

P6KBT

II. Direktni unos DNA

- a. Bombardiranje mikročesticama zlata ili kositra** (0,5 do 2 μm 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

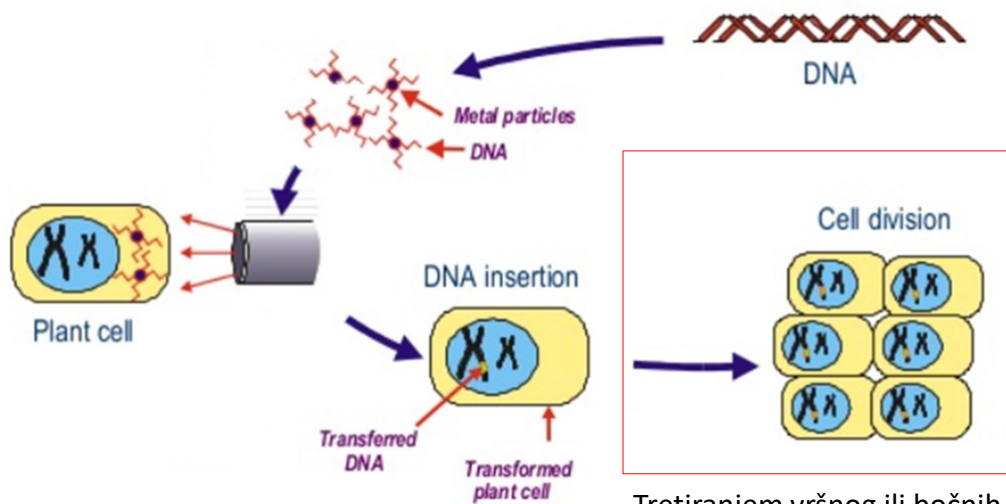
- b. Polietilen glikol (PEG) i elektroporacija** – unos DNA u protoplaste. Resinteza stanične stjenke, diobe i regeneracija.



Helios Gene Gun



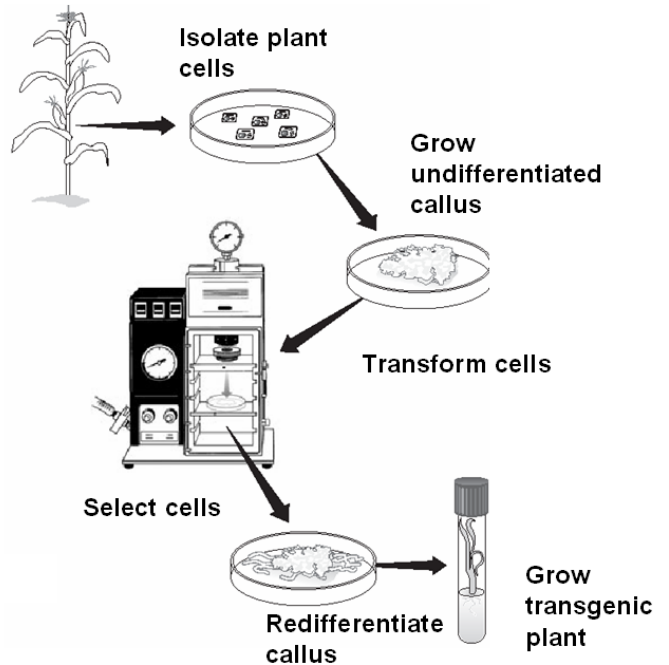
Za brzu transformaciju bez potrebe za kulturom tkiva



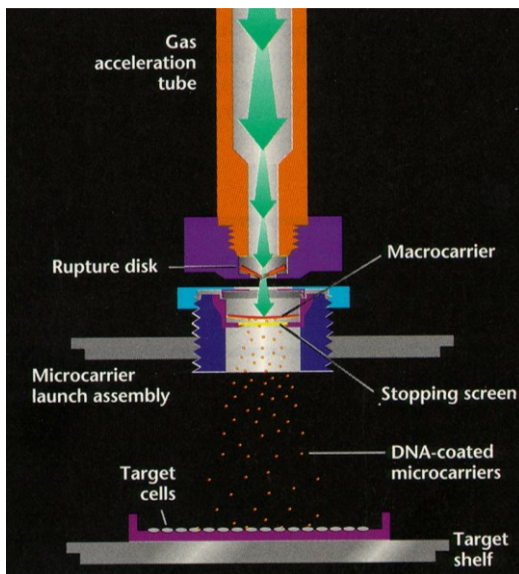
Tretiranjem vršnog ili bočnih meristema moguća regeneracija GMO izdanka

