Kultura animalnih i biljnih stanica

KULTURA BILJNOG TKIVA

Treće predavanje

- Vrste kultura biljnih tkiva
  - Kultura kalusa
  - Kultura stanica u suspenziji
  - Kultura protoplasta
- Somaklonska varijabilnost
- Somaklonsko/mutacijsko oplemenjivanje

Kultura kalusa (staničja)

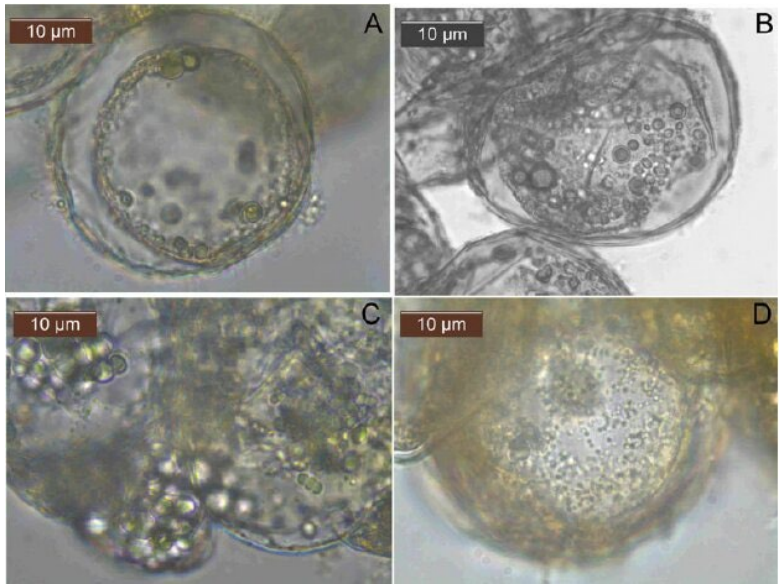
- Neorganizirana rastuća masa stanica.
- Stanice mogu biti diferencirane ili nediferencirane, a rast je **neorganiziran**.
- U prirodi - tkivo koje se razvija kao odgovor na ozljeđivanje (zaštita ozlijeđenog mjesta).
- *In vitro* - nestrukturirani skup tkiva s potencijalom formiranja bilo kojeg biljnog organa
- Uglavnom brzo-rastuće tkivo
- Struktura i način rasta kalusa razlikuju se ovisno o vrsti.
- Na rast kalusa utječe starost eksplantata, dio biljke koji se koristi kao eksplantat, vrsta biljke, uvjeti rasta, itd.


Kalus rane na eksplantatu lista


Kalus u kulturi in vitro

Kultura kalusa

- **Kalus sadrži**:
  - Totipotentne stanice
  - Nediferencirane stanice – meristemske, male, okrugle stanice s malim vakuolama
  - Diferencirane stanice **–** specifični tipovi stanica s točno određenom funkcijom, veće, vakuolizirane stanice, dijelovi provodnih elemenata, vrškovi korijena



Four different cell types observed with the callus of banana with respect to density of organelles or cellular inclusions:

A) displaying a thick central area of thick inclusions and a peripheral clear area,
B) showing abundant organelles or inclusions distributed in the cell lumen,
C) organelles scattered in the cell matrix with obvious vacuoles or free spaces,
D) those not showing any obvious large cellular inclusions

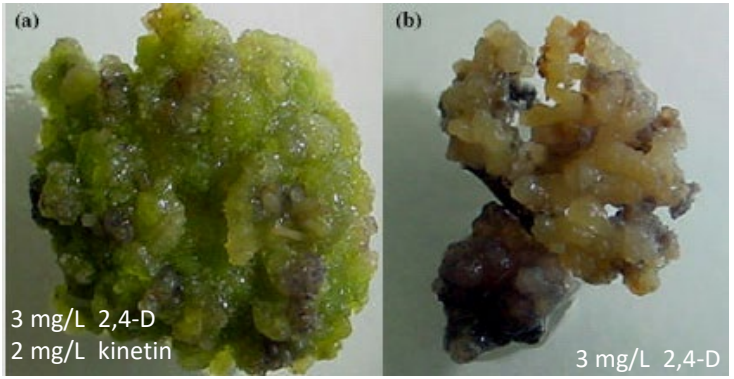
Thomas & Sekhar (2014) *AoB PLANTS*, *6*, 10.1093/aobpla/plu002

Kultura kalusa

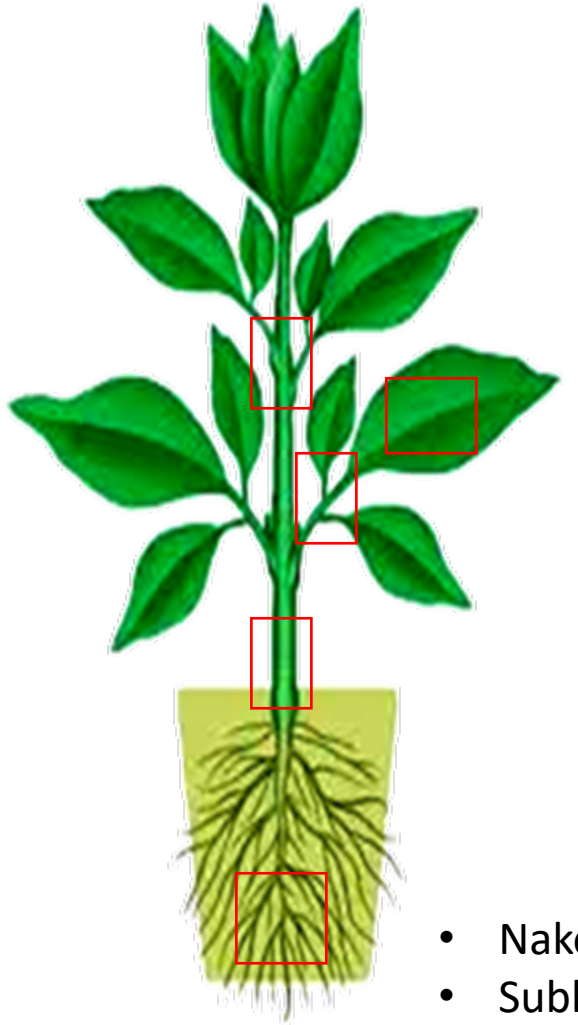
- prvi put je inducirana 1920-ih, uspješno održavana 1930-tih.
- ključni dio gotovo svakog biokemijskog, fiziološkog i genetičkog eksperimenta.
- izvrstan je način za postizanje genetičke varijabilnosti u biljkama (kod oplemenjivanja).
- koristi se za postavljanje kulture stanične suspenzije*, in vitro* razvoj somatskih embrija*, in vitro* razvoj organa i dobivanje sekundarnih metabolita za komercijalnu upotrebu.

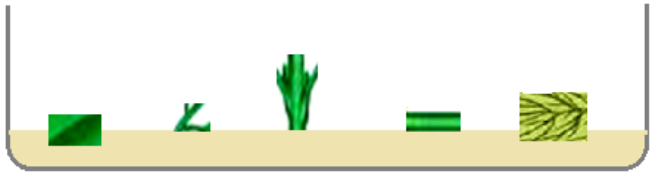
Kultura kalusa – razlozi razvoja/proliferacije

- ❑Biljke stvaraju kalus kao odgovor na ranjavanje tkiva. Pri tome u inicijaciji i rastu kalusa sudjeluju endogeno sintetizirani hormoni.
- ❑Egzogeno dodani auksini i citokinini potrebni su za incijaciju kalusa u kulturi *in vitro*. Dodatak hormona utječe na promjene u signalnim putevima i potiče diobe stanica.
- ❑Kalus mogu potaknuti bakterije (npr. Agrobakterije, *Pantoea agglomerans),* virusi, protisti, nematode i insekti
- **Tipični eksplantati za inicijaciju kalusa: provodna tkiva, skladišni parenhim, pericikl korijena, kotiledoni, lisni mezofil.**
- Iz stanica kalusa moguće je potaknuti razvoj izdanaka, korijena ili embrija

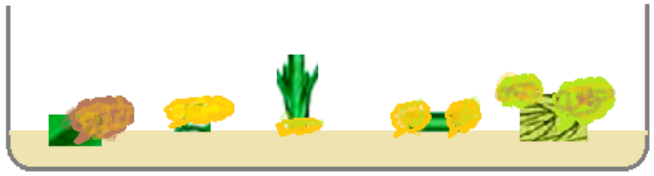


Kultura kalusa - indukcija

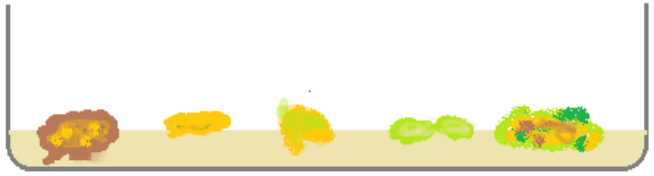




Kalus se može potaknuti na svim tipovima eksplantata. Pogodnije je mlado tkivo.



Fenotipski različite stanice mogu dati fenotipski i morfološki drukčiji kalus.



- Nakon indukcije, kalus se subkultivira i održava prenošenjem na svježi medij svakih 28 dana.
- Subkultivacija osigurava hranjive tvari te eliminaciju toksičnih metabolita.
- Subkultiviranjem kalusa na pogodnu podlogu, moguće je potaknuti razvoj izdanaka, korijena ili embrija

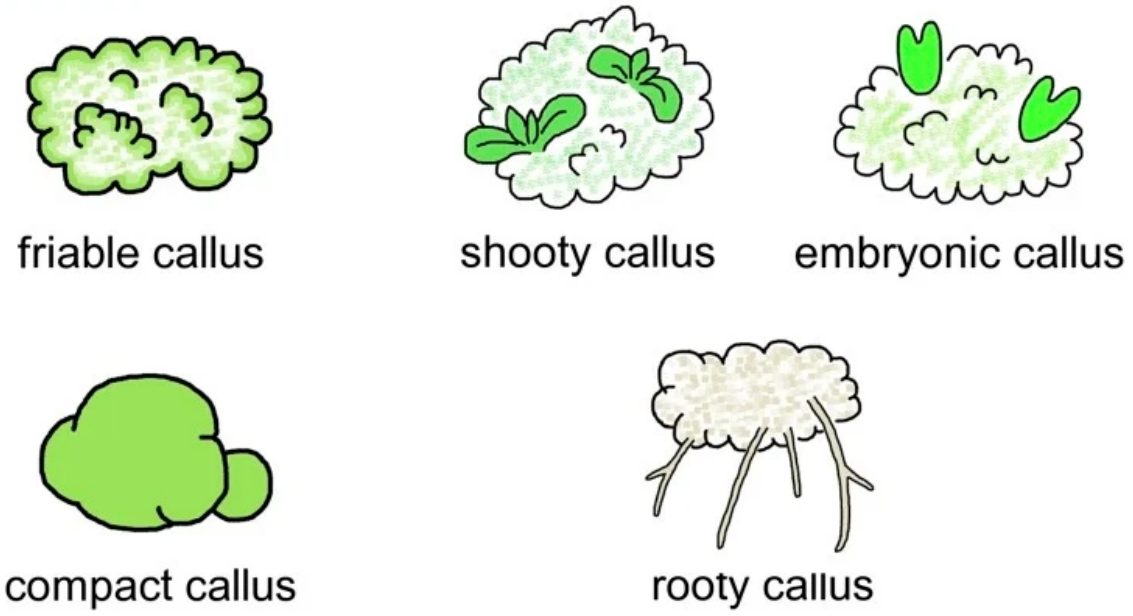
Kultura kalusa – tipovi kalusa

Prema morfogenezi:

Neorganogeni kalus | Organogeni kalus

Prema mikroskopskoj građi i strukturi:

- Rastresiti (sipki) kalus
- Kompaktni kalus



Ikeuchi i sur. (2013). 10.1105/tpc.113.116053

Prema makroskopskim karakteristikama kalusna se tkiva mogu značajno razlikovati pa kalus možemo klasificirati ovisno o vanjskom izgledu:

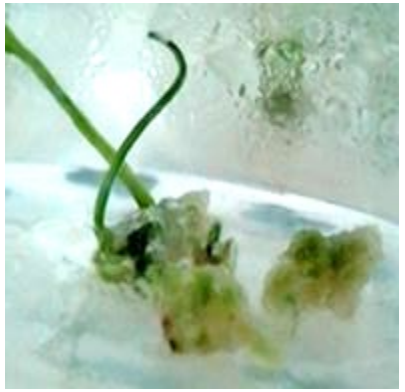
- Kalus bez znakova regeneracije: rastresiti ili kompaktni
- Kalus sa dijelovima regeneriranih organa

Stanice različitih tipova kalusa imaju različitu ekspresiju gena, i kalus sadrži stanice različitog stupnja diferencijacije

Tri stadija kulture kalusa







1. Poticanje /indukcija kalusa : stanice eksplantata su inducirane na diobu (2 – 6 tjedana)
2. Održavanje i rast: brze diobe stanica. Niski stupanj diferencijacije. (svakih 3 – 4 tjedna)
3. Regeneracija organa/biljaka iz kalusa

Organogeneza → regeneracija organa

Somatska embriogeneza → indukcija stvaranja somatskih embrija

Kultura kalusa - indukcija

Eksplantat

- Različiti tipovi stanica – manji stupanj diferencijacije →lakše poticanje kalusa na jednostavnom mediju
- Fiziološki status eksplantata – odgovor eksplantata određen je hranidbenim statusom biljke donora, npr. sadržaj endohormona ili dormancija mijenjaju mogućnost indukcije kalusa
- Genotip – različiti varijeteti iste biljke – različita potreba tj. osjetljivost na hormone
- Veličina eksplantata – bolji su veći

Hranjiva podloga

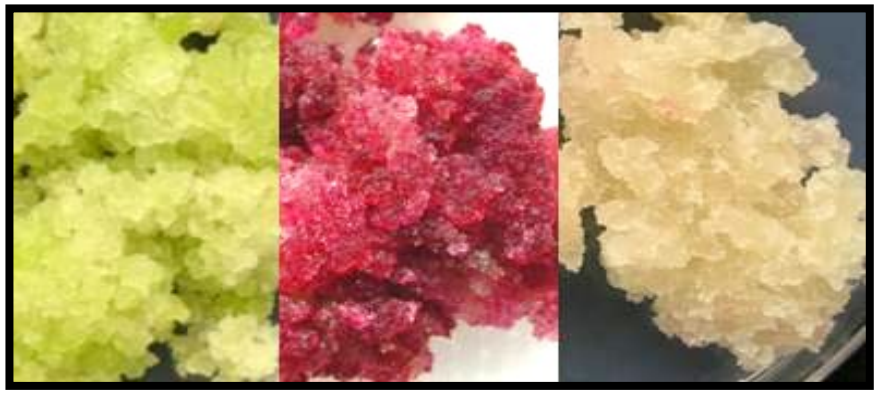
- Kod većine biljnih vrsta kalus se inducira dodatkom auksina i citokinina u hranjivu podlogu, no postoje biljke i tipovi kalusa neovisni o hormonima:
  - **Auksin i citokinin autotrofna tkiva** = PRILAGOĐENI KALUS
    - nezreli plod limuna, tumorska tkiva
  - **Citokinin autotrofna** – trebaju samo auksin
    - korijen mrkve
- Često potreban dodatak aminokiselina: Gly, Arg, hidrolizat proteina

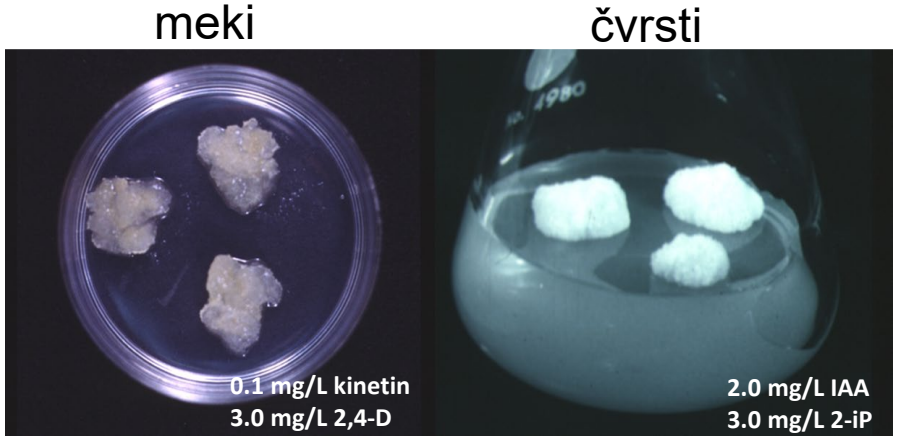
Uvjeti kultiviranja

- Temperatura – 24 to 28 °C
- Svjetlost – tama ili slabo svjetlo

Kultura kalusa - održavanje

- Regulatori rasta značajno utječu na strukturu, prirast mase i staničnu diferencijaciju kalusa.
- Supkutivacija kalusa provodi se nakon prirasta tkiva 4-6X. Taj interval naziva se **PASAŽA**.
- Kalusne se kulture razlikuju po intenzitetu rasta, boji, kompaktnosti i građi staničja. Na morfologiju utječe genotip i sastav medija.

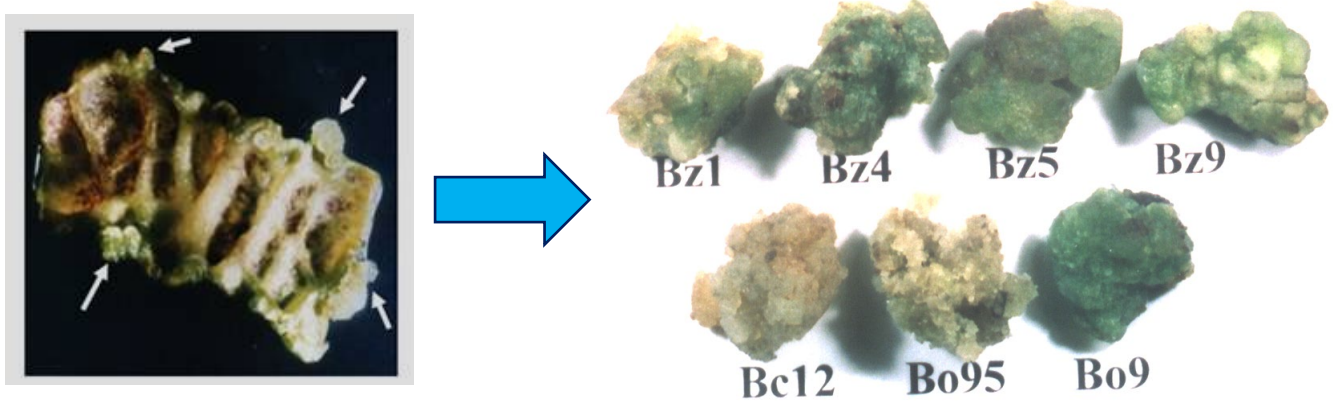




Rastresiti kalus često se koristi za inicijaciju stanične suspenzije

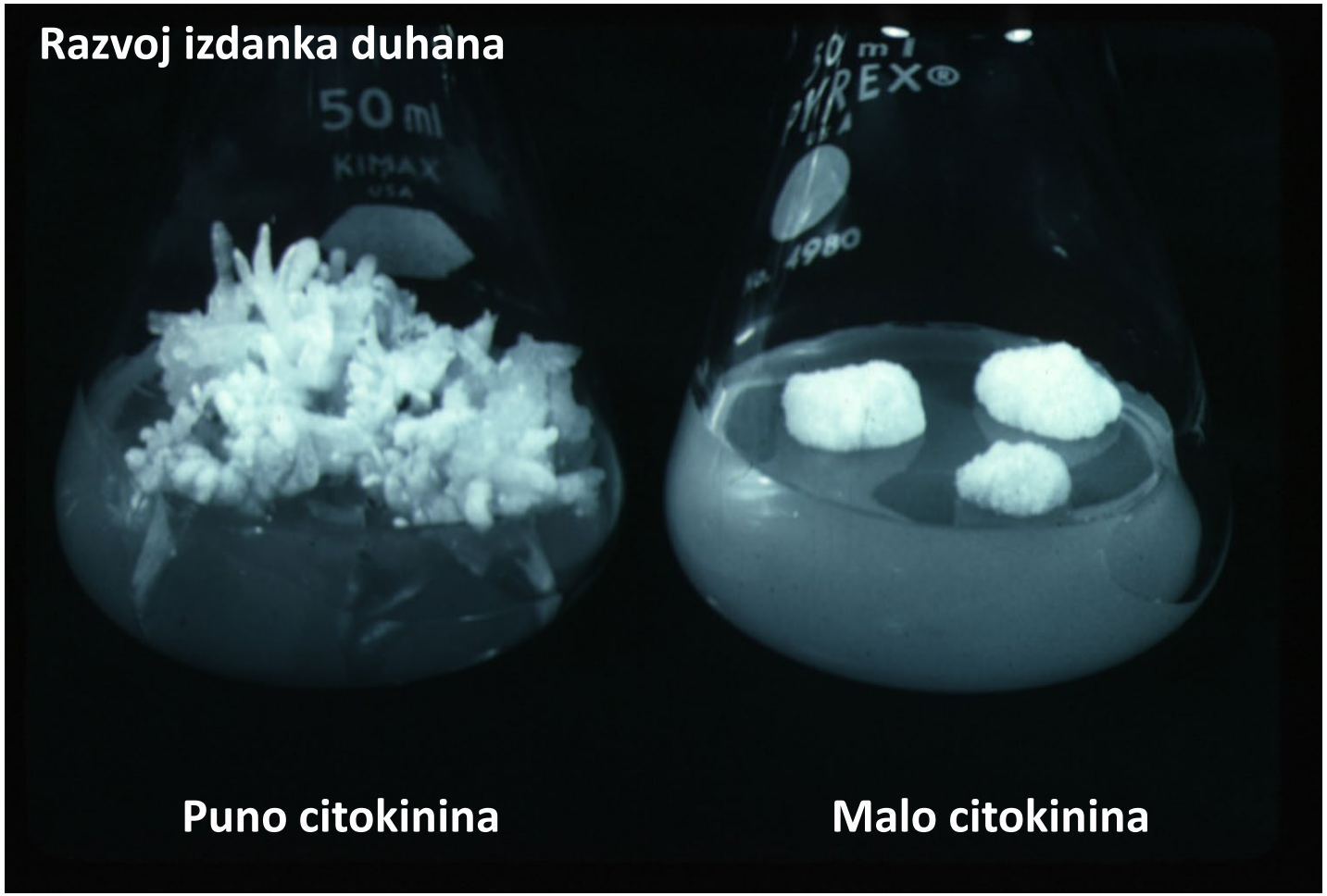
Kultura kalusa - održavanje

- Stvaranjem specijaliziranih stanica u kalusnom staničju nastaje KALUSNO TKIVO.
- Kalusno tkivo nije jednoliko, različita genetska aktivnost izvornih stanica može biti zadržana u kalusu pa nastaju fenotipski različite stanične linije.
- Neke stanice kalusa diferenciraju, a druge ostaju u dediferenciranom stanju i intenzivno se dijele.

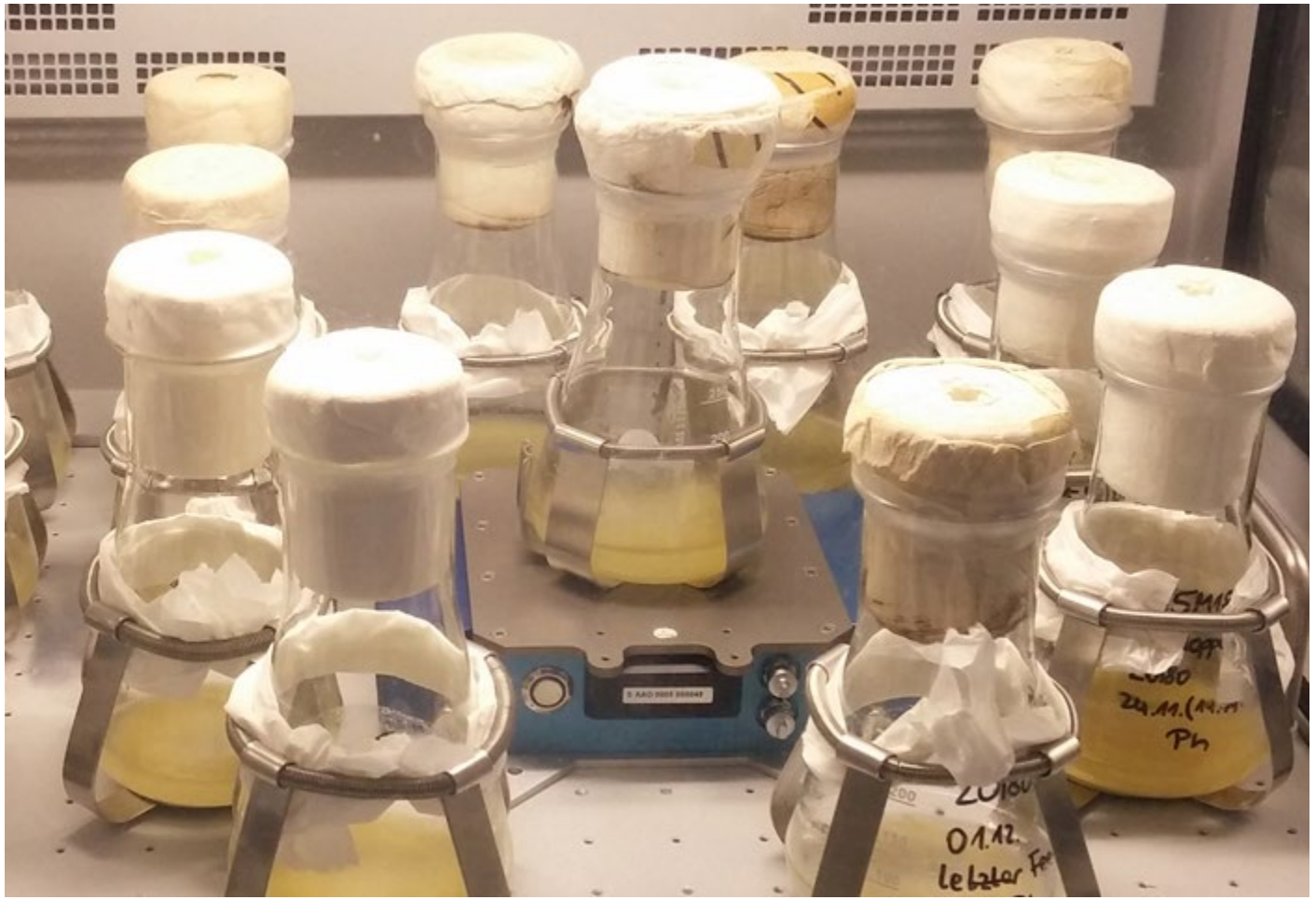


Značajke kalusa određene su statusom stanica iz kojih je kalus induciran i promjenjive su.

Kultura kalusa – regeneracija organa



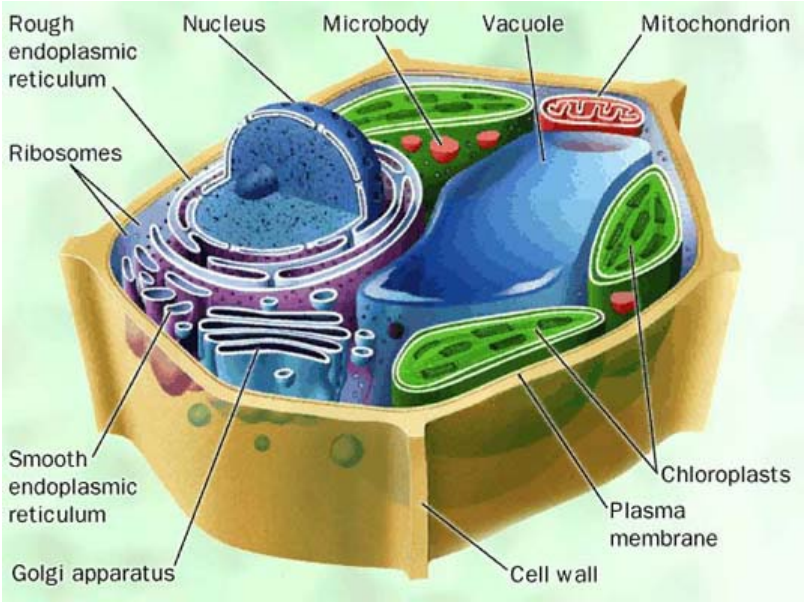
Kultura stanica u suspenziji (stanična suspenzija)



1965. Nickell – prva kontinuirana suspenzija, *Phaseolus vulgaris*

Kultura stanica u suspenziji

- Karakteristike biljnih stanica
  - Velike su (10-100 µM)
  - Zbog stanične stijenke agregiraju
  - Osjetljive na mehanička oštećenja
  - Sporo rastuće (st. ciklus prosječno 24 h)
  - Lako se kontaminiraju
  - Ne toleriraju anaerobne uvjete
  - Mogu rasti do visoke stanične gustoće (>300 g/l svježe tvari)
  - Mogu stvarati vrlo viskozne suspenzije





Kultura stanica u suspenziji (stanična suspenzija)

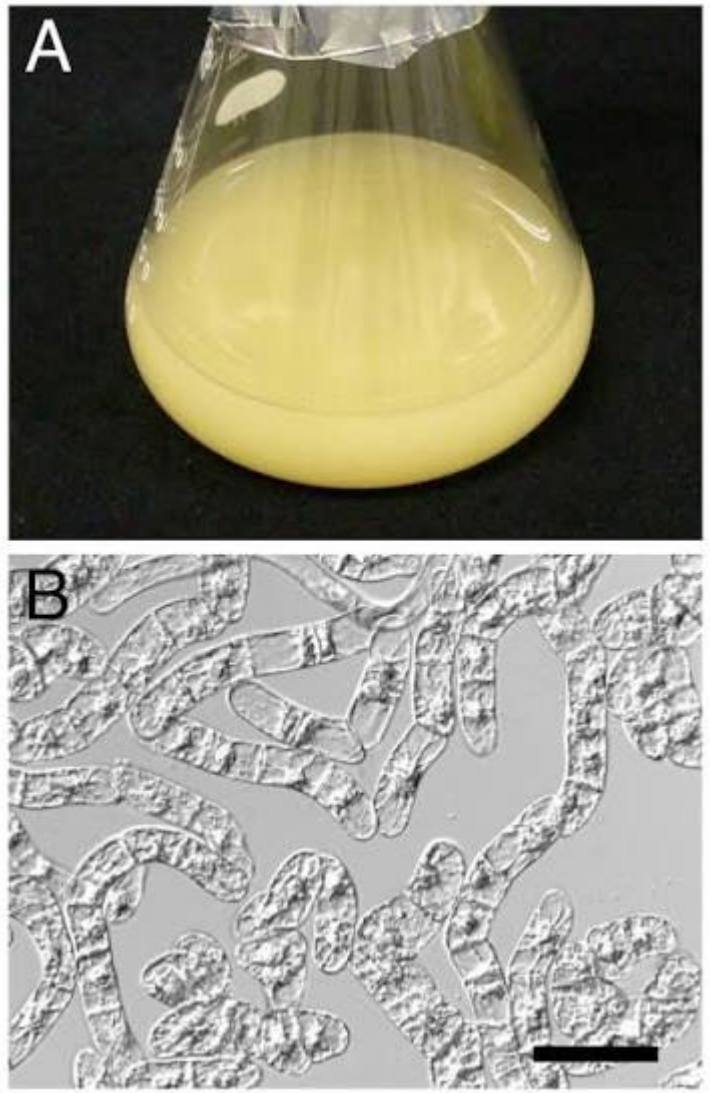
- kultura homogenih pojedinačnih stanica i manjih staničnih nakupina koje rastu u tekućoj podlozi uz neprestano miješanje
  - U tekućoj hranjivoj podlozi izmjena hranjivih tvari je bolja nego na krutoj pa stanice i tkivo bolje i brže rastu.
- Zbog brzog rasta stanične suspenzije su pogodne kada je potrebna veća količina biljne mase – BIOTEHNOLOGIJA.
- Postavlja se kad je potrebno uspostaviti staničnu liniju
- Za proučavanje regulacije staničnog ciklusa
- Za proučavanje i manipulaciju, te proizvodnju sekundarnih metabolita u komercijalne svrhe.



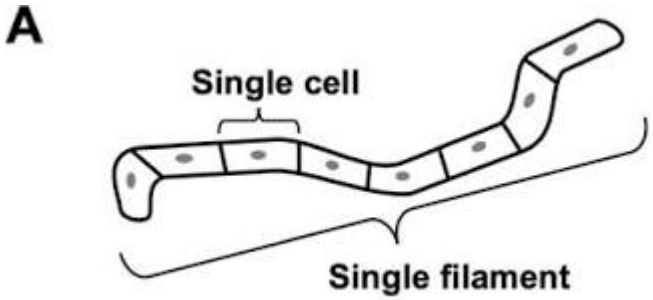


Kultura stanica u suspenziji

- Postavljanje stanične suspenzije
  - Jednostavno iz mekog i/ili rastresitog kalusa.
  - Zahtjeva odstranjivanje velikih staničnih agregata procjeđivanjem.
  - Pogoduje nasađivanje malih staničnih nakupina.
  - Često se dodaje 2,4-D koji sprečava diferencijaciju stanica te omekšava staničnu stjenku i olakšava odvajanje stanica.
  - Malo citokinina pogoduje indukciji staničnih dioba.
  - Osobito važna kontrola pH.
  - Može pomoći enzimatska digestija s pektinazom
  - Miješanje.

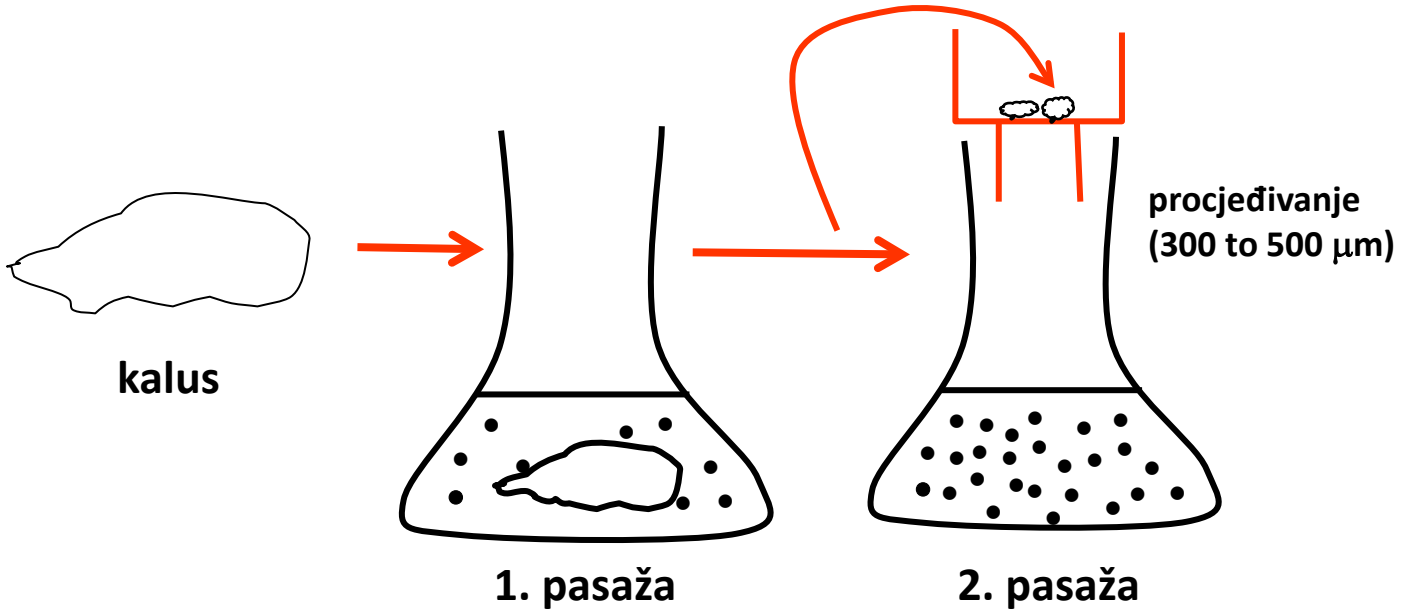


Tobacco BY-2 cells



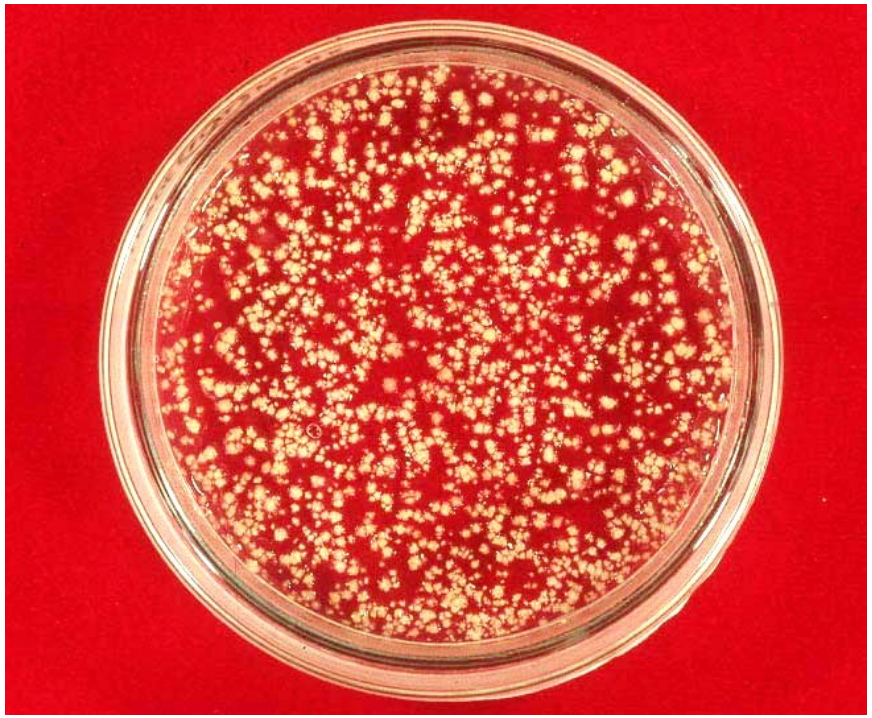
Kultura stanica u suspenziji

- Postavljanje stanične suspenzije
  - Eksplantat za postavljanje stanične suspenzije su najčešće rastresita kalusna tkiva (2-3 g) prenesena u tekuću podlogu (20-100 mL) koja se neprestano miješa na tresilici.
  - Stanične diobe osiguravaju se prozračivanjem podloge (miješanje), te se odvajaju pojedinačne stanice i manje nakupine.
  - Nakon prve pasaže, veće nakupine stanica uklanjaju se filtriranjem.
  - Stanična suspenzija se subkultivira u svježu podlogu.



Kultura stanica u suspenziji

- Stanična suspenzija može se postaviti i iz pojedinačnih stanica
  - Na krutu podlogu (ili na dadilju) se nasade pojedinačne stanice
  - Nakon dioba razvijaju se protokalusi (stanični klonovi)

