Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet Zavod za molekularnu biologiju

Interna skripta Kultura biljnoga tkiva

Prof.dr.sc. Nataša Bauer
Dr. sc. Mateja Jagić

Zagreb, 2026

Sadržaj

VJEŽBA 1: PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA....4
1.1. Hranjive podloge....4
1.1.1. Anorganske soli: makro- i mikroelementi....4
1.1.2. Organske komponente....4
1.2. Sterilizacija hranjivih podloga....6
1.3. Priprema hranjivih podloga....6
1.4. Eksperimentalni rad....8
1.4.1. Priprema hranjive podloge za kulturu torenije....8
1.4.2. Priprema hranjive podloge za kulturu duhana....9
1.4.3. Priprema hranjive podloge za selekciju transgeničnih uročnjaka....11
VJEŽBA 2. ISPITIVANJE STANIČNE VIJABILNOSTI....12
VJEŽBA 3: UMNAŽANJE BILJAKA METODOM ADVENTIVNIH PUPOVA....13
3.1. Rad u sterilnim uvjetima....13
3.2. Umnažanje biljaka metodom adventivnih pupova....13
3.3. Protokol za umnažanje duhana metodom adventivnih pupova:....14
VJEŽBA 4: UMNAŽANJE BILJAKA METODOM NODALNIH SEGMENATA....16
4.1. Umnažanje biljaka metodom nodalnih segmenata....16
4.2. Protokol za umnažanje torenije metodom pojedinačnih nodija....16
VJEŽBA 5: SELEKCIJA TRANSGENIČNIH BILJAKA UROČNJAKA....18
5.1 Sterilizacija biljnog tkiva....18
5.1.1 Sterilizacija sjemenki uročnjaka i nasađivanje sjemenki na selekcijsku hranjivu podlogu....18
5.2. Selekcija homozigotnih transgeničnih linija....19

Sažetak vježbi iz Kulture biljnog tkiva:

1. **termin**

- Priprema hranjivih podloga
- Ispitivanje stanične vijabilnosti

2. **termin**

- Umnažanje biljaka metodom nodalnih segmenata: kultura torenije
- Umnažanje biljaka metodom adventivnih pupova: kultura duhana
- Selekcija transgeničnih biljaka uročnjaka

3. **termin – po dogovoru** (sredinom prosinca)

- Analiza rezultata praktikuma

VJEŽBA 1: PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA

1.1. Hranjive podloge

Postoji veći broj dobro poznatih hranjivih podloga te njihove brojne modifikacije. Kod uspostavljanja nove kulture hranjivu podlogu odabiremo prema literaturi koja sadrži podatke o radu na istoj biljnoj vrsti ili sličnom cilju istraživanja. Potom eksperimentalno ispitujemo nekoliko poznatih podloga uz varijaciju sadržaja dodataka, naročito regulatora rasta. Sve podloge za aseptičke kulture biljnoga tkiva sadrže komponente koje se mogu grupirati u: anorganske soli i organske komponente te prema potrebi, dodatak inertnog materijala koji služi za podržavanje kultura.

1.1.1. Anorganske soli: makro- i mikroelementi

Formula podloge MS (Murashige & Skoog, 1962) koja je bila upotrijebljena za kulturu tkiva duhana primjenjuje se danas za mnoge kulture u svom originalnom ili modificiranom sastavu. Karakteristika te podloge su vrlo visoke koncentracije nitrata, kalija i amonijevih iona. Makroelementi za pripremu hranjivih podloga najčešće se priređuju u 100 puta koncentriranim matičnim („*stock*“) otopinama, svaki element **zasebno**. Željezo je u matičnoj otopini koja je 200 puta koncentrirana, a matična otopina mikroelemenata priređuje se tako da su sve soli otopljene **zajedno** u otopini koja je 1000 puta koncentrirana u odnosu na konačnu koncentraciju u podlozi.

1.1.2. Organske komponente

Glavni sastojci iz ove grupe dodataka su ugljikohidrati, regulatori rasta (hormoni) i vitamini. Dodatak aminokiselina, amida, nekih purina, pirimidina ili organskih kiselina ponekad može pogodno utjecati na rast i razvoj. Većina biljnih kultura je heterotrofna pa se kao izvor energije dodaju ugljikohidrati, najčešće saharoza (2-3%) ili glukoza (posebno za kulture jednosupnica). Inozitol pospješuje transport i metabolizam ugljikohidrata i fosfata, pa ga gotovo uvijek dodajemo u podlogu. Najčešće upotrebljavana koncentracija je 100 mg/L u mediju, no mogu se dodavati i veće koncentracije.

U uvjetima *in vitro* biljke ne mogu sintetizirati dovoljne količine vitamina B1 (tiamin) pa njega uvijek dodajemo u hranjivu podlogu. Ostali vitamini mogu se dodati, jer mogu poticati specifične procese rasta.

Ovisno o tipu kulture koju želimo uspostaviti (kultura korijena, kultura izdanaka, regeneracija kompletne biljke, kultura kalusa, embriogena kultura...) u hranjivu podlogu potrebno je dodati određene regulatore rasta. Eksplantati kojima manipuliramo u kulturi sadrže određene količine (ovisno o tipu i starosti eksplantata) endogenih hormoni, kao i receptora hormona. Stoga na istom mediju različiti eksplantati drugačije regeneriraju. Općenito, auksini potiču rast korijena, a citokinini rast izdanaka no njihova količina i omjer moraju biti usklađeni ovisno o željenom cilju te o vrsti i veličini početnog eksplantata. Poželjna koncentracija auksina kreće se unutar 0,1-10 mg/L, a citokinina od 0,03-30 mg/L. Nekim biljnim kulturama dodaju se giberelini, koji potiču izduživanje. Njihov dodatak podlozi nije neophodan i kultura će rasti bez obzira da li su sadržani u mediju ili nisu. Regulatori rasta (sintetske molekule) i hormoni (prirodni spojevi) se najčešće priređuju u matičnim otopinama koncentracije 1 mg/L. Najčešće nisu topivi u vodi te je pripremi matičnih otopina hormona potrebno posvetiti posebnu pažnju.

Adenin i adenin sulfat često se dodaju u medij jer potiču stvaranje izdanaka *in vitro.* Koncentracije koje se koriste su od 40 do 160 mg/L. Limunska kiselina, askorbinska kiselina, aktivni ugljen i sl. dodaju se da otklone tamnjenje tkiva i podloge izazvano otpuštanjem fenolnih spojeva iz biljnih stanica.

Ponekad se dodaju kompleksni prirodni pripravci kao što su različiti prirodni ekstrakti i sokovi (kokosovo mlijeko, sok lubenice, ekstrakt krumpira i dr.). Oni se preporučuju u slučaju kada svi pokušaji sa sintetskim medijima ostaju bezuspješni. Krute hranjive podloge pripremaju se dodatkom agara (polisaharidni kompleks) ili heteropolisaharida poznatog pod nazivom „gelrite“. Ponekad za podržavanje tkiva na površini podloge koristimo inertne materijale kao što su staklena vuna ili filtar papir.

1.2. Sterilizacija hranjivih podloga

Hranjive podloge najčešće se steriliziraju povišenom temperaturom. Budući da povišena temperatura štetno utječe na sastavnