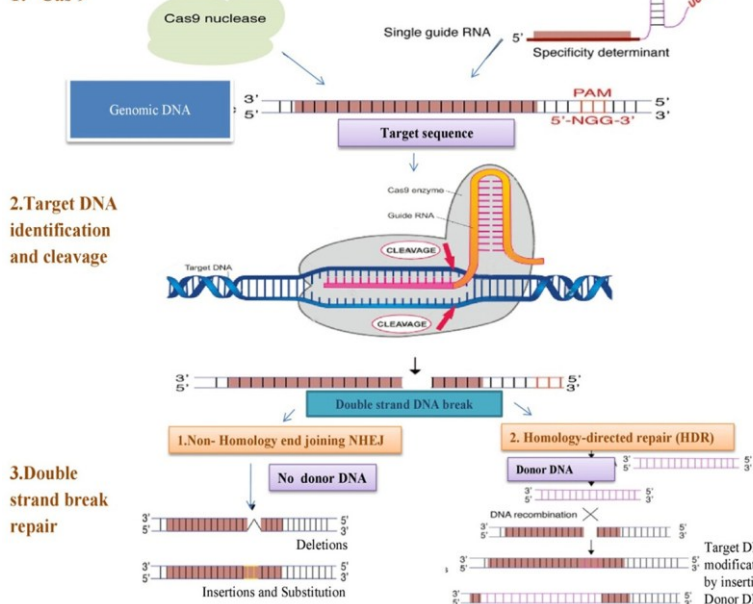
- Sustav CRISPR / Cas koristi sgRNA za ciljanu modifikaciju gena u genomu
- sgRNA se prepisuje s transgena i navodi protein Cas9 na poziciju u genomu gdje Cas9 protein radi dvolančani lom DNA
- Stanica dDNA lom popravlja nasumično pri čemu uvodi mutacije
- Istovremeno moguće ciljati (modificirati) više gena/pozicija u genomu



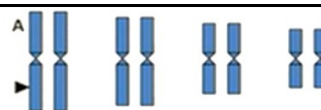
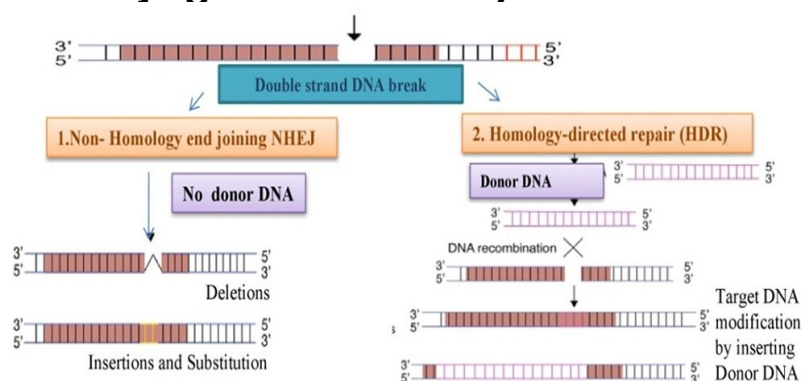
[doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9)

## Editiranje genoma CRISPR/Cas metodom

### 1. Cas 9

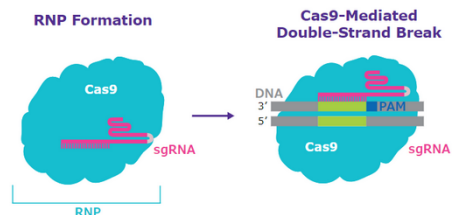
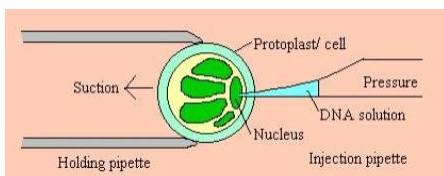


## Editiranje genoma CRISPR/Cas metodom



- CRISPR/Cas sustav se može koristiti i za ciljane modifikacije genoma
- Nakon eliminacije transgena u genomu ostaje promjena koja sliči mutacijama uvedenim kemijskim i fizikalnim mutagenima
- Organizmi oplemenjeni na ovaj način nisu GMO već spadaju u tzv. organizme dobivene novim genomskim tehnikama

## Mikroinjektiranje (DNA i/ili kemikalija) Mikroisisavanje (mRNA)



- Direktan unos proteina Cas9 i sgRNA (RNP: ribonukleoprotein) u stanicu omogućava editiranje genoma

CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants, 10.1016/j.xplc.2021.100168

CRISPR/Cas9 tehnologija za uređivanje gena na različitim poljoprivrednim usjevima

| Crop                 | Enhanced trait by CRISPR           | Target Gene            |
|----------------------|------------------------------------|------------------------|
| Beta vulgaris        | Severe curly top virus             | IR                     |
| Brassica oleracea    | Mosaic virus                       | CP                     |
| Brassica napus       | Herbicide resistance               | OsALS                  |
| Capsicum frutescens  | Leaf curl virus                    | C1/C4 + V1/V2          |
| Cucumis sativus      | Mosaic virus                       | ORF1a, ORF 3a, 3' OUTR |
| Glycine max          | Salt resistance                    | GmDrb2a and GmDrb2b    |
| Gossypium herbaceum  | Leaf curl Multan virus             | Rep + IR               |
| Gossypium herbaceum  | Leaf curl virus and beta satellite | Rep                    |
| Gossypium hirsutum   | Heat resistance                    | GhPGF and GhCLA1       |
| Manihot esculenta    | Cyanide reduction                  | CYP79D1 and CYP79D2    |
| Manihot esculenta    | Herbicide resistance               | OsALS                  |
| Medicago sativa L.   | Biomass yield and quality          | Msfta1                 |
| Musa sp.             | Streak virus                       | ORF1, 2, 3             |
| Oryza sativa         | Salt resistance                    | OsDST                  |
| Oryza sativa         | Salt resistance                    | OsSPL10                |
| Oryza sativa         | Heat tolerance                     | OsPDS                  |
| Oryza sativa         | Herbicide resistance               | OsTB1                  |
| Oryza sativa         | Metal stress tolerance             | OsPRX2                 |
| Oryza sativa         | Bacterial blight                   | OsSWEET13              |
| Oryza sativa         | Plant hopper                       | OsCYP71A1              |
| Oryza sativa         | Stem borer Rice                    | OsCYP71A1              |
| Phaseolus vulgaris   | Yellow dwarf virus                 | LIR                    |
| Solanum lycopersicum | Powdery mildew                     | SIMLO                  |
| Solanum lycopersicum | Late blight                        | miR482b and miR482c    |
| Solanum lycopersicum | Gray mould                         | SIPL                   |

Saini et al. 2023

[doi.org/10.1080/21645698.2023.2256930](https://doi.org/10.1080/21645698.2023.2256930)

## Protivnici GMO biljaka osobito protiv:

### 1) Prekomjernog unošenja gena za rezistenciju na antibiotike i herbicide u okoliš

- u slučaju prijenosa na organizme iz okoline mogli bi nastati super rezistentni, infektivni mikroorganizmi i/ili super rezistentni korov

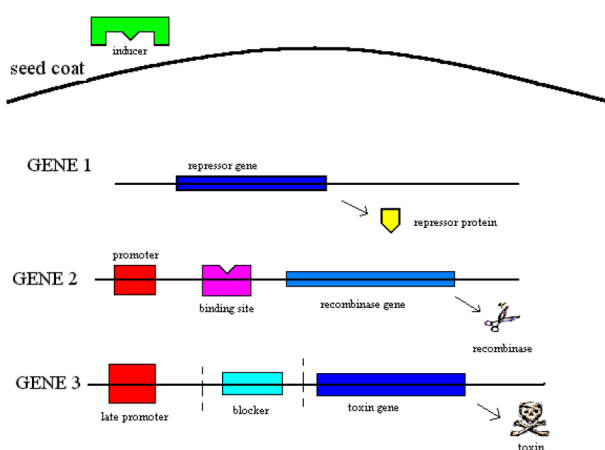
### 2) Uništavanje rijetkih i korisnih vrsta kukaca zbog transgenih biljaka koje sintetiziraju insekticide

Riješenje: Stvaranje biljka otpornih na ograničeni, usko specifičan tip insekata

### 3) Nekontroliranog širenja transgenog peluda i sjemena

Riješenje: terminator tehnologija (neviabilno sjeme) i stvaranje sterilnog polena