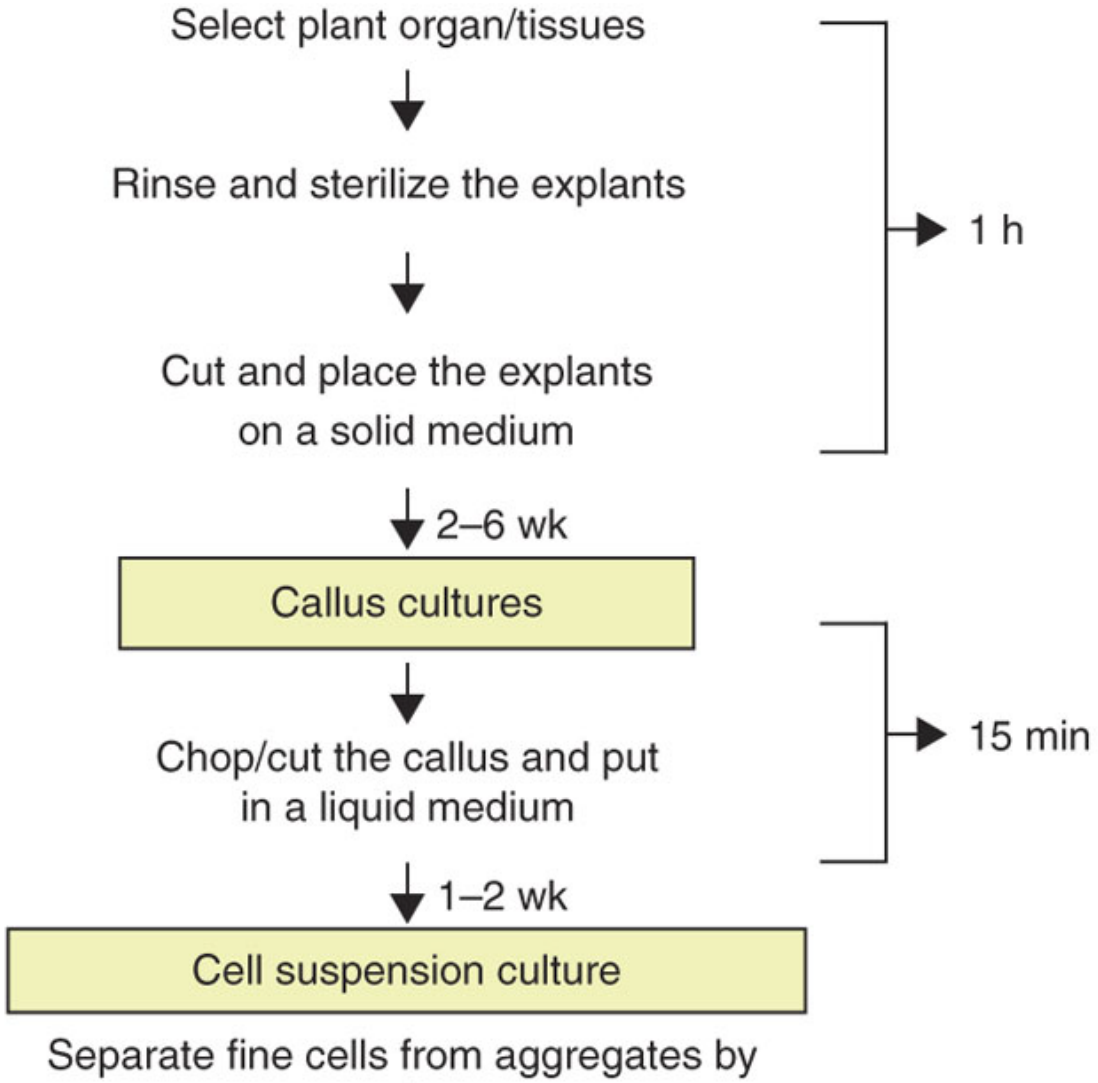


Kultura stanica u suspenziji

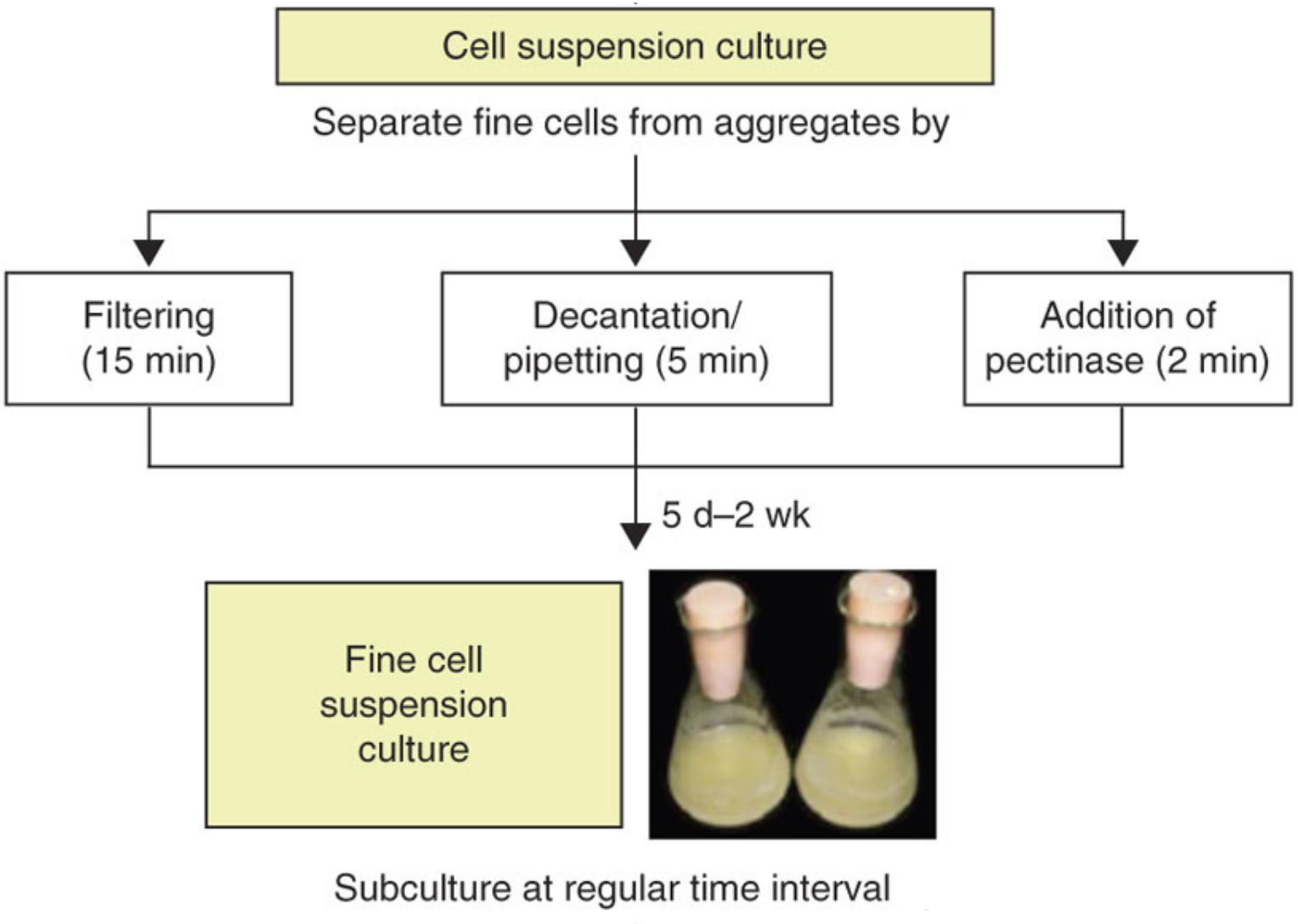
- Idealna stanična suspenzija – morfološka i biokemijska homogenost stanica
  - **Ne postoji!**
- Stanice u suspenziji se mogu **sinkronizirati** – većina stanica je istovremeno u istoj fazi staničnog ciklusa
  - ODLIČAN MODEL ZA PROUČAVANJE STANIČNOG CIKLUSA



Protokol za postavljanje stanične suspenzije

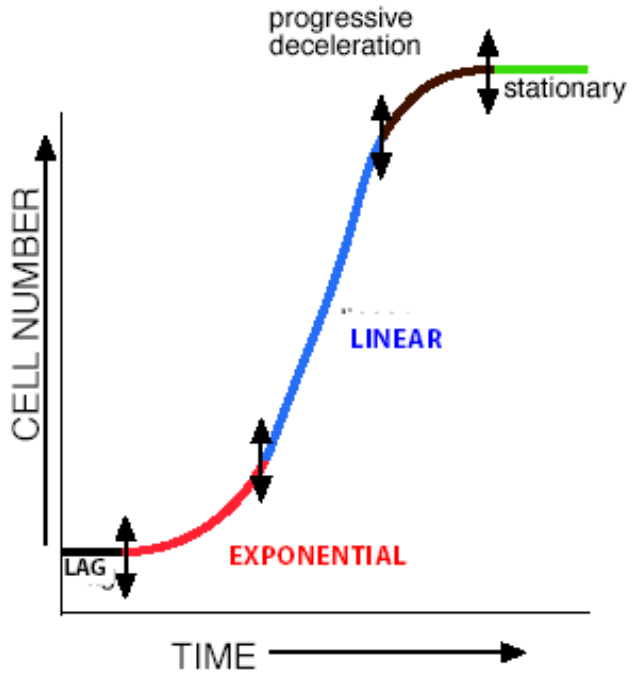


Protokol za postavljanje stanične suspenzije



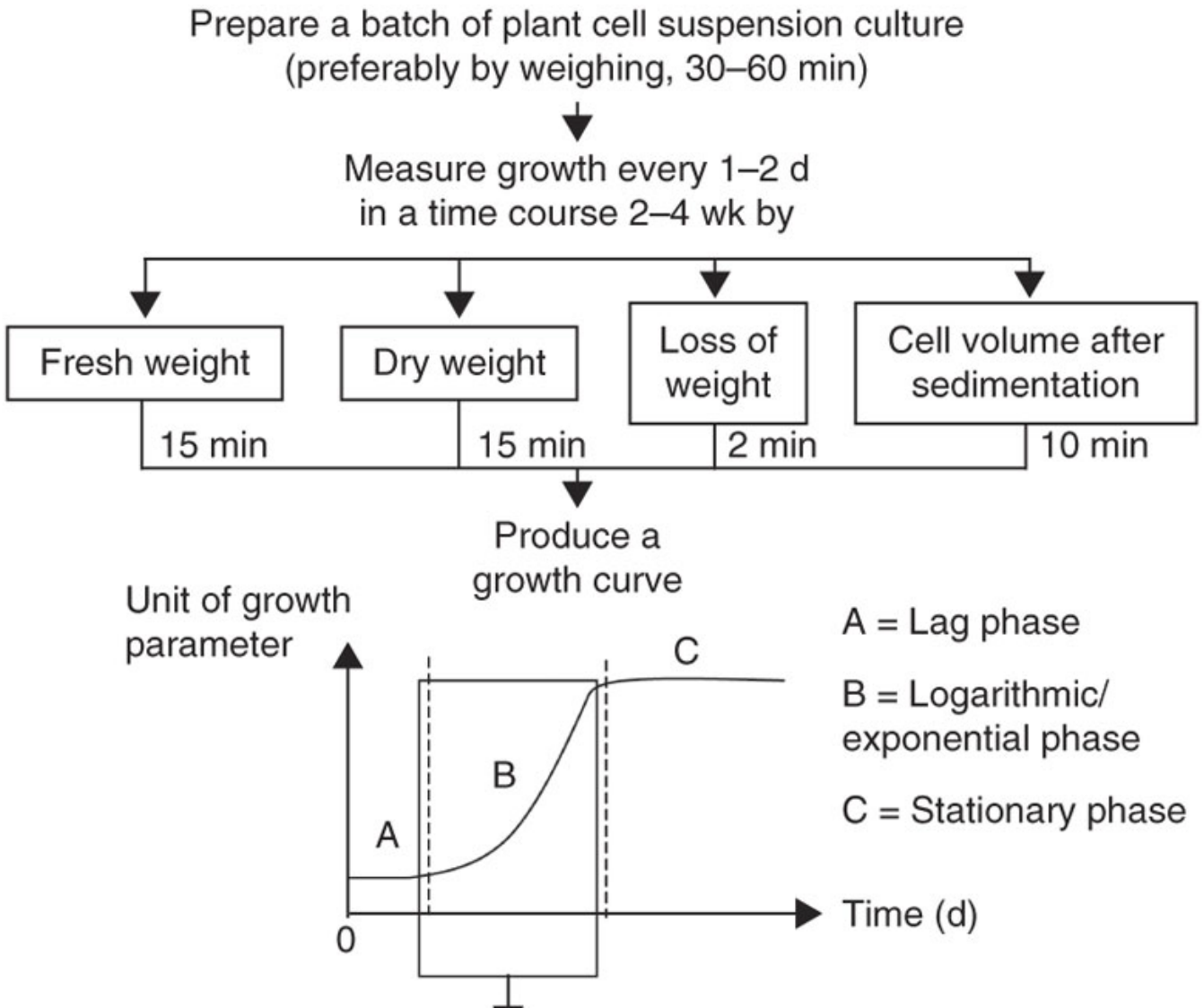
Krivulja rasta stanične suspenzije

- Za svaki tip stanične suspenzije postoji **MINIMALNI POČETNI INOKULUM**
  - početna gustoća stanica mora biti veća od kritične (najmanja koja će omogućiti rast kulture)



- ❑ Duljina LAG faze ovisi o broju stanica u početnom inokulumu.
- ❑ Eksponencionalna faza – sve veći broj stanica u diobi.
- ❑ Linearna faza – sve stanice su u dobi.
- ❑ Faza usporenih dioba – zbog istrošenosti hranjive podloge diobe se zaustavljaju, no stanice rastu (produžni rast stanica)
- ❑ Stacionarna faza - medij je istrošen, diobe prestaju i rast stanica je smanjen. Može doći do apoptoze i raspadanja stanica.

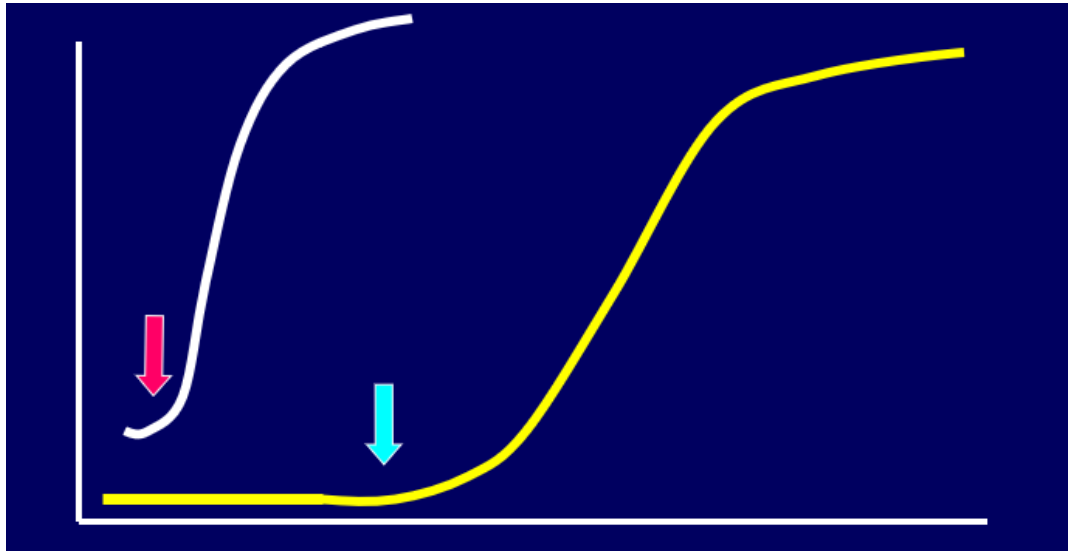
Krivulja rasta stanične suspenzije





Krivulja rasta stanične suspenzije

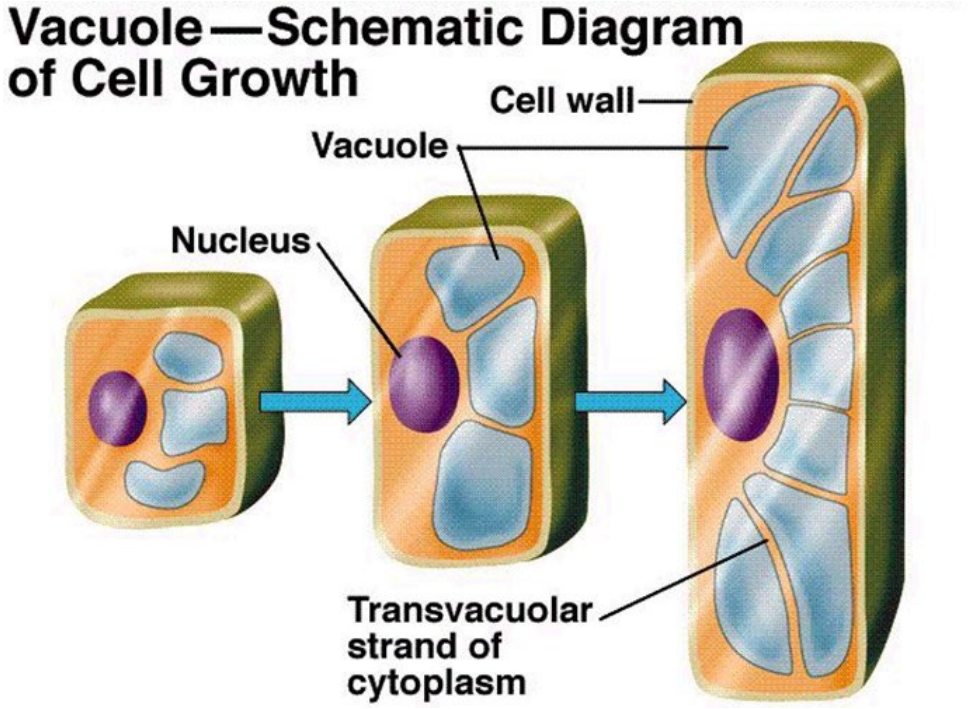
- Za svaki tip stanične suspenzije postoji **MINIMALNI POČETNI INOKULUM**
  - početna gustoća stanica mora biti veća od kritične (najmanja koja će omogućiti rast kulture)



Učinak staničnog inokuluma na stanični rast - veći početni inokulum, kraća lag faza, brži stanični ciklus

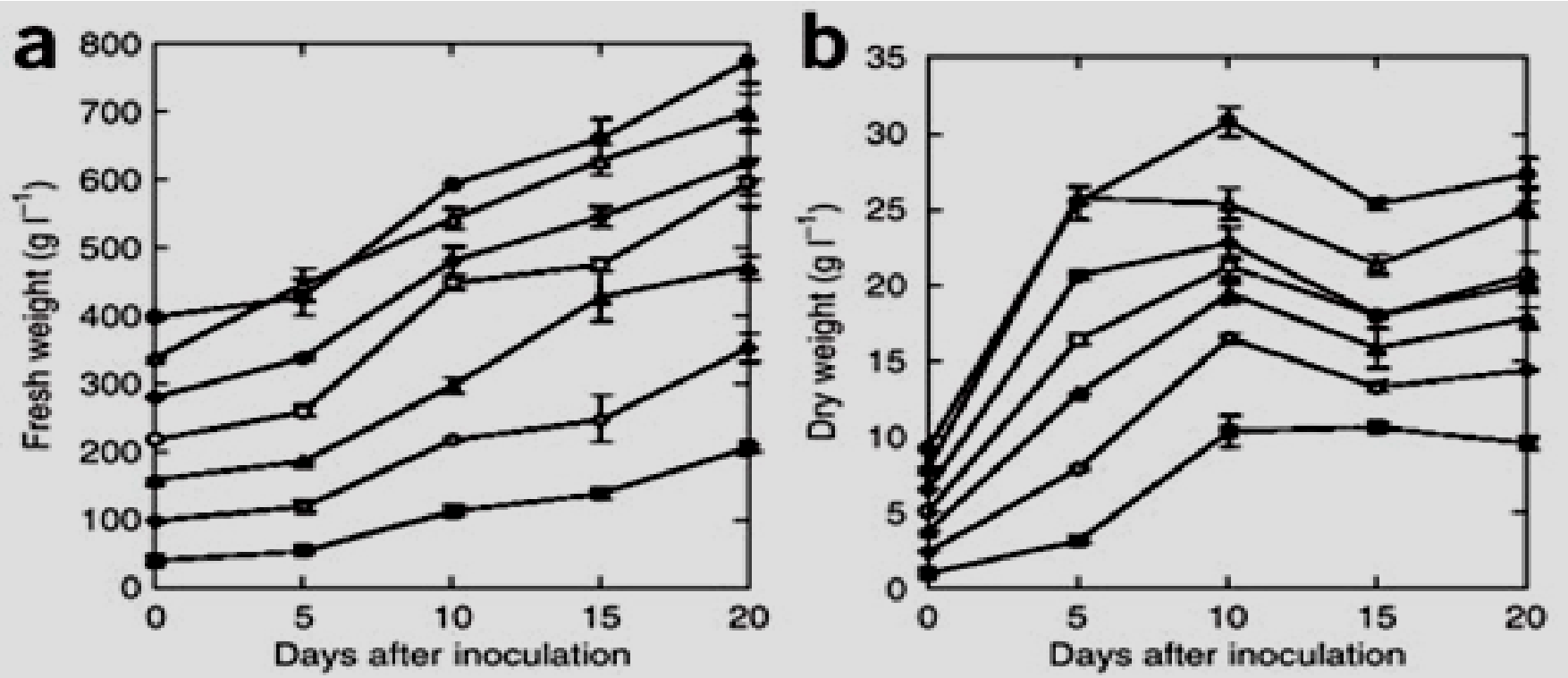
Krivulja rasta stanične suspenzije

- Osim dioba, biljne stanice značajno povećavaju volumen i time doprinose povećanju svježe mase



Nakon prestanka dioba masa stanica može višestruko rasti zbog ekstenzije stjenke i povećanja vakuole zbog nakupljanja vode (i metabolita).