Biolistik

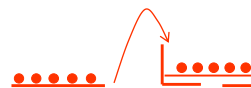
- Biolistik transformacija se koristi za biljke koje se ne mogu transformirati agrobakterijama
- Embrionalne stanice su otpornije na Agrobakterije pa je biolistik učinkovitiji za njihovu transformaciju
- Bombardiranje mikroprojektilima dovodi do kompleksne integracija DNA



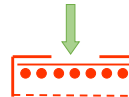
Biolistic PDS-1000 Particle Bombardment sustav

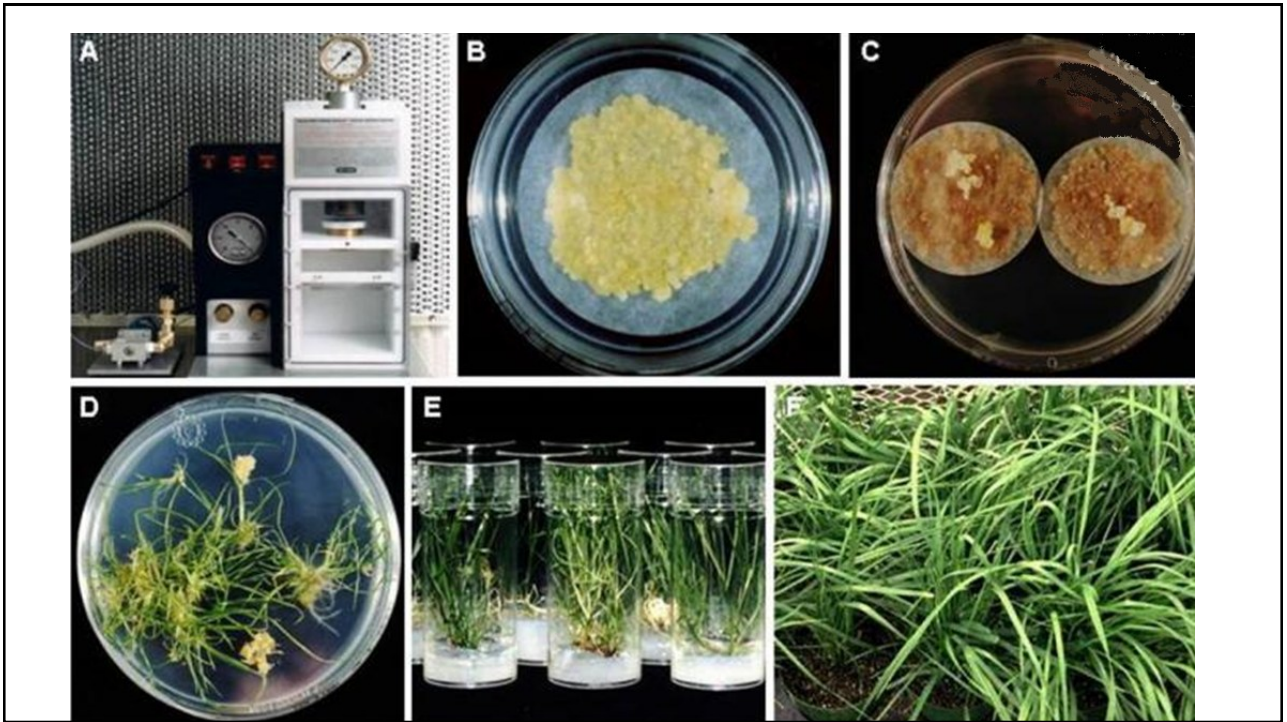


DNA coated particles



He



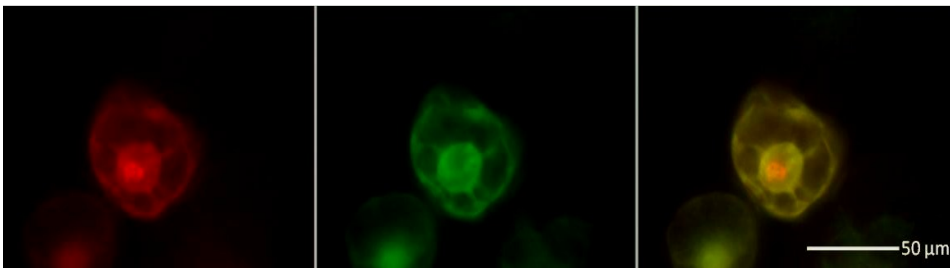


Privremena transformacija