## Tehnologija terminatora



Induktor

Gen za represor = GEN1

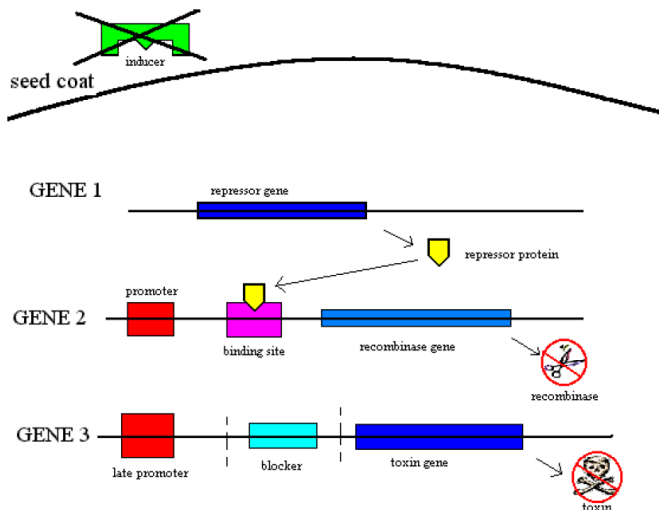
Gen za rekombinazu=GEN2

Gen za toksin=GEN3

- Represor sprečava stvaranje rekombinaze
- Bez rekombinaze nema stvaranja toksina.

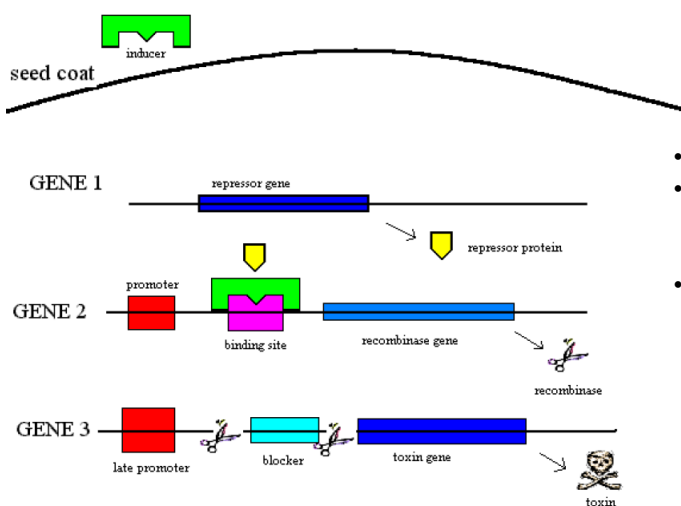


## Tehnologija terminatora: proizvodnja sjemena



Nema prisutnog induktora  
– stvara se vijabilno sjeme

## Tehnologija terminatora: sijanje transgenog sjemena



- Sjeme se inokulira s induktorom.
- Induktor sprečava vezanje represora i omogućava ekspresiju rekombinaze.
- Rekombinaza izrezuje blok iz promotora gena za toksin. Takva biljka tijekom stvaranja sjemena sintetizira toksin koji sprečava razvoj embrija i dobiva se nevijabilno sjeme.

**Zaštita novih sorti biljaka omogućuje uzgajivačima da očuvaju svoja prava na komercijalizaciju i distribuciju svojih inovacija, sprječavajući druge da neovlašteno koriste njihov rad.**

### **Priznavanje novih biljnih sorti**

Nacionalni ili međunarodni sustav za priznavanje i zaštitu novih biljnih sorti, kao što je UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants), organizacija koja osigurava međunarodnu zaštitu biljnih sorti i štiti prava uzgajivača novih biljnih sorti

### **Licenciranje i komercijalizacija**

Nakon što se sorte zaštite vlasnici prava mogu licencirati **tehnologiju ili sjeme**, što im omogućuje da naplate korištenje nove sorte. Ovaj korak je ključan za zaštitu komercijalnih interesa i može uključiti ugovore s komercijalnim partnerima ili tvrtkama za širenje novih sorti na tržištu. U prijavi za licenciranje potrebno navesti jedinstvene karakteristike varijeteta. Agencija potom provodi ispitivanje kako bi se utvrdilo da li sorta ispunjava sve uvjete za zaštitu.

- **Novina** (nikada ranije nije bila poznata ili komercijalizirana),
- **Razlikovan** (ima karakteristike koje je razlikuju od drugih postojećih varijeteta),
- **Uniforman** (ima stabilne karakteristike u različitim uvjetima),
- **Stabilan** (karakteristike se moraju održati tijekom vremena i generacija).