Krivulja rasta stanične suspenzije

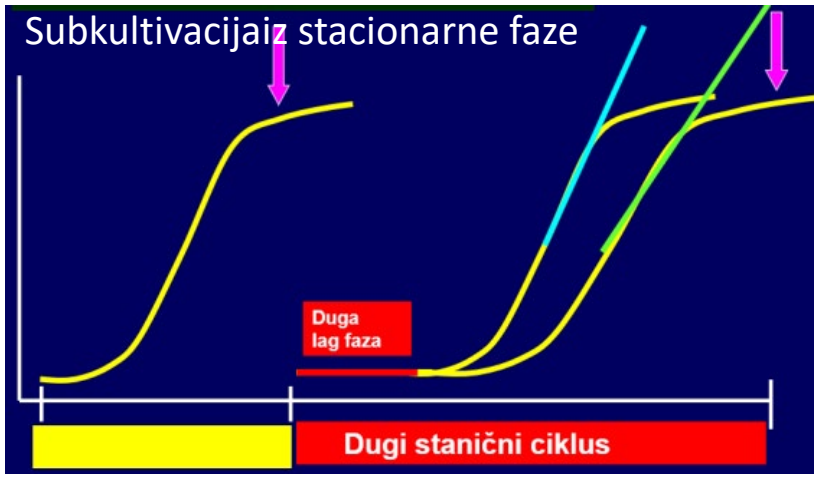


- Početni inokulum značajno utječe na prinos mase
- Nakon što prestanu stanične diobe, svježa masa se povećava zahvaljujući produžnom rastu stanica

Održavanje staničnih suspenzija

- Stanične suspenzije održavaju se u sustavima koji omogućuju miješanje i prozračivanje (bioreaktori ili tikvice na tresilicama)
  - Kidanje staničnih agregata u manje nakupine stanica
  - Održavanje stalnog odnosa pojedinačnih stanica i nakupina
  - Olakšana izmjena plinova

Učinak faze staničnog ciklusa u kojoj se stanice presađuju





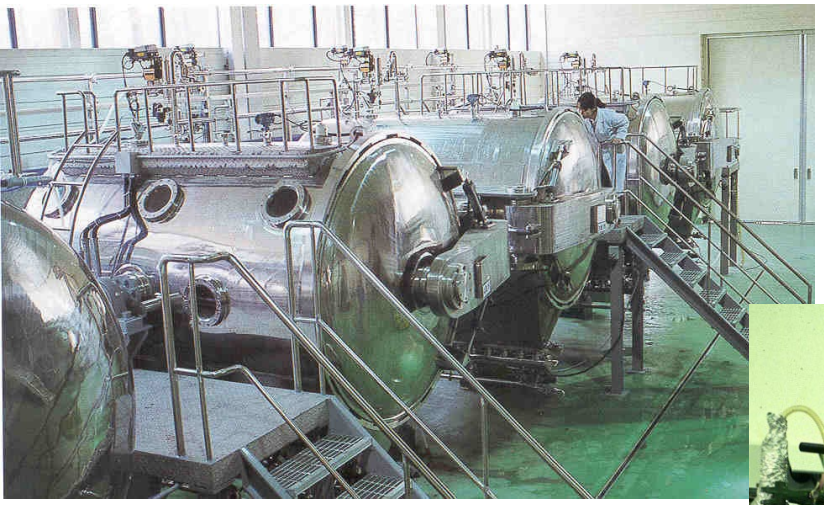
Tipovi staničnih suspenzija

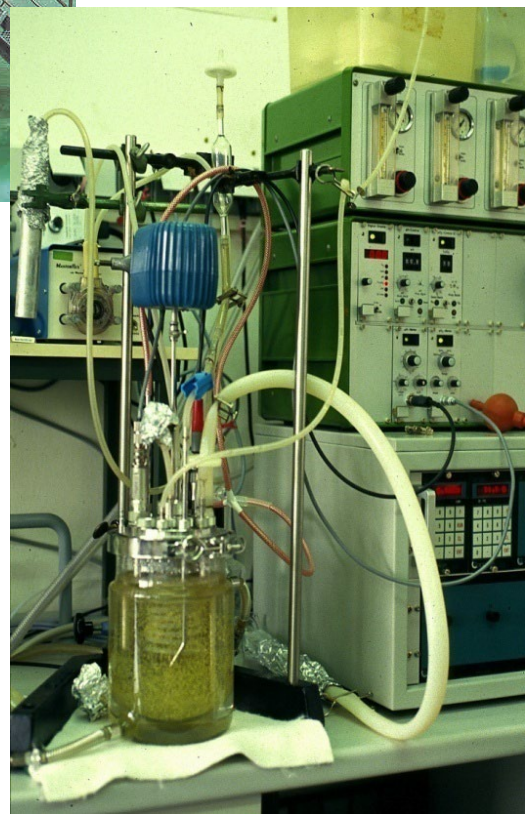
Šaržne (nekontinuirane)

- Određeni broj stanica se inokulira u određeni volumen podloge
- Nakon nekog vremena prestaje rast stanica u određenom volumenu podloge (iscrpljivanje podloge – najčešće manjak dušika ili fosfata) – prijenos stanica u svježu podlogu
- Završni broj stanica ovisi o limitirajućoj hranjivoj komponenti podloge
- Najčešće u tikvicama ili bioreaktorima zatvorenog tipa
  - Erlenmeyerove tikvice: volumen suspenzije zbog aeracije ne smije premašiti 20% kapaciteta tikvice
- Ciklus rasta: 3 do 6 st. dioba svake stanice početnog inokuluma, 12-25 dana



Tipovi staničnih suspenzija





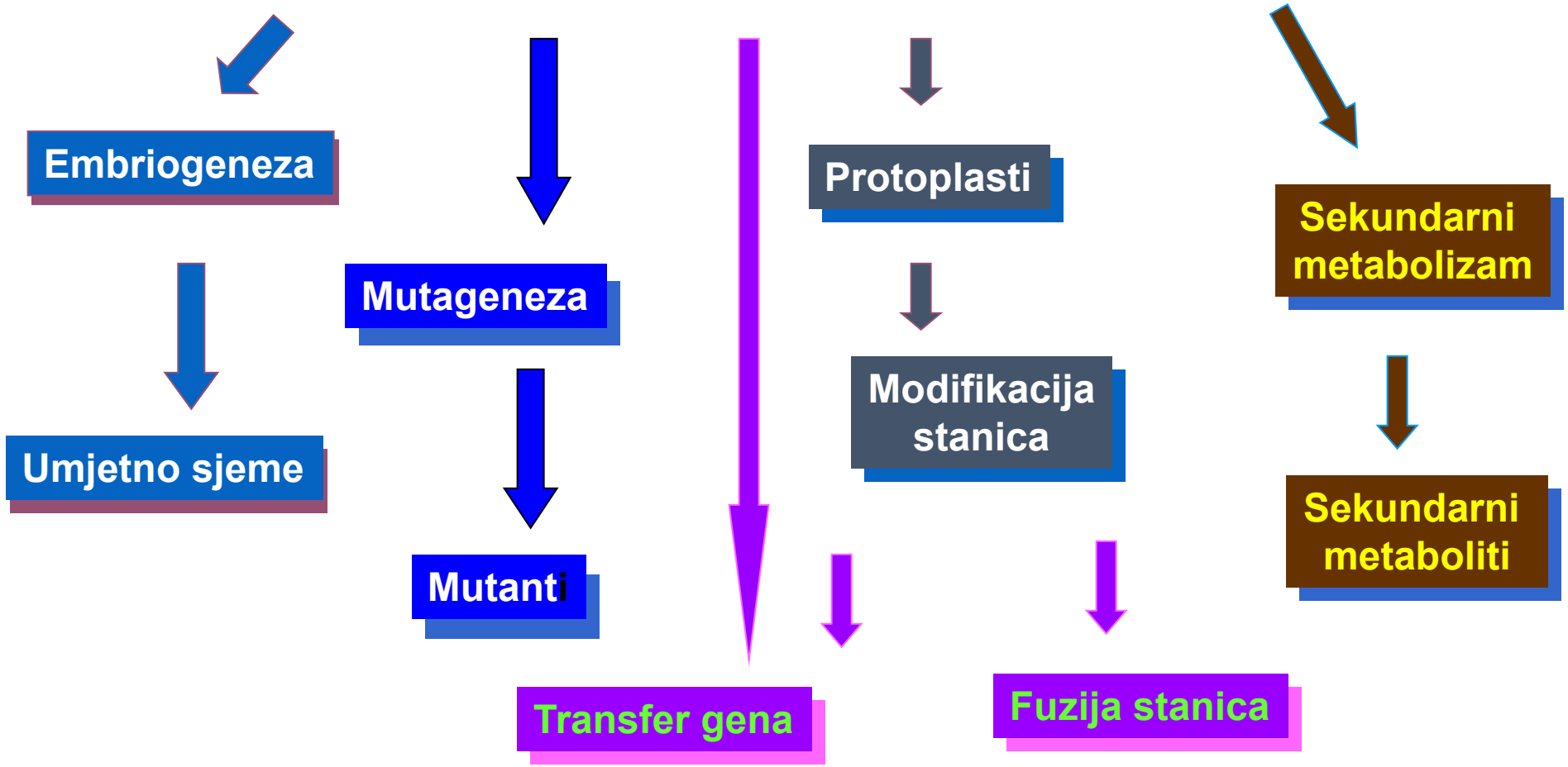
Kontinuirane

- Bioreaktori

Zatvoreni tip: kontinuirano ili povremeno odvođenje dijela istrošene podloge i dovođenje svježe. Kulture imaju produženu eksponencijalnu fazu, fazu linearnog rasta i stacionarnu fazu. Korisne za proizvodnju sekundarnih metabolita

Otvoreni tip: uz podlogu odvodi se i određena količina stanice te se stanična gustoća održava konstantnom i optimalnom. Mogu trajati godinama.

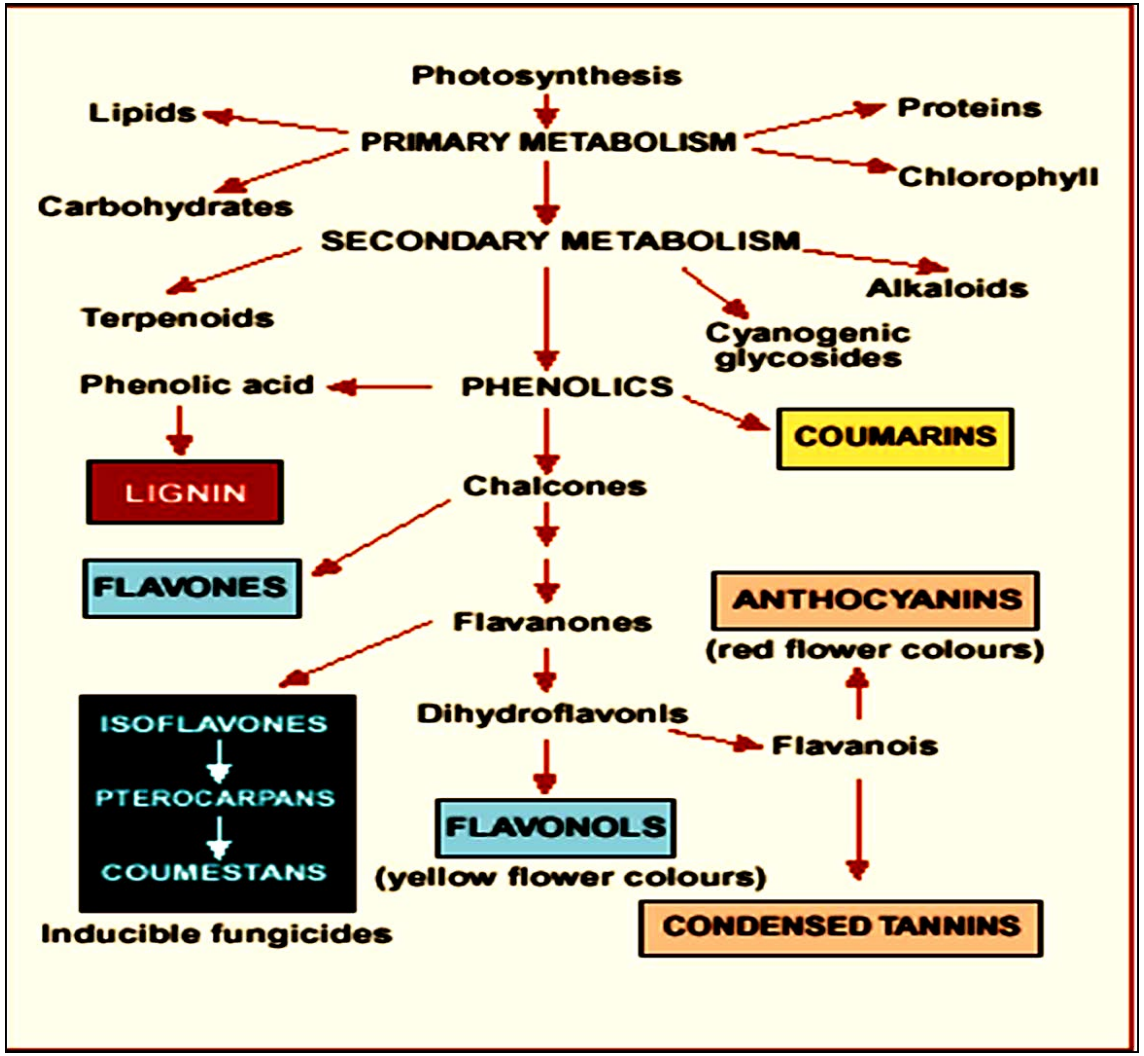
Upotreba staničnih suspenzija

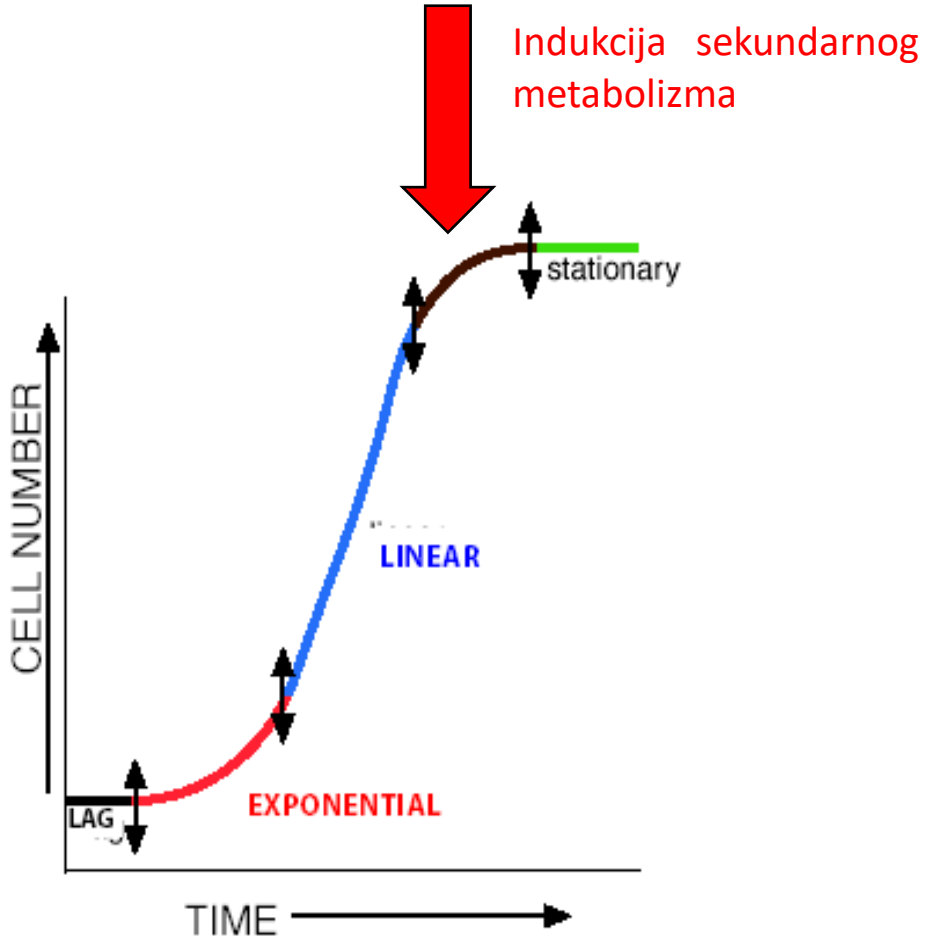


Sinteza sekundarnih metabolita u biljnoj staničnoj suspenziji

- Primarni cilj: učinkoviti i brzi rast stanica (veliki prinos biomase) i učinkovita sinteza sekundarnog metabolita
- Sekundarni metaboliti biljkama većinom služe kao zaštita od nepovoljnih uvjeta okoliša ili od predatora
- Prilikom obrane od stresa biljka usporava/zaustavlja stanične diobe i rast i reprogramira se za proizvodnju sekundarnih metabolita
- Većina sekundarnih metabolita nepovoljno djeluje na rast i stanične diobe pa se sinteza u staničnoj suspenziji potiče u stacionarnoj fazi rasta
    - Elicitacija: proces izazivanja učinaka poput napada patogena u biljkama kako bi se potaknula ekspresija gena koji su odgovorni za sintezu sekundarnih metabolita. U tu svrhu koriste se biotički i abiotički elicitori (jasmonska kiselina, polimeri glukana, glikoproteini, stanični ekstrakt gljivica, UV zračenje, soli teških metala…).
    - Dodatak prekursora za biosintezu sekundarnih metabolita: ***precursor feeding***

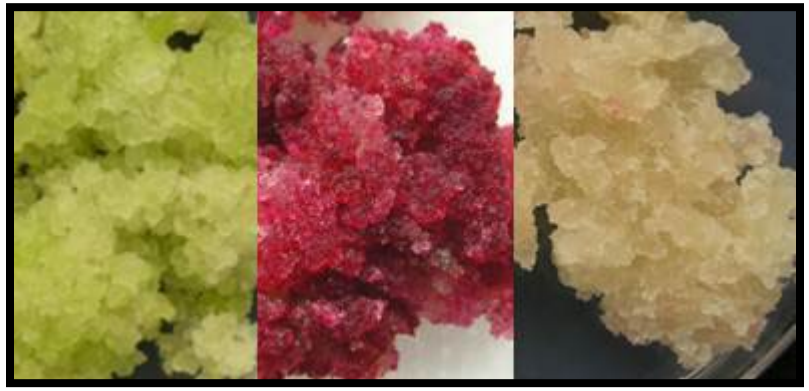
Sinteza sekundarnih metabolita u biljnoj staničnoj suspenziji





Sinteza sekundarnih metabolita u biljnoj staničnoj suspenziji

- Odabir stanične linije
- Odabir najpovoljnije podloge za rast stanica
- Odabir najpovoljnijeg induktora sekundarnog metabolizma



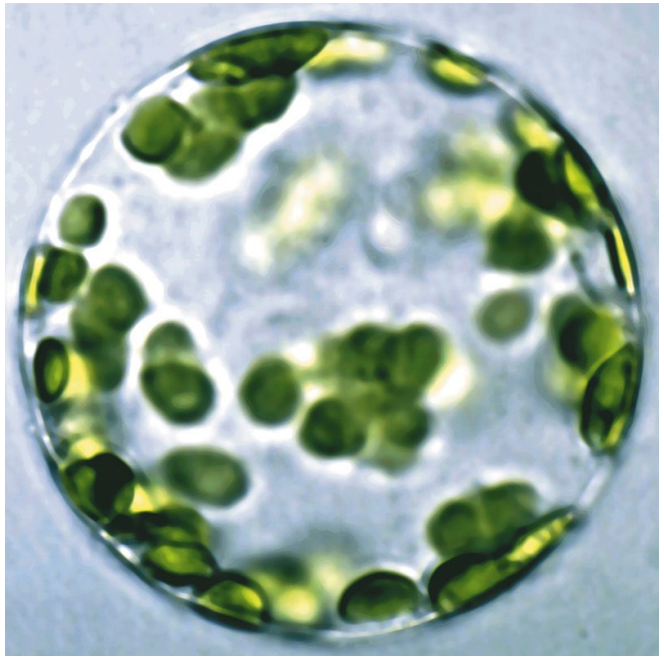
Kalus šećerne repe

Sinteza sekundarnih metabolita u biljnoj staničnoj suspenziji

Metabolite	Usage	Plant species
Ajmalicine	Antihypertensive	*Cath. roseus*
Artemisinin	Antimalarial	*Artemisia annua*
Ajmaline	-	*Ra. serpentina*
Acinitine	-	*Acotinum* spp.
Berberine	Intestinal ailment	*C. japonica*
Camptothecin	Antitumour	*Camptotheca acuminata*
Capsaicin	Counterirritant	*Ca. frutescens*
Castanospermine	Glycoside inhibitor	*Castanospermum australe*
Codeine	Sedative	*P. somniferum*
Colchicine	Antitumour	*Colchium autumnale*
Digoxin	Heart stimulant	*Di. lanata*
Diosgenin	Steroidal precursor	*Dioscorea deltoidea*
Ellipticine	Antitumour	*Orchrosia elliptica*
Emetine	-	*Cephaclis ipecaccuanha*
Forskolin	Bronchial asthma	*Coleus forskolii*
Ginsenosides	Health tonic	*Panax ginseng*
Morphine	Sedative	*P. somniferum*
Podophyllotoxin	Antitumour	*Podophyllum petalum*
Quinine	Antimalarial	*Cinchon. ledgeriana*
Sanguinarine	Antiplaque	*Sanguinaria canadensis*
		P. somniferum
Shikonin	Antibacterial	*L. erythrorhizon*
Taxol	Anticancer	*Taxus* spp.
Vincristine	Antileukemic	*Cath. roseus*
Vinblastine	Antileukemic	*Cath. roseus*

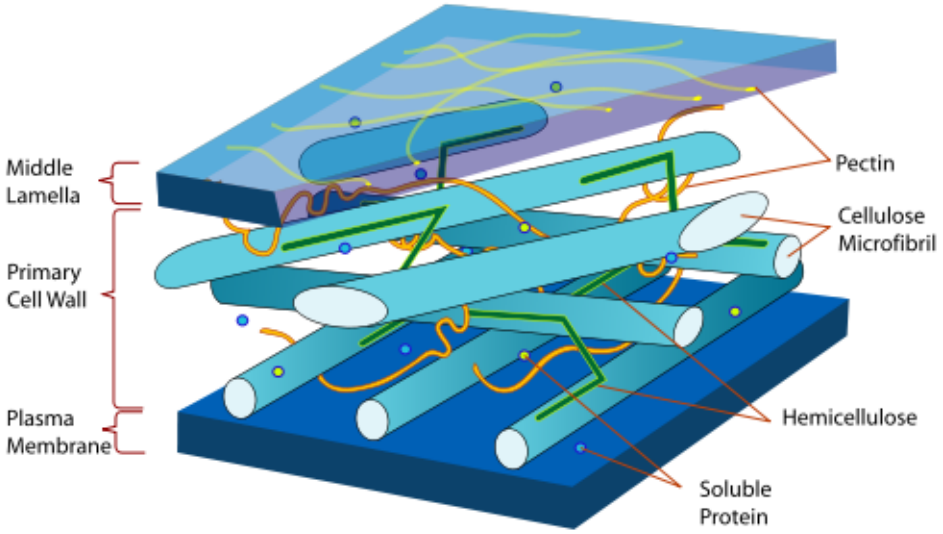
Kultura protoplasta

- PROTOPLASTI – stanice bakterija, gljiva i biljaka sa kompletno uklonjenom staničnom stjenkom
- SFEROPLASTI – stanice sa djelomično uklonjenom staničnom stjenkom
- **Biljni protoplasti su izrazito osmotski osjetljivi!**





Stanična stijenka biljaka



Središnja lamela

"Ljepilo" –pektinski sloj bogat Ca2+ i Mg2+

Primarna stijenka

Fleksibilni sloj

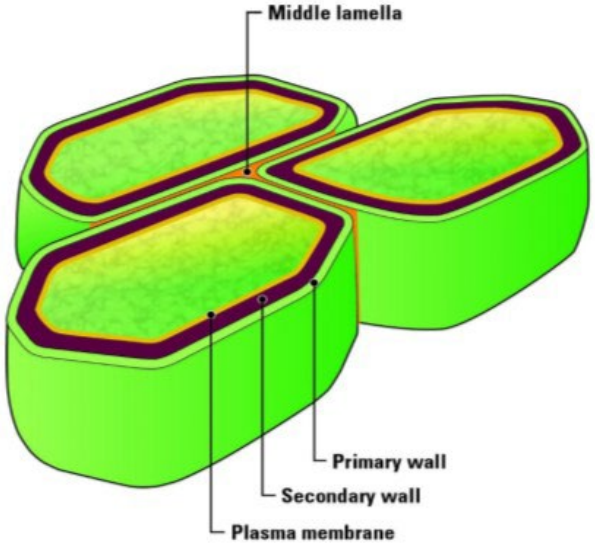
Celuloza, hemiceluloza (većinom ksiloglukan), pektin, proteini ekspanzini, enzimi (hidrolaze, esteraze, peroksidaze)

Na površini biljke kutikula (kutin i voskovi)

Sekundarna stijenka

Fiksni sloj koji se (ponekad) ulaže između primarne stijenke i st. membrane

Celuloza, hemiceluloza (ksilan), pektin, lignin



Glavna uloga stijenke je spriječiti povećanje i pucanje stanica uslijed dotoka vode.