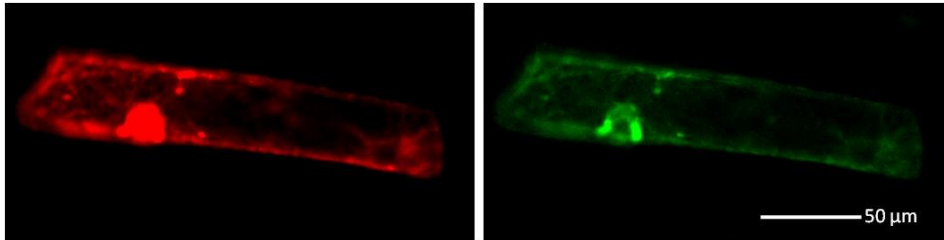
Subcelularna (ko)lokalizacija fluorescentnih proteina



BIOLISTIK TRANSFORMACIJA STANICA DUHANA BY2:

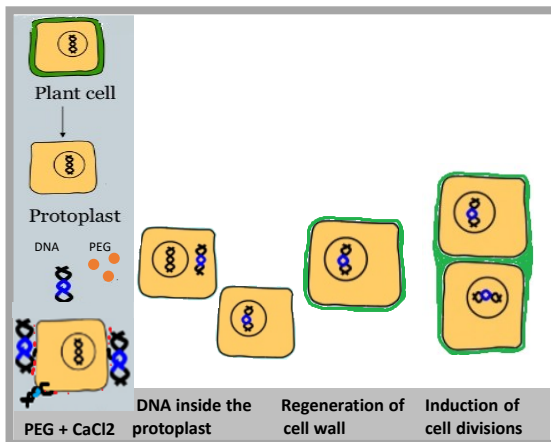


BIOLISTIK TRANSFORMACIJA STANICA POKOŽICE LUKA

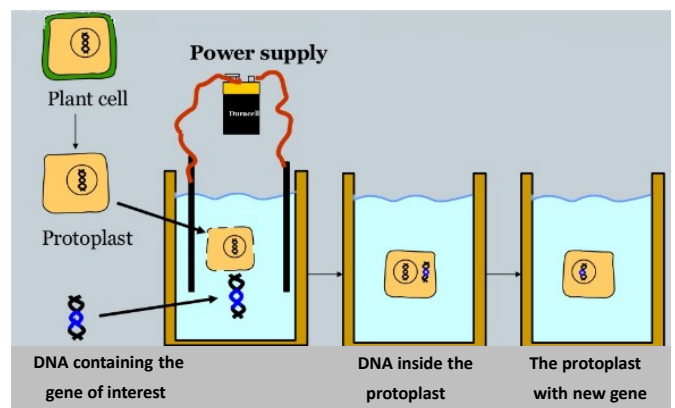


Transformacija protoplasta

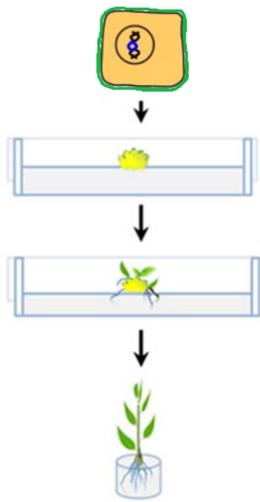
Polietilenglikol (PEG) transformacija



Elektroporacija



Regeneracija GMO biljaka nakon transformacije protoplasta

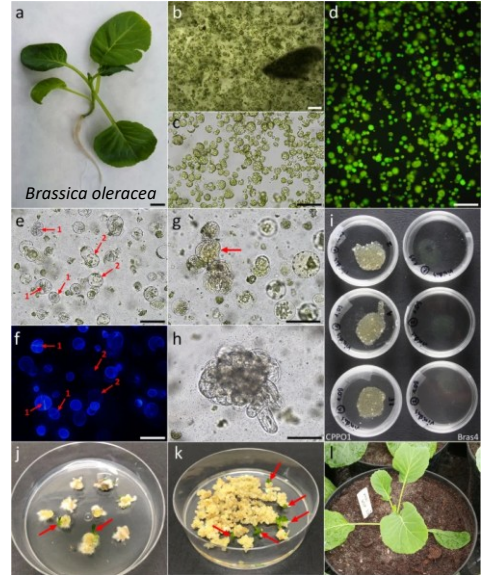


Transformacija protoplasta

Regeneracija stjenke i indukcija dioba (kalus)

