Kultura animalnih i biljnih stanica

KULTURA BILJNOG TKIVA

Četvrto predavanje

- Biljna biotehnologija
- Čuvanje biljnog genofonda

Biljna biotehnologija

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

- omogućuje precizno unošenje ili utišavanje samo jednog, točno određenog svojstva.
- u biljke se mogu prenositi geni iz potpuno nesrodnih organizama (bakterija, kvasaca, životinja).

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.

Biljna biotehnologija - povijest

1911. Agrobacterium tumefaciens izaziva “crown-gall”

1974. Plazmid Ti (tumor inducirajući)

1977. T-DNA prijenos u biljne stanice

1982. Prva transgenična biljka – duhan

1984. Višestruki vektorski sustavi

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

1992. Prva komercijalna trangenična biljka – duhan otporan na viruse

1994. Prva genetski modificirana biljka za prodaju i ljudsku prehranu – rajčica Flavr Savr

1996. Tržišna proizvodnja transgeničnih poljoprivrednih kultura (soja, kukuruz, pamuk)

Genetičke manipulacije biljaka u istraživanjima i u proizvodnji

- Pojačana ekspresija transgena (overexpression)
- Utišavanje endogenog gena (knock-down)
- Uništavanje (eliminacija ekspresije) endogenog gena (knock-out)
- Dodavanje privjeska endogenom proteinu (tag)
- Istraživanje aktivnosti promotora endogenog gena

Najčešće GMO biljke



- Kako nastaju transgenične biljke?
- Koji su ciljevi biotehnoloških tvrtki vezani uz GMO?
- Koji su rizici, a koje prednosti?

Unos DNA (transformacija)

- Metode unosa DNA
  I. *Agrobacterium tumefaciens* (prirodni patogen)
     - Ti plasmid odgovoran za infektivnost i transformaciju pomoću Agrobakterija

     → transformacija *in planta*
  II. Direktan unos DNA
     - bombardiranje mikročesticama (biolistic)
     - PEG i elektroporacija za unos DNA u protoplaste
     - mikroinjektiranje

- 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 posredovana Agrobakterijama

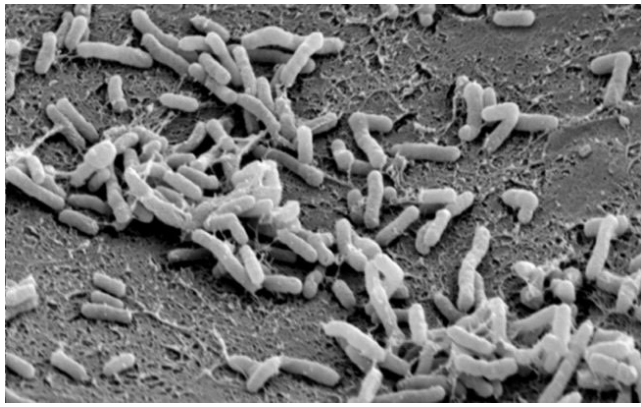
Agrobacterium tumefaciens

- Uzročnik tumora vrata korijena (Crown gall)

Agrobacterium rhizogenes

- Uzročnik bolesti dlakavog (kosmatog) korijenja (hairy root)





Gram-negativne, pokretne, štapičaste bakterije iz tla

Transformacija posredovana Agrobakterijama

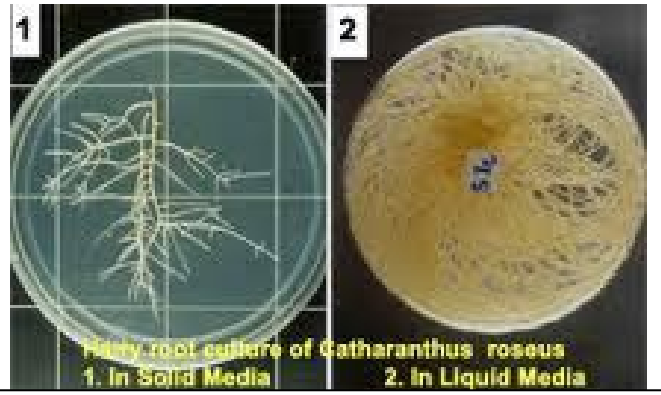
Agrobacterium tumefaciens

- Uzročnik tumora vrata korijena (Crown gall)
- Ti plazmid (**t**umor-**i**nducing)
  - T-DNA → *vir* geni i geni uključeni u biosintezu fitohormona i biosintezu opina
  - Oktopinski, nopalinski i agropinski



Agrobacterium rhizogenes

- Uzročnik bolesti dlakavog (kosmatog) korijenja (hairy root)
- Ri plazmid (**r**oot-**i**nducing)
  - T-DNA → *rol* geni mijenjaju osjetljivost biljnih stanica na fitohormone
  - Manopinski i agropinski



Unesena DNA integrira se u genom biljke, replicira i nasljeđuje. Geni preneseni iz agrobakterija uzrokuju promijenjen rast na mjestu rane.

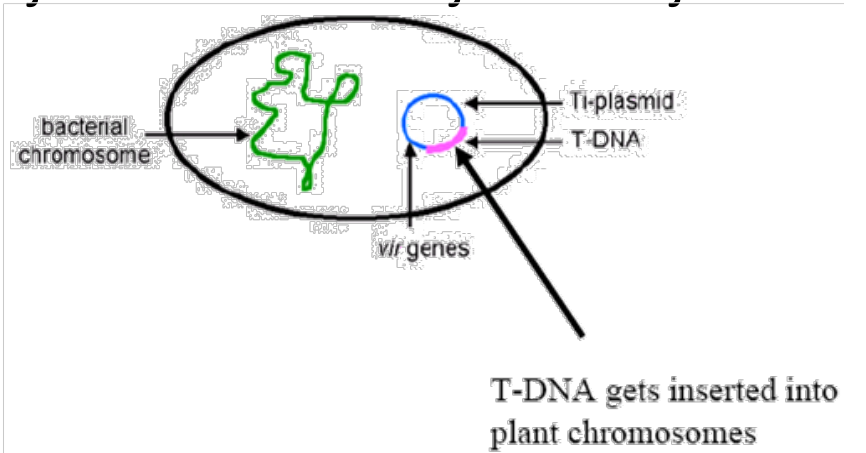
Transformacija posredovana Agrobakterijama

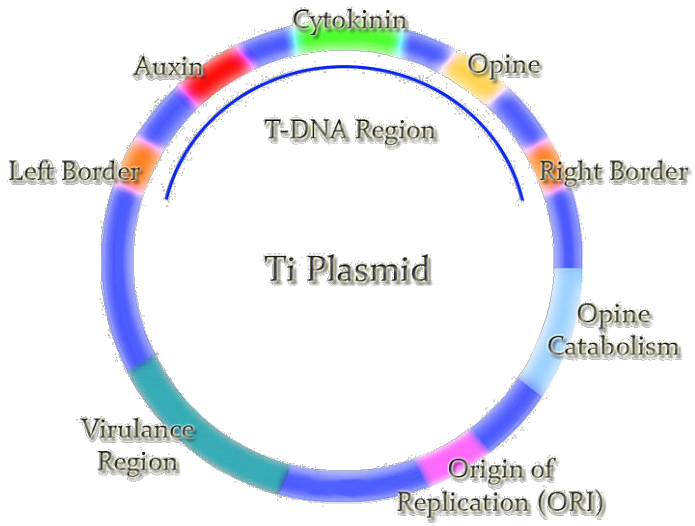
Agrobacterium tumefaciens

- Tri glavne grupe gena odgovorne za transformaciju:
- **T-DNA**
- **Vir geni** (*Vir*)

} smješteni na tumor inducirajućem plazmidu (*Ti*) plasmid (~180 kb)

- **kromosomalni geni** za virulenciju odgovorni za kemotaksiju i prihvaćanje bakterija za staničnu stijenku biljne stanice



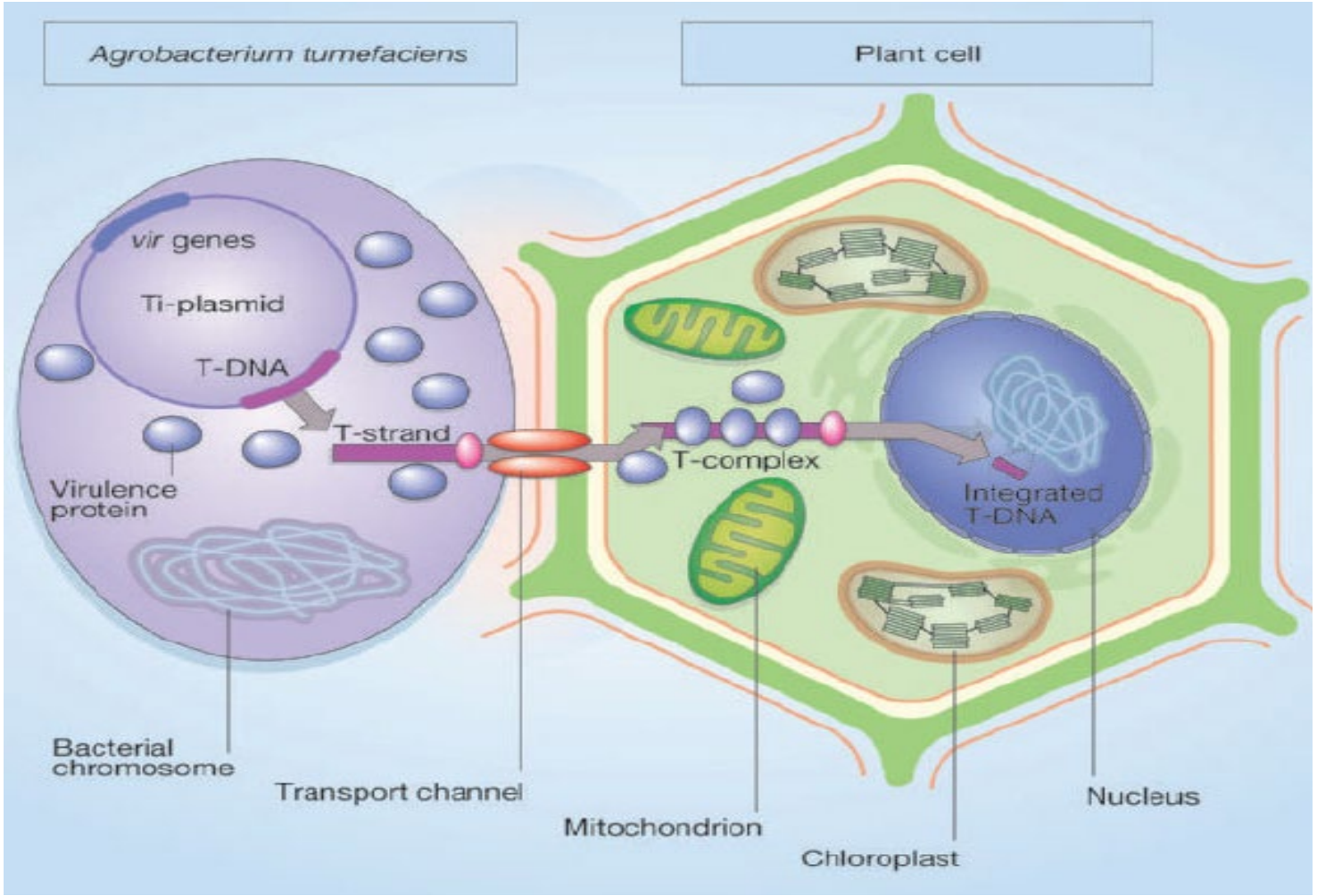


Transformacija posredovana Agrobakterijama

- Prirodni, divlji tip Ti plazmida
  - sudjeluje u infekciji i transformaciji
  - sadrži regiju virulencije "*vir*" u kojoj su vir geni čiji produkti posreduju pri infekciji, nakon čega slijedi ekscizija T-DNA, transport u biljnu stanicu i 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

  = prijenosna ili transfer DNA (**T-DNA**)
- T-DNA: geni za sintezu opina i stvaranje tumora (biosinteza auksina i citokinina)
  - Jedino **granični dijelovi T-DNA** (25 pb) su neophodni za transformaciju, geni unutar lijeve (**LB**) i desne granice (**RB**) se mogu izbaciti i/ili promijeniti.

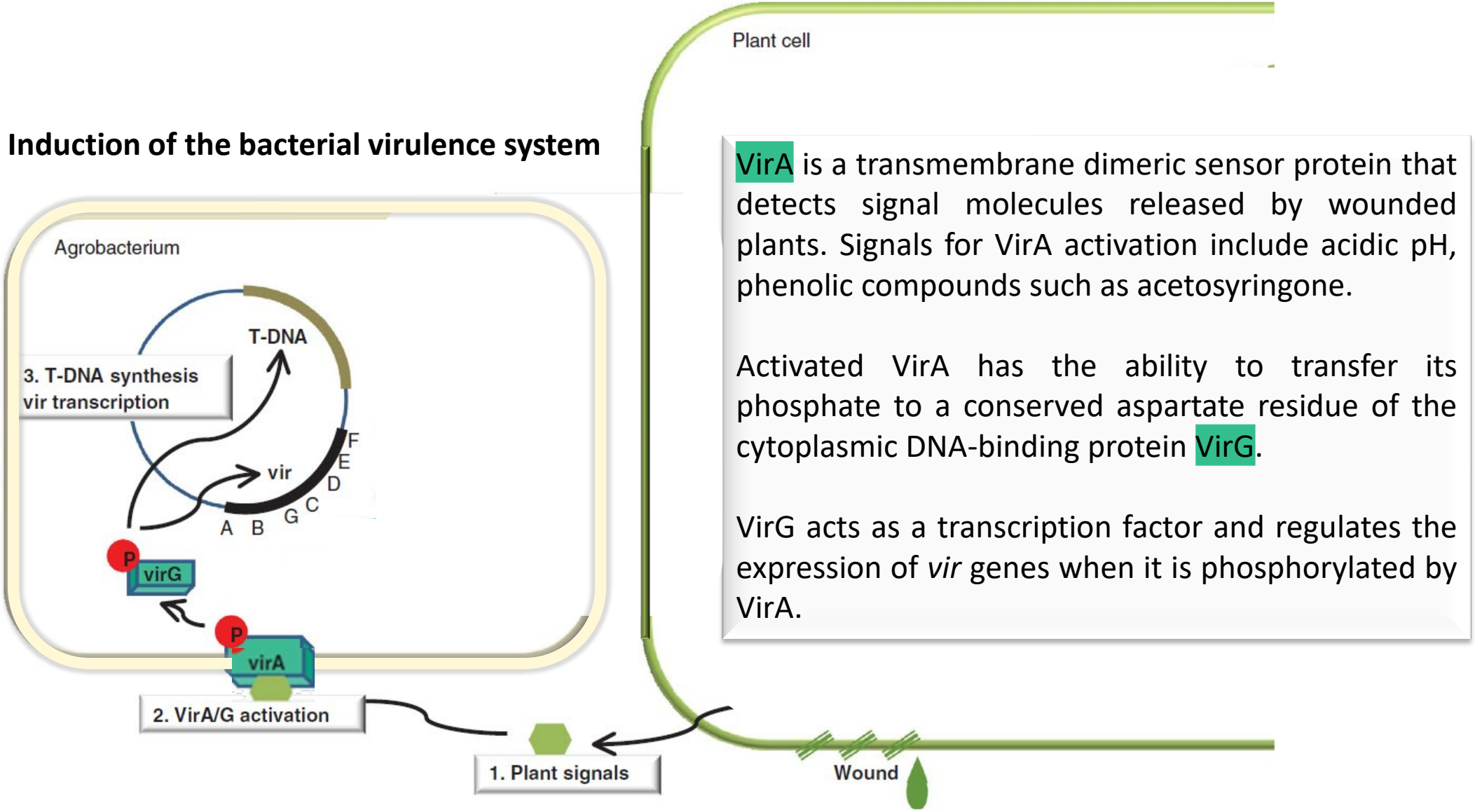
Transformacija posredovana Agrobakterijama



- Neophodna *vir* regija te LB i RB

Transformacija posredovana Agrobakterijama

Induction of the bacterial virulence system



VirA is a transmembrane dimeric sensor protein that detects signal molecules released by wounded plants. Signals for VirA activation include acidic pH, phenolic compounds such as acetosyringone.

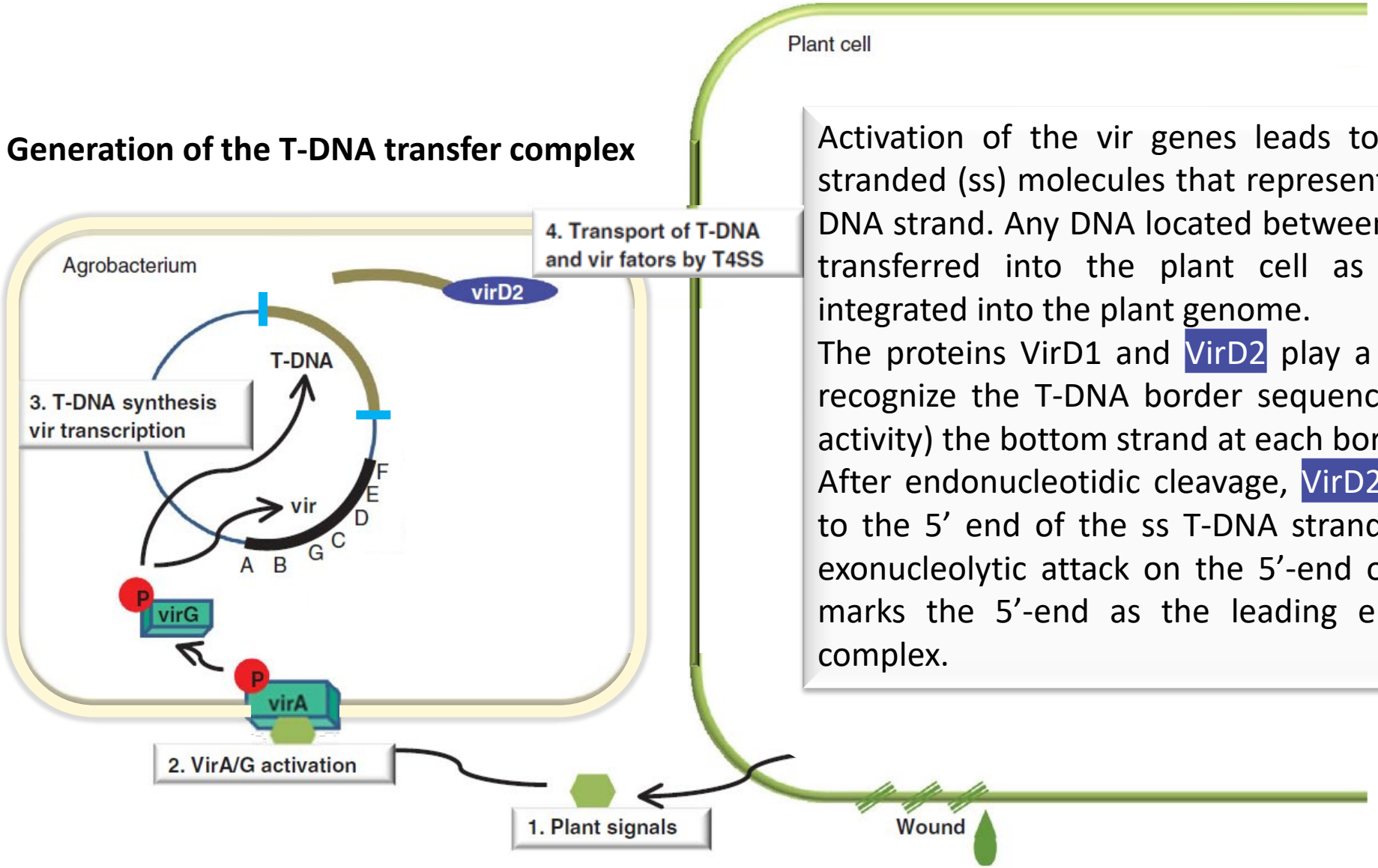
Activated VirA has the ability to transfer its phosphate to a conserved aspartate residue of the cytoplasmic DNA-binding protein VirG.

VirG acts as a transcription factor and regulates the expression of *vir* genes when it is phosphorylated by VirA.

Pitzschkeand Hirt. The EMBO Journal (2010) 29, 1021–1032

Transformacija posredovana Agrobakterijama

Generation of the T-DNA transfer complex



Activation of the vir genes leads to the generation of single-stranded (ss) molecules that represent the copy of the bottom T-DNA strand. Any DNA located between the T-DNA borders will be transferred into the plant cell as single-stranded DNA and integrated into the plant genome.

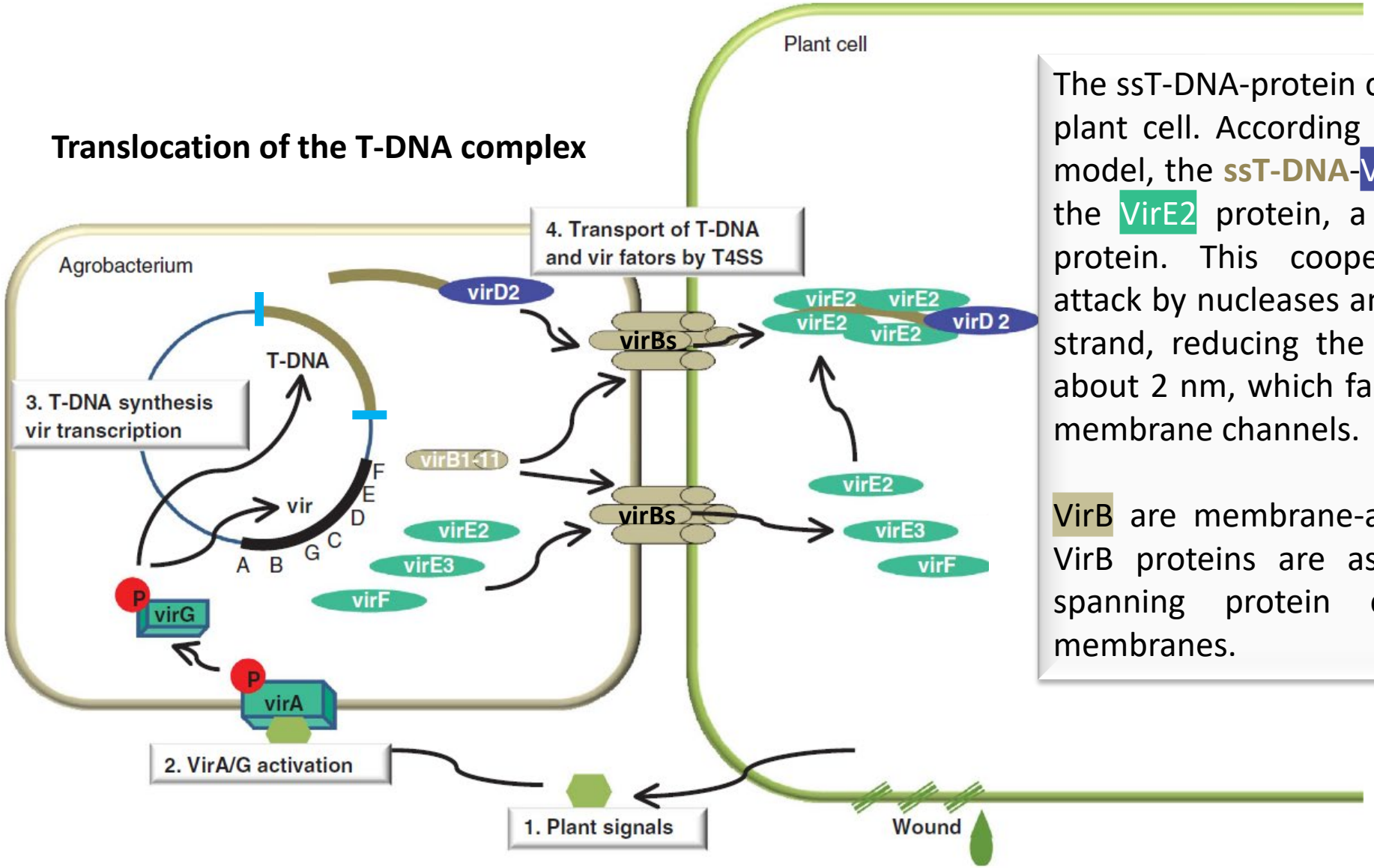
The proteins VirD1 and VirD2 play a key role in this step. They recognize the T-DNA border sequences and nick (endonuclease activity) the bottom strand at each border.

After endonucleotidic cleavage, VirD2 remains covalently bound to the 5' end of the ss T-DNA strand. This association prevents exonucleolytic attack on the 5'-end of the ss-T-DNA strand and marks the 5'-end as the leading end of the T-DNA transfer complex.

Pitzschkeand Hirt. The EMBO Journal (2010) 29, 1021–1032

Transformacija posredovana Agrobakterijama

Translocation of the T-DNA complex

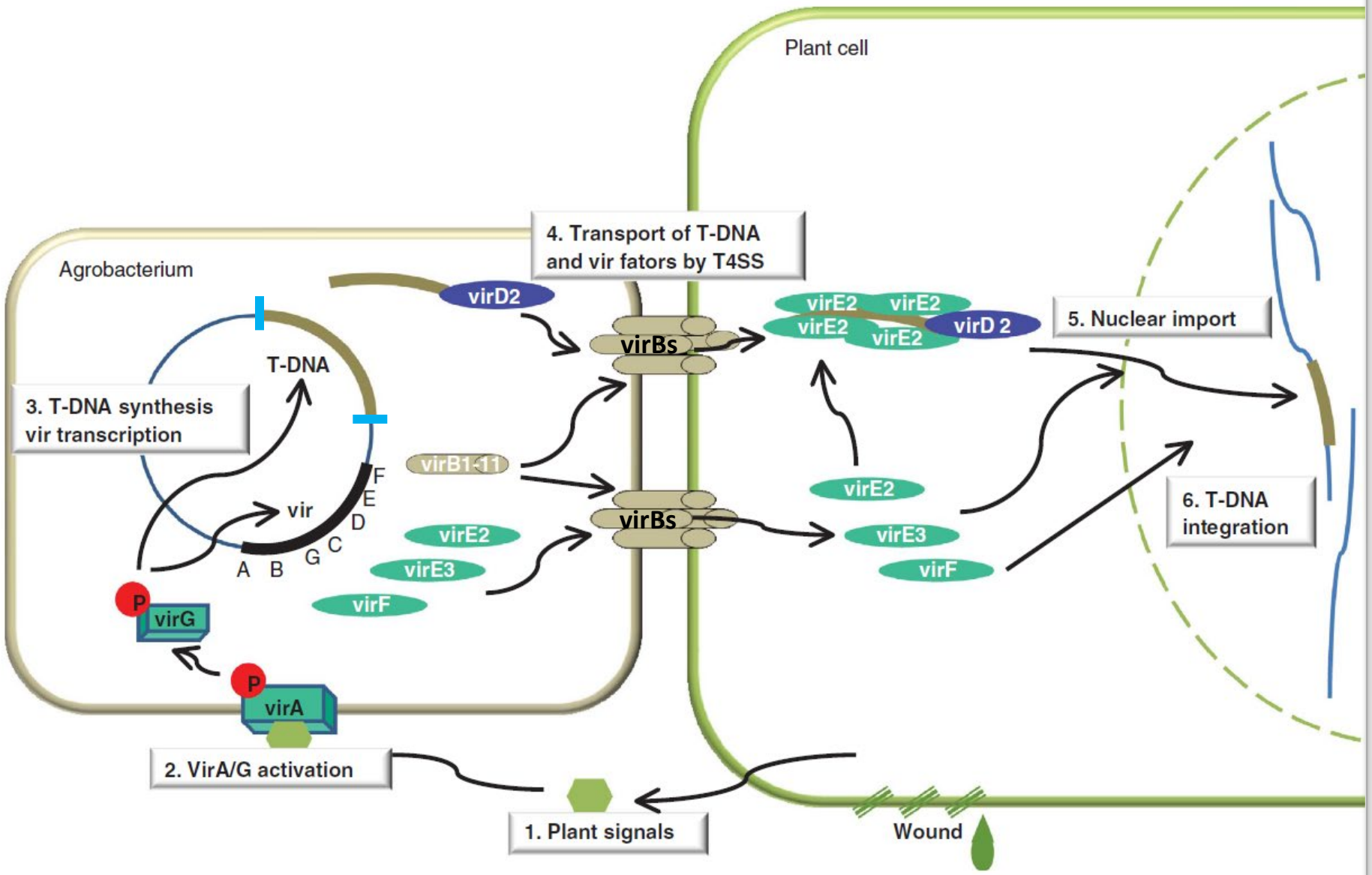


The ssT-DNA-protein complex is transferred into the plant cell. According to the most widely accepted model, the ssT-DNA-VirD2 complex is enveloped by the VirE2 protein, a single-stranded DNA-binding protein. This cooperative association prevents attack by nucleases and also elongates the ssT-DNA strand, reducing the diameter of the complex to about 2 nm, which facilitates translocation through membrane channels.

VirB are membrane-associated proteins and most VirB proteins are assembled into a membrane-spanning protein channel that spans both membranes.

Pitzschkeand Hirt. The EMBO Journal (2010) 29, 1021–1032

Integration of the T-DNA into the plant genome



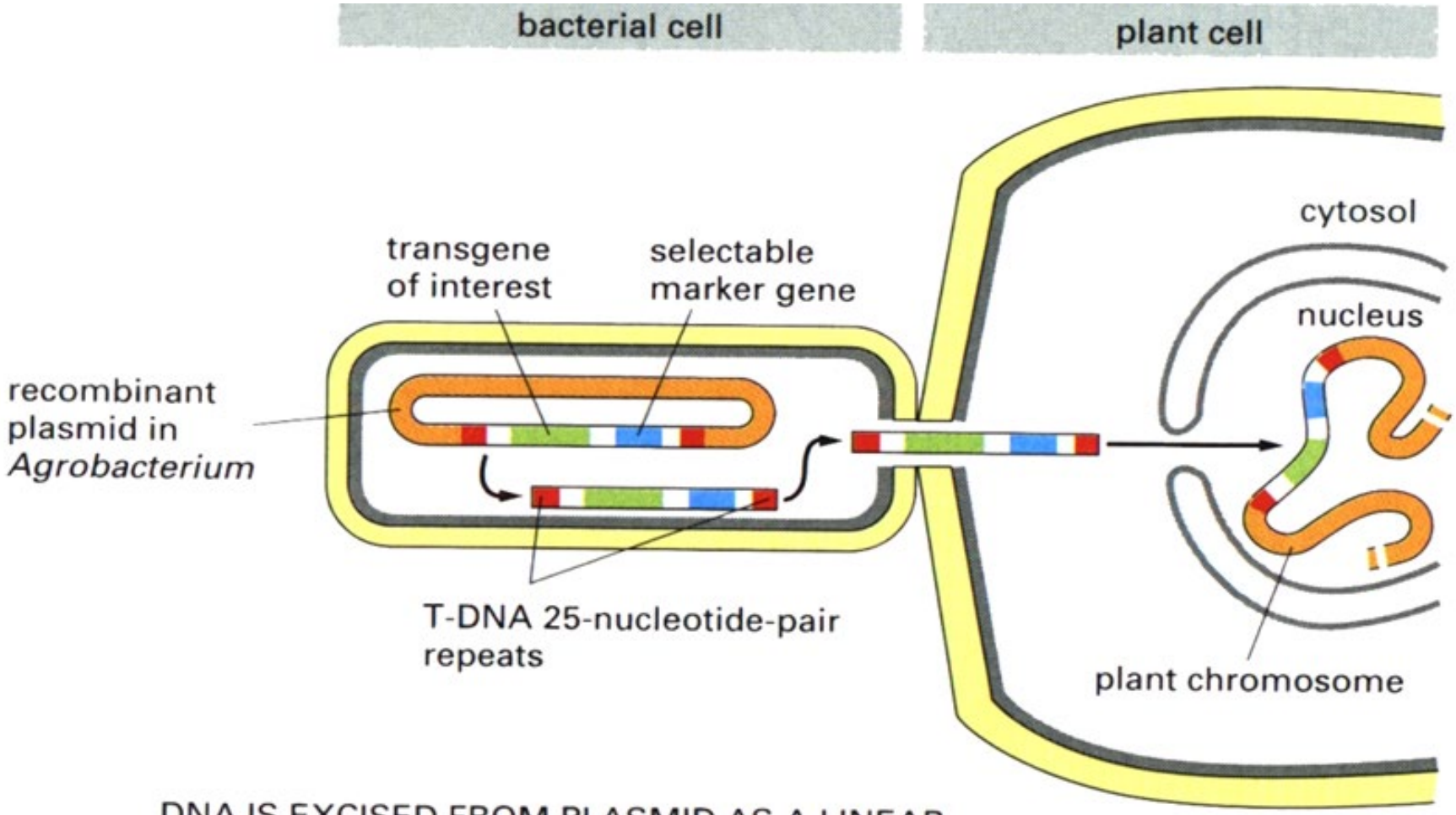
Within the plant cell, the ssT-DNA complex is transported through the nuclear membrane into the nucleus. It was found that two Vir proteins play an important role in this step: VirD2 and VirE2. It is hypothesized that the two **NLS**s of VirE2 are important for the continuous nuclear import of the ss-T-DNA complex.

The final step of T-DNA transfer is its integration into the plant genome. It is assumed that integration occurs by illegitimate recombination. The cleavage of some bases confers only minimal specificity to the recombination process by positioning VirD2 for ligation.

Pitzschkeand Hirt. The EMBO Journal (2010) 29, 1021–1032

Transformacija posredovana Agrobakterijama

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



Transformacija posredovana Agrobakterijama

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]

[a]Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium; [b]International Potato Center, Lima 12, Peru; [c]Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Laboratory of Crop Heterosis and Utilization, Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing, China, 100193; and [d]Plant Genetic Resources Unit, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Griffin, GA 30223

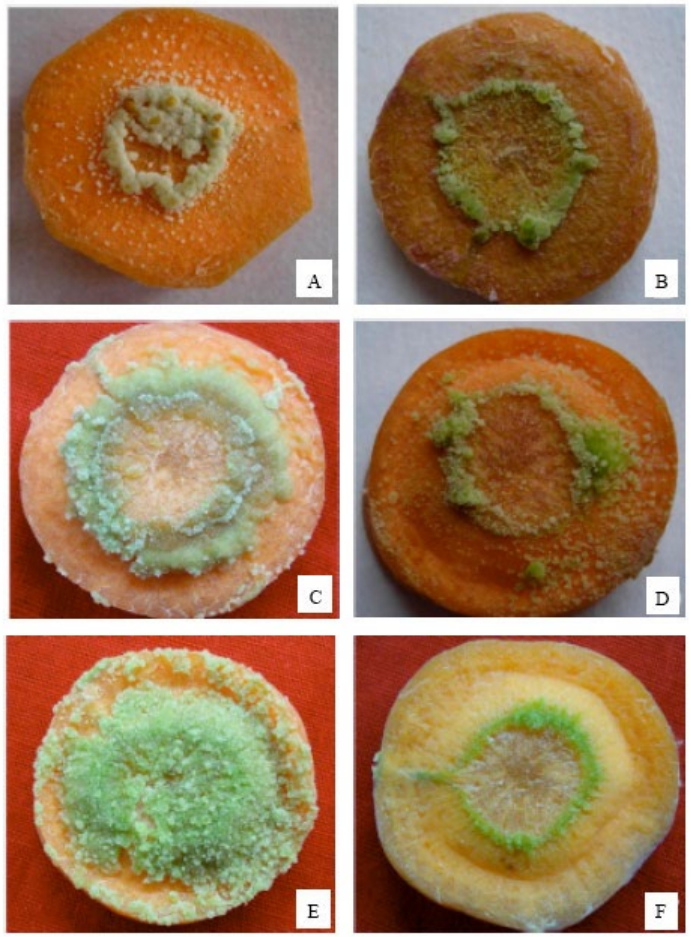
Edited by Eugene W. Nester, University of Washington, Seattle, WA, and approved March 16, 2015 (received for review October 13, 2014)

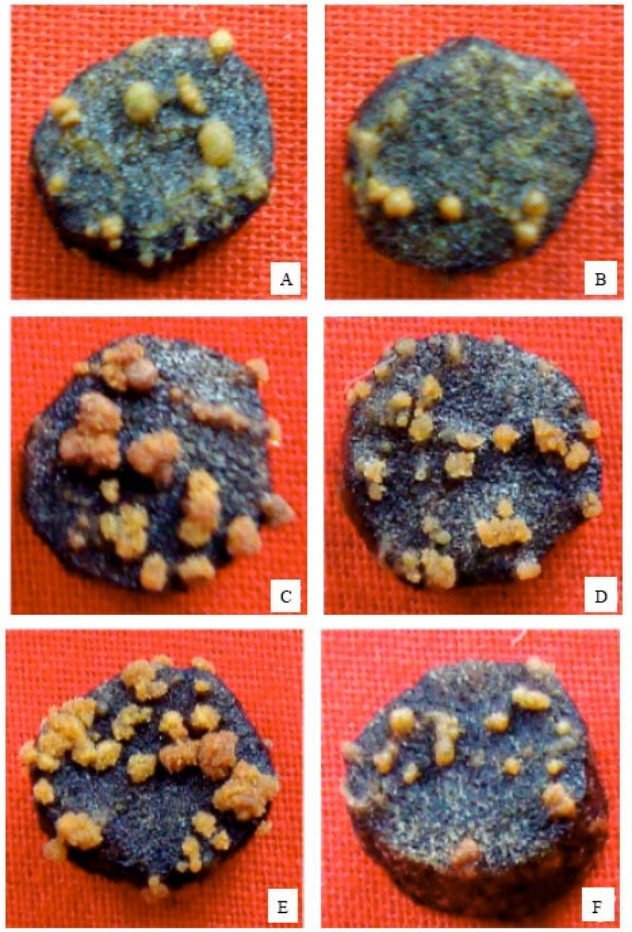


Transformacija posredovana Agrobakterijama

Agrobacterium tumefaciens

Tumor vrata korijena (eng. crown gall) potaknut 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.

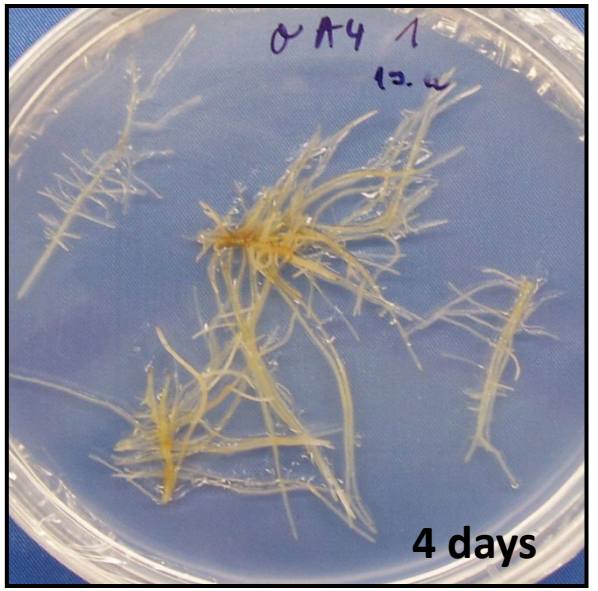
Transformacija posredovana Agrobakterijama

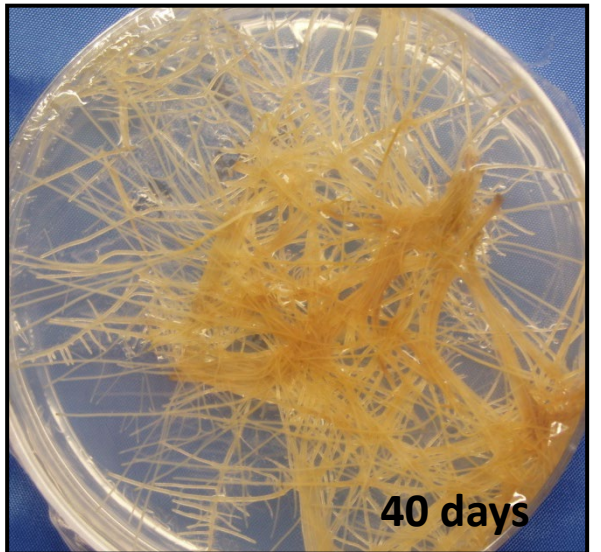
Agrobacterium rhizogenes











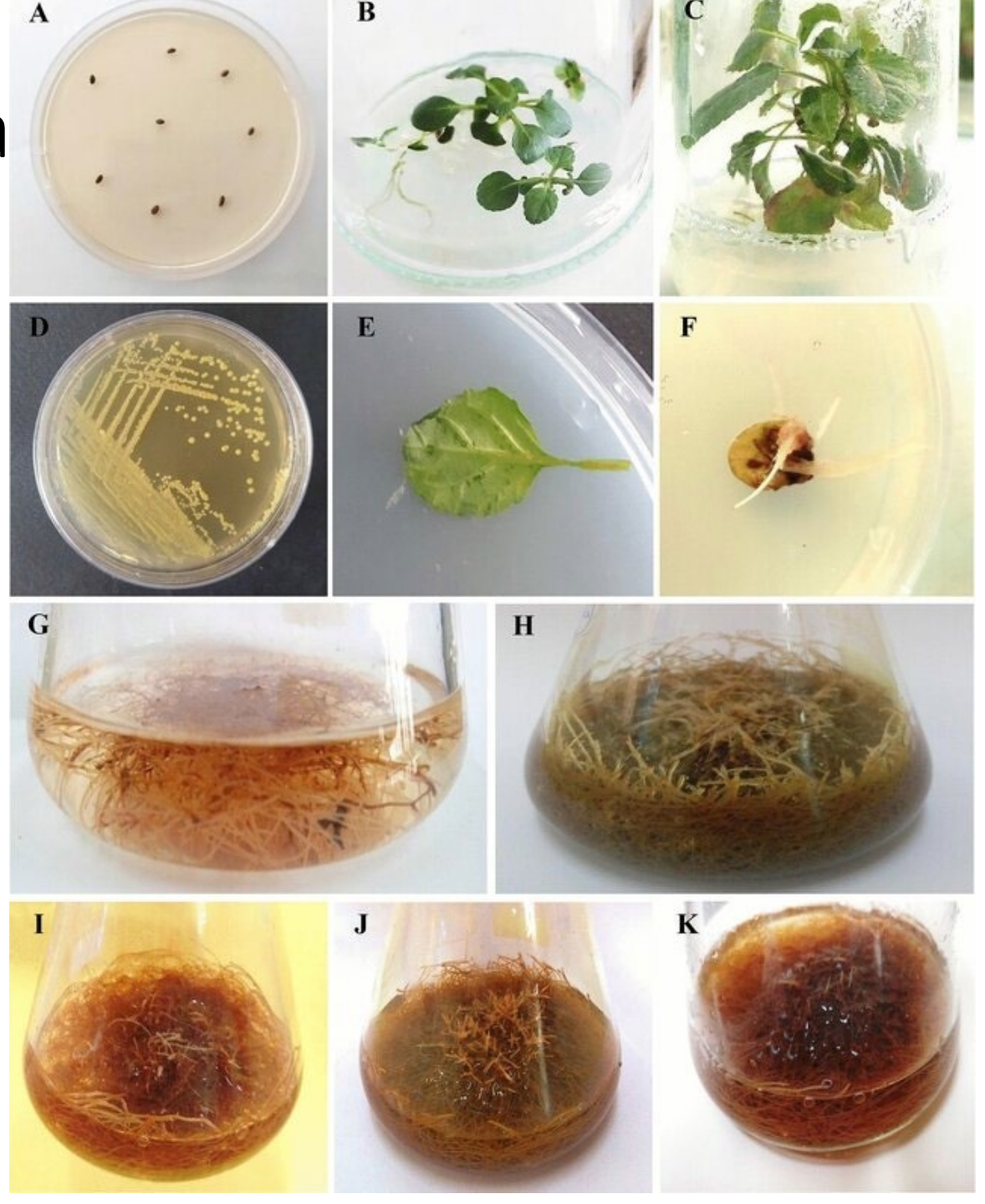
Kosmato korijenje

(eng. hairy roots)

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

Transformacija posredovana Agrobakterijama

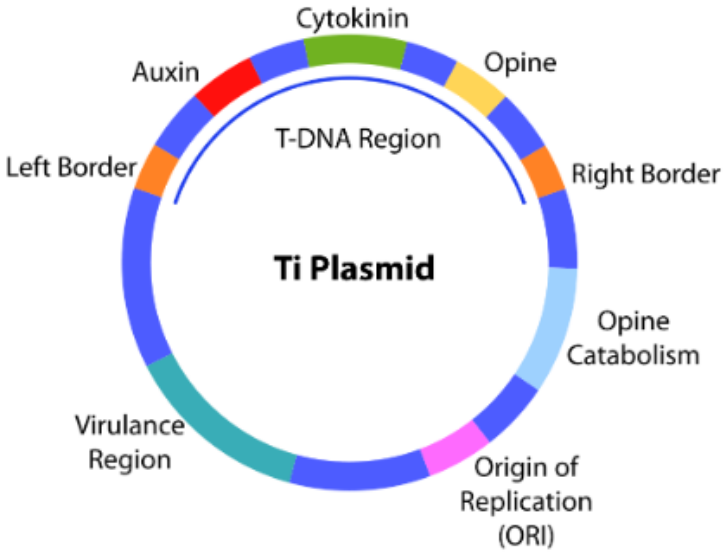
Povećana proizvodnja tanšinona i fenolnih spojeva u kulturi dlakavog korijenja vrste *Salvia miltiorrhiza* Bunge postupkom elicitacije (doi: 10.1007/s11240-023-02632-1)

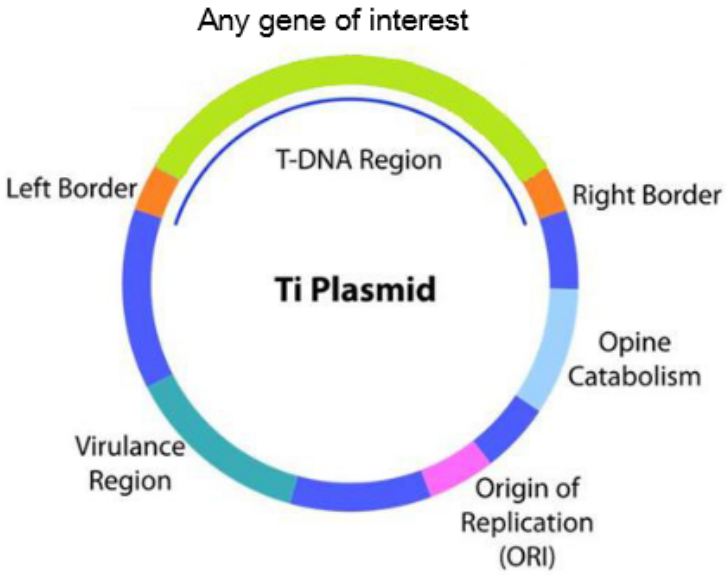


Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

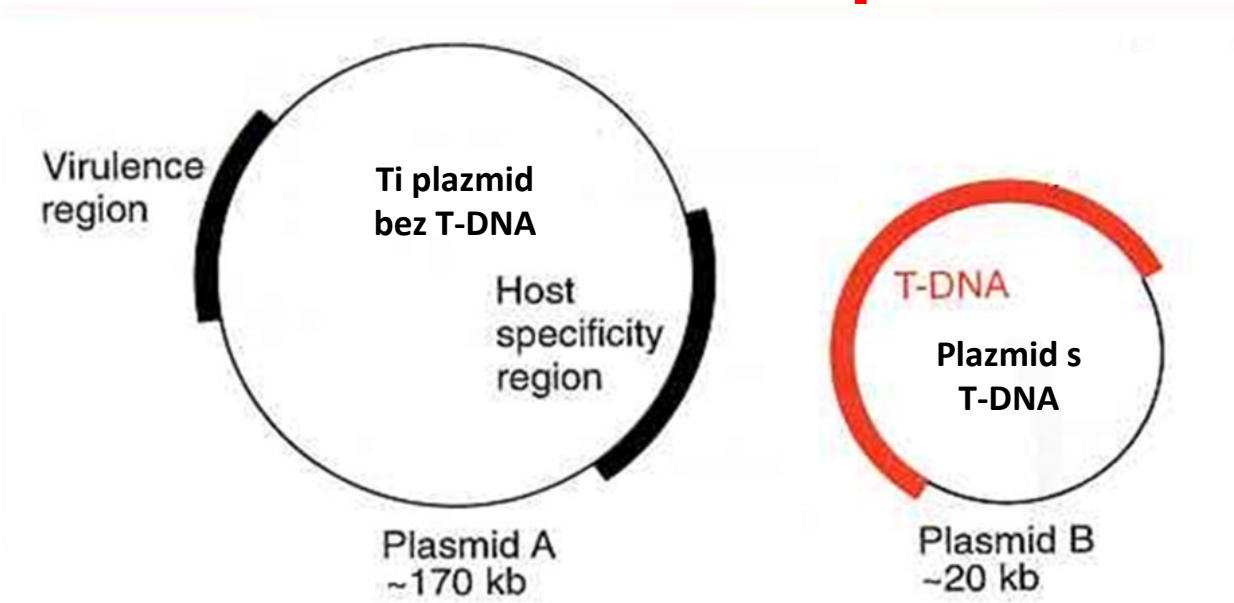
- Razoružani Ti plazmid i sustav binarnih plazmida
  - **Manipulacija agrobakterijama za transformaciju biljne stanice**
  - **Razoružani Ti**: umjesto gena za opine i regulatore rasta ugrađene su željene genske kazete
  - **Binarni sustav**: u transformaciji sudjeluju 2 plazmida (jednostavnija manipulacija)
    - **Plazmid s Vir regijom** koji nema T-DNA
    - **Plazmid s 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 pb (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.

Razoružani Ti plazmidi



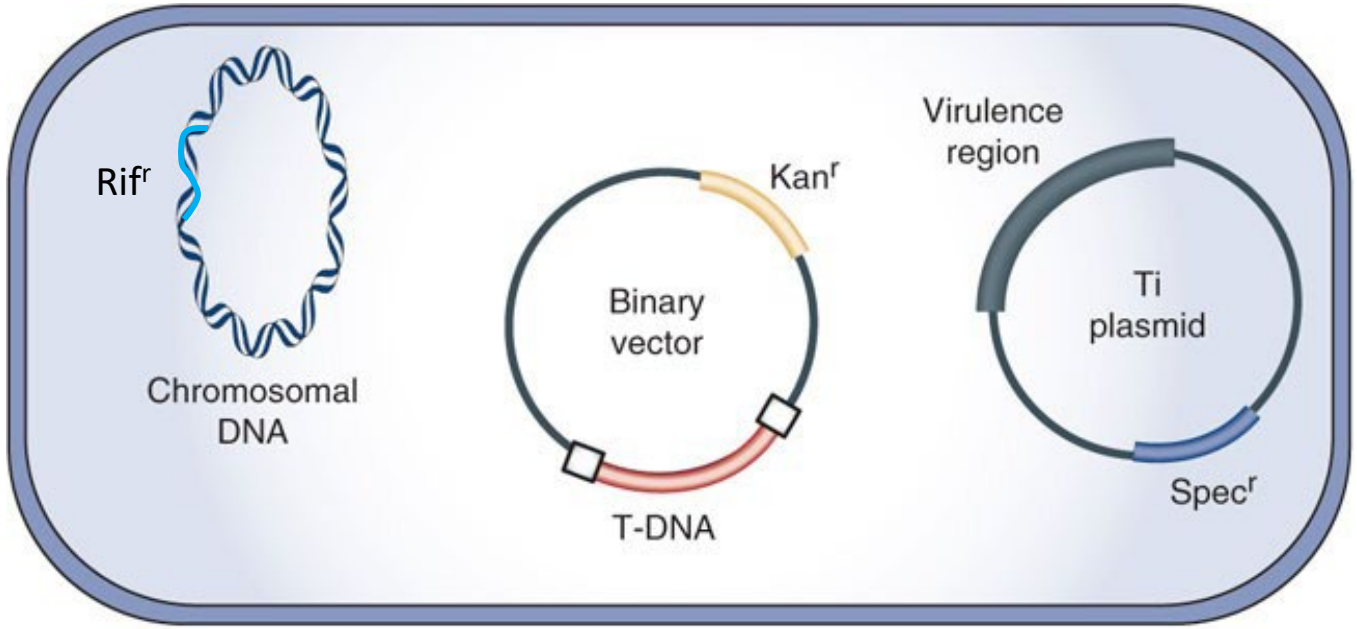


Sustav binarnih plazmida



Najčešća metoda za dobivanje GMO biljaka

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101



The *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 used for transformation harbors the C58 chromosomal backbone containing **rifampicin** resistance and carries two plasmids. A non-oncogenic disarmed tumor-inducing plasmid (**Ti plasmid**) containing the virulence (*vir*) genes and resistance to **gentamicin**, but lacking the T-DNA region. The T-DNA region is present on a second plasmid, the **binary vector**. The selection marker in the binary vector is the **kanamycin** resistance gene. DNA sequences to be transformed are cloned between the left and right border sequences of the T-DNA region and transferred to the host.

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

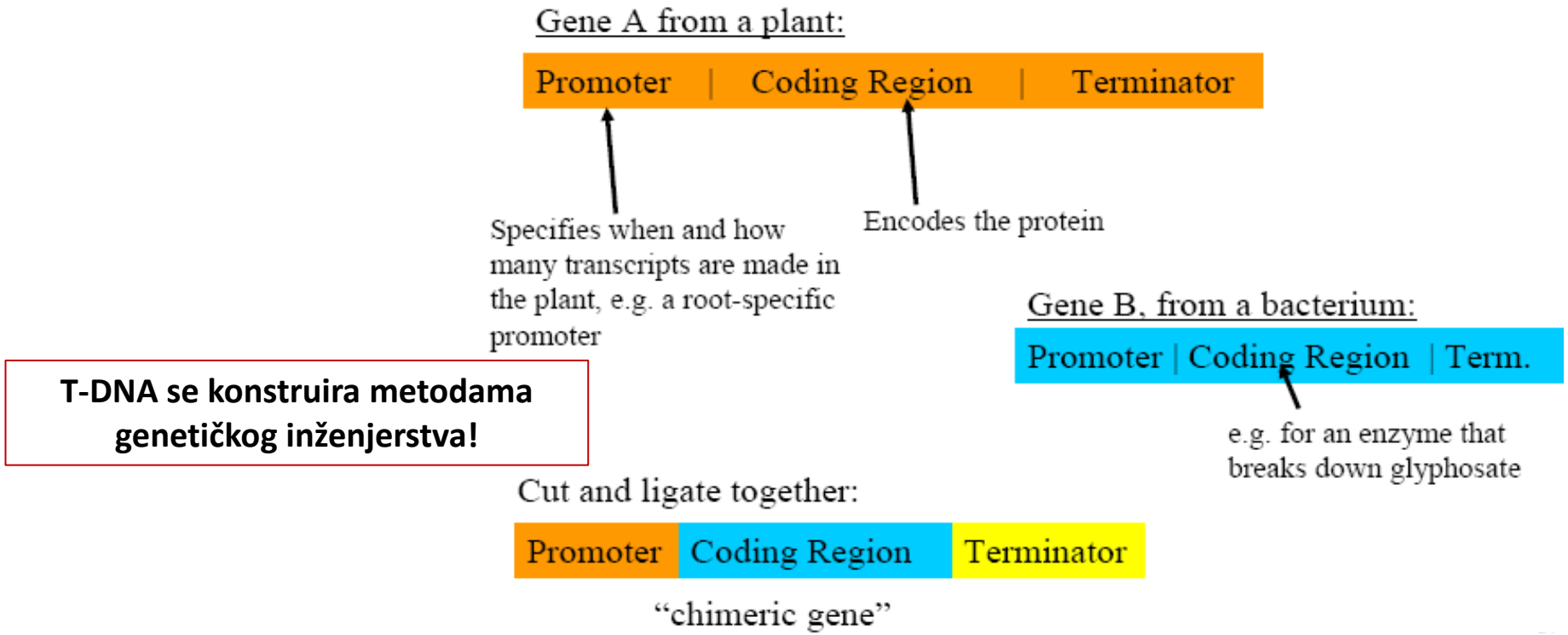
Kako napraviti transgeničnu biljku?

1. Identifikacija gena (iz bilo kojeg organizma) koji će donijeti željeno svojstvo biljci
2. Izrada konstrukta s željenim genom pod kontrolom odgovarajućeg (biljnog) promotora
3. Ugradnja u odgovarajući vektor
4. Transformacija biljne stanice
5. Selekcija transformanata
6. Regeneracija cijele biljke iz selektirane transformirane stanice

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

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

- Izrada željenog konstrukta – ekspresijske kazete (*promotor::gen*)
  - Istraživanje promotora gena
  - Istraživanje kodirajuće regije gena (CDS)

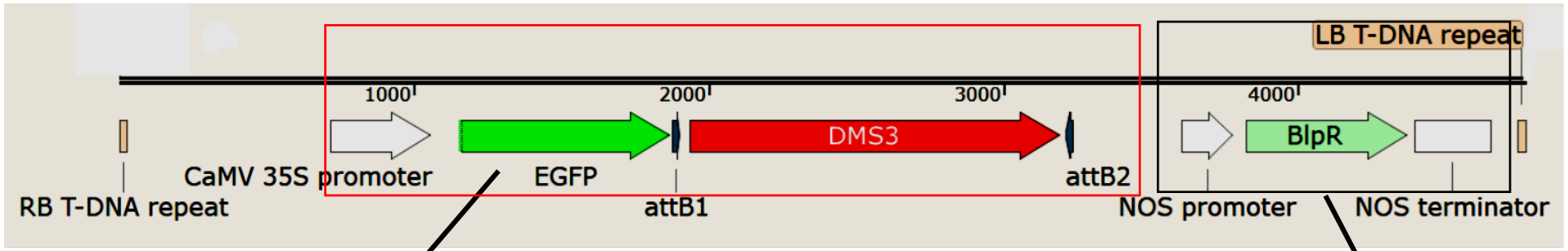


T-DNA se konstruira metodama genetičkog inženjerstva!

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

- Ekspresijska kazeta ugrađuje se u vektor (plazmid)
  - Obično više od jedne ekspresijske kazete (selektivni marker, gen s reporterom)

Biljna ekspresijska kazeta



Reporter

Rekombinantni protein GFP-DMS3 sintetizira se u transformiranim stanicama

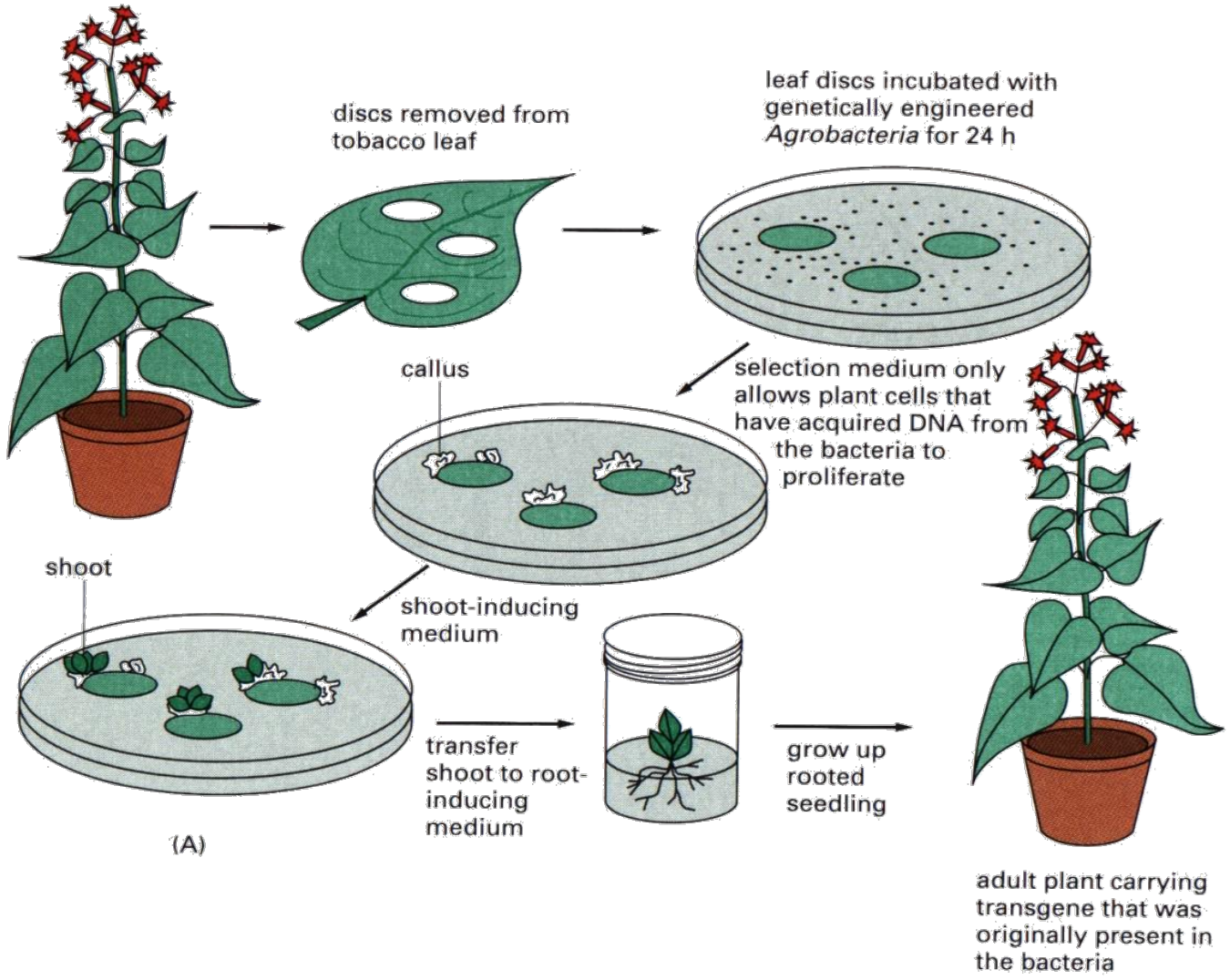
Selekcijski marker

Basta/glufosinat amonium/fosfinotricin

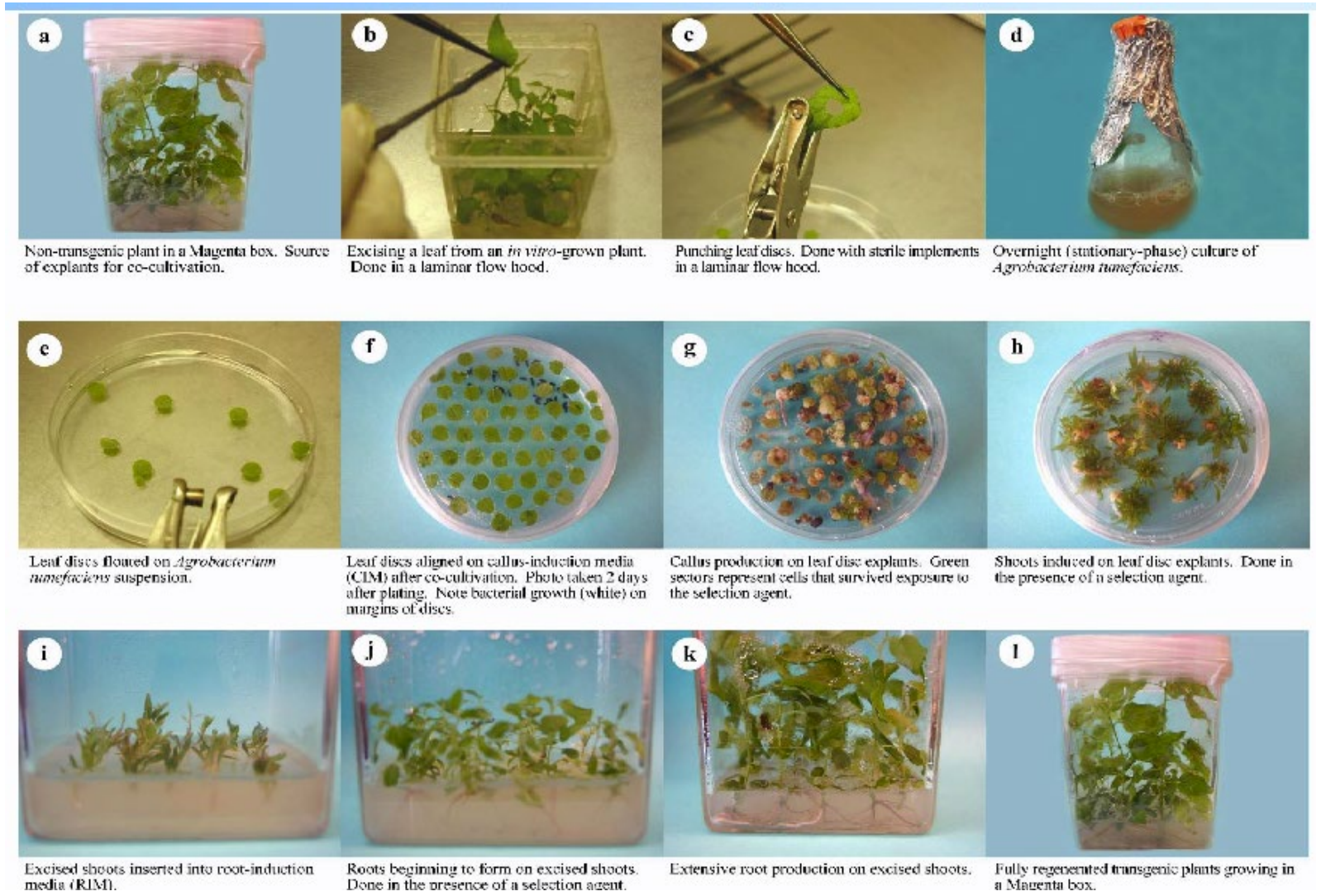
Rezistencija transformiranih stanica

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

Transformacija lisnih diskova



Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

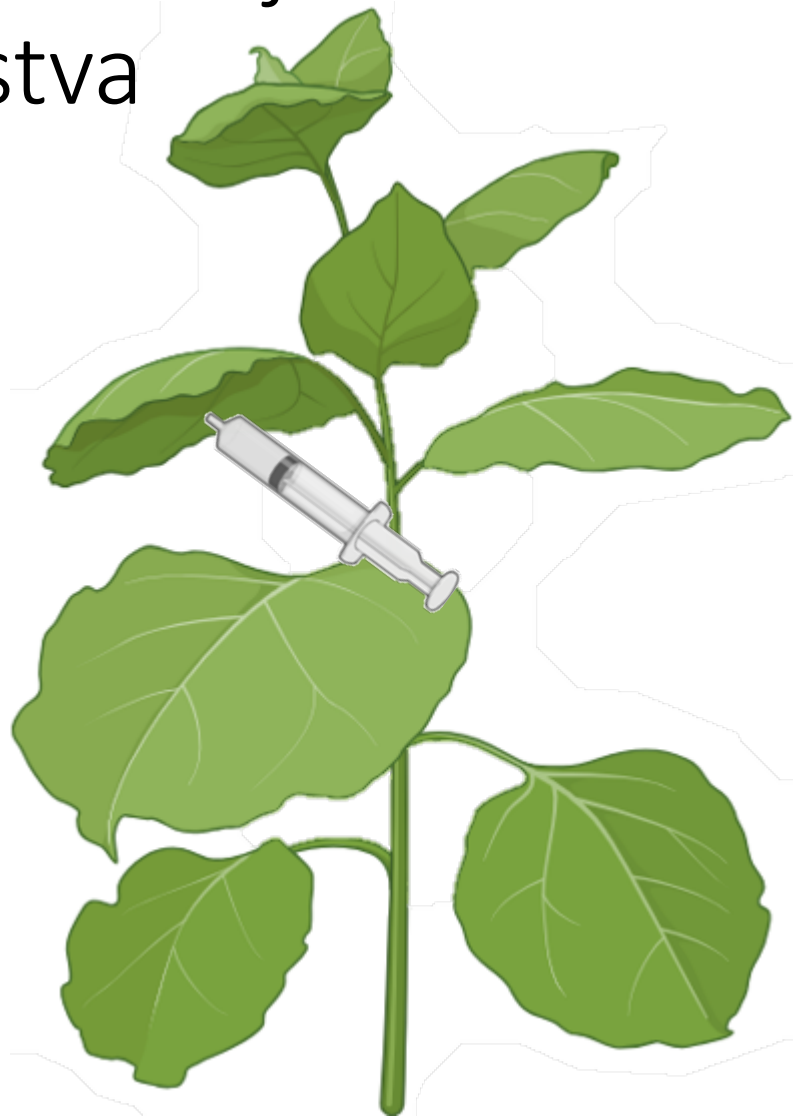


Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

Agroinfiltracija

Brza, prolazna, ekspresija proteina u epidermalnim stanicama duhana *Nicotiana benthamiana*

- Infiltracija agrobakterija u listove duhana: T-DNA se prenosi u epidermalne stanice



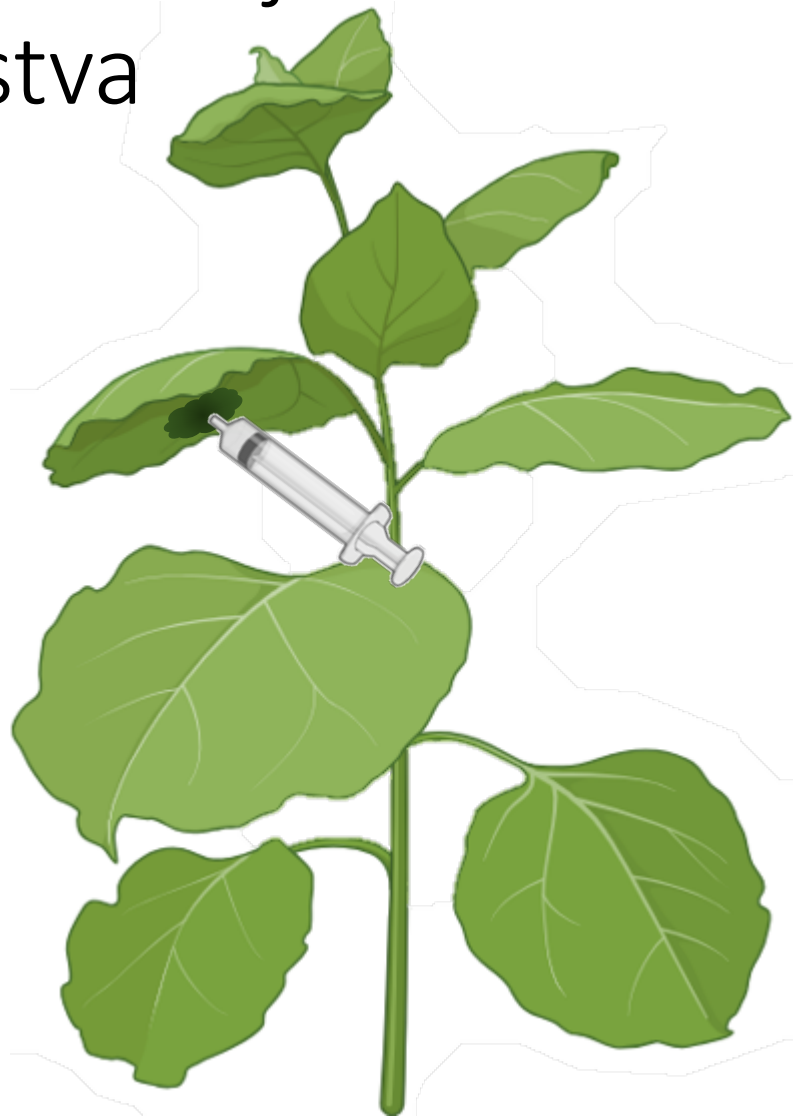
Nicotiana benthamiana

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

Agroinfiltracija

Brza, prolazna, ekspresija proteina u epidermalnim stanicama duhana *Nicotiana benthamiana*

- Infiltracija agrobakterija u listove duhana: T-DNA se prenosi u epidermalne stanice

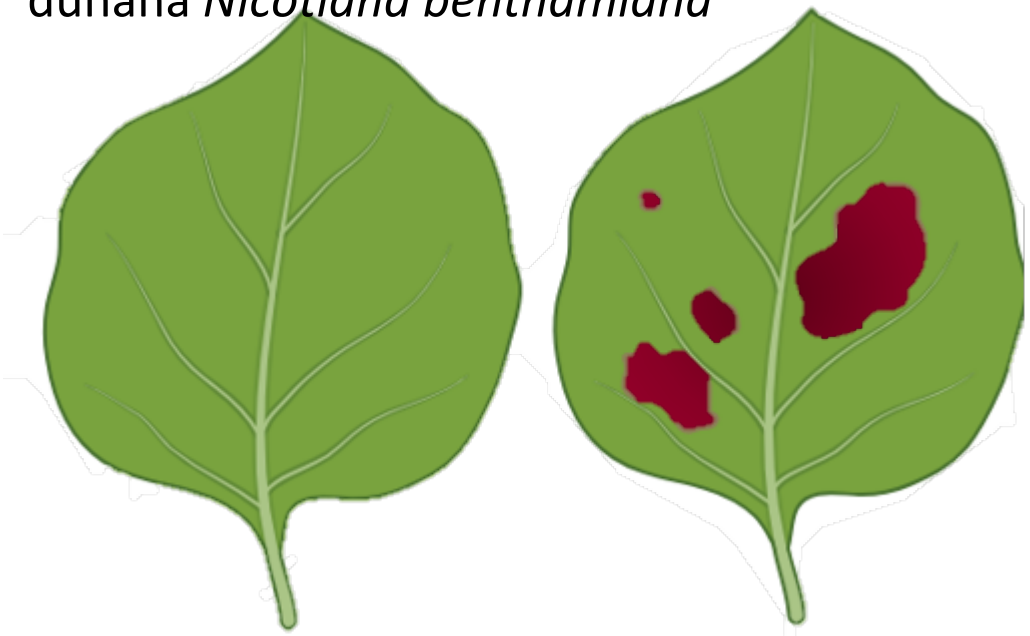


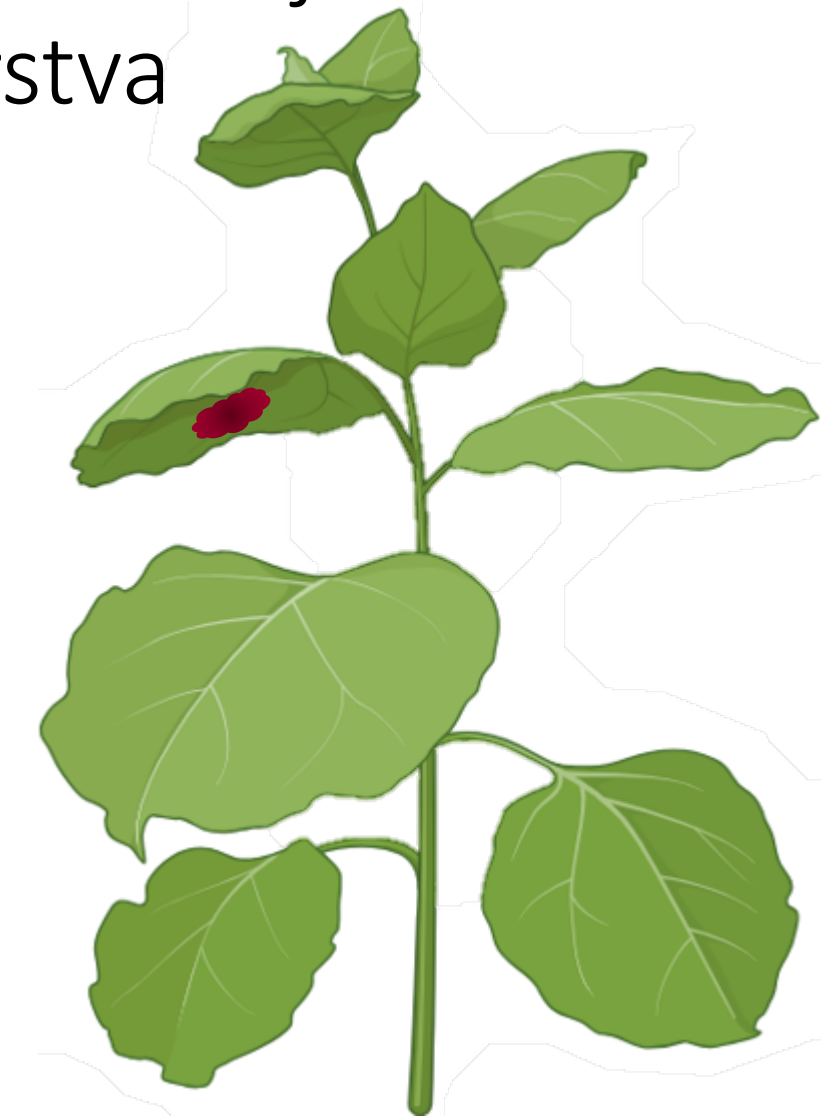
Nicotiana benthamiana

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

Agroinfiltracija

Brza, prolazna, ekspresija proteina u epidermalnim stanicama duhana *Nicotiana benthamiana*





Nicotiana benthamiana

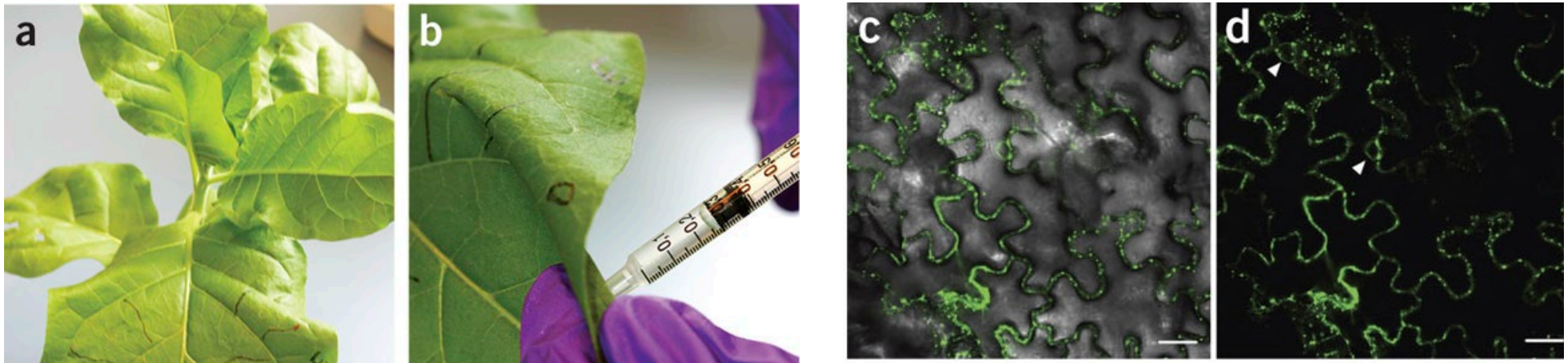
- Infiltracija agrobakterija u listove duhana: T-DNA se prenosi u epidermalne stanice

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

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



2 dana nakon infiltracije

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

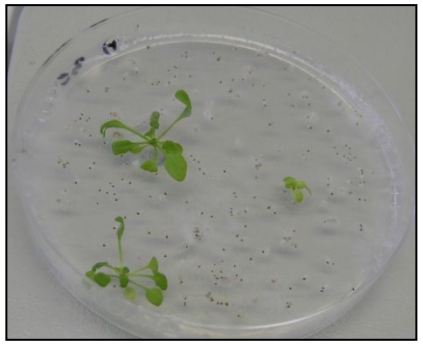
In planta (Floral dip) transformacija

Uročnjak *Arabidopsis thaliana*





Transformacija



Selekcija

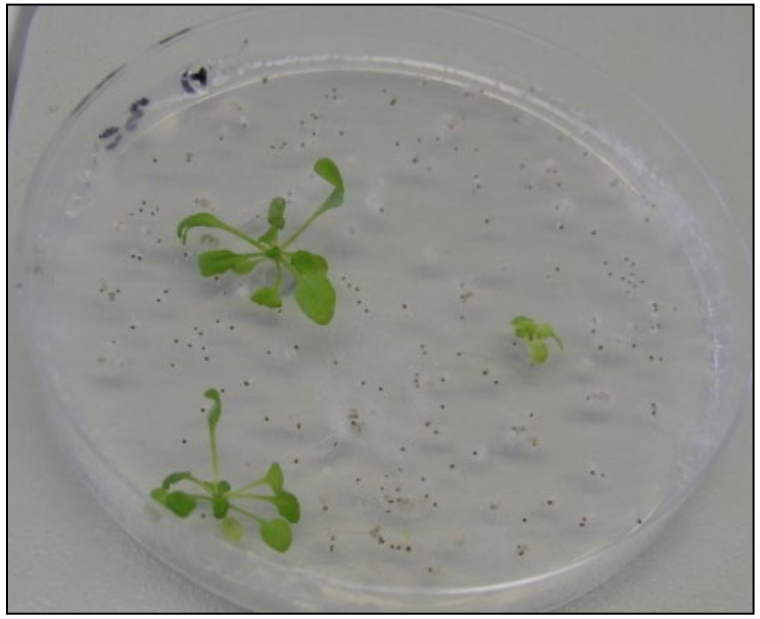


Uzgoj transformanata

- 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

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

In planta (Floral dip) transformacija



T1 generacija (0,1 – 1% transformanata)

- Hemizigoti
- Do ugradnje je moglo doći na jednom ili na više mjesta u genomu

T2 generacija

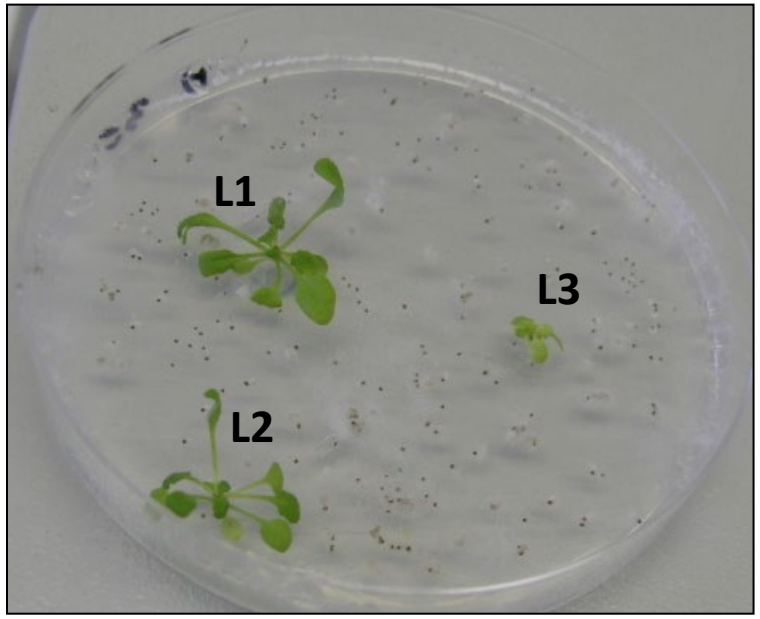
- Nastaje samooplodnjom odabrane T1 biljke (buduća linija)
- Mendelova segregacija gena
- Probir varijanti s jednom insercijom

T3 generacija

- Nastaje samooplodnjom pojedinačnih T2 linija
- Mendelova segregacija gena
- Selekcija homozigota

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

In planta (Floral dip) transformacija



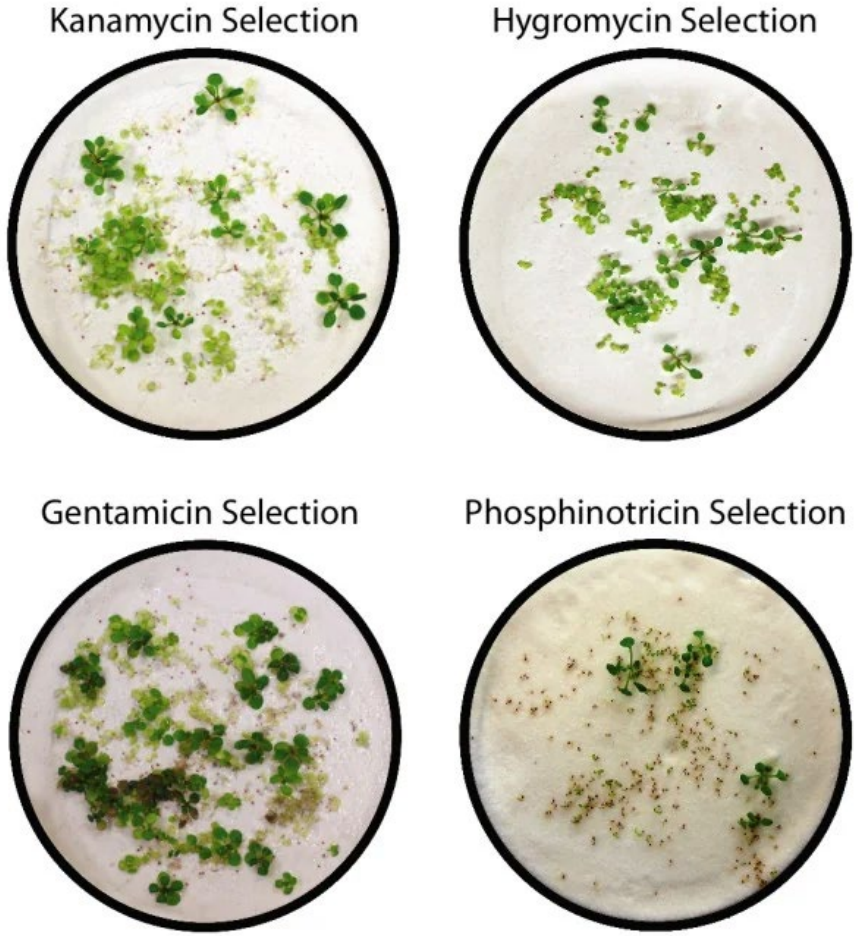
L1
Činjenica: u T2 generaciji 27% sjemenki ne klije na selekcijskoj podlozi
Zaključak: insercija T-DNA na jednom mjestu u genomu (monohibridno k.)
Tt × Tt= 25% TT + 50% Tt + 25 % tt (divlji tip)

L2
Činjenica: u T2 generaciji nakon samooprašivanja 9,2% sjemenki ne klije na selekcijskoj podlozi
Zaključak: insercija T-DNA na dva mjesta u genomu (dihibridno križanje T1T2t1t2 genotipa)

L3
Činjenica: zakržljali rast, ne stvara sjemenke
Zaključak: ugradnja T-DNA u esencijalni gen uzrokuje poremećaj rasta

Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

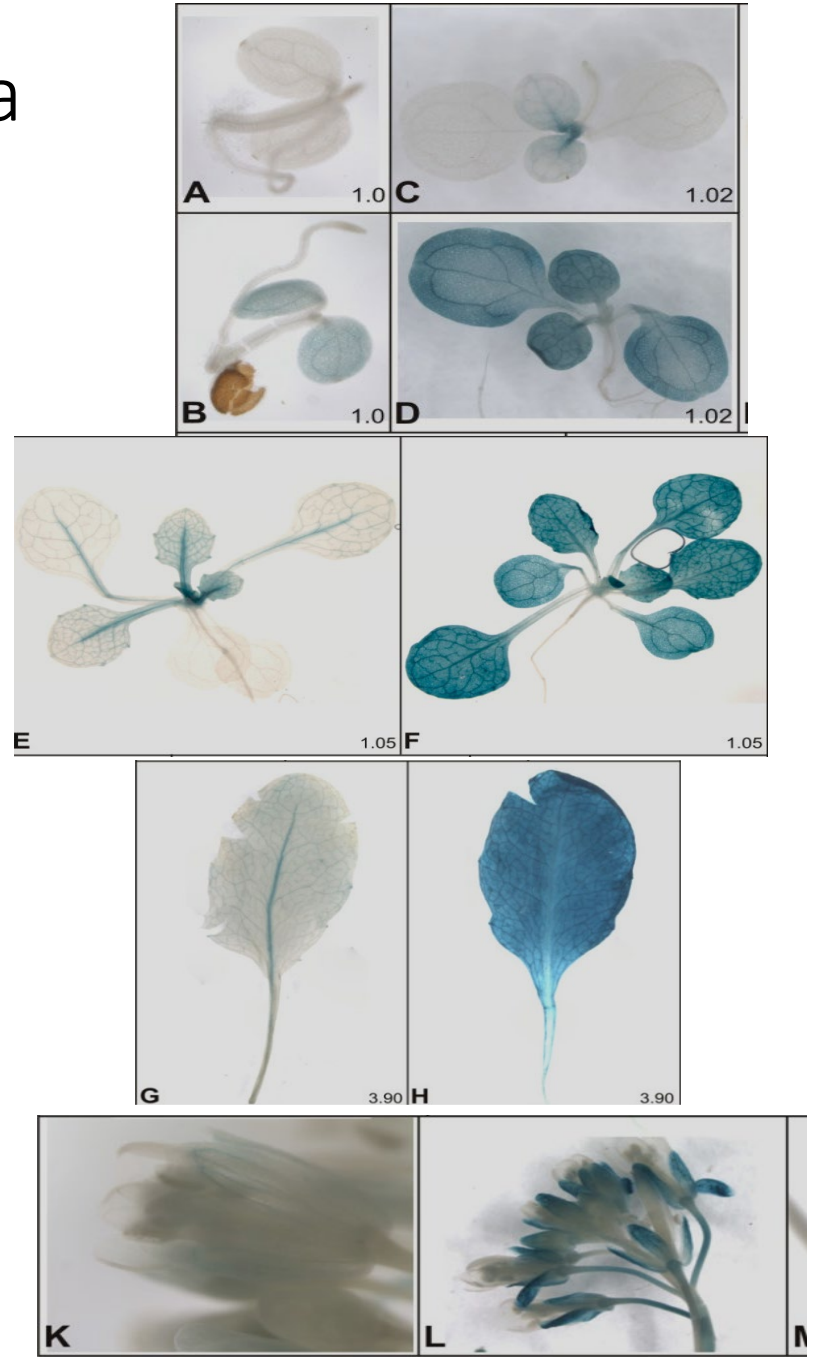
***In planta* (Floral dip) transformacija**



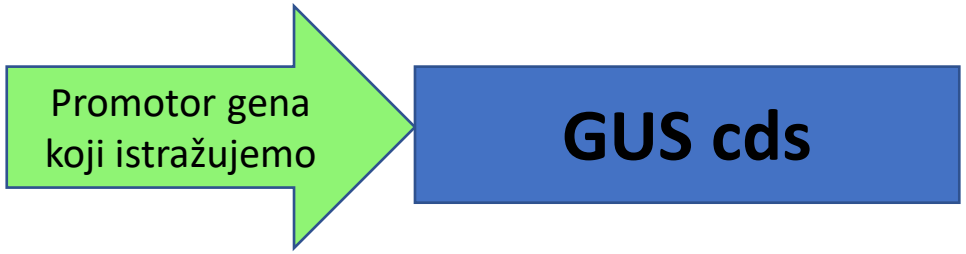
Transformacija posredovana Agrobakterijama - metode genetičkog inženjerstva

Istraživanje ekspresije gena i aktivnosti promotora

- Usporedba aktivnosti dvaju promotora
  - GUS (beta-glukuronidazni) reporterski sustav
  - Nativni promotor::GUS
    - Histokemijski se pokazuje mjesto aktivnosti određenog promotora



Kazeta za transformaciju:



Cds=coding DNA sequence

Direktni unos DNA

- Transport i integracija u jezgru bez posrednika

a) **Bombardiranje mikročesticama – zlatne čestice** (0,5 do 2 μm u promjeru) obavijene s DNA i unesene u stanicu velikim brzinama. Stanice preživljavaju, dijele se i regeneriraju biljke.

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

Direktni unos DNA

a) **Bombardiranje mikročesticama – zlatne čestice** (0,5 do 2 μm u promjeru) 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.
   - Privremena transformacija, ili rjeđe (< 2%) stabilna transformacija



Helios
Gene gun



Biolistic
PDS

Direktni unos DNA

a) **Bombardiranje mikročesticama – zlatne čestice** (0,5 do 2 μm u promjeru) obavijene s DNA i unesene u stanicu velikim brzinama. Stanice preživljavaju, dijele se i regeneriraju biljke.

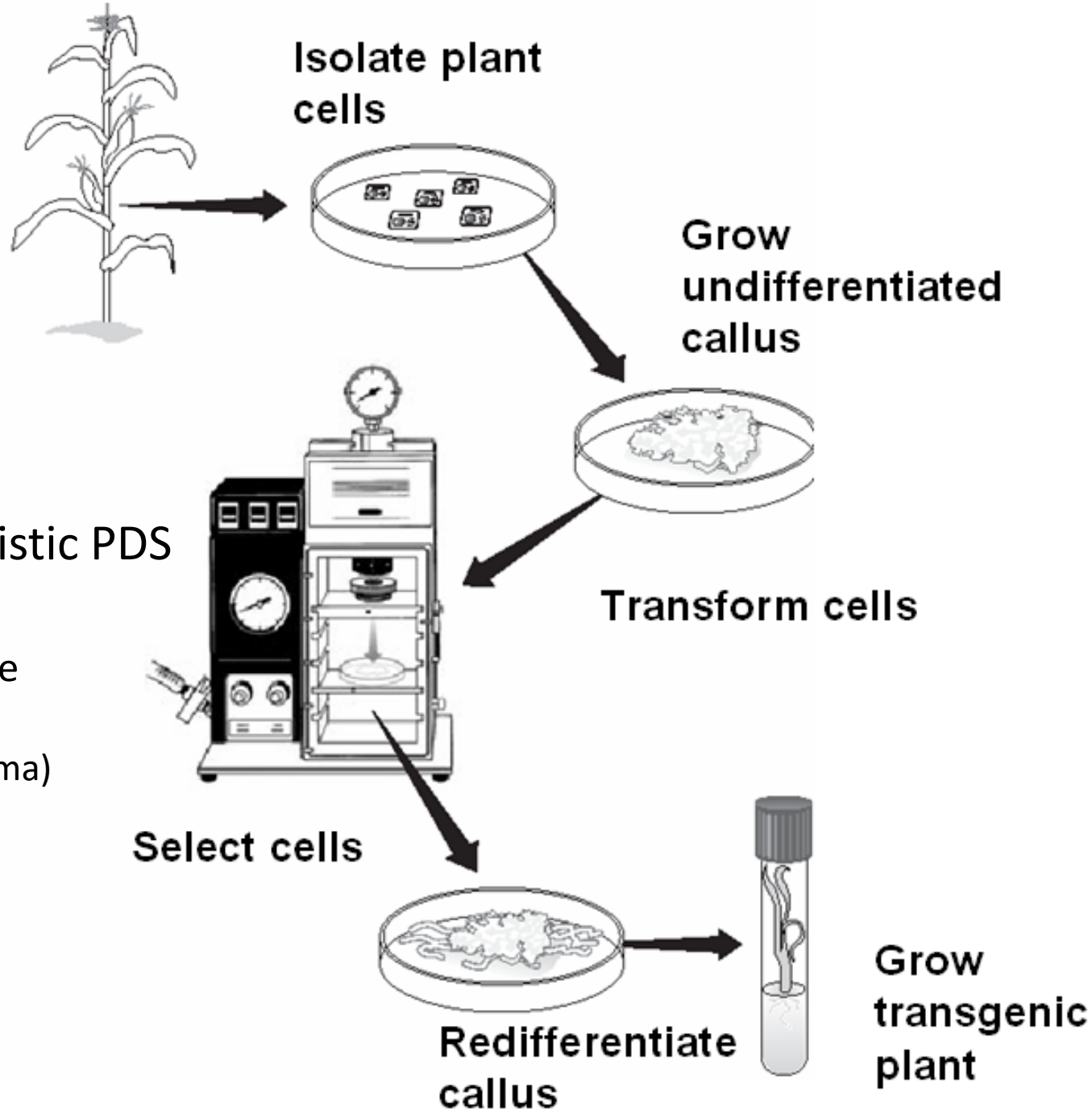


Helios Gene Gun

Za brzu transformaciju bez potrebe za kulturom tkiva

Direktni unos DNA

a) **Bombardiranje mikročesticama**



Biolistik transformacija se koristi za biljke koje se ne mogu transformirati agrobakterijama:

- Jednosupnice (nisu kompatibilne s agrobakterijama)
- Embrionalne stanice (otpornije na agrobakterije)

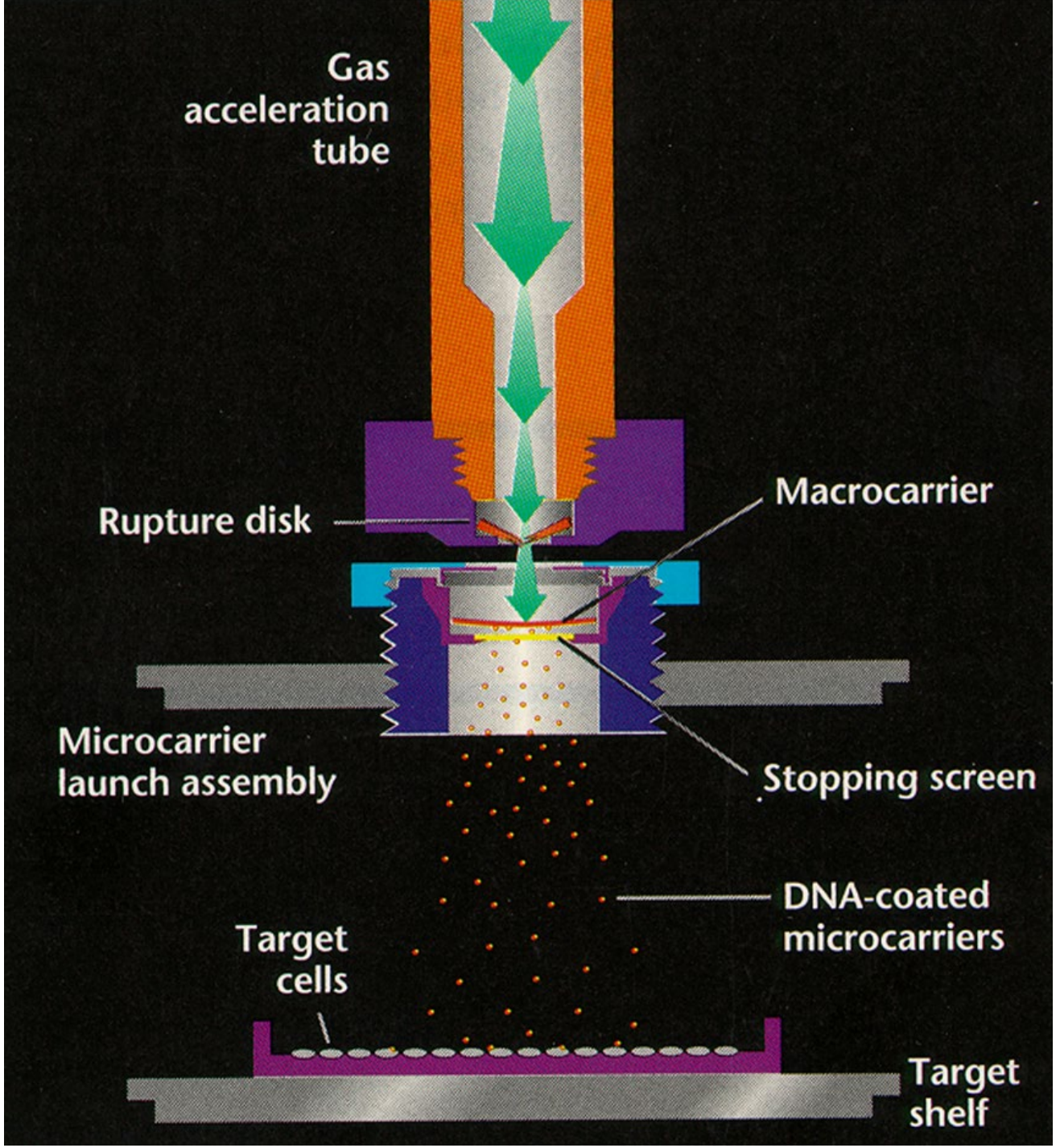
Bombardiranje mikroprojektilima dovodi do kompleksne integracije DNA.

Direktni unos DNA

a) Bombardiranje mikročesticama

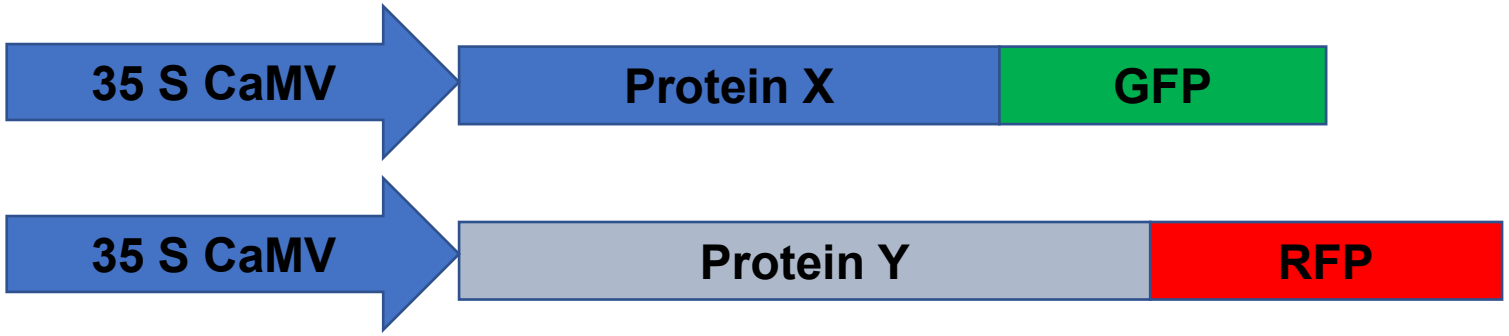
Biolistic PDS-1000 Particle Bombardment system



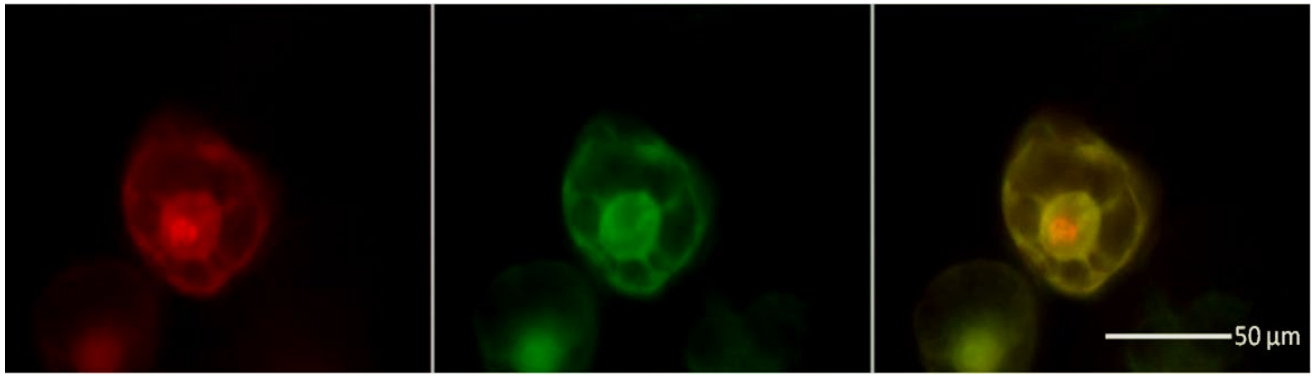


Direktni unos DNA

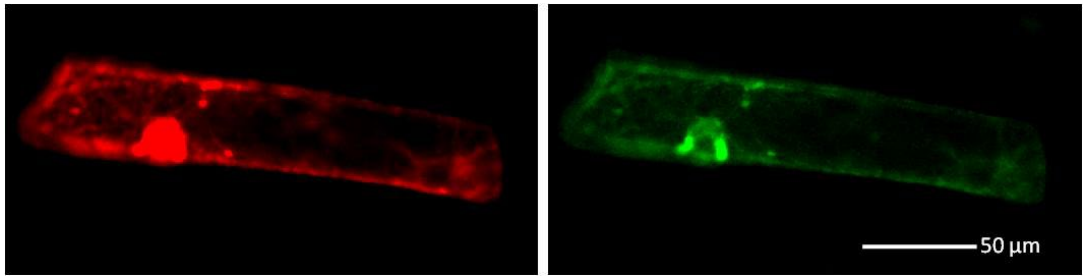
a) **Bombardiranje mikročesticama – privremena transformacija**
   - Unutarstanična (ko)lokalizacija fluorescentno obilježenih proteina



Biolistik transformacija stanica duhana BY-2



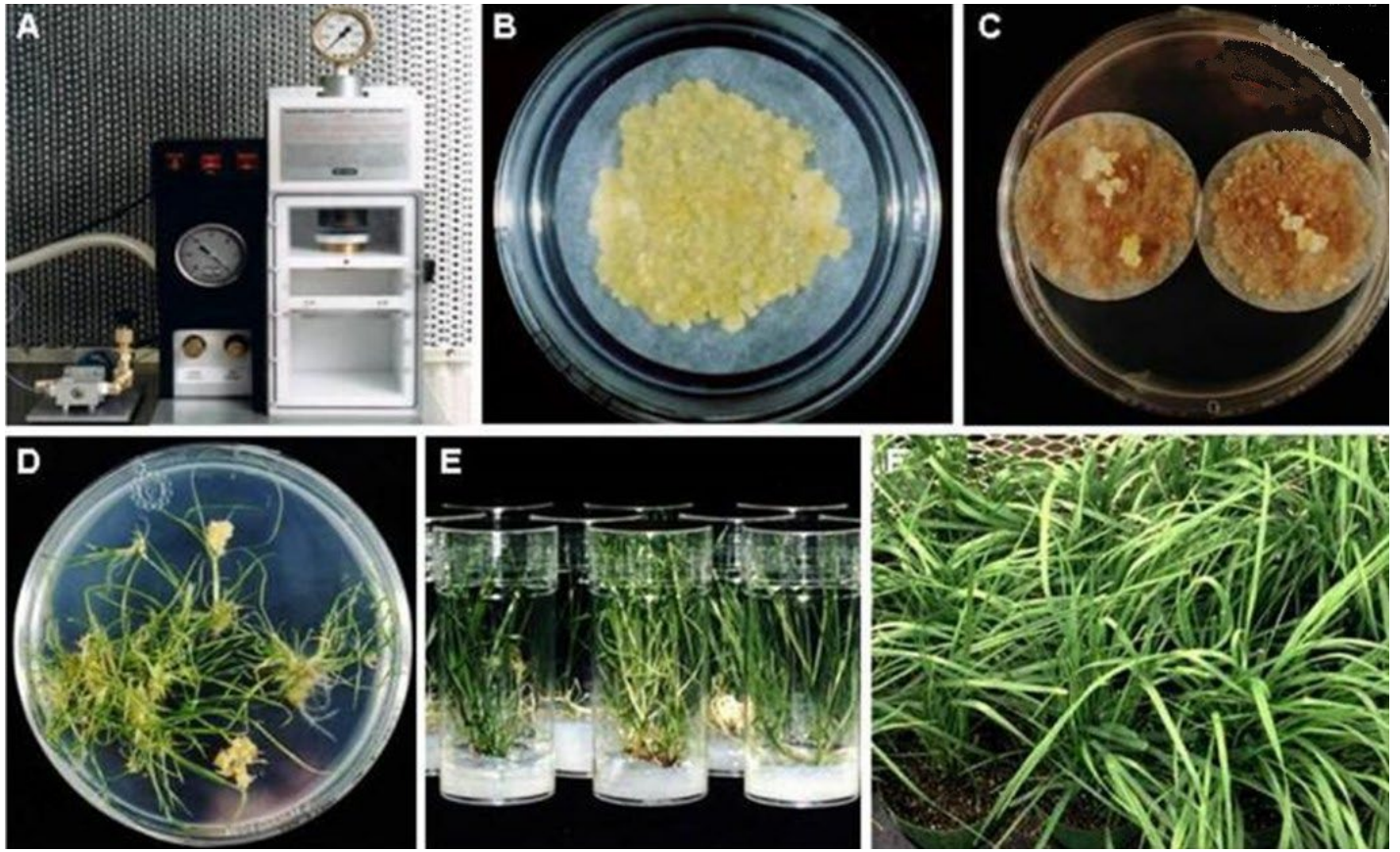
Biolistik transformacija stanica pokožice luka



Direktni unos DNA

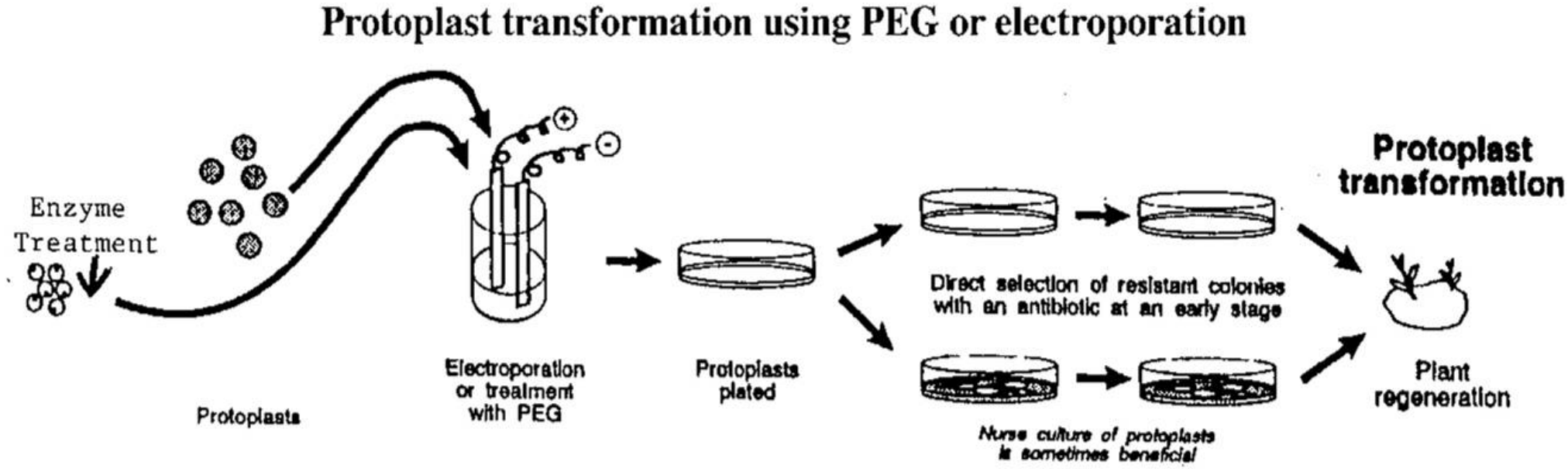
a) Bombardiranje mikročesticama – stabilna transformacija

- Stabilna transformacija pšenice (poboljšana kvaliteta glutena), riže i šećerne trske (otpornost na štetnike, bolesti i sušu)



Direktni unos DNA

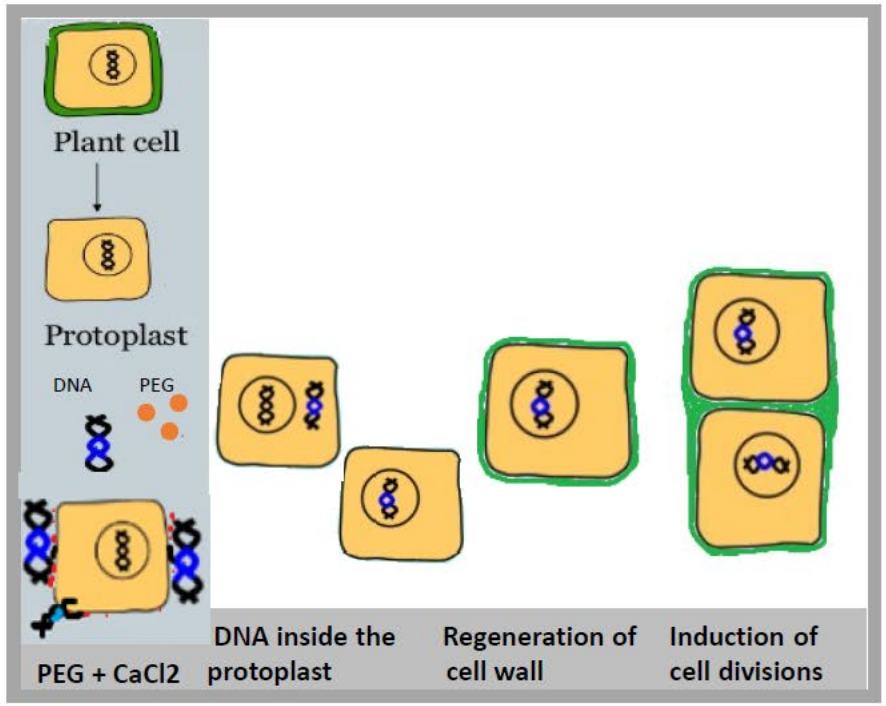
b) **Polietilen glikol (PEG) ili elektroporacija** – unos DNA u protoplaste. Resinteza stanične stjenke, diobe i regeneracija.