Zbog stanične stijenke biljna stanica je rigidna.

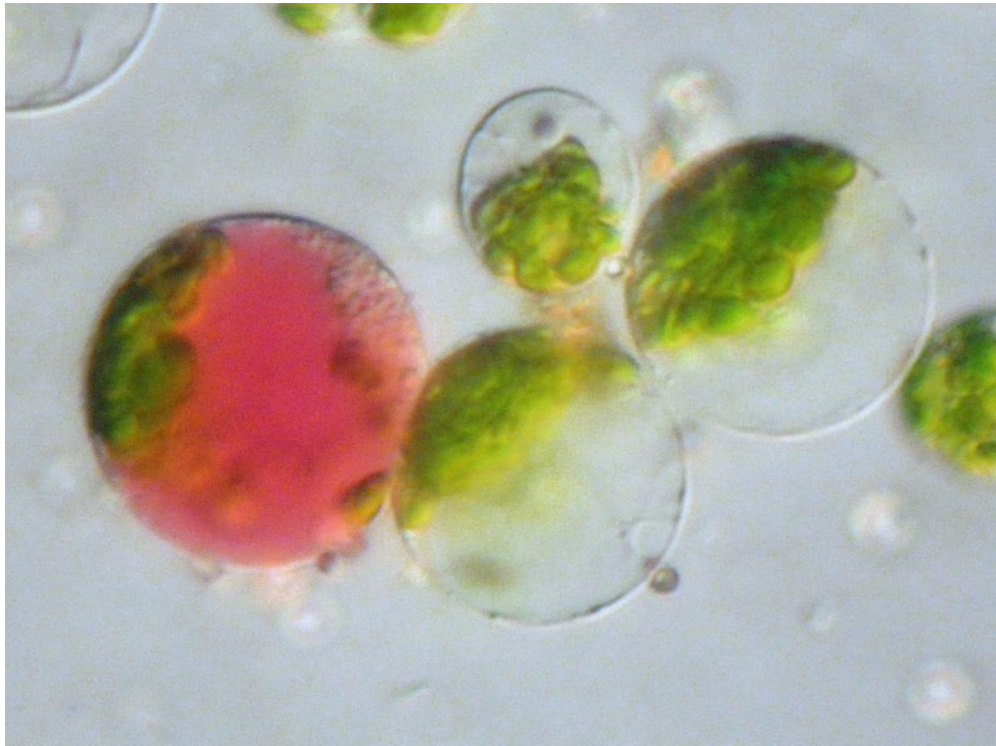
Stanične stijenke cijele biljke određuju izgled biljke (morfologiju).

Sastav i svojstva stanične stijenke variraju tijekom staničnog ciklusa i tijekom diferencijacije stanice.

Kultura protoplasta

- Koriste se za proučavanje biologije membrane, osobito za proučavanje unosa makromolekula i virusa
- Upotreba za genetičke transformacije u znanstvenim istraživanjima
- Primjena u oplemenjivanju
  - transformacija protoplasta
  - fuzija protoplasta

  →Somatski hibridi
    - Spajanje protoplasta taksonomski različitih jedinki
    - prenošenje poligenskih svojstava (tolerancija na hladnoću, otpornost, boja cvijeta…)



Kultura protoplasta

- Protoplasti se koriste za transformaciju i/ili za fuziju.
  - Metoda za međuvrsni transfer organela
- Moguća je regeneracija kompletne biljke
  - nastaju transformanti i/ili somatski hibridi (fuzijom)

Stadiji kulture protoplasta

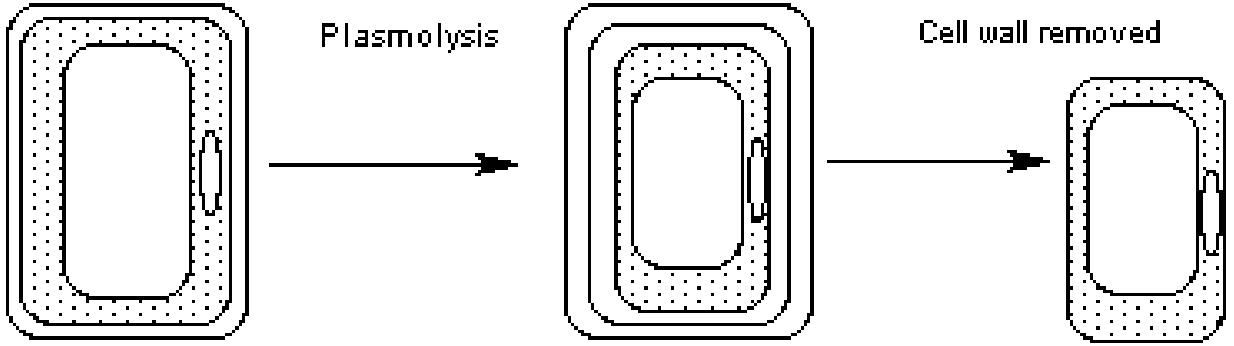
1. izolacija
2. kultivacija (fuzija i/ili transformacija)
3. regeneracija nove stanične stijenke
4. stanične diobe – nastaju protoklonovi (protokalusi)
5. regeneracija biljaka (iz protokalusa/kalusa!)
6. karakterizacija transformanata i/ili hibrida

Kultura protoplasta – izolacija protoplasta

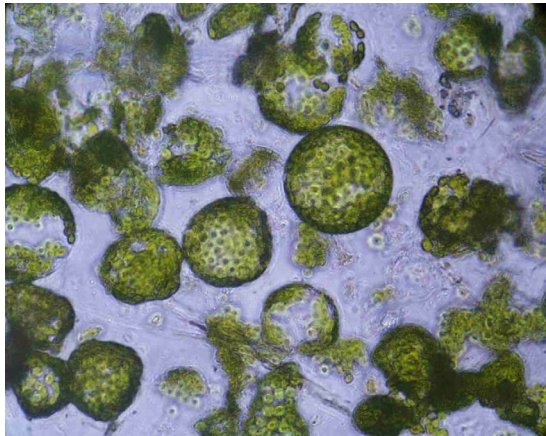
- Izbor tkiva za kulturu:
  - Listovi, kalus, stanična suspenzija, embriji…







1. Sterilizacija tkiva ili korištenje tkiva iz kulture *in vitro*
2. Mehaničko usitnjavanje tkiva
3. Inkubacija u plazmolitiku
4. Tretiranje enzimima za razgradnju stijenke
5. Odvajanje protoplasta od nerazgrađenih dijelova tkiva
6. Odvajanje protoplasta od raspadnutih dijelova stanica

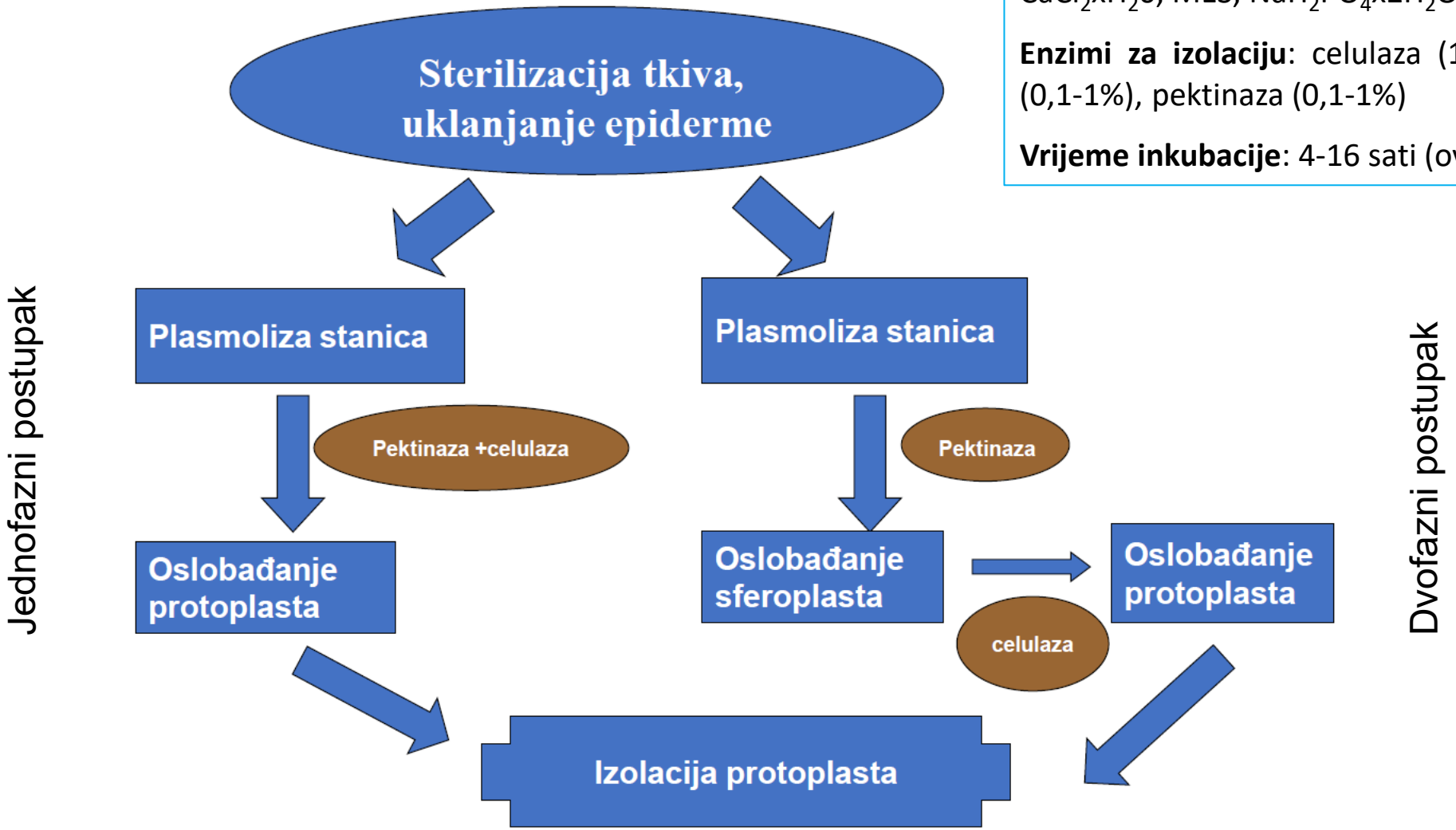


Kultura protoplasta – izolacija protoplasta

Plazmolitici: glukoza, manitol, sorbitol, saharoza, $CaCl_2xH_20$, MES, $NaH_2PO_4x2H_2O$

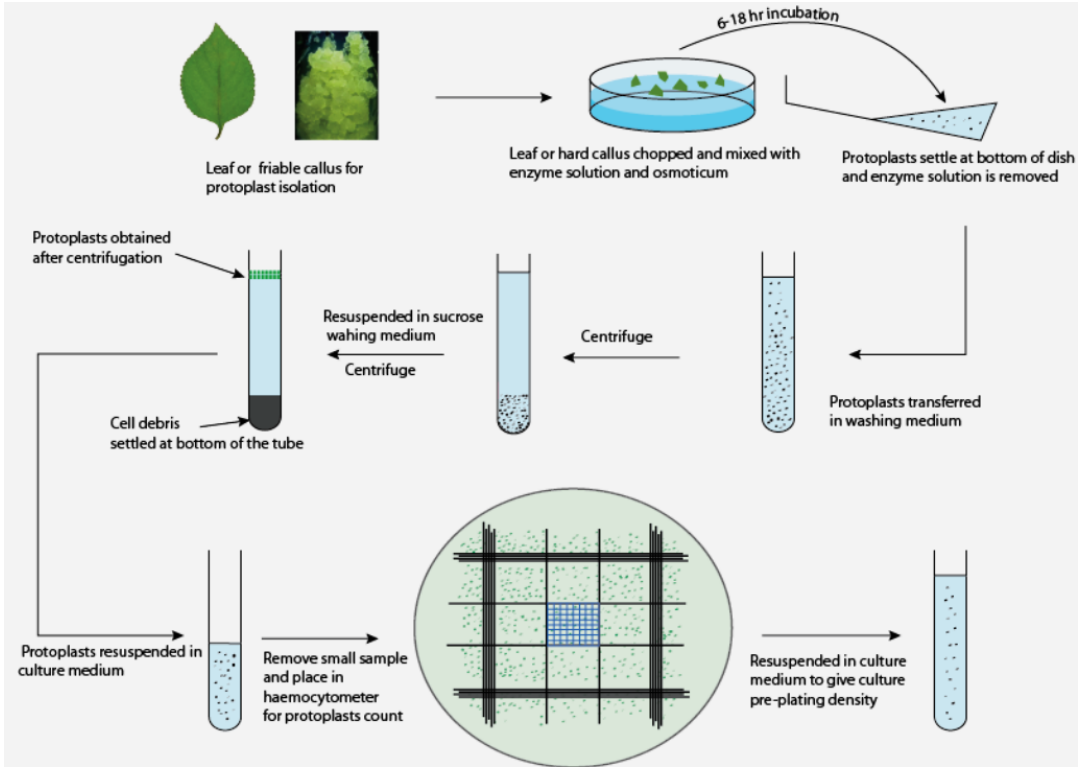
Enzimi za izolaciju: celulaza (1-10%), hemicelulaza (0,1-1%), pektinaza (0,1-1%)

Vrijeme inkubacije: 4-16 sati (ovisno o temperaturi)



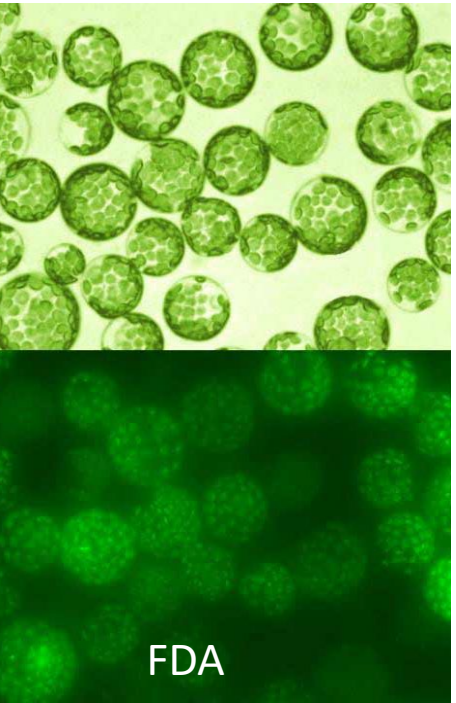
Kultura protoplasta – izolacija protoplasta

- Pročišćavanje protoplasta
  1. Filtracija kroz pore 40-100 µm
  2. Centrifugiranje (100 × g) (oprez - protoplasti lako pucaju!)
  3. Pročišćavanje u gradijentu saharoze ili sorbitola (0,4 – 0,6 M)

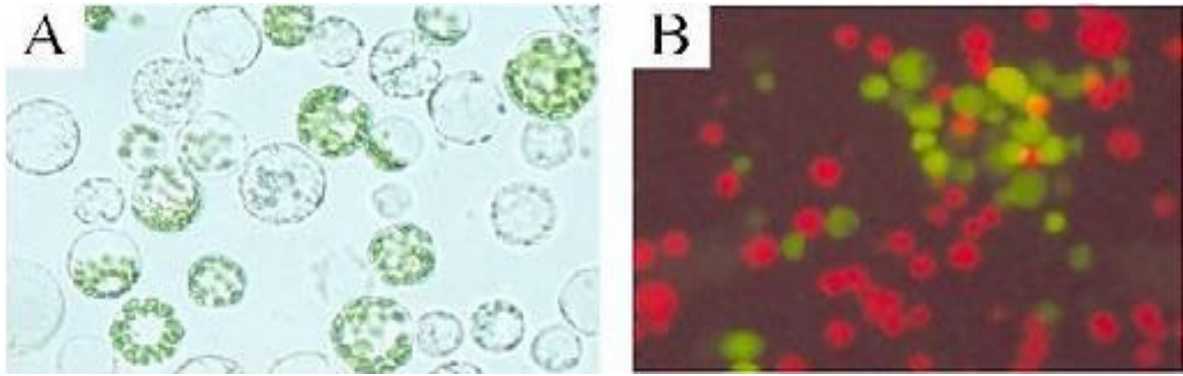


Kultura protoplasta – izolacija protoplasta

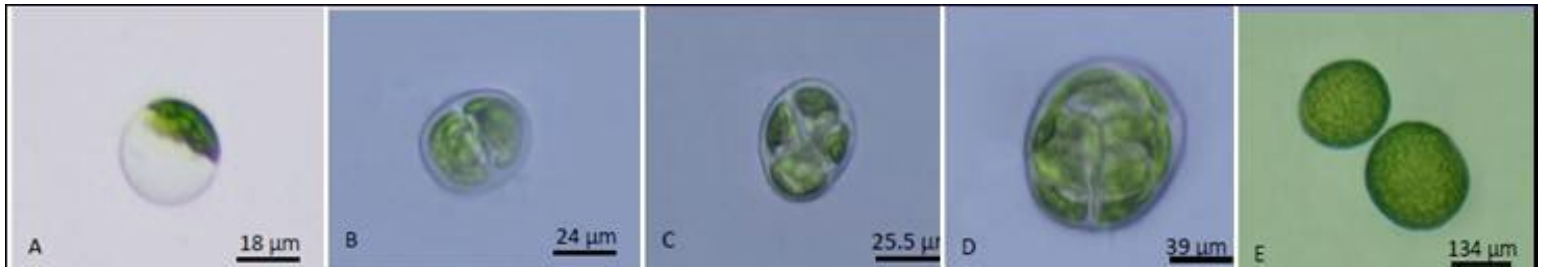
- Test vijabilnosti
  - Fluorescein diacetat, FDA
    - živi protoplasti/stanice = zelena fluorescencija
  - Propidij jodid, PI
    - ulazi u mrtve stanice pa jezgre mrtvih protoplasta fluoresciraju crveno



- OPREZ! Protoplasti svih stanica koji sadrže klorofil (i mrtvih i živih) autofluoresciraju crveno

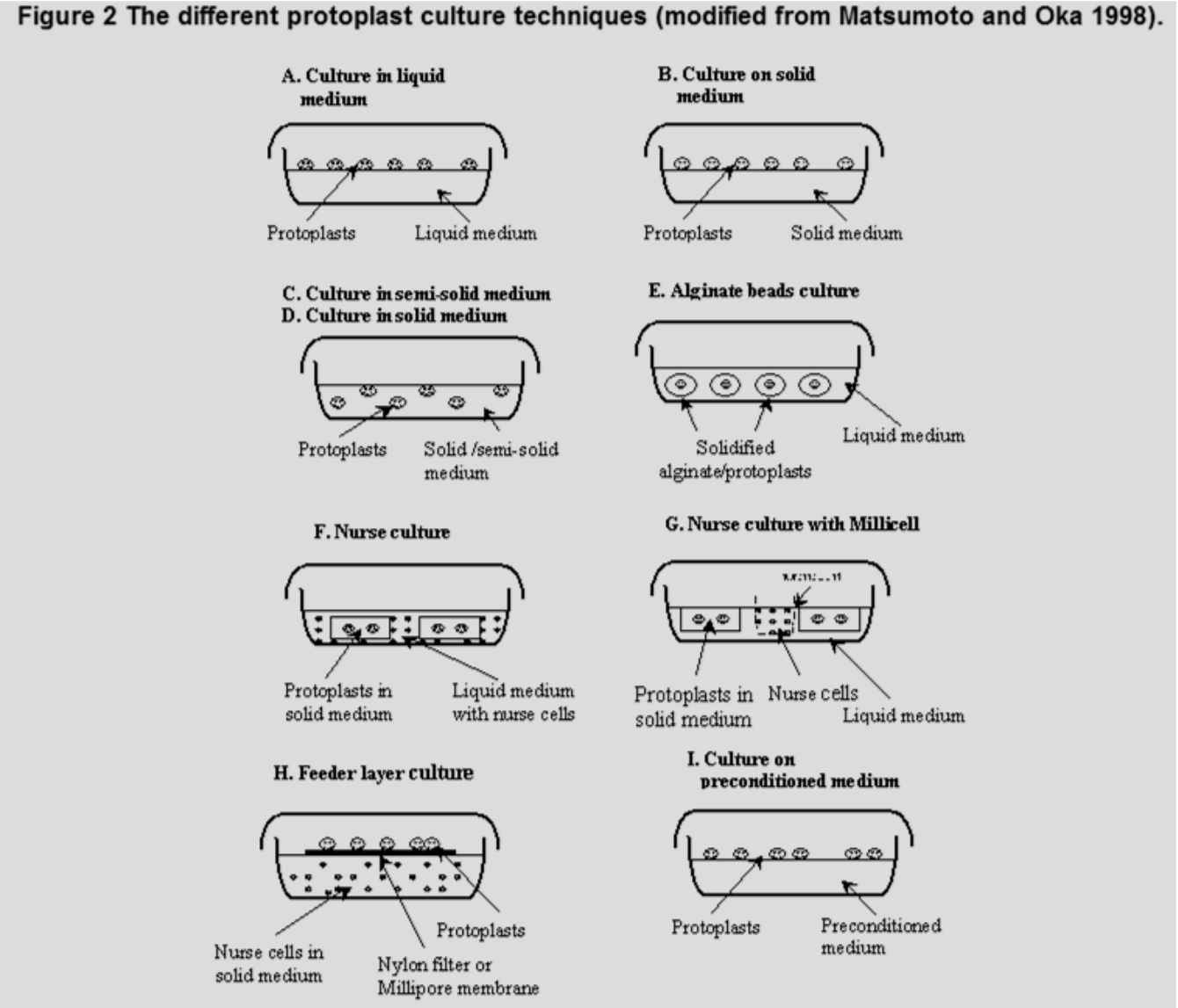


Kultura protoplasta – postavljanje kulture

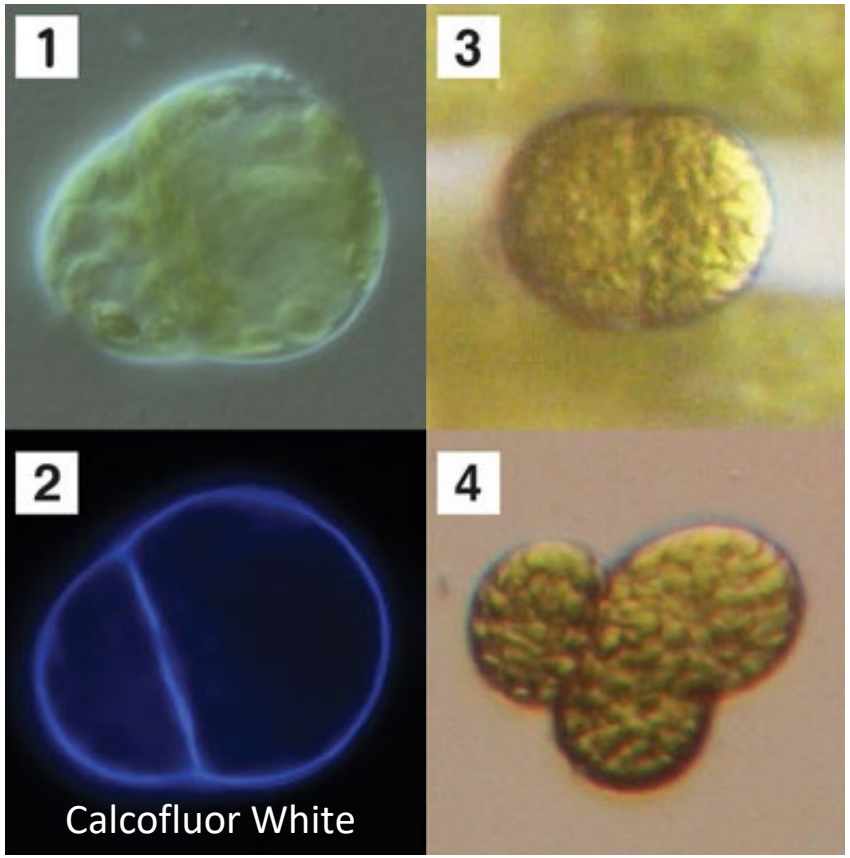


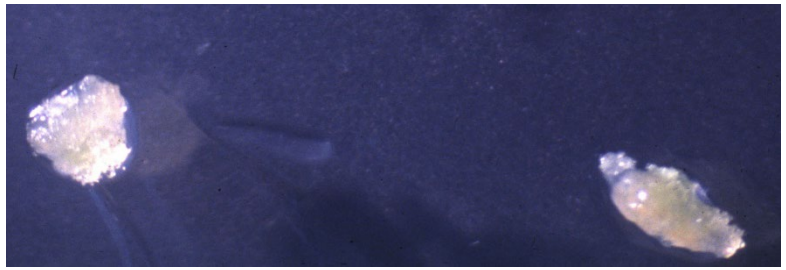
- minimalni početni inokulum
- mogućnost selekcije hibrida
  - dodatni tipovi kultivacije: smanjenje broja (gustoće) protoplasta zbog lakše selekcije)
- uzgoj u kapi podloge, viseća kap, “uzgoj na dadilji” …
- Modificiran sastav hranjivih podloga
- Regeneracija stanične stijenke preduvjet je za daljnje diobe i regeneraciju biljke

Kultura protoplasta – postavljanje kulture

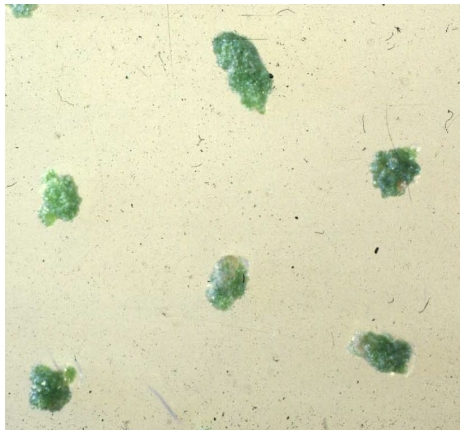


Kultura protoplasta
– regeneracija stanične stijenke



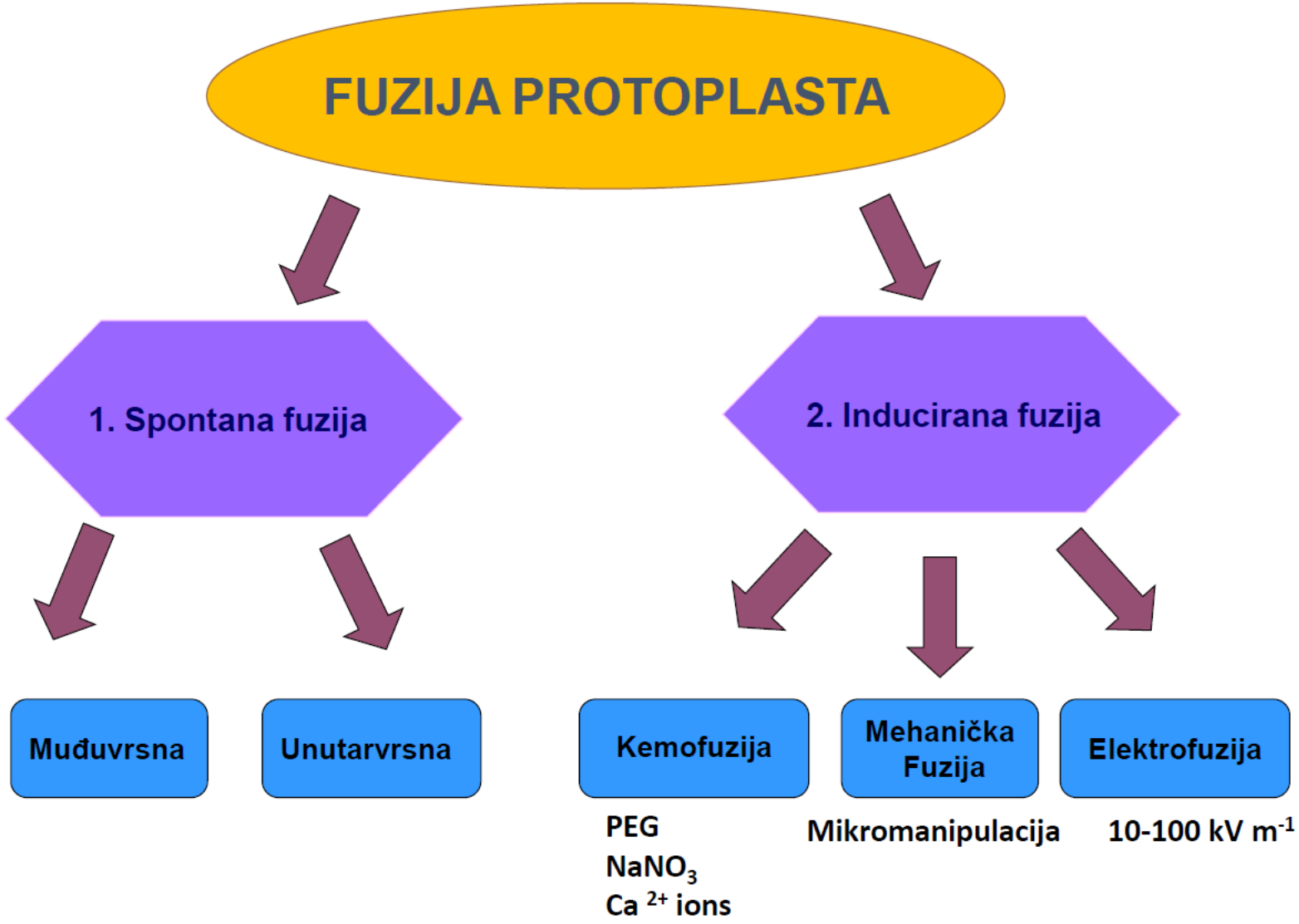


protokalusi

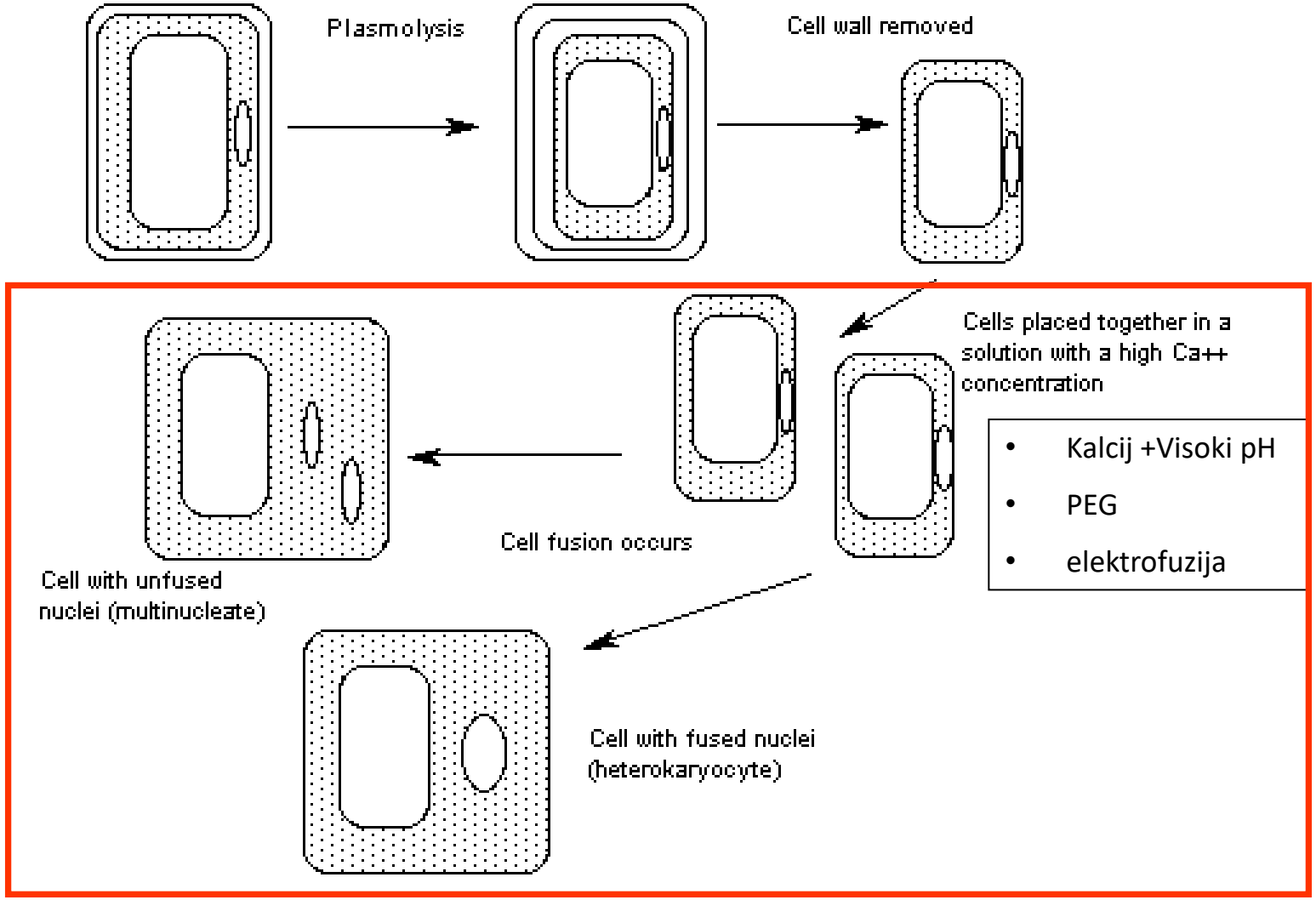




Kultura protoplasta – fuzija protoplasta

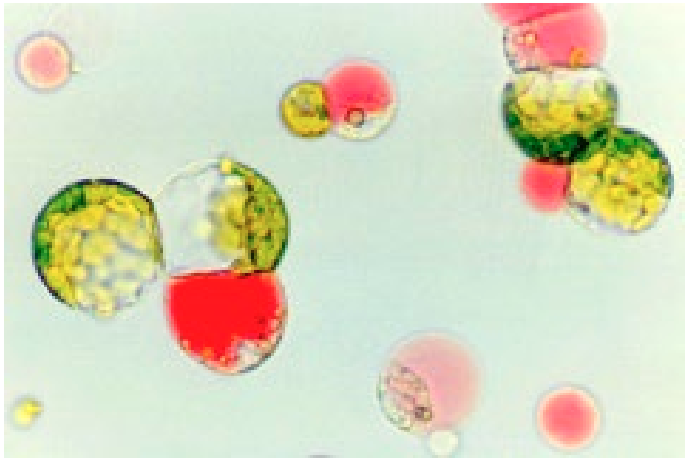


Kultura protoplasta – fuzija protoplasta

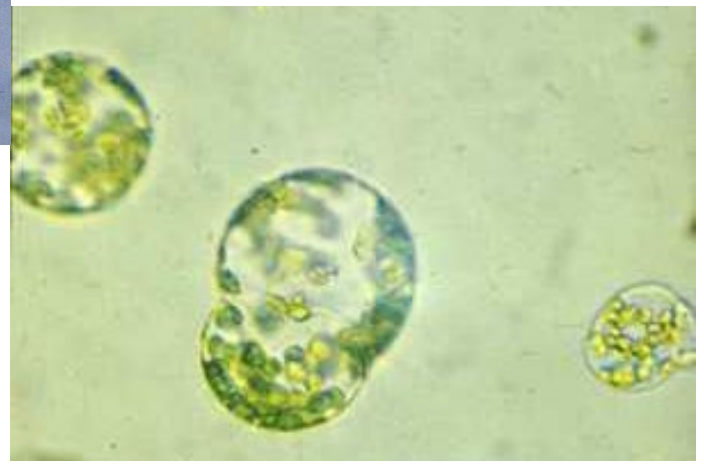


Kultura protoplasta – fuzija protoplasta





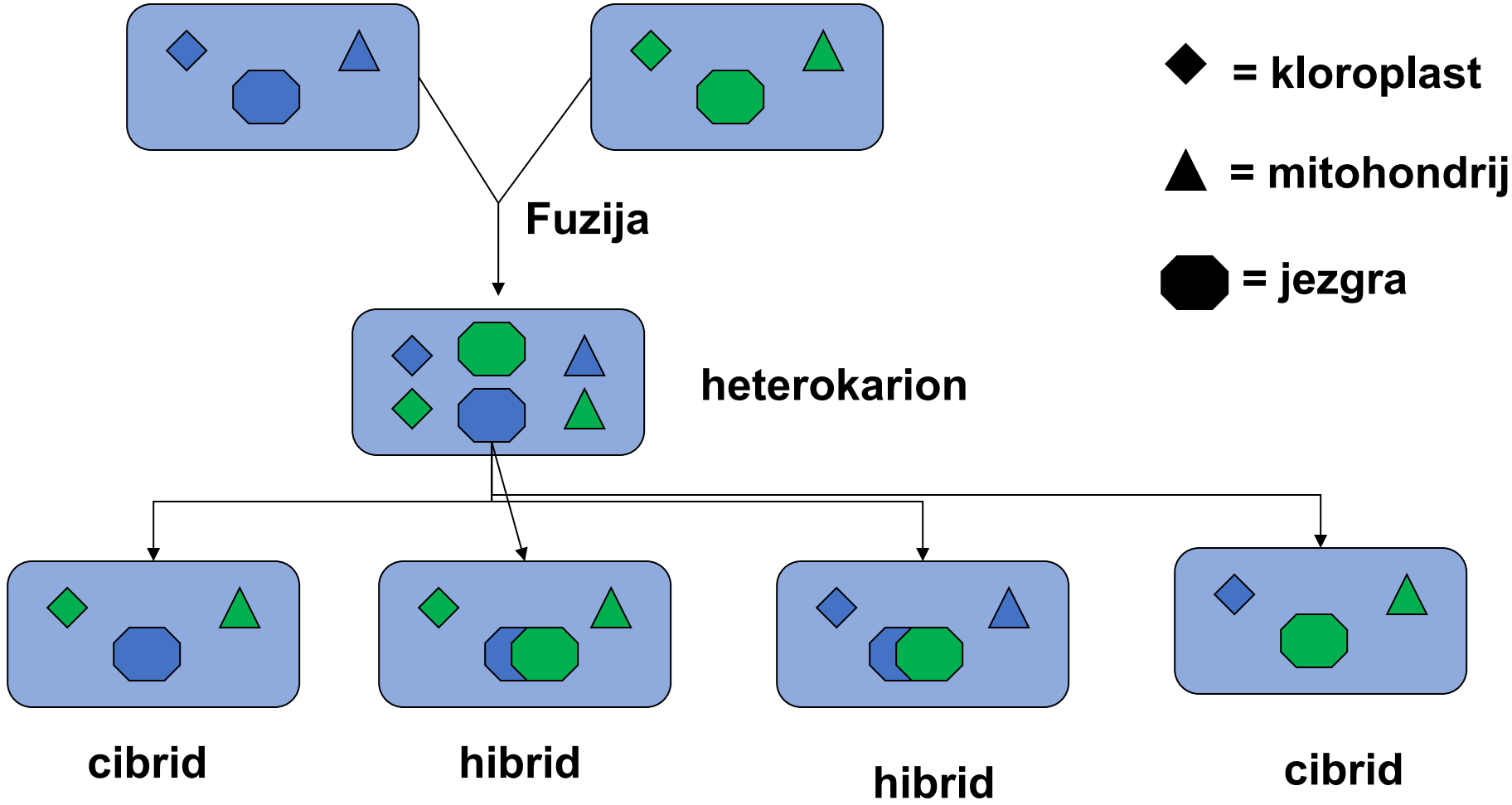
Heterokariocita – nastaje fuzijom iz dvije ili više stanica različitih jedinki



Homokariocita – nastaje fuzijom iz stanica iste jedinke

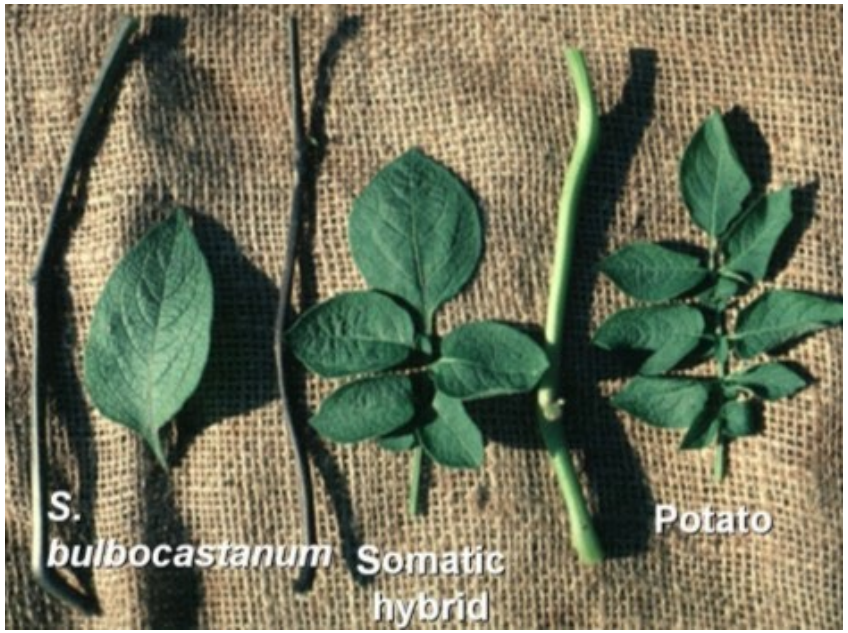
Kultura protoplasta – fuzija protoplasta

Mogući ishodi fuzije dva genetički različita protoplasta



Kultura protoplasta

- Primjena u oplemenjivanju
  - prijenos rezistencije sa divljih na kultivirane vrste





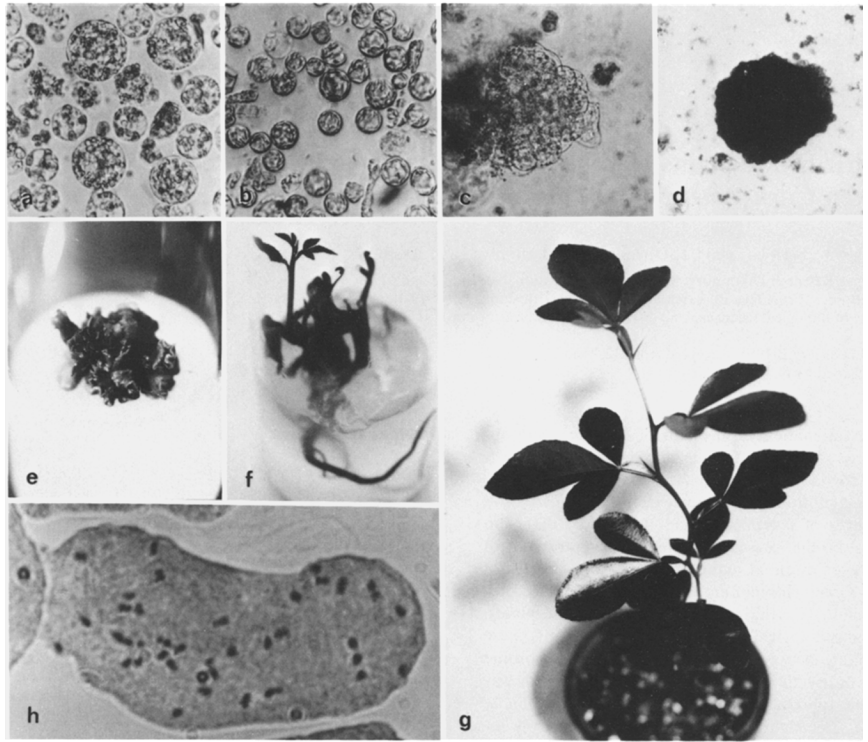
FUZIJA PROTOPLASTA

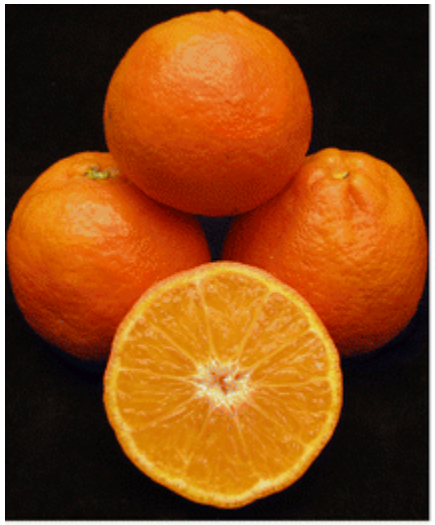
Somatski hibridi imaju svojstva obje vrste iz kojih su nastali

Otpornost hibrida prema bolestima

Kultura protoplasta

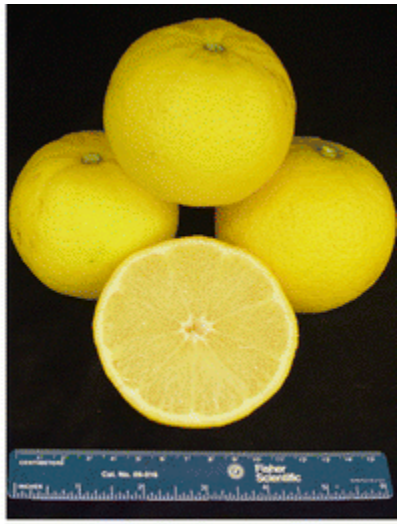
- Primjena u oplemenjivanju
  - Zbog muške sterilnosti, često prisutne kod citrusa, križanje sorti i vrsta tog roda se provodi fuzijom protoplasta
  - Hibridi slatke naranče (*Citrus sinensis*) i trolisnog limuna (*Poncirus trifoliata*).
    - dobra kvaliteta ploda s otpornošću na hladnoću, viruse i trulež korijena




Triploid Mandarin Hybrid



Triploid Lime Hybrid


Triploid Lemon Hybrid

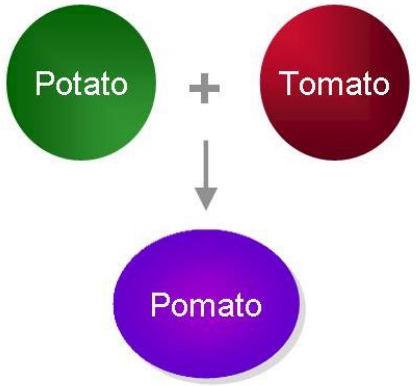
Ohgawara i sur. (1985). Theor Appl Genet 71 : 1-4

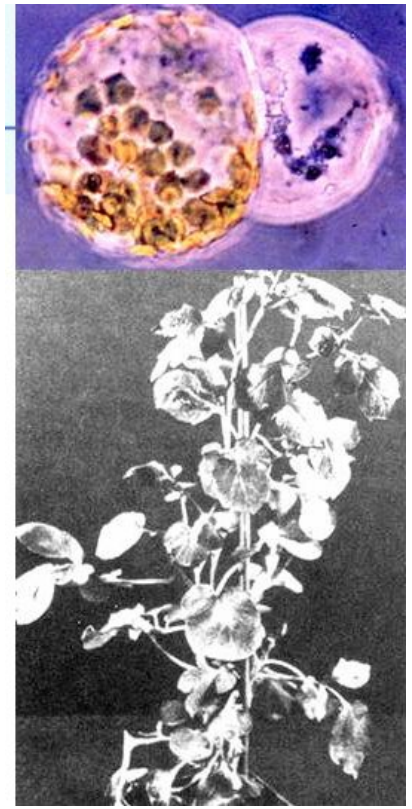
Kultura protoplasta



- Primjena u oplemenjivanju
  - POMATO
    - 1978. g. Fuzionirani protoplasti mezofila lista rajčice i stanične suspenzija krumpira nepoželjne karakteristike hibrida
    - 1986. g. uspješna regeneracija željenog hibrida, <u>ali prinos neznatan</u>







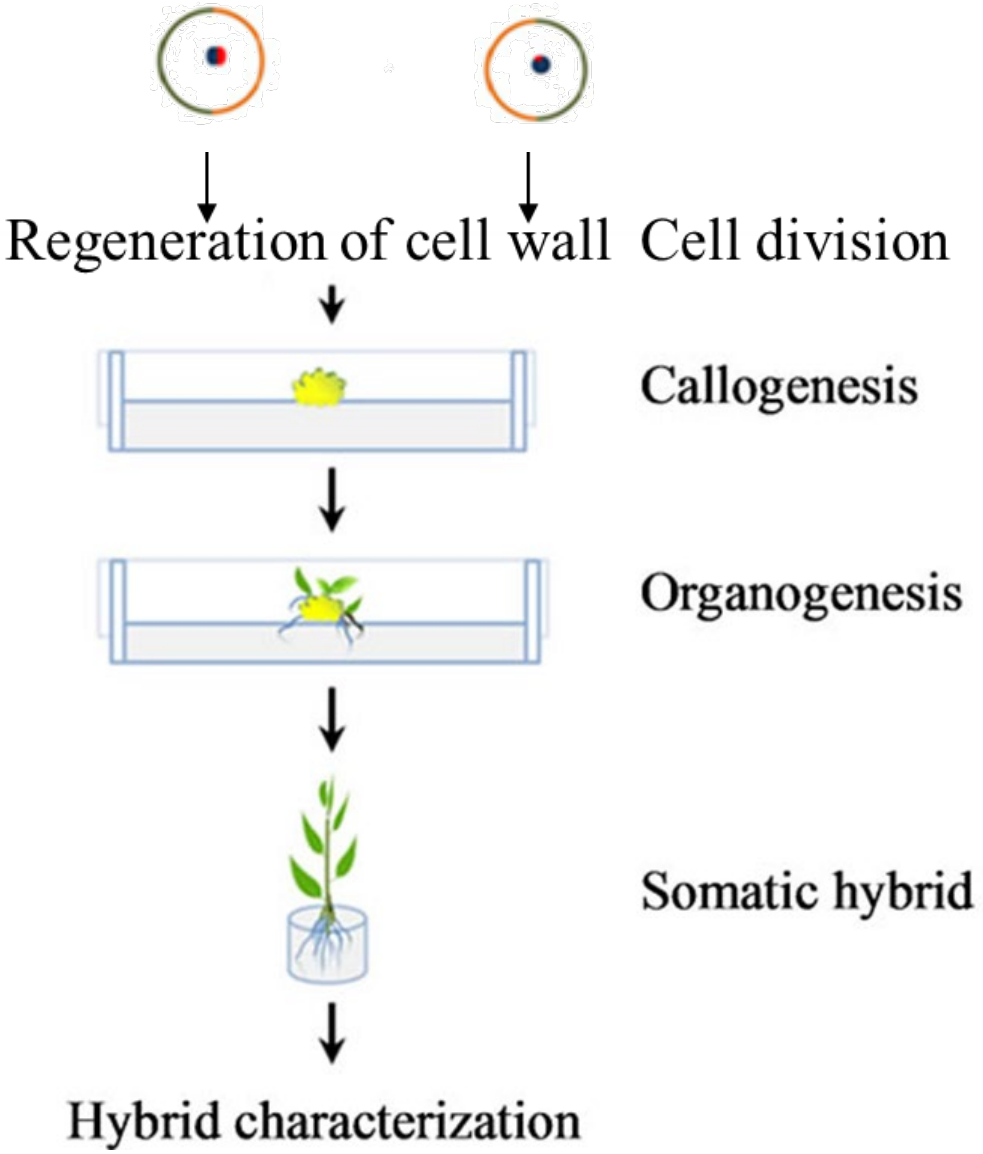
2013. g. Nacjepljivanjem rajčice na krumpir dobivena biljka TomTato – komercijalna proizvodnja rajčica i krumpira na jednoj jedinki

NIJE REZULTAT FUZIJE PROTOPLASTA!



The top half remains 100% tomato and the bottom half remains 100% potato. Because they stay genetically separate, you cannot plant the tomato seeds to grow another pomato

Kultura protoplasta – regeneracija biljaka



Problemi: selekcija poželjnih hibrida i regeneracija

Identifikacija poželjnih fuzijskih varijanti

- Komplementacijska selekcija
  - Moguća ako donori imaju različite selekcijske markere (otpornost na antibiotik ili herbicid). Protoplast nastao fuzijom mora imati oba svojstva.
- Fluorescencijsko obilježavanje stanica
  - Svaki donor se obilježava posebnom bojom, fuzijski produkt mora sadržavati obje boje
- Mehanička izolacija i mikromanipulacija
  - Sporo ali učinkovito, naročito za različite stanične tipove
- Masovna regeneracija biljaka iz fuzijskih produkata
  - Regeneracija bez selekcije, a potom pregled i determinacija poželjnih svojstava u fuzijskim produktima.
  - Molekularno biokemijske analize i/ili fenotipska karakterizacija.

Različite vrste kultura biljnih tkiva

- Kultura organa
- Kultura sjemenki
- Kultura embrija
- Kultura polena
- Kultura antera
- Kultura kalusa
- Kultura pojedinačne stanice
- Kultura stanica u suspenziji
- Kultura protoplasta

Fenotipske varijacije u kulturi biljnog tkiva



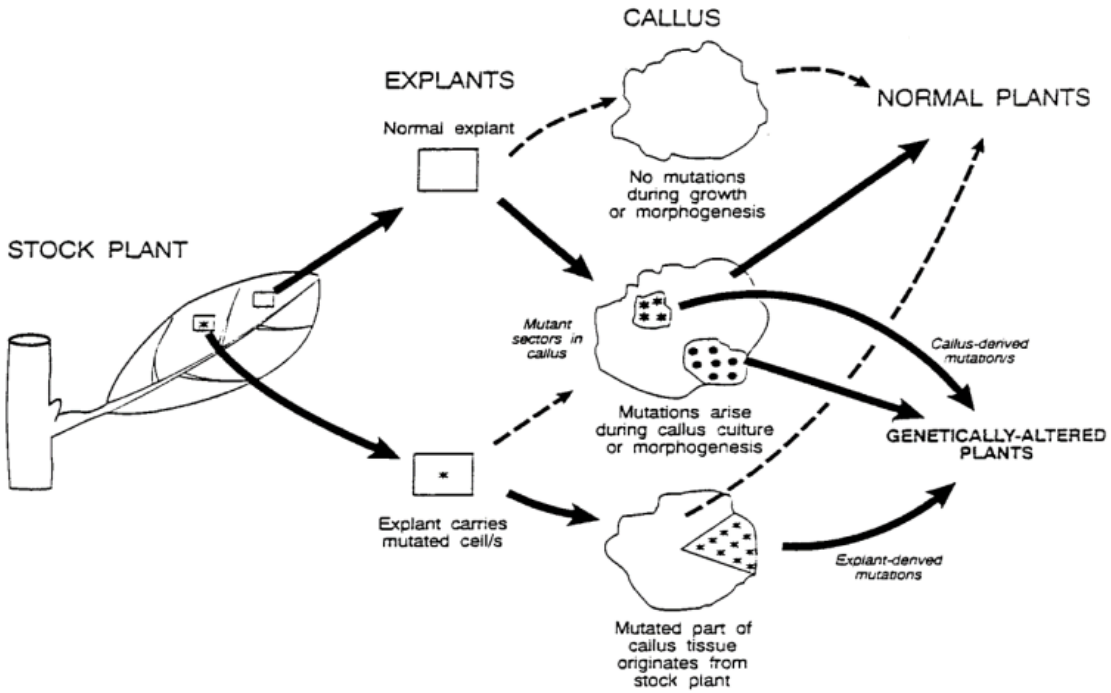
- Morfološke promjene, npr. smanjeni broj puči
- Staklastost “vitrificiranost” (natopljenost vodom)
- Biljke mogu biti razgranate (zbog citokinina)
- Biljke bez virusa fenotipski su drukčije

Stresni uvjeti hranjive podloge često potiču spontane promjene u genomu.

Varijacije u biljkama koje su proizvedene kulturom biljnog tkiva
= **somaklonska varijabilnost**
- može biti genetičke ili epigenetičke prirode

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.



Larkin i Scowcrof, 1981

Fig. 28. Sources of genetic variation in plants obtained through organogenesis in callus cultures. Events shown by broken lines occur less frequently.

Somaklonska varijabilnost

- Uzroci:

❑ Početni materijal ima mutaciju

❑ Vrsta tkiva koje se koristi za kulturu

❑ Metode vegetativnog razmnožavanja

❑ Upotreba regulatora rasta

❑ Broj supkultura

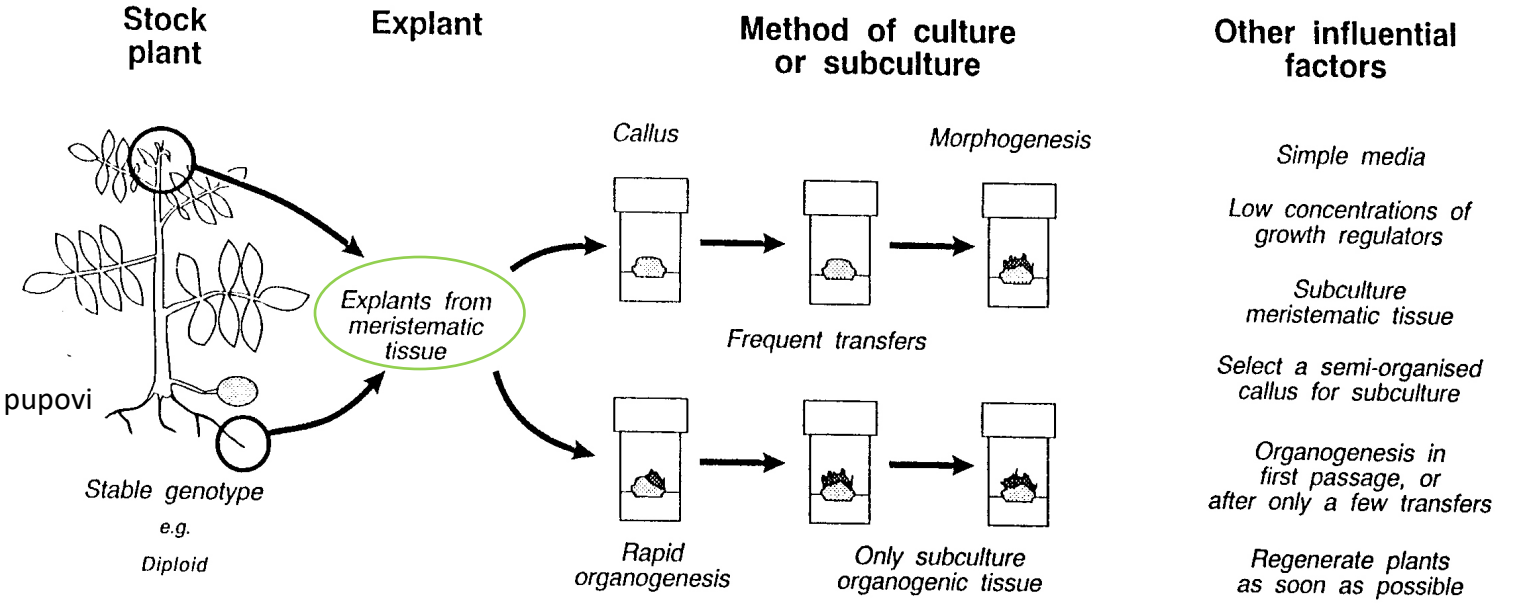


Cao et al. (2016) 10.1007/s11240-016-0996-3

Mutacije također proizlaze iz procesa kulture tkiva: tijekom ranjavanja (rezanja eksplantata), tijekom sterilizacije, zbog neprirodnog 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.