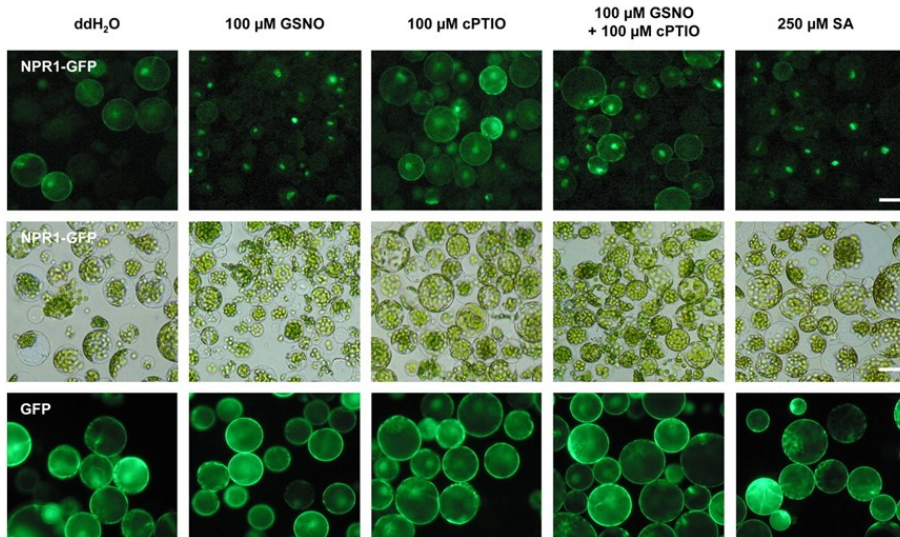
Organogeneza – indukcija izdanaka

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

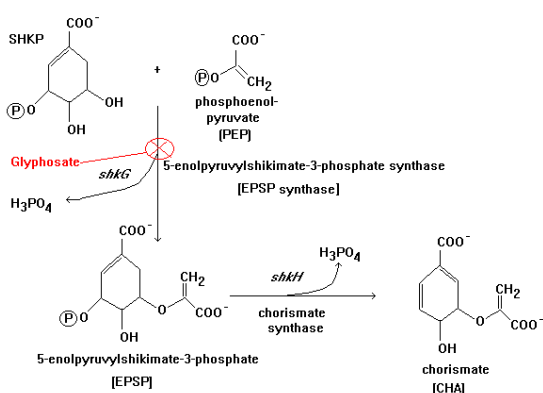
1. Modificiranje agronomskih svojstava:

- 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

Rezistencija na herbicid *Roundup* (Glifosat)

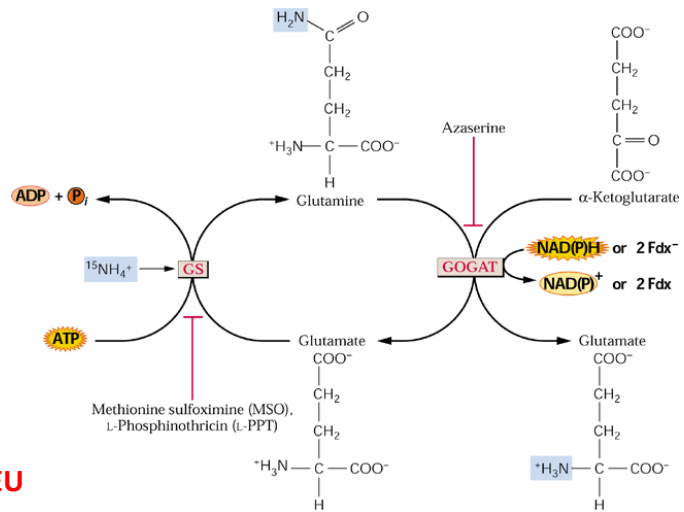


Roundup blokira sintezu aromatskih AK.

Rezistentne biljke imaju bakterijski EPSP enzim otporan na glifosat

Liberty Link®: glufosinat amonijum / fosfotricin / basta

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



OD 2018 NIJE ODOBREN U EU

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



Zlatna riža

Nedostatak vitamina A – zdravstveni problemi

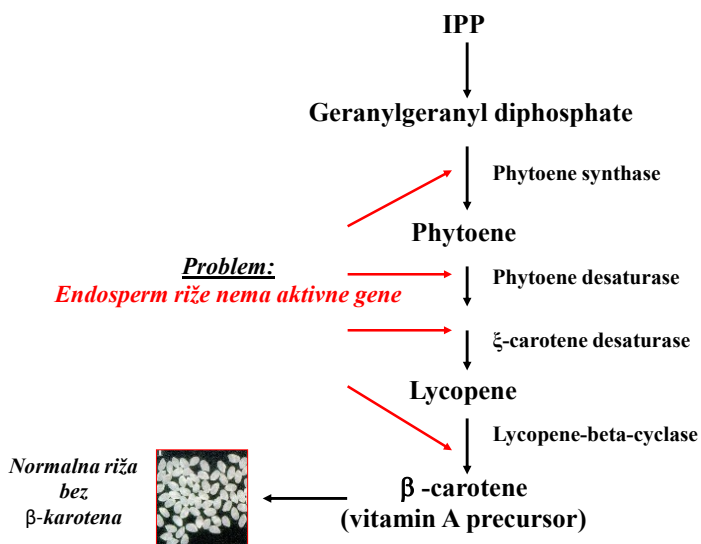
- slijepilo, ospice, smrt

>100 miliona djece pati od nedostatka vitamina A

CILJ: povećati sadržaj vitamina A u hrani



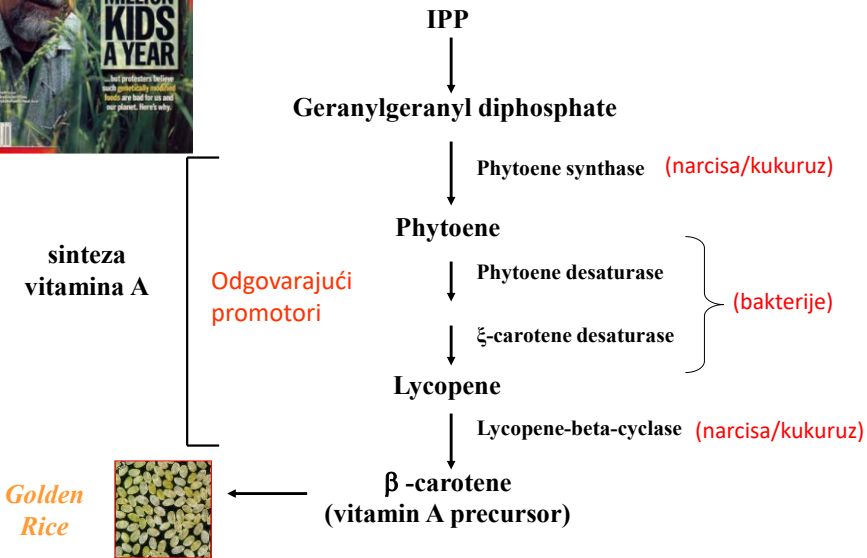
Sinteza β -karotena u biljaka



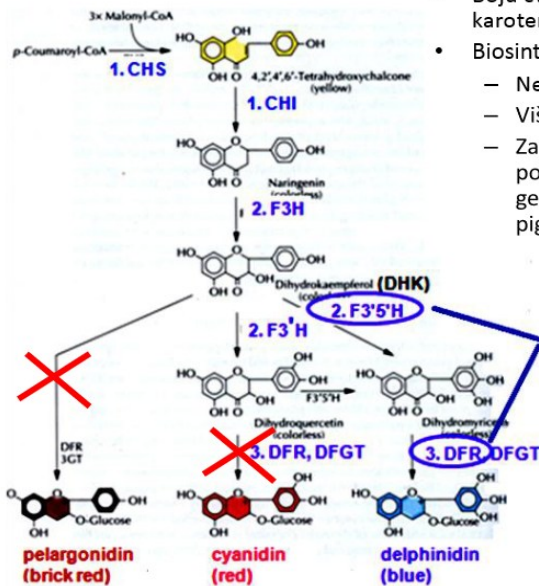


The Golden Rice Solution

β -Carotene Pathway Genes Added

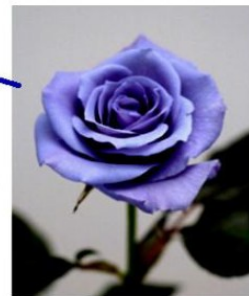


Plava boja cvjetova



X utišani geni
 O uvedena ekspresija gena

- 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

Arctic Golden (od Golden Delicious)
Arctic Granny (od Granny Smith)
Arctic Fuji
Arctic Gala

- Jabuke koje ne posmeđe (glavno svojstvo) kad se prerežu ili zagrizu → ne tamne
- To je postignuto utišavanjem ekspresije gena (RNA interferencija) i posljedično smanjenjem dostupnosti enzima polifenol oksidaza (PPO)
- Enzim PPO sadrži bakar i katalizira oksidaciju fenolnih spojeva u kinone. Kinoni polimeriziraju u smeđi pigment melanin odgovoran za reakciju smeđenja koja se vidi kada se jabuke ili drugo voće režu ili zgnječe

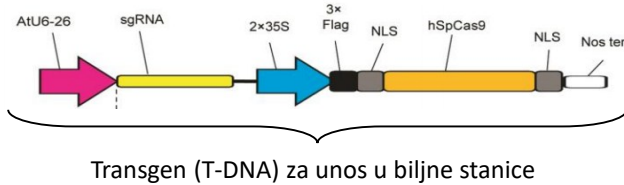


GMO jabuke u SAD i Kanadi se prodaju u obliku:

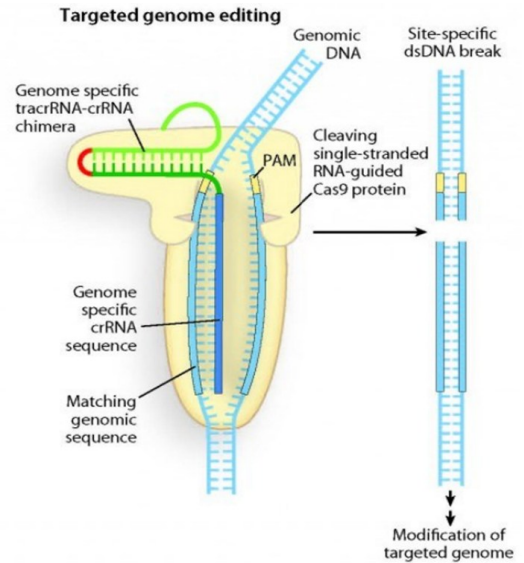
- narezane jabuke
- grickalice

doi.org/10.1038/551149a

Editiranje genoma CRISPR/Cas sustavom



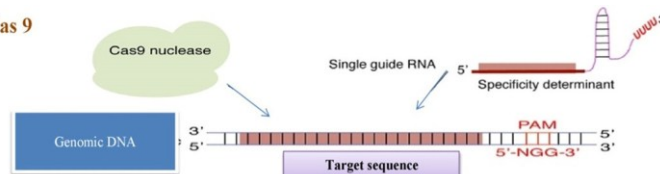
- Sustav CRISPR / Cas koristi sgRNA za ciljanu modifikaciju gena u genomu
- sgRNA se prepisuje s transgena i navodi protein Cas9 na poziciju u genomu gdje Cas9 protein radi dvolančani lom DNA
- Stanica dDNA lom popravlja nasumično pri čemu uvodi mutacije
- Istovremeno moguće ciljati (modificirati) više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



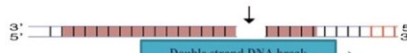
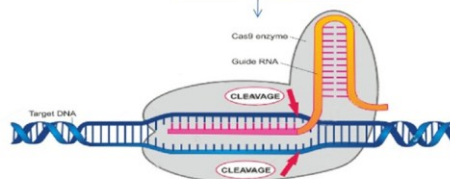
doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9

Editiranje genoma CRISPR/Cas metodom

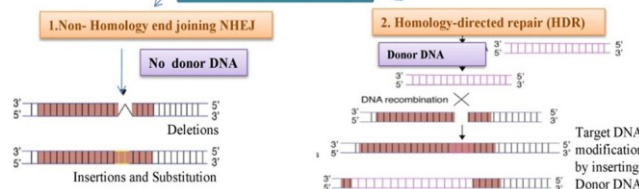
1. Cas 9



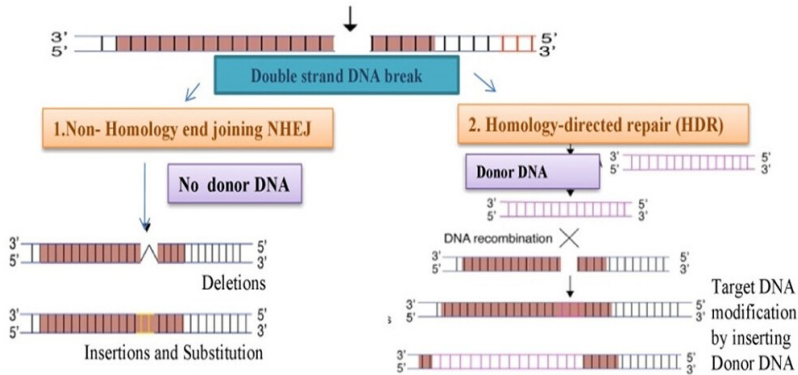
2. Target DNA identification and cleavage