**Dobivanje ekskluzivna prava na proizvodnju, prodaju, korištenje i distribuciju sjemena ili biljnih proizvoda, no biljke se ne mogu patentirati!**

## **GMO regulativa u EU**

**Uredba (EC) br. 1829/2003** ključni je dio zakonodavstva Europske unije (EU) koji uređuje genetski modificiranu hranu i hranu za životinje. Usvojena je 22. rujna 2003. i postavlja pravila za autorizaciju, označavanje i sljedivost genetski modificiranih organizama (GMO) u hrani i stočnoj hrani unutar EU. Uredba osigurava da su GMO sigurno procijenjeni, pravilno označeni i sljedivi u cijelom lancu hrane i hrane za životinje.

### **1. Autorizacija GMOa u hrani i hrani za životinje**

- **Odobrenje prije stavljanja na tržište: GMO-i moraju proći temeljitu procjenu rizika**
- **Postupak autorizacije** - GMO je odobren za uporabu samo ako zadovoljava sigurnosne standarde EU-a.
- **Odobrenje za GM prehrambene sastojke i aditive:** Ne samo cjeloviti GM prehrambeni proizvodi, već i sastojci ili aditivi izvedeni iz GMO-a (kao što je kukuruzno ili sojino ulje iz GM usjeva) također moraju biti odobreni.

### **2. Označavanje GMOa**

- **Obavezno označavanje** hrana ili hrana za životinje koja sadrži više od **0,9% GMO-a**
- **Označavanje prerađene hrane**

### **3. Sljedivost**

- **Sustav sljedivosti:** Postoji zahtjev za sljedivost GMO-a u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije. Tvrtke moraju voditi evidenciju o tome odakle GMO ili proizvodi dobiveni od GMO-a dolaze i gdje se prodaju ili distribuiraju, osiguravajući da se proizvodima može pratiti njihovo podrijetlo

### **4. Procjena rizika na ljude i okoliš obvezna ....**

## Zakon o genetički modificiranim organizmima (NN 70/2015)

**Biljke dobivene novim genomskim tehnikama za sada u EU podliježu istoj regulativi kao GMO. U tijeku su pregovori i intenzivne rasprave te se očekuje blaža regulativa, odnosno izjednačavanje s organizmima dobivenim standardnim metodama mutageneze**

- Osim GMO hrane i hrane za životinje propisuje i pravila koja se odnose na sve aktivnosti koje uključuju GMO, uključujući **istraživanje i eksperimentiranje u zatvorenim sustavima**
- Zatvoreni sustav za baratanje GMO organizmima može biti kategorizirani u 4 kategorije (ovisno o opasnosti za okoliš) te su za svaku kategoriju propisani različiti sigurnosni standardi i postupci.

**Dodatni pravni okviri i regulacije:**

- **Europska uredba 2009/41/EC o zatvorenim sustavima za rad s GMO-ima i Direktiva 2009/41/EZ** koja osigurava usklađivanje sigurnosnih mjera za laboratorije i istraživačke ustanove koje manipuliraju s GMO-ima.

## ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

Dugovječno čuvanje jedinstvenih i vrijednih jedinki, varijeteta, sorti i vrsta

### A) Produženje ciklusa mikropropagacije – 2 metode:

#### 1) Mikrokloniranje kod normalnih temperatura

- Usporavanje rasta u kulturi upotrebom podloge koja ograničava rast
- Isušivanjem i snižavanjem atmosferskog tlaka
- Dodavanjem inhibitora rasta (klorkolinklorida, ABA)

#### 2) Mikrokloniranje kod temp. Od +2 do +15 °C i niskog intenziteta osvjetljenja.

**čuvanje do 4 godine**

## ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

### B) Krioprezervacija tkiva (-196 °C)

- ultra niske temperature
- zaustavljanje st. dioba i metabolizma
- **neograničeno vrijeme čuvanja**

## ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

### Krioprezervacija

### POHRANA U DUBOKO POTHLAĐENOM STANJU (u tekućem dušiku, temp. -196°C) – metaboličko mirovanje

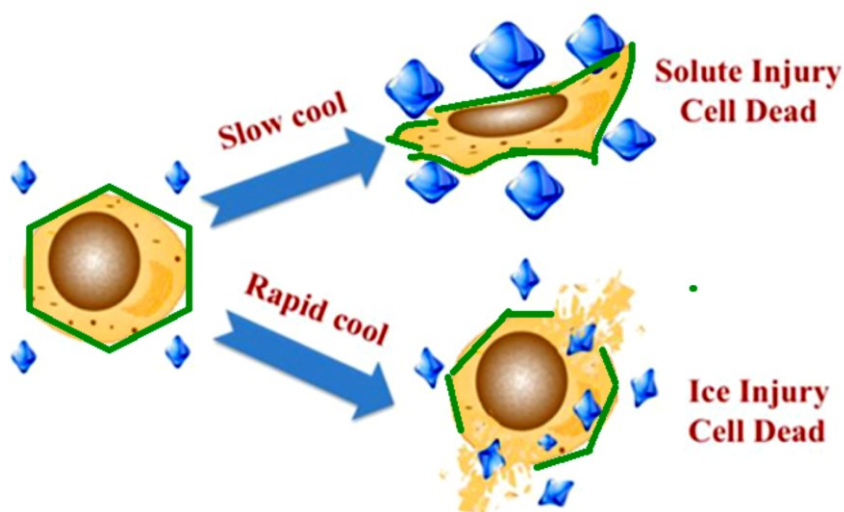
- Predtretman
- Smrzavanje
- Otapanje
- Regeneracija

Čuvanje

Ponovna  
upotreba

## Eksplantati za krioprezervaciju

- nediferencirane stanice
- embriogene suspenzije
- kalus
- polen
- sjemenke
- somatski embriji
- vrškovi izdanka



## Predtretman

➤ **Prekultivacija** – obično u uvjetima koji potiču brzi rast što omogućuje razvoj stanica s malim vakuolama i niskim sadržajem vode

➤ **Prekondicioniranje stanica** – dodatak osmotski aktivnih tvari (manitol, sorbitol, saharoza, prolin)

- povećanje otpornosti na smrzavanje (smanjenje staničnog volumena i dehidratacija)

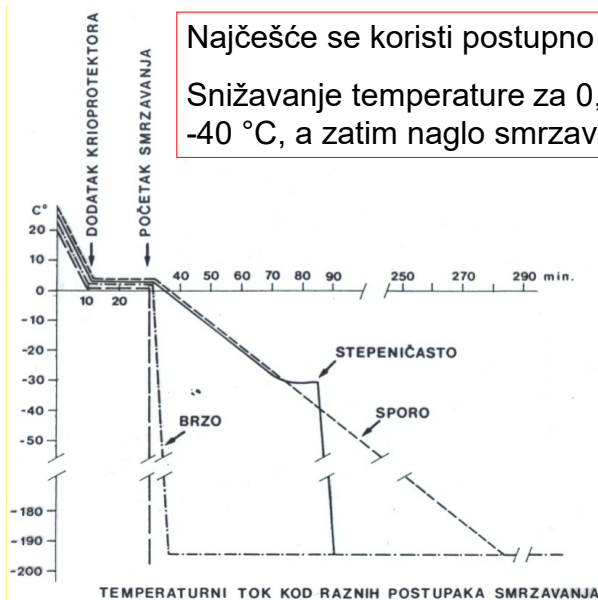
➤ **Krioprotekcija** - zaštita od smrzavanja, zaštita tkiva od ozljeda i smanjenje stvaranja ledenih kristala

- prožimajuće tvari (ulaze u stanice): dimetilsulfoksid (DMSO), metanol, glicerol
- neprožimajuće tvari: šećeri, šećerni alkoholi, polivinil-pirolidon, dekstran, hidroksietilni škrob

## Smrzavanje

Najčešće se koristi postupno smrzavanje:

Snižavanje temperature za 0,5-2 °C po minuti do -40 °C, a zatim naglo smrzavanje u tekućem dušiku



Smrznuti materijal se u tekućem dušiku može čuvati neograničeno dugo.



## Otapanje i regeneracija materijala

Prema potrebi materijal se otapa.

Otapanje obično brzo (uranjanem tkiva u toplu vodu) da se izbjegne ozljeđivanje zbog rasta ledenih kristala.

Nakon ispiranja krioprotektora otopljenom materijalu se obnavlja sposobnosti rasta.

Biljke se regeneriraju postupcima *in vitro* pri čemu je poželjno izbjegavanje kalusnog rasta radi stabilnosti.