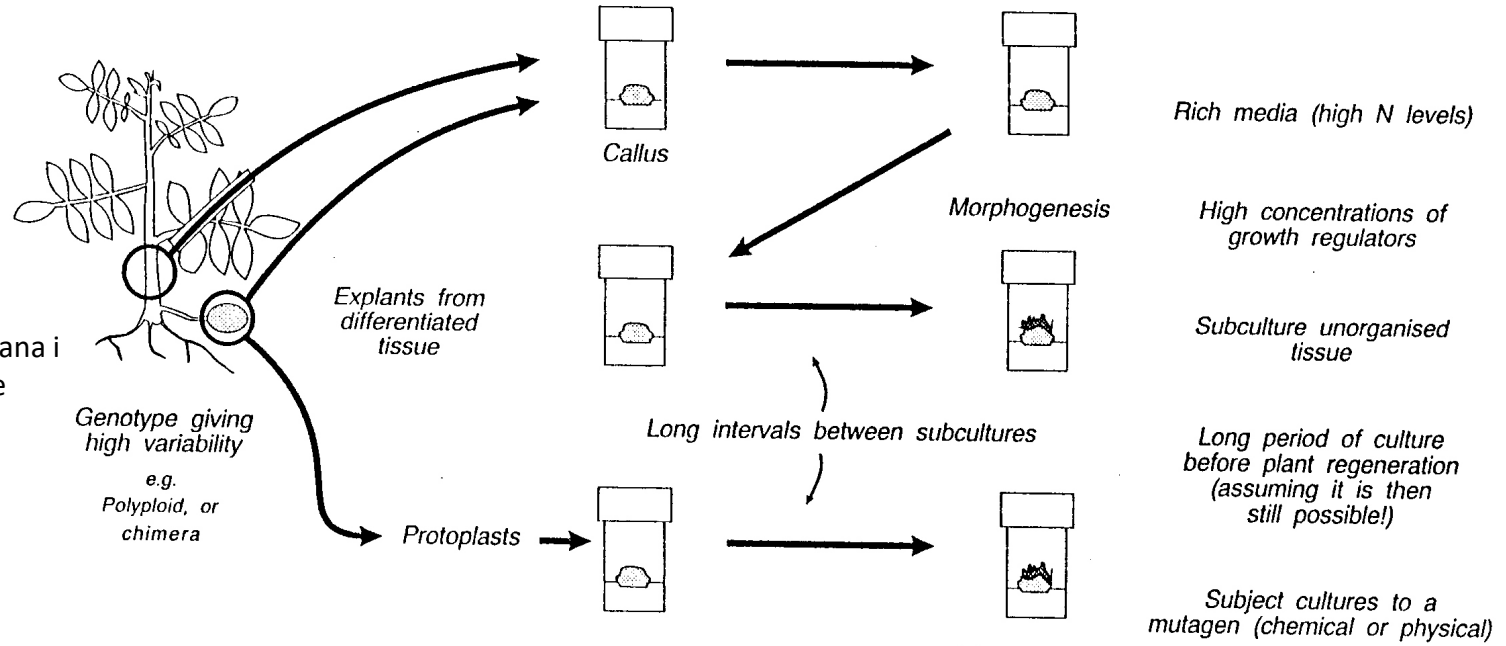
Niska varijabilnost

Nodalni segmenti/aksilarni pupovi



Visoka varijabilnost

Kalus i posredne kulture organa i somatske embriogeneze



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

- Nedostatak u metodama klonskog umnažanja
  - umnažanje genetski uniformnih jedinki, jednakih majčinskoj jedinki
- Prednost u metodama oplemenjivanja
  - Otpornost na herbicide
  - Otpornost na patogene
  - Otpornost na antibiotike
  - Otpornost na stresne uvjete
    - Suša, preplavljivanje, salinitet, temperatura, teški metali
  - Biokemijske mutante, inaktivacija gena
  - Poboljšana prehrambena svojstva
    - Sinteza Lys kod žitarica
  - Poboljšan urod (usjevi)
  - Poboljšana kvaliteta
    - Nutritivni sadržaj, okus i boja voća i povrća

Somaklonska varijabilnost

- Nedostatak u metodama klonskog umnažanja

- Prednost u metodama oplemenjivanja

  - Stvaranje novih varijanti kultivara, a bez uključivanja hibridizacije i/ili transformacije
  - Kod izolacije korisnih varijanata dobro adaptiranih jedinki koje daju velike prinose, a kojima nedostaje neko poželjno svojstvo.
  - Izolacija korisnih varijanata koje sintetiziraju određeni primarni ili sekundarni metabolit
  - Izolacija korisnih varijanata koje su jače otporne na bolesti i bolje toleriraju stresne uvjete

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.

→ promjene u strukturi gena i posljedično uzrokovane promjene, gubitak ili povećana količina 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. promjene 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 promjene 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: mismatch mutacija!

mC ⟶ T

Mutacija DNA

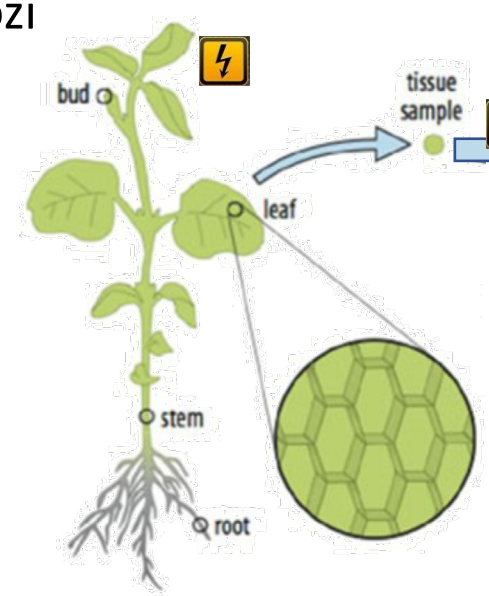
C ⟶ U

Popravak DNA

Izazivanje mutacija - oplemenjivanje

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**



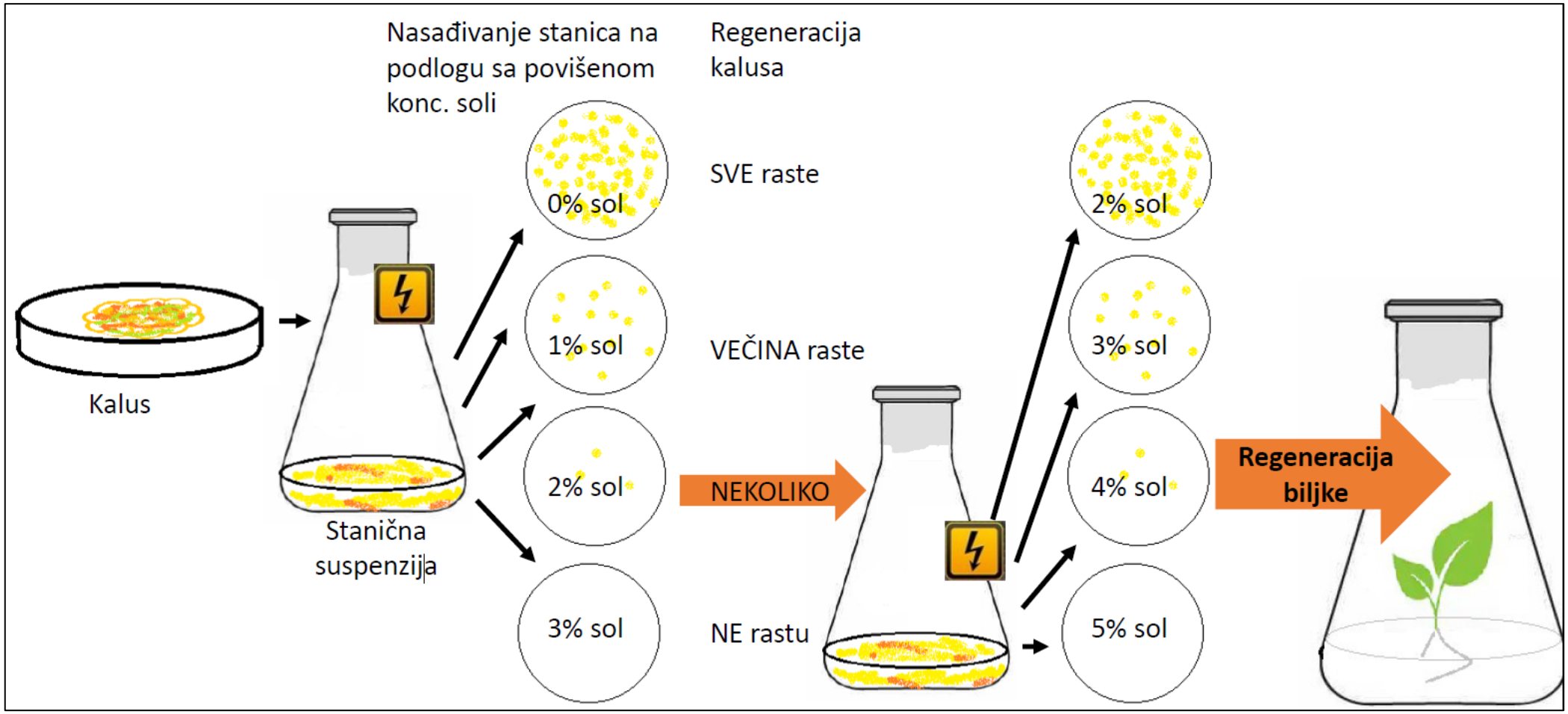

Callus induction


Shoot regeneration


Somatic embryos regeneration

Indukcija somaklonske varijabilnosti

- Dobivanje biljaka otpornih na povišenu koncentraciju soli



Indukcija somaklonske varijabilnosti

- Dobivanje biljaka otpornih na povišenu koncentraciju soli

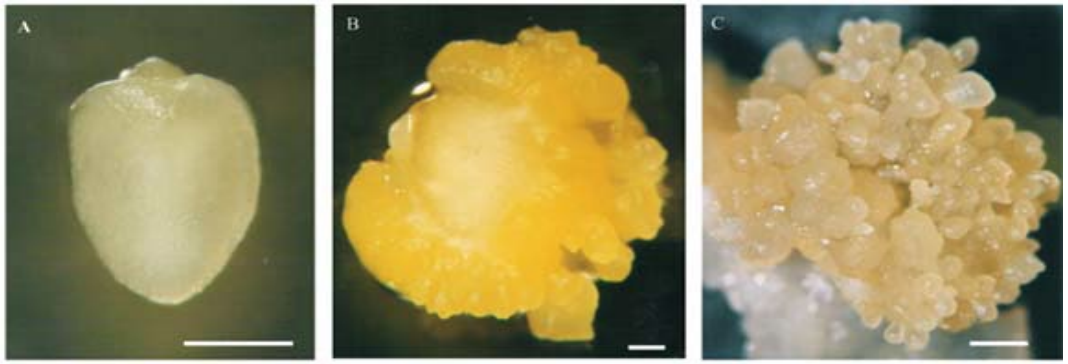
Triticum aestivum	NaCl (2.5, 5, 10 or 15 g/l NaCl)	Salt stress	Zair *et al*. 2003
Solanum tuberosum	NaCl (direct selection 60, 90, 120, 150, 300 or 450 mM)	Salt stress	Ochatt *et al.* 1999
Solanum tuberosum	NaCl (50, 100, 150 or 200 mM NaCl)	Salt stress	Queirós *et al*. 2007
Saccharum sp.	NaCl (0 or 68 mM NaCl)	Salt stress	Gandonou *et al*. 2006
Nicotiana tabacum	NaCl 175 mM	Salt stress	Rout *et al*. 2008
Morus sp.	NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00% NaCl)	Salt stress	Vijayan *et al*. 2003
Medicago sativa	NaCl (screened on 0-350 mol m^{-3} NaCl finally 250 mmol m^{-3} used further analysis)	Salt stress	Safarnejad *et al*. 1996
Lycopersicon esculentum	NaCl (raised from 0 to 15, 30 and finally 50 mM NaCl)	Salt stress	Kripkyy *et al*. 2001
Brassica oleracea var. *botrytis*	NaCl and hydroxyproline (*in vitro* 350 mM and *in vivo* 550 mM NaCl; *in vitro* 3 mM and *in vivo* 10 mM hydroxyproline)	Frost and salt	Fuller *et al*. 2006
Winter barley	Hydroxyproline (10-20 mM)	Frost	Tantau *et al.* 2004
Cymbopogon martinii (Roxb.)	NaCl (300 mM)	Salt stress	Patnaik and Debata 1997
Oryza sativa	Al (0, 250, 500, 7500, 1000, 1250, 1500, 2000 µM of Al)	Aluminium	Jan *et al.* 1997
Oryza sativa	Al (0, 30 and 60 ppm of Al in the form of $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$)	Aluminium	Roy and Mandal 2005

Penna i sur. 2012

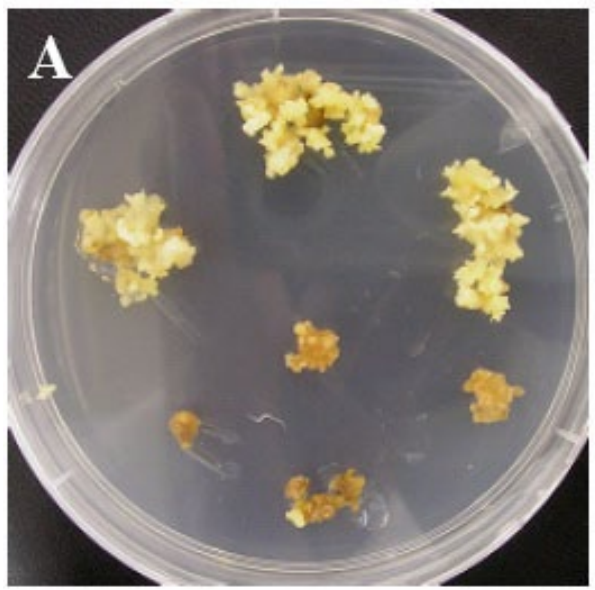
Indukcija somaklonske varijabilnosti

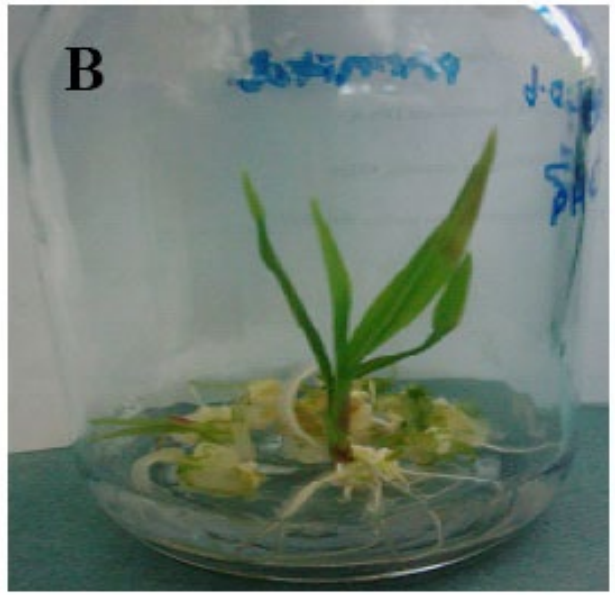
- Dobivanje biljaka otpornih na sušu

Indukcija kalusa



Selekcija otpornih somaklonova.
→ Hranjivi medij s manitolom (veliki osmotski potencijal).

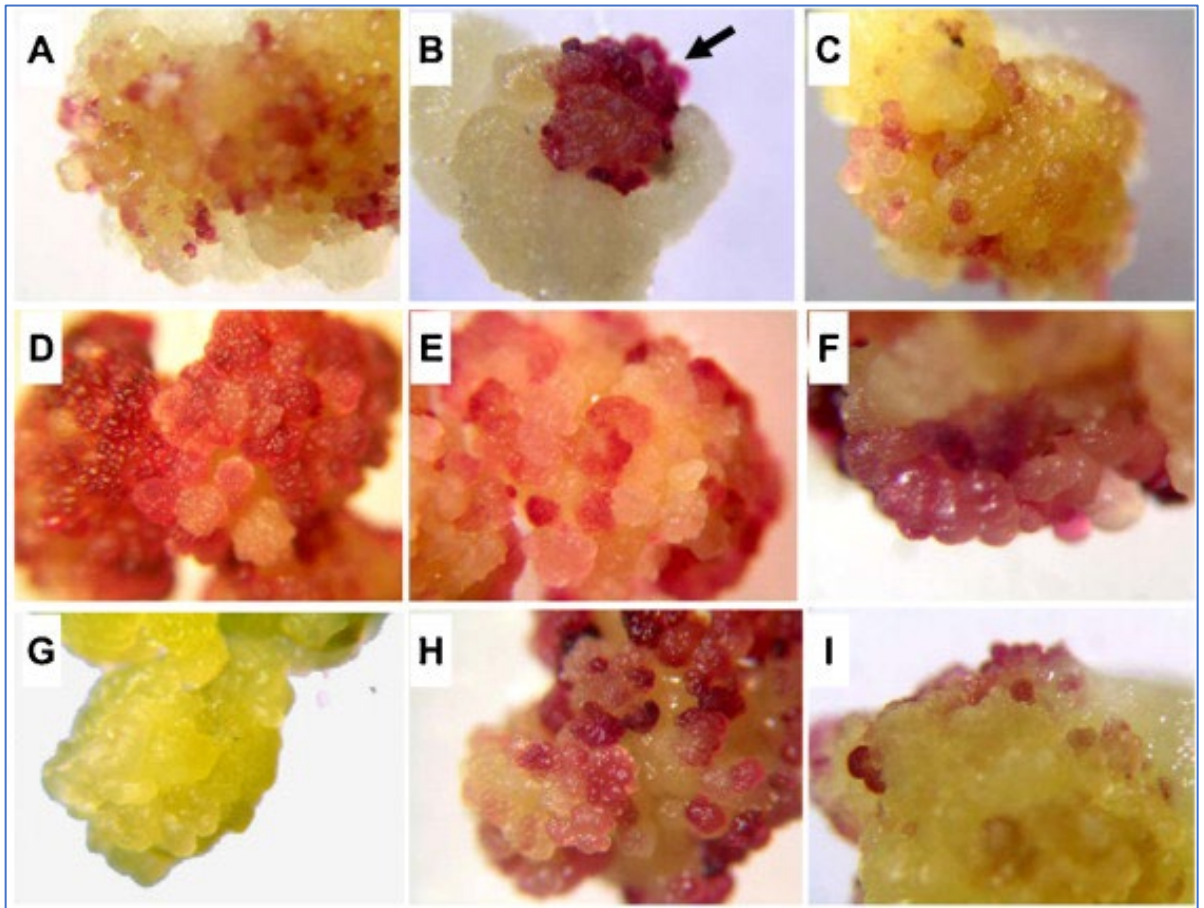




Indukcija somaklonske varijabilnosti

- Indukcija sinteze sekundarnih metabolita

Indukcija kalusa s 2,4-D.
Selekcija protokalusa s najjačom sintezom betalaina.



Indukcija somaklonske varijabilnosti

- Selekcija biljaka otpornih na bolesti

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*	Psedomonas tabaci	Methionine-sulfoximine
Tobacco*	Alternaria alternata	Partially purified toxin

*Shown to be heritable through sexual propagation
**Shown to be stable through vegetative propagation

Indukcija somaklonske varijabilnosti

- Dobivanje hortikulturalno atraktivnijih biljaka



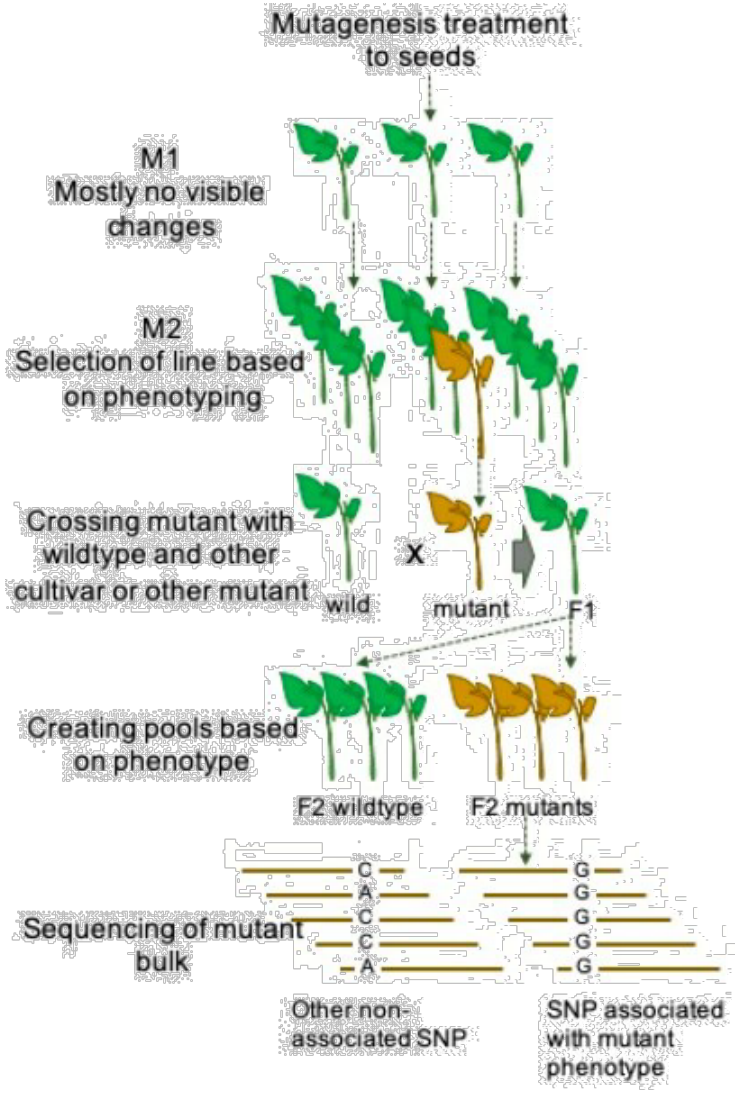


Kohleria „Orange Glow“, eine durch mutagene Behandlung von Gewebekulturen erhaltene Mutante (Oben) im Vergleich zur Ausgangsform (links).

Somaklonsko/mutacijsko oplemenjivanje sjemenke i klijanci *in vivo*

Klasično:

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



Somaklonsko/mutacijsko oplemenjivanje

Prednosti

- Rad sa velikom populacijom biljaka (ili stanica)

Mane

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

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 ploidnostii 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

Analiza somaklonskih varijanti

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