3. Double strand break repair

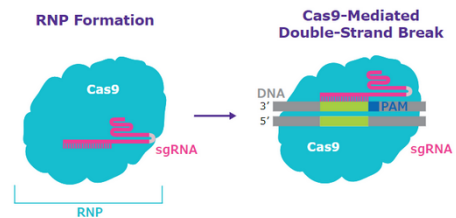
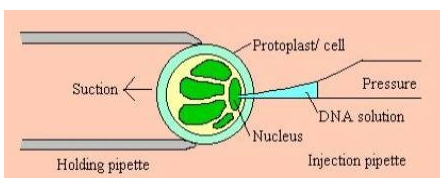


Editiranje genoma CRISPR/Cas metodom



- CRISPR/Cas sustav se može koristiti i za ciljane modifikacije genoma
- Nakon eliminacije transgena (gena za Cas9 i sgRNA) u genomu ostaje promjena koja slično 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) Mikroisusavanje (mRNA)



- Direktno unošenje proteina Cas9 i sgRNA (RNP: ribonukleoprotein) u stanicu omogućava editiranje genoma

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

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

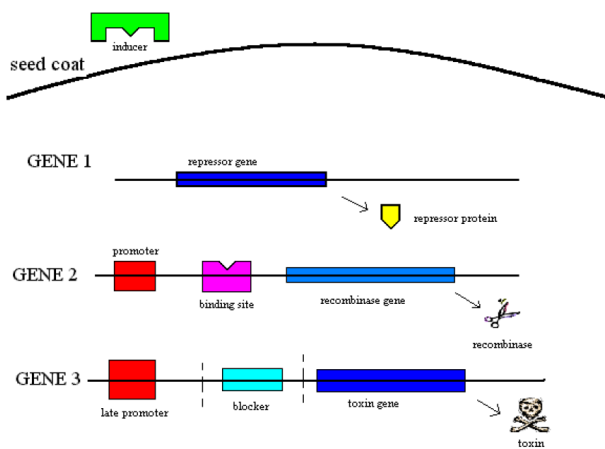
2) Uništavanje rijetkih i korisnih vrsta kukaca zbog transgenih biljaka koje sintetiziraju insekticide