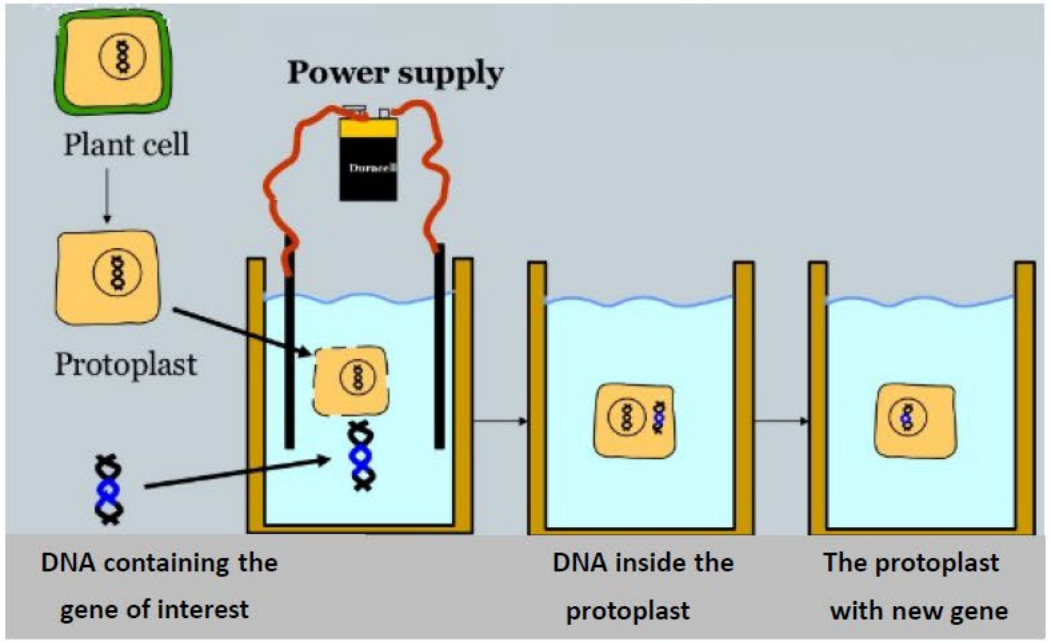
Direktni unos DNA

b) Polietilen glikol (PEG) ili elektroporacija

Polietilenglikol (PEG) transformacija



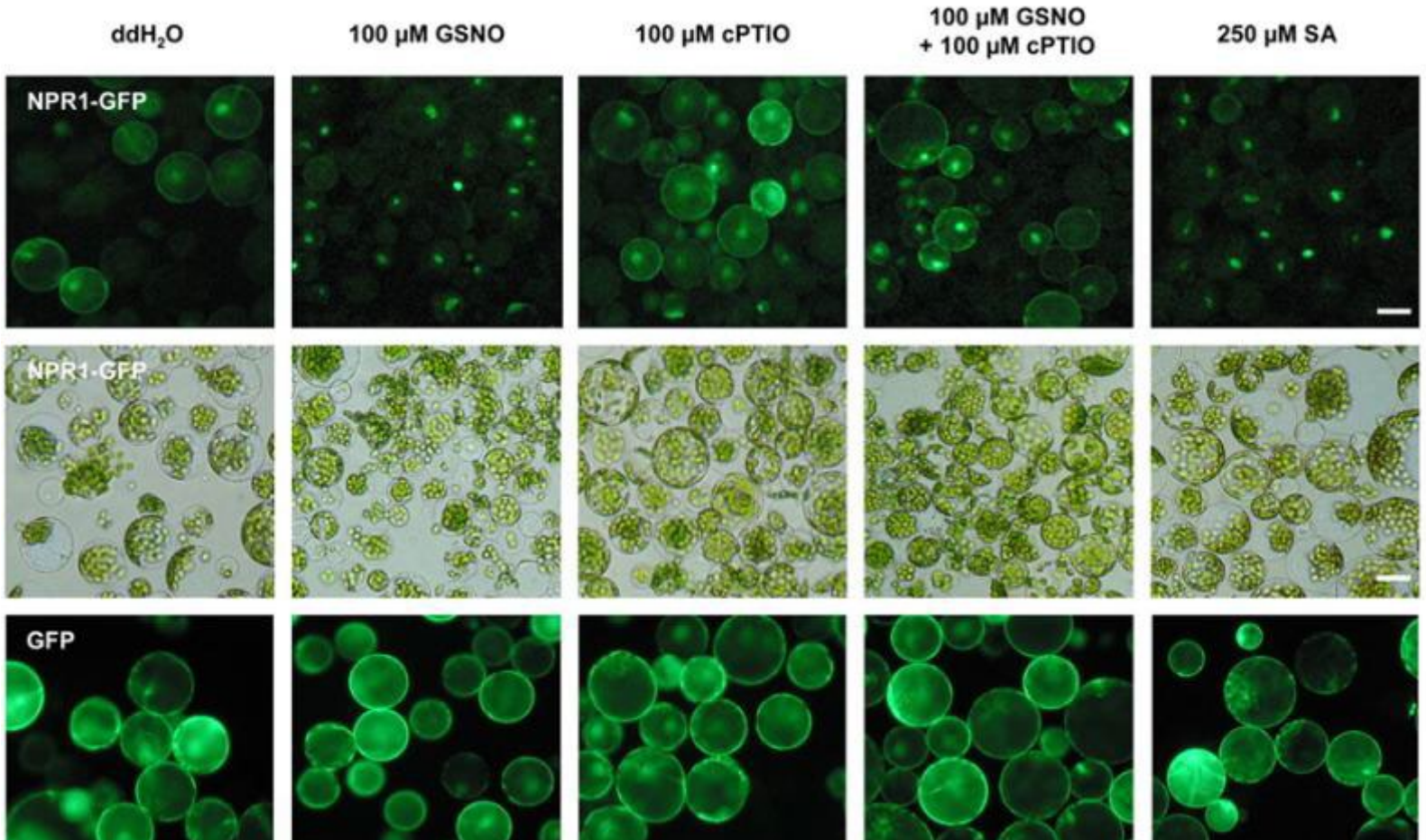
Elektroporacija



Direktni unos DNA

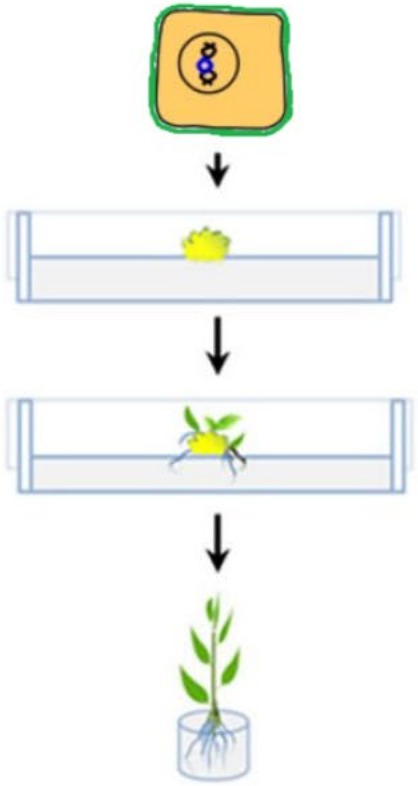
b) Polietilen glikol (PEG) ili elektroporacija – privremena transformacija

Protein NPR1 nakon dodatka induktora ulazi u jezgru



Direktni unos DNA

b) Polietilen glikol (PEG) ili elektroporacija – stabilna transformacija

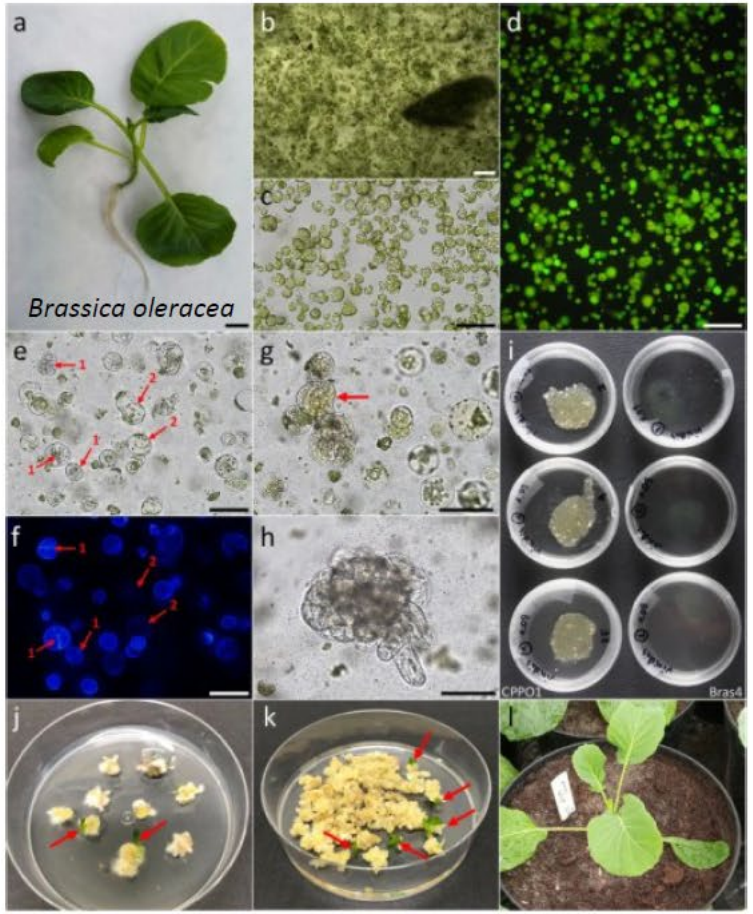


Transformacija protoplasta

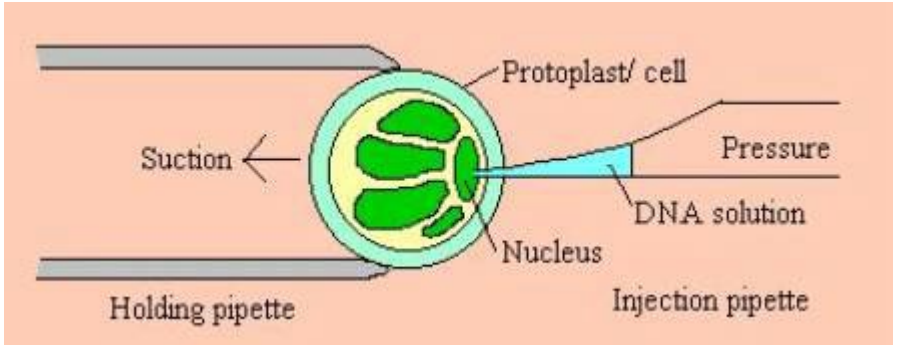
Regeneracija stjenke i indukcija dioba (kalus)

Organogeneza – indukcija izdanaka

Zakorjenjivanje i regeneracija GMO biljaka



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

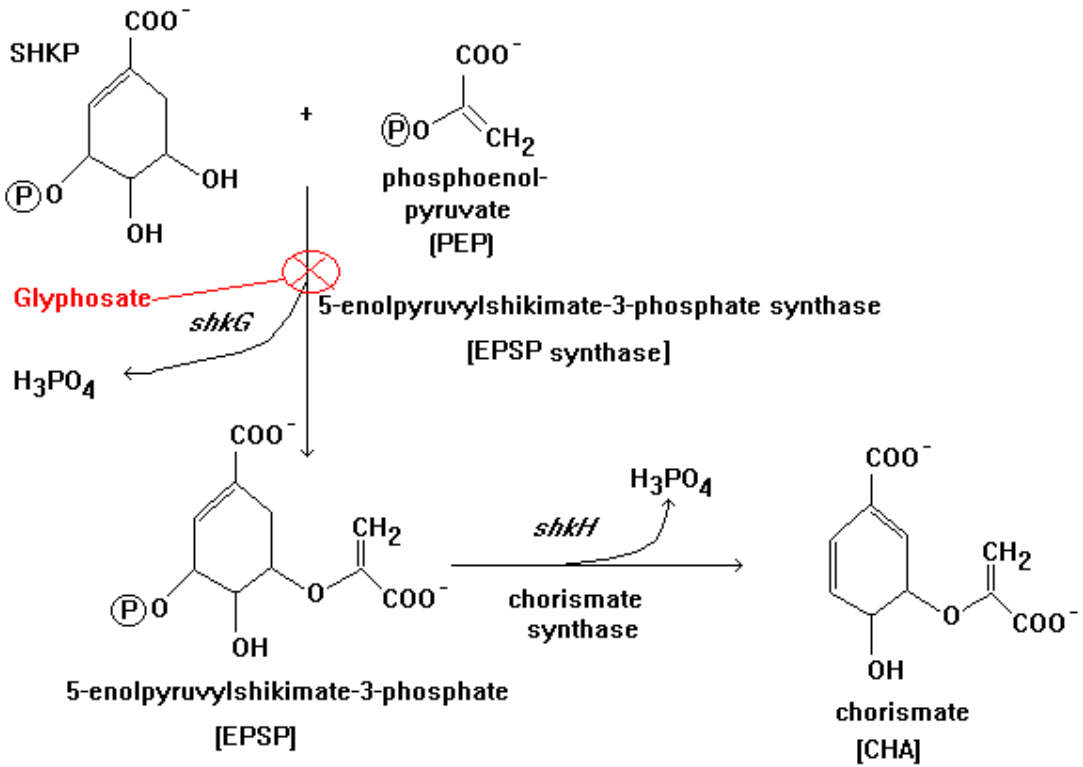




Svojstva komercijalnih GMO kultura

1. Modificiranje agronomskih svojstava:
   - Tolerantnost na herbicide
     - Glifosat Roundup Ready ® ili Roundup
     - Glufosinat Liberty Link®
   - Otpornost na insekte – *Bt* kulture
     - *Bt – Bacilus thurigiensis – crystaline – Cry* gen
   - Otpornost na viruse
2. Poboljšana ‘proizvodna’ svojstva kulture:
   - Odgođeno dozrijevanje
   - Usporeno dozrijevanje
   - Izmijenjeni, poboljšani sastav hranjiva

Rezistencija na herbicid Roundup (Glifosat)







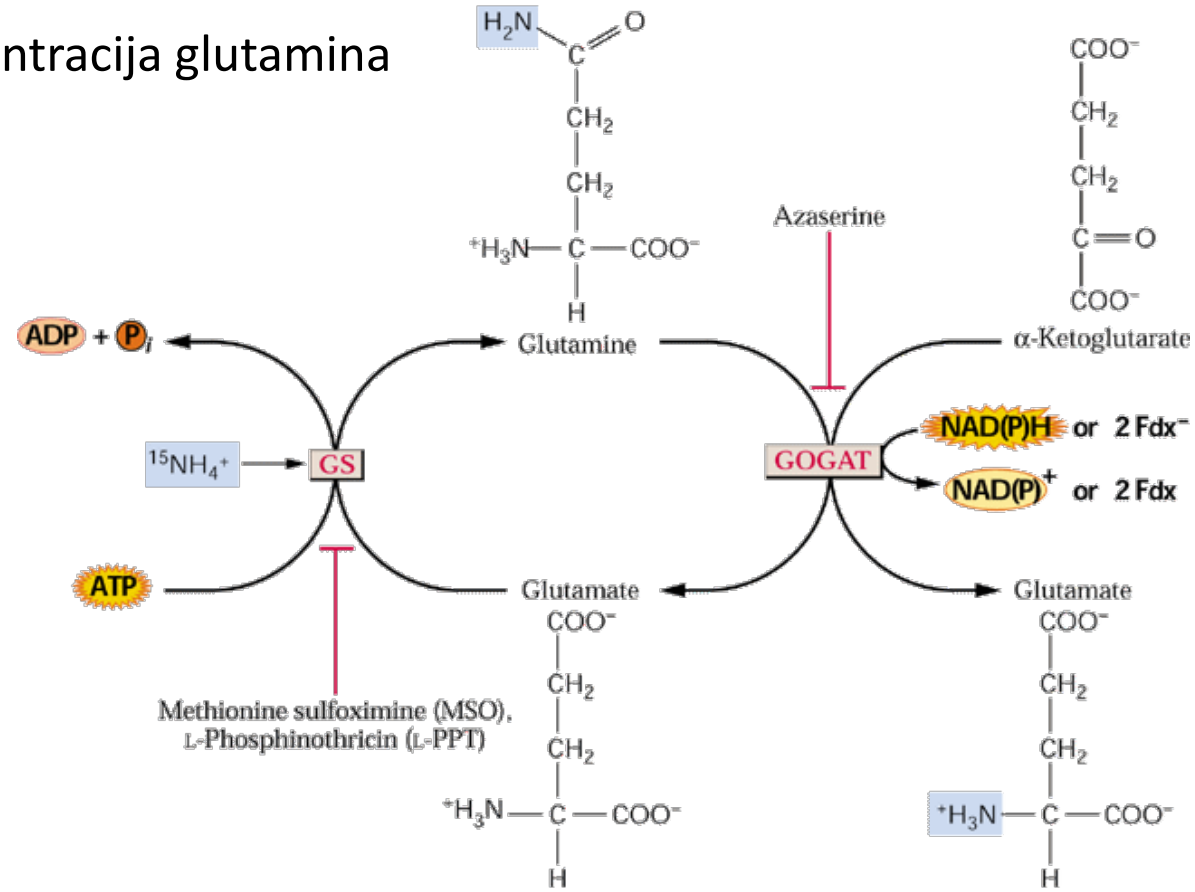


Roundup blokira sintezu aromatskih AK.

Rezistentne biljke imaju bakterijski enzim otporan na glifosat

Liberty Link®: glufosinat amonijum/fosfinotricin/basta

- Inhibira aktivnost glutamin sintaze
  - Blokira vezanje amonijevih iona
  - Akumulira se amonijak i smanjuje se koncentracija glutamina
  - Otporne biljke degradiraju herbicid



Neki od ciljeva genetičkog inženjerstva biljaka

Druga generacija GM 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

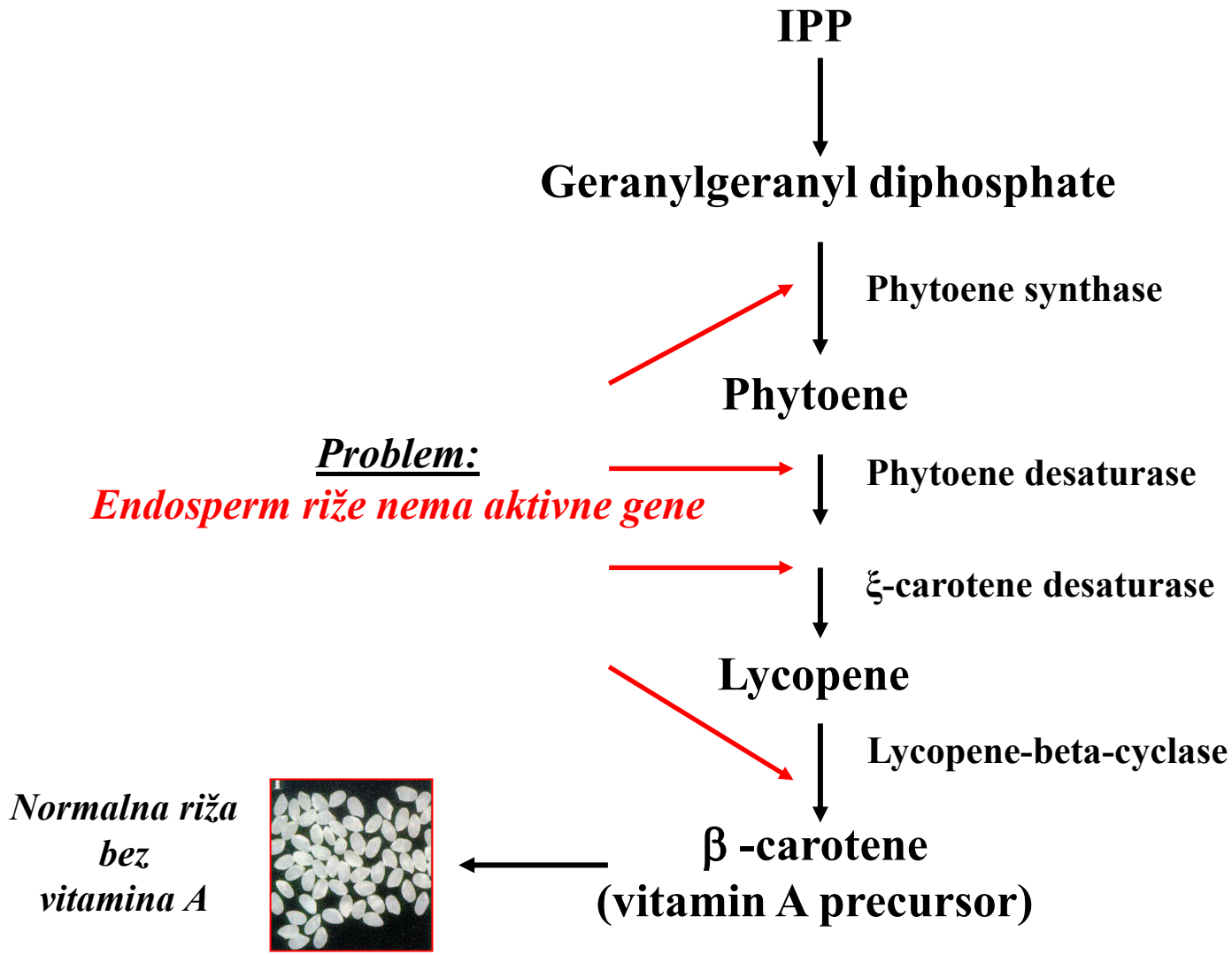
- Nedostatak vitamina A – zdravstveni problemi
  - slijepilo, ospice, smrt
- >100 milijuna djece pati od nedostatka vitamina A

CILJ: povećati sadržaj vitamina A u hrani





Sinteza β-karotena u biljaka





The Golden Rice Solution

β-Carotene Pathway Genes Added

IPP

↓

Geranylgeranyl diphosphate

↓ **Phytoene synthase** (narcisa)

Phytoene

↓ **Phytoene desaturase**

↓ **ξ-carotene desaturase** } (bakterije)

Lycopene

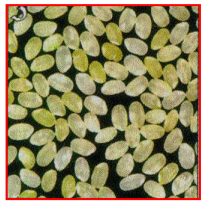
↓ **Lycopene-beta-cyclase** (narcisa)

β -carotene
(vitamin A precursor)

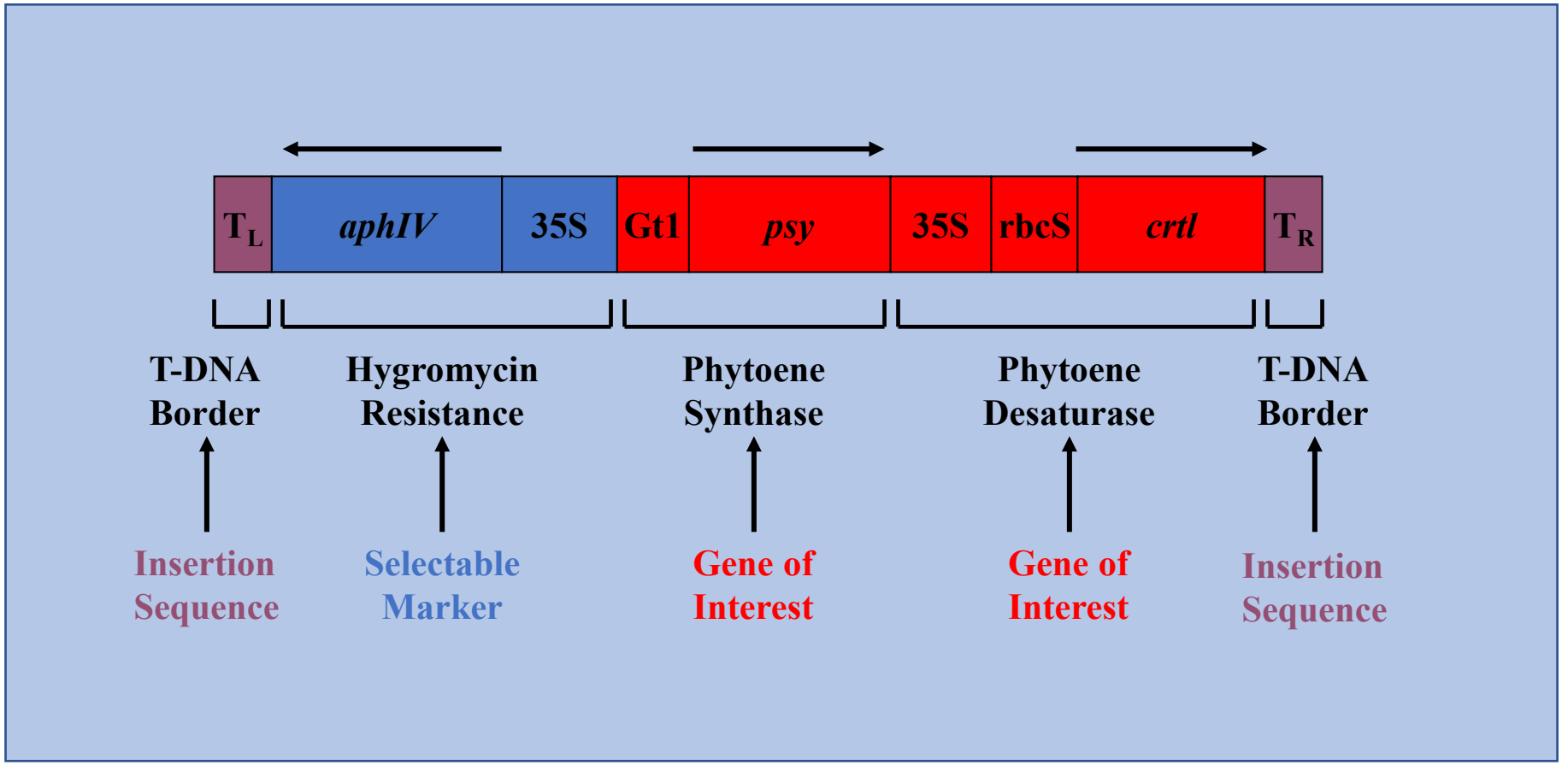
sinteza vitamina A

Odgovarajući promotori

Golden Rice



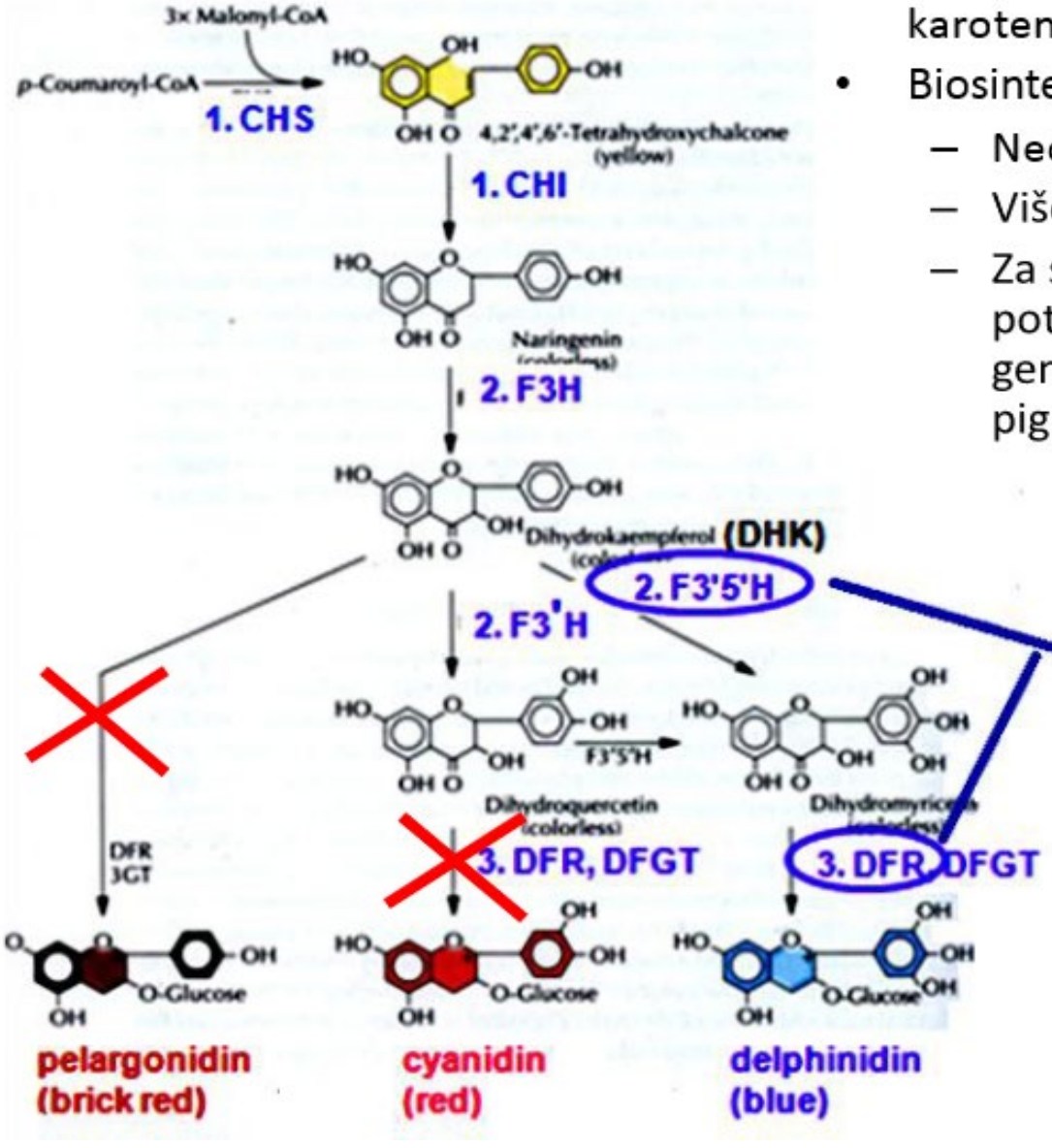
pB19hpc (jedna ekspresijska kazeta za dobivanje zlatne riže)



Plava ruža

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

X utišani geni
O uvedena ekspresija gena





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
- Utišavanje 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 (rezanje ili gnječenje)

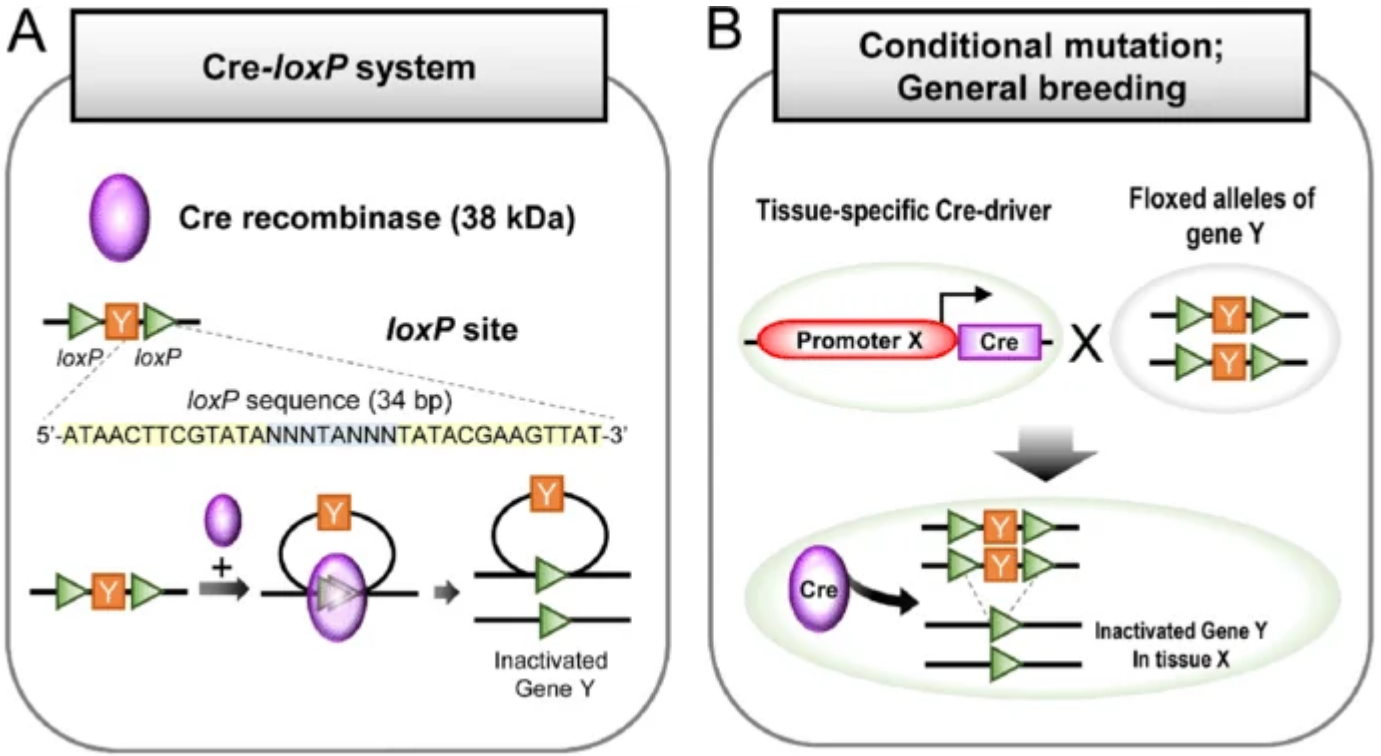
doi.org/10.1038/551149a

Ekološki rizici GMO biljaka

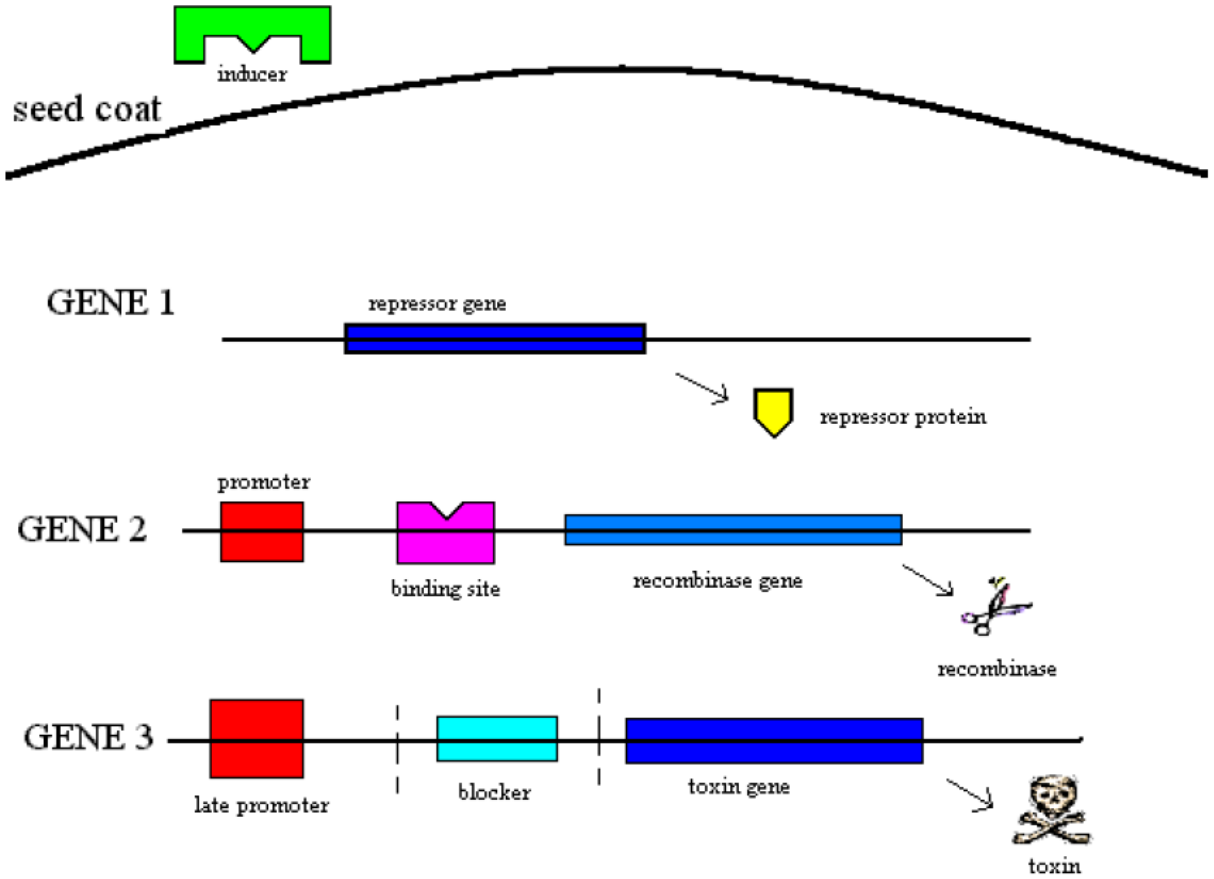
- Prekomjerno unošenje gena za rezistenciju na antibiotike i herbicide u okoliš
  - u slučaju prijenosa na organizme iz okoline mogli bi nastati super rezistentni, infektivni mikroorganizmi i/ili super rezistentni korov
- Uništavanje rijetkih i korisnih vrsta kukaca zbog transgenih biljka koje sintetiziraju insekticide
  - Rješenje: Stvaranje biljka otpornih na ograničeni, usko specifičan tip insekata
- Nekontrolirano širenje transgenog peluda i sjemena
  - Rješenje: terminator tehnologija (nevijabilno sjeme) i stvaranje sterilnog polena

Glavne metode uklanjanja selekcijskih markera

- Kotransformacija i genetička segregacija (križanje)
- Sustavi za ciljanu rekombinaciju (npr. Cre/*loxP*)



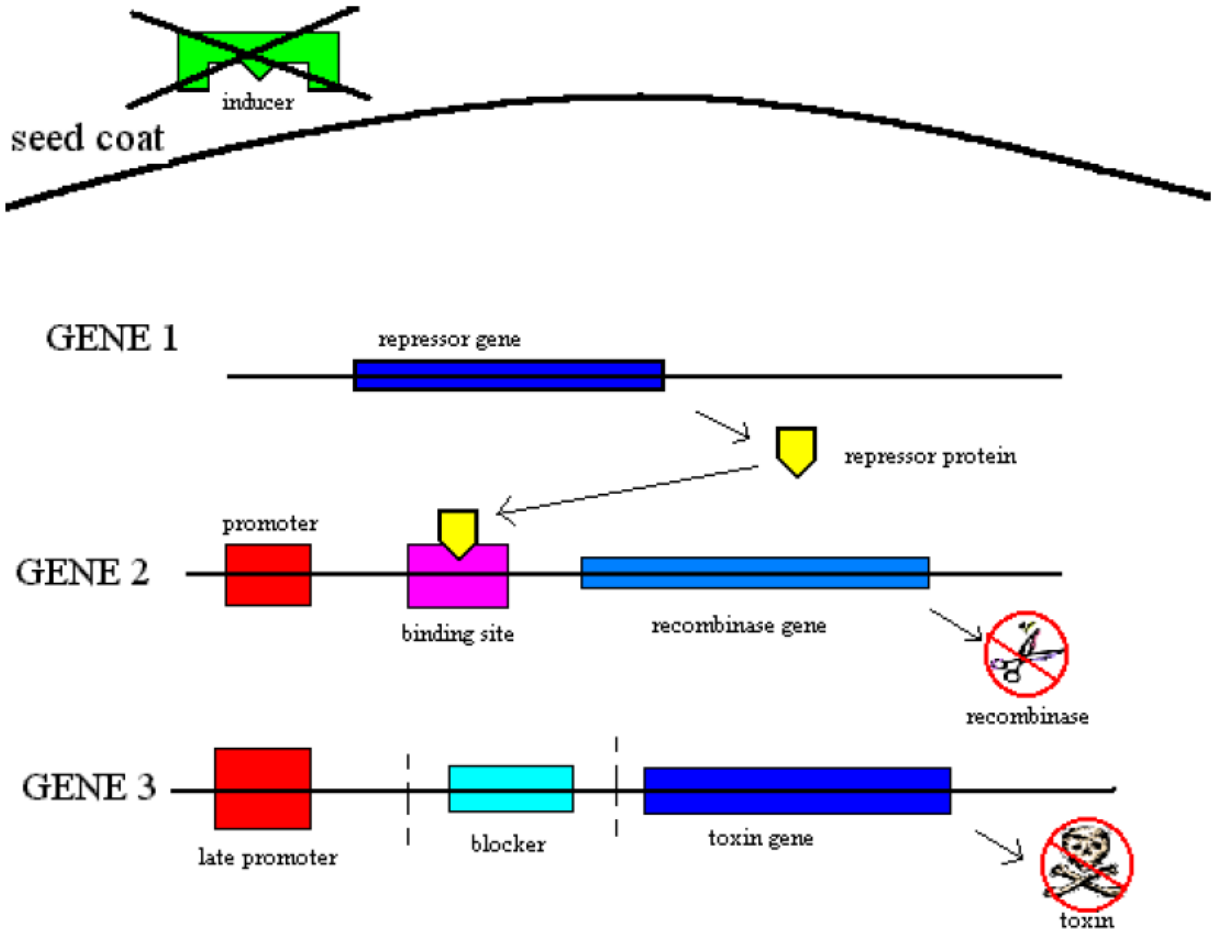
Tehnologija terminatora



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

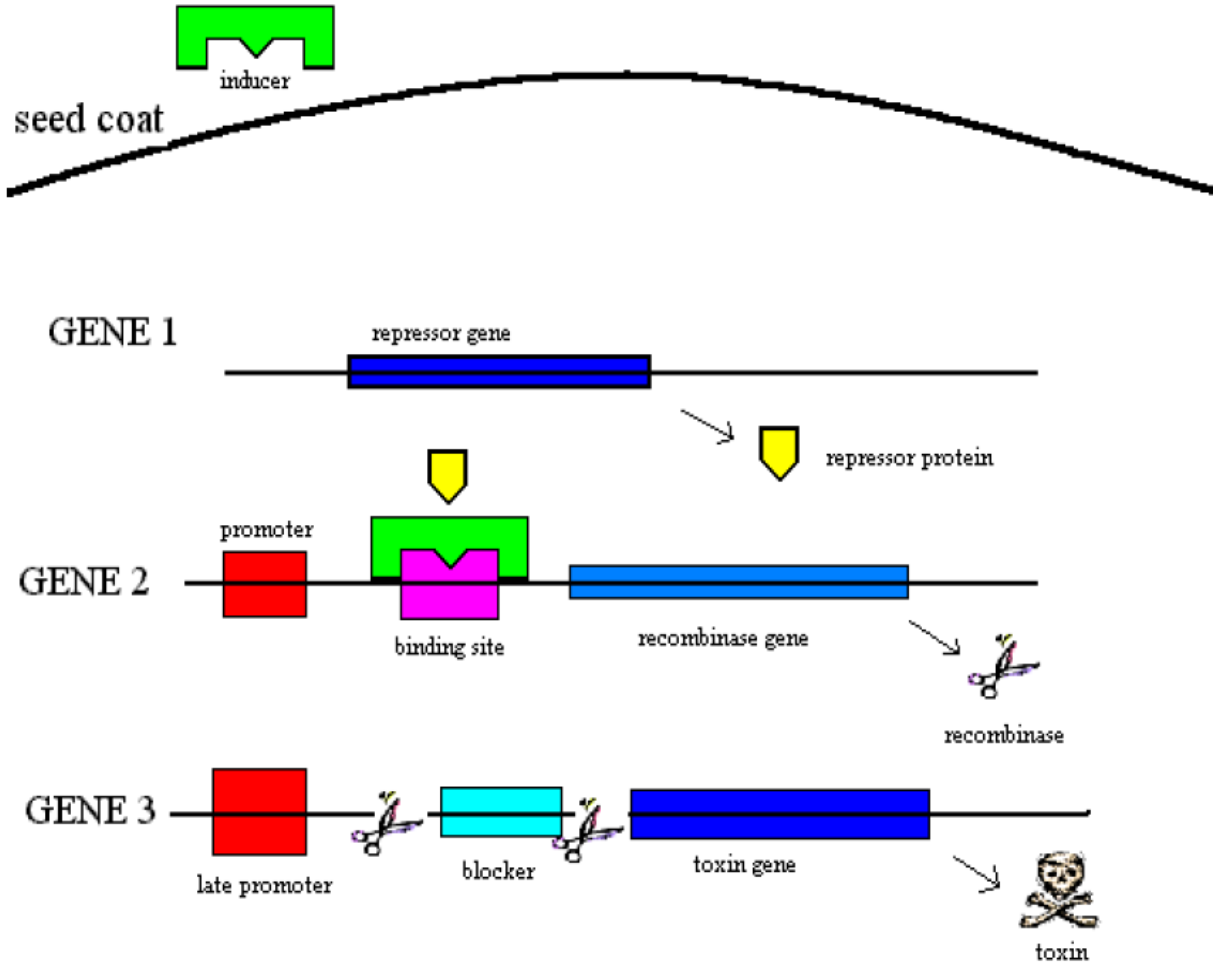
Represor sprečava stvaranje rekombinaze.
Bez rekombinaze nema stvaranja toksina.

Tehnologija terminatora – proizvodnja sjemena



Nema prisutnog induktora – stvara se vijabilno sjeme

Tehnologija terminatora – proizvodnja sjemena



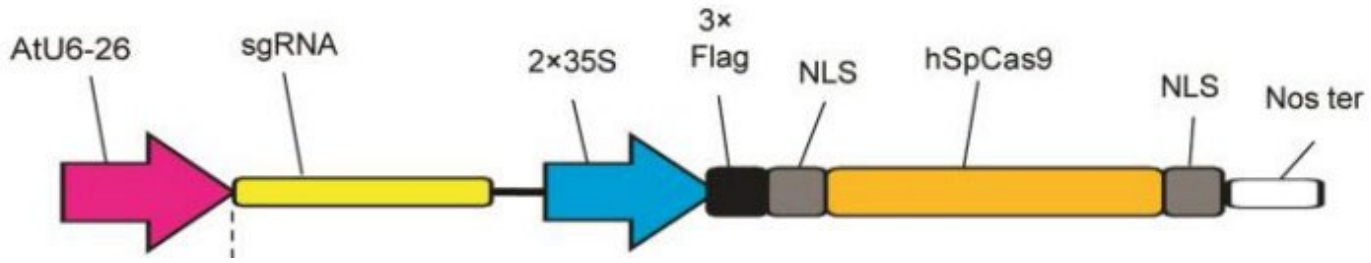
Sjeme se inokulira s induktorom.

Induktor sprečava vezanje represora i omogućava ekspresiju rekombinaze.

Rekombinaza izrezuje bloker iz promotora gena za toksin.

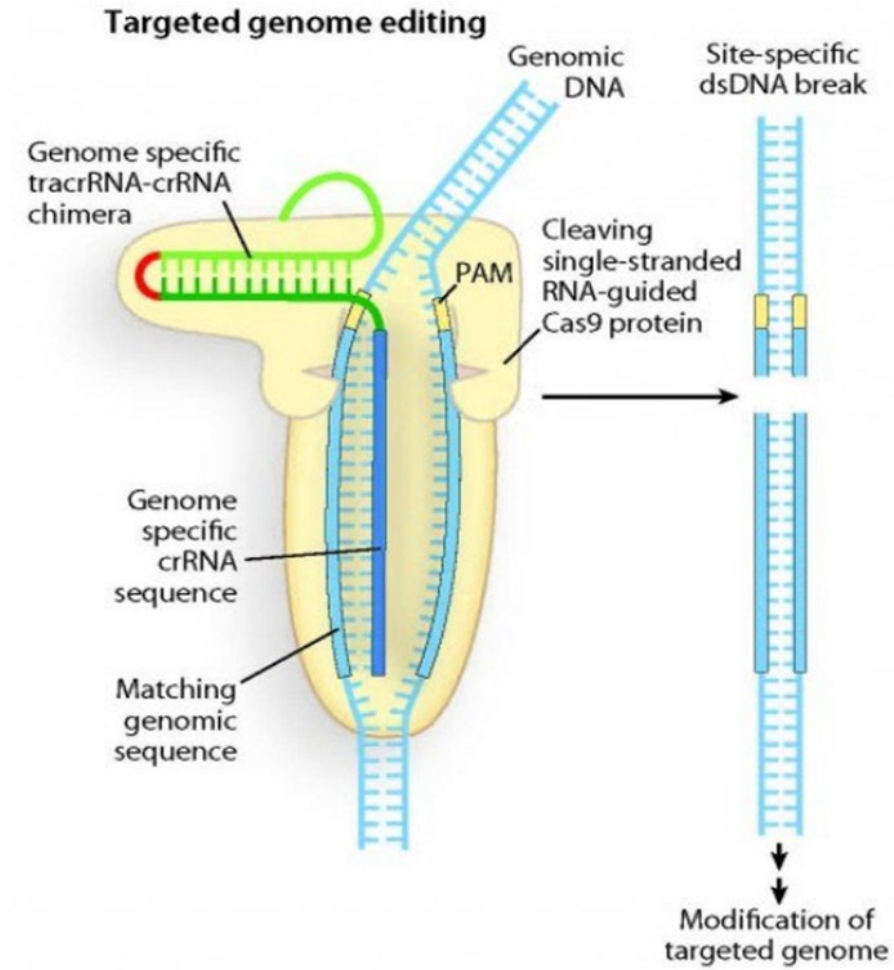
Takva biljka tijekom stvaranja sjemena sintetizira toksin koji sprečava razvoj embrija i dobiva se nevijabilno sjeme.

Nove genomske tehnike
- Editiranje genoma CRISPR/Cas sustavom



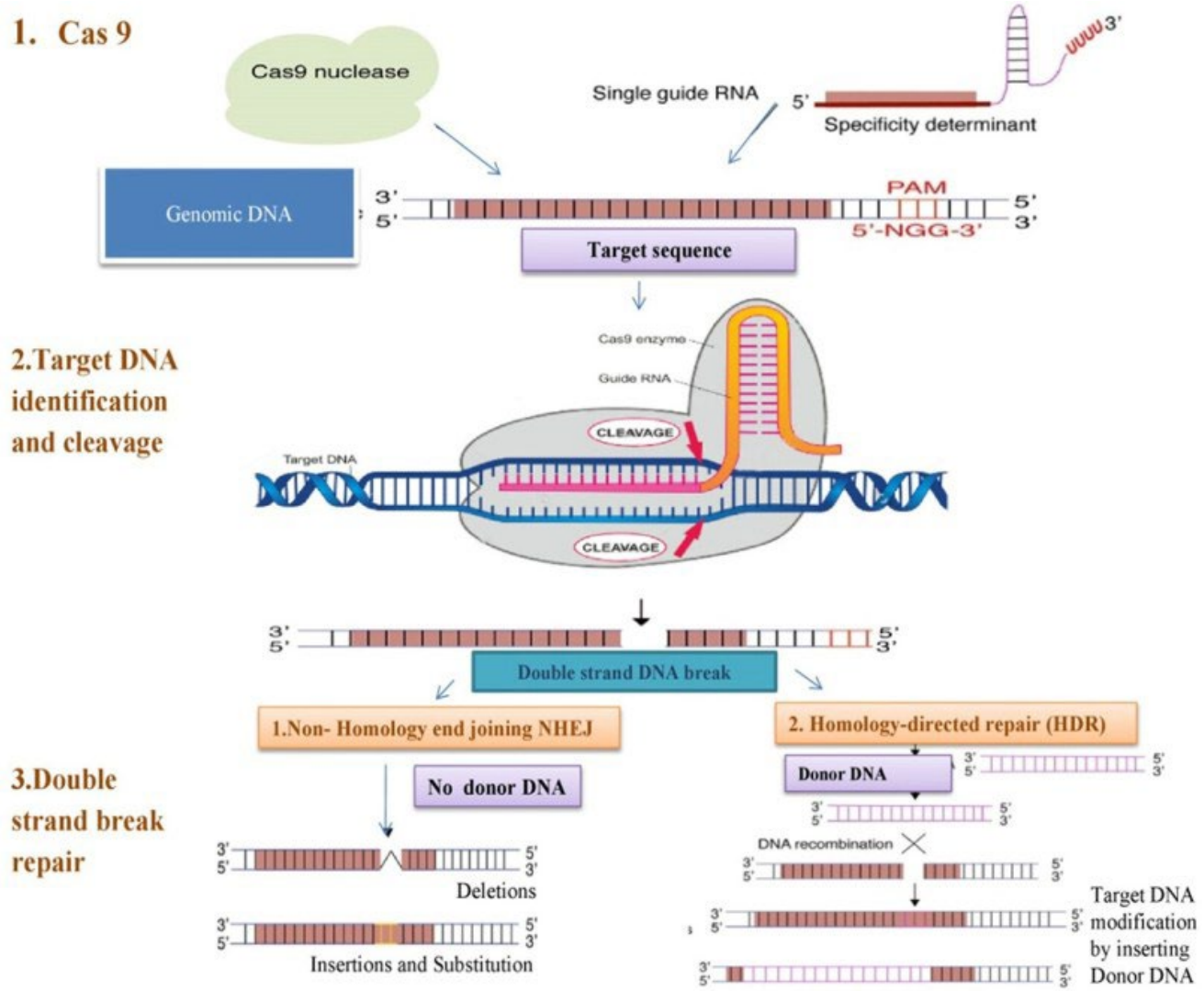
Transgen(T-DNA) za unos u biljne stanice

- 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 popravlja dvolančani lom DNA nasumično pri čemu uvodi mutacije
- Istovremeno moguće ciljati (modificirati) više gena/pozicija u genomu



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

Nove genomske tehnike
- Editiranje genoma CRISPR/Cas sustavom



- CRISPR/Cas sustav se može koristiti i za ciljane modifikacije genoma
- Nakon eliminacije transgena (gena za Cas9 i sgRNA) 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

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 frutiscens	Leaf curl virus	C1/C4 + V1/V2
Cucumis sativus	Mosaic virus	ORF1a, ORF 3a, 3 0UTR
Glycine max	Salt resistance	GmDrb2a and GmDrb2b
Gossypiun herbaceum	Leaf curl Multan virus	Rep + IR
Gossypiun 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	SlMLO
Solanum lycopersicum	Late blight	miR482b and miR482c
Solanum lycopersicum	Gray mould	SlPL

Sainietal. 2023
doi.org/10.1080/21645698.2023.2256930

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!

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 varije
- **Uniforman** (ima stabilne karakteristike u različitim uvjetima),
- **Stabilan** (karakteristike se moraju održati tijekom vremena i generacija).

Dobivanje ekskluzivnih prava na proizvodnju, prodaju, korištenje i distribuc 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 ….

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
naplate korištenje nove sorte. Ovaj korak je klj
ugovore s komercijalnim partnerima ili tvrtkam
potrebno navesti jedinstvene karakteristike va
utvrdilo da li sorta ispunjava sve uvjete za zašti

- **Novina** (nikada ranije nije bila poznata ili k
- **Razlikovan** (ima karakteristike koje je razlik
- **Uniforman** (ima stabilne karakteristike u ra
- **Stabilan** (karakteristike se moraju održati t

Dobivanje ekskluzivnih prava na proizvodnju, proizvoda, no biljke se ne mogu patentirati!

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.

ljuje genetski modificiranu
iju, označavanje i sljedivost
osigurava da su GMO sigurno

ka

osne standarde EU-a.

beni proizvodi, već i sastojci ili
moraju biti odobreni.

- **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 ....

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 temperature od +2 do +15 °C i niskog intenziteta osvjetljenja.

čuvanje do 4 godine

ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA *IN VITRO*

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

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

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

Pogodni eksplantati:

- nediferencirane stanice
- embriogene suspenzije
- kalus
- polen
- sjemenke

- somatski embriji
- vršKovi izdanka

ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

Krioprezervacija

POHRANA U DUBOKO POTHLAĐENOM STANJU (u tekućem dušiku, -196°C)

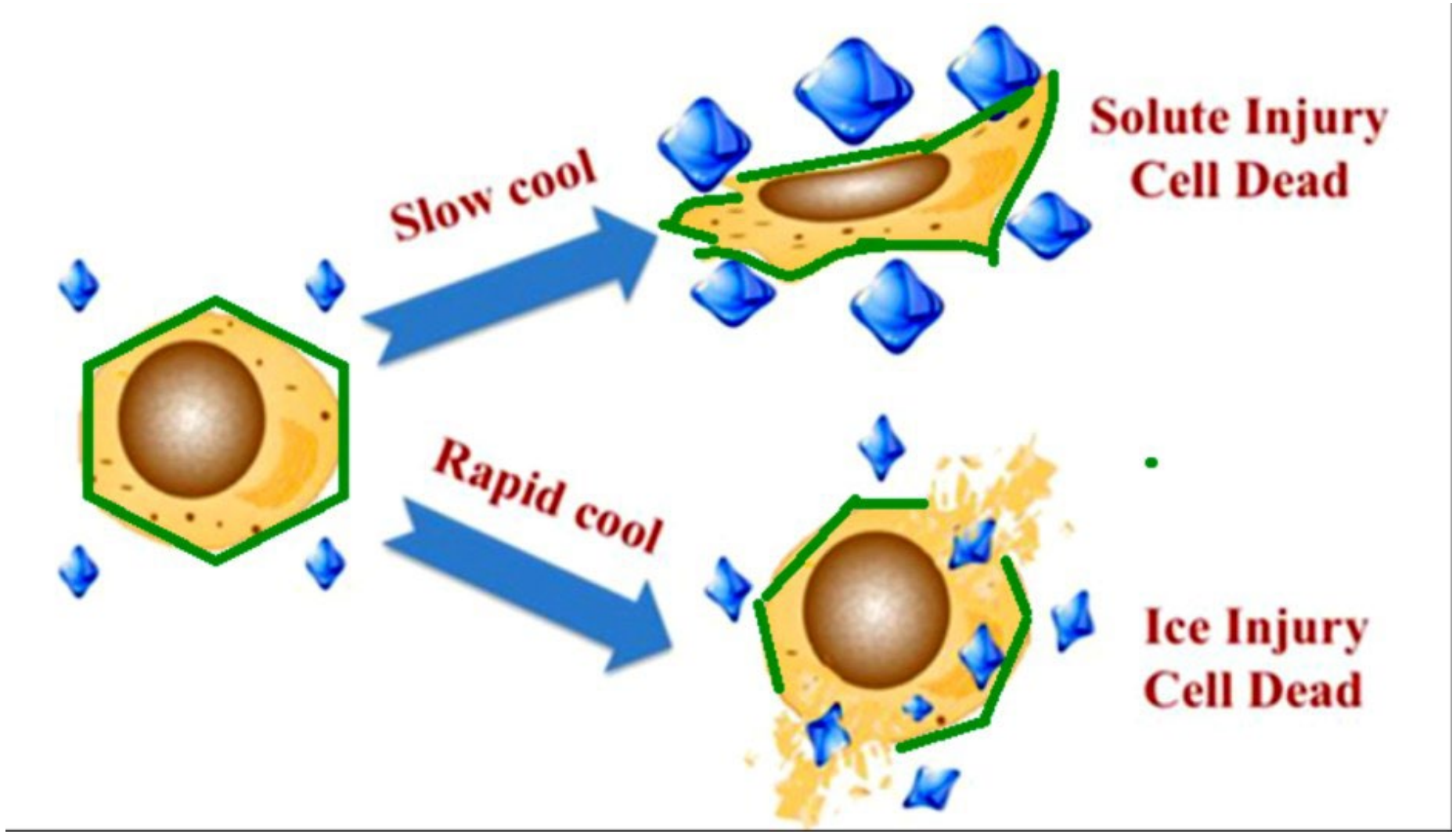
– metaboličko mirovanje

- Predtretman
- Smrzavanje

Čuvanje

- Otapanje
- Regeneracija

Ponovna upotreba


Slow cool
Solute Injury
Cell Dead
Rapid cool
Ice Injury
Cell Dead

ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

Krioprezervacija

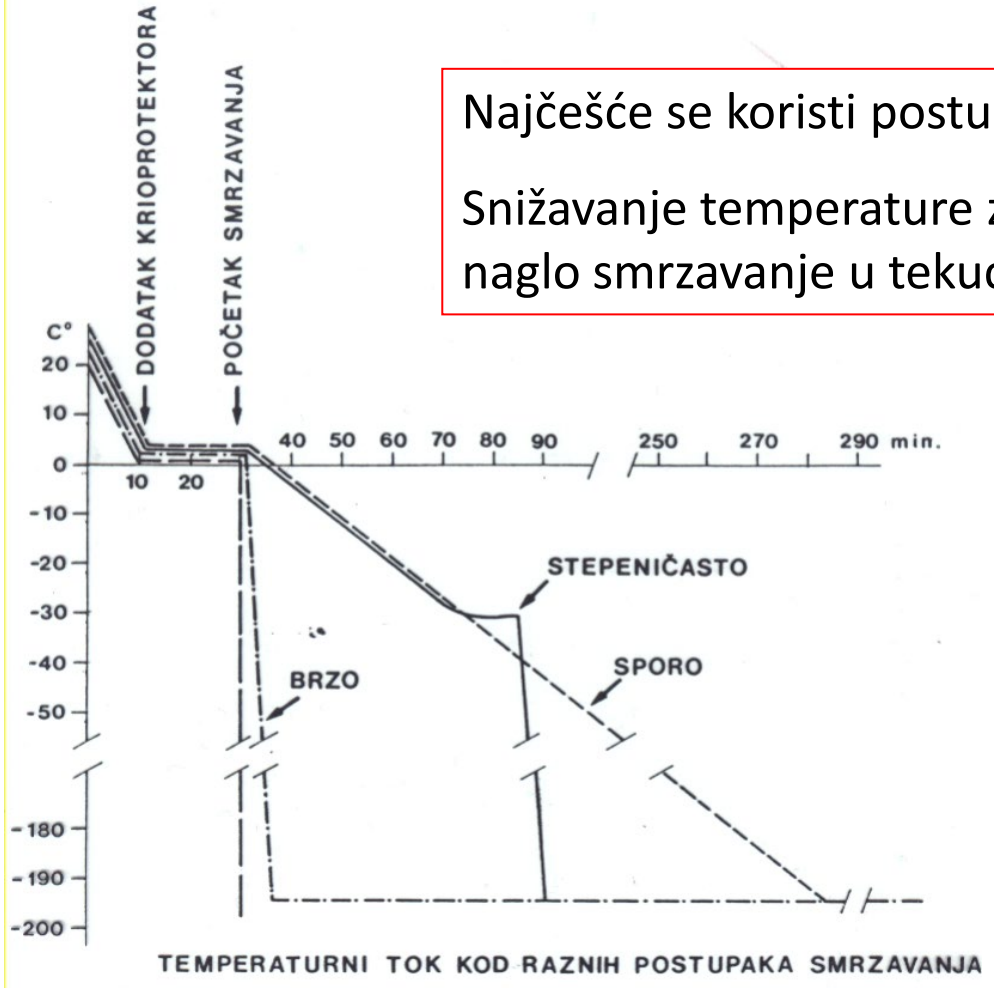
Predtretman

- **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

ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

Krioprezervacija

Smrzavanje



TEMPERATURNI TOK KOD RAZNIH POSTUPAKA SMRZAVANJA

Najčešće se koristi postupno smrzavanje:

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

Pohrana

Smrznuti materijal se u tekućem dušiku može čuvati neograničeno dugo.

ČUVANJE BILJNOG GENOFONDA IN VITRO

Krioprezervacija

Otapanje i regeneracija materijala

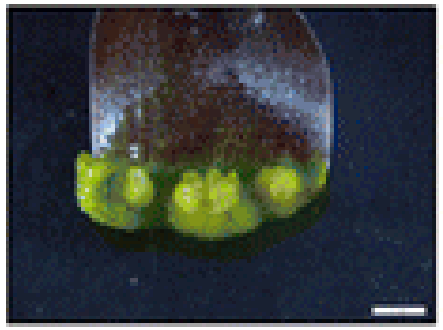
Prema potrebi materijal se otapa.

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

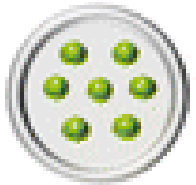
Nakon ispiranja krioprotektora otopljenom materijalu se obnavlja sposobnosti rasta.

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

Initiation of new corms from basal parts of individual scales

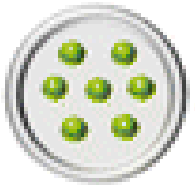


Preconditioning 4°C (14 days)



0.3M sucrose

Extraction of juvenile corms



Preculture



0.3M (1d)
0.7M (1d)

Loading and Dehydration



C4 -> PVS3

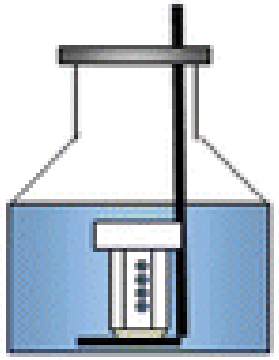
Droplet freezing

Foil





LN Storage



Thawing



40°C
0.8M sucrose
30 sec.

Unloading

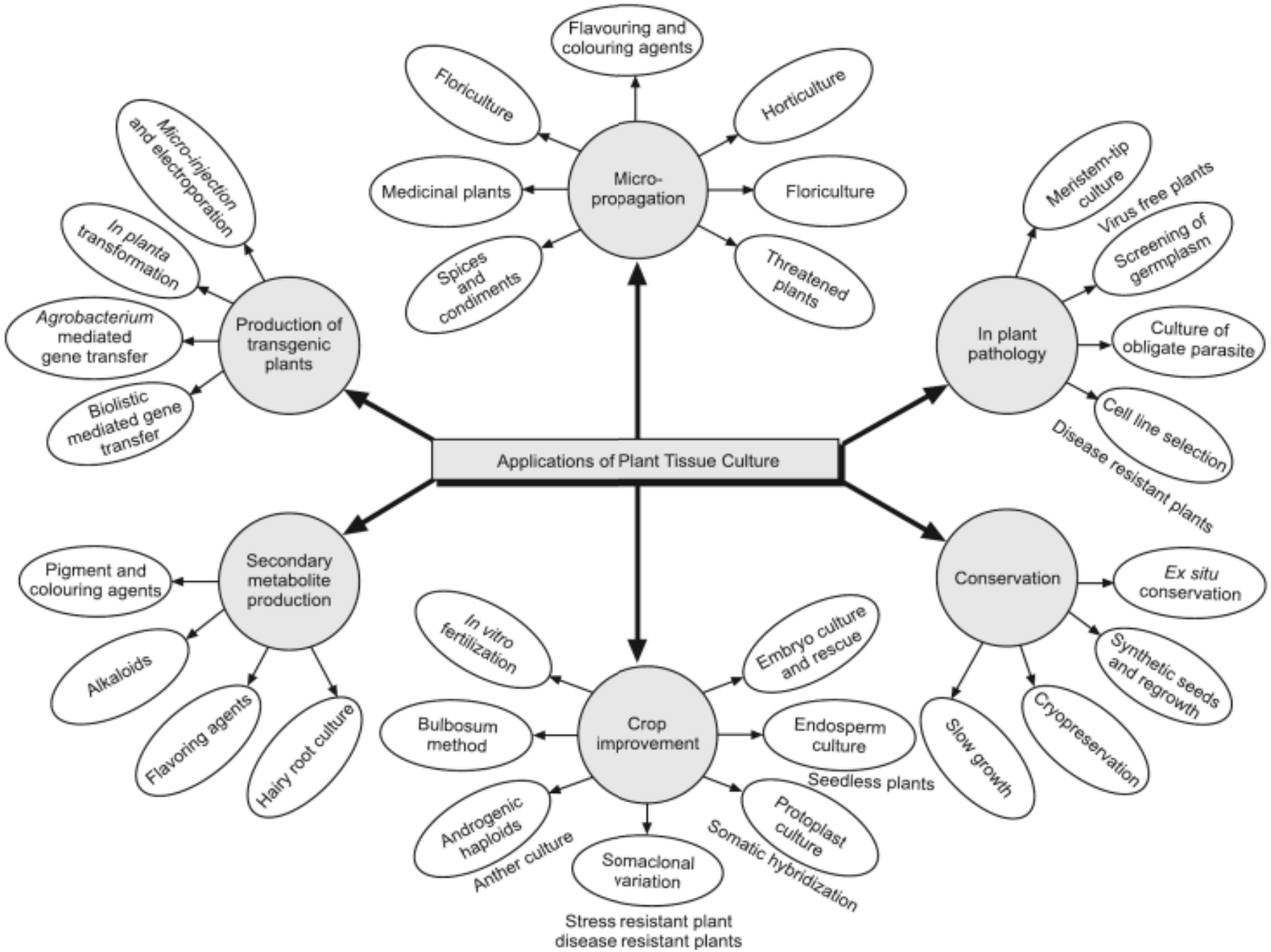


sucrose
(0.8M, 40min)

Recovery



25°C, Dark (5d), then normal conditions


Applications of Plant Tissue Culture
Micro-propagation
Flavouring and colouring agents
Horticulture
Floriculture
Medicinal plants
Floriculture
Spices and condiments
Threatened plants
Production of transgenic plants
Micro-injection and electroporation
In planta transformation
Agrobacterium mediated gene transfer
Biolistic mediated gene transfer
In plant pathology
Meristem-tip culture
Virus free plants
Screening of germplasm
Culture of obligate parasite
Cell line selection
Disease resistant plants
Secondary metabolite production
Pigment and colouring agents
Alkaloids
Flavoring agents
Hairy root culture
Crop improvement
In vitro fertilization
Embryo culture and rescue
Bulbosum method
Endosperm culture
Seedless plants
Androgenic haploids
Anther culture
Somaclonal variation
Protoplast culture
Somatic hybridization
Stress resistant plant
disease resistant plants
Conservation
Ex situ conservation
Synthetic seeds and regrowth
Slow growth
Cryopreservation