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

3) Nekontroliranog širenja transgenog peluda i sjemena

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

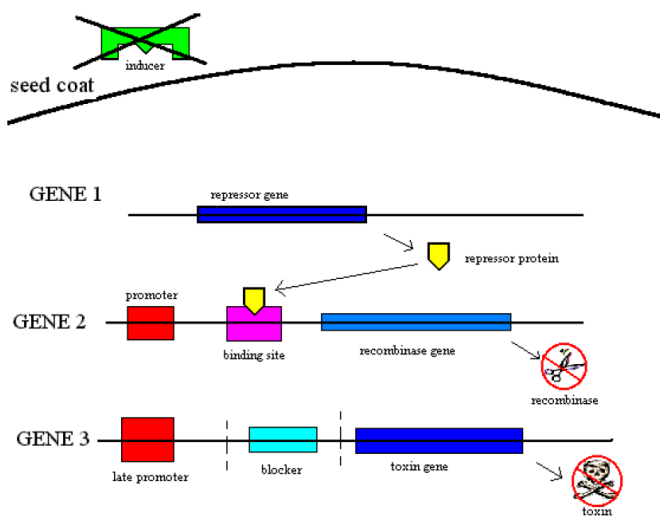
Tehnologija terminatora



Induktor
 Gen za represor = GEN1
 Gen za rekombinazu=GEN2
 Gen za toksin=GEN3

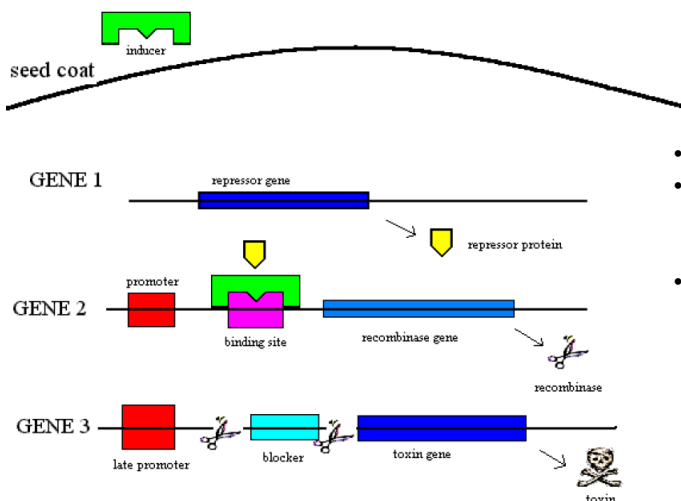
- Represor sprečava stvaranje rekombinaze
- Bez rekombinaze nema stvaranja toksina.

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 ekskluzivnih 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** hrane ili hrane 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 su u EU do 2023 g. bile pod istom regulativom kao GMO. Prema novoj regulativi (2025 g.) Kategorija 1 (NGT-1) u kojoj su biljke s malim, ciljanim promjenama (npr. CRISPR bez stranog DNA) ne smatraju se GMO u klasičnom smislu, a Kategorija 2 (NGT-2: složenije promjene i više izmjena ili veće intervencije) i dalje se tretiraju kao GMO

- 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

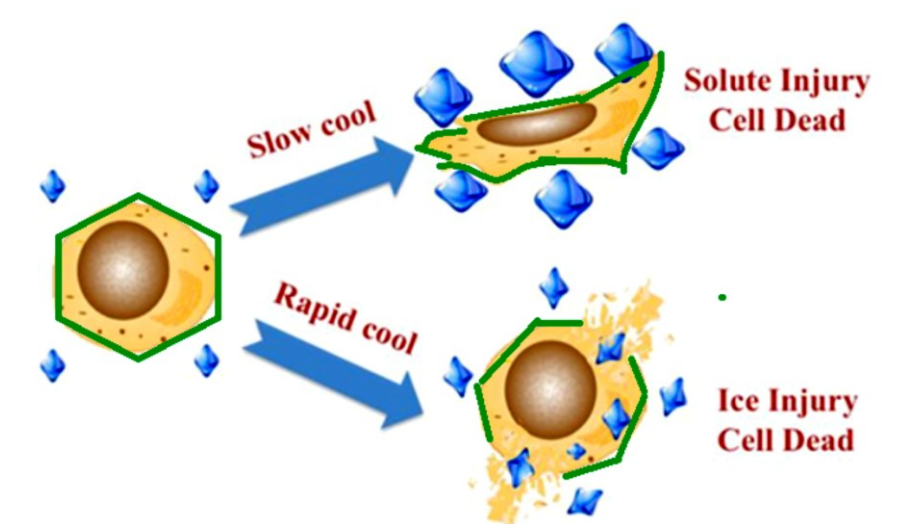
- Predtretman
- Smrzavanje
- Otapanje
- Regeneracija

Čuvanje

Ponovna
upotreba

Eksplantati za krioprezervaciju

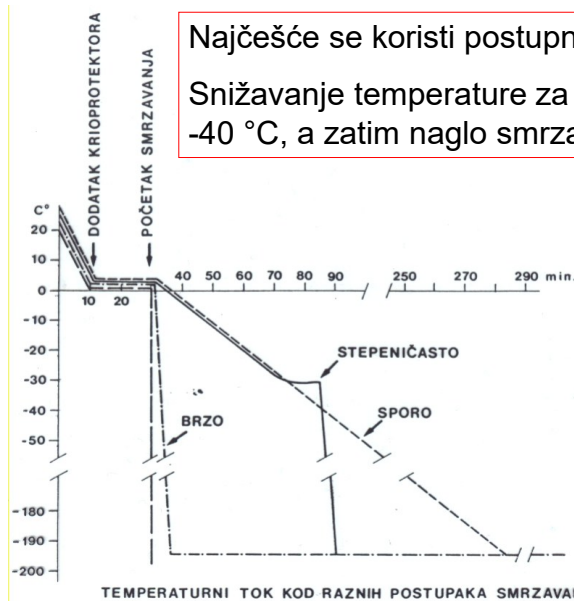
- nediferencirane stanice
- embriogene suspenzije
- kalus
- polen
- sjemenke
- somatski embriji
- vrškovi izdanka



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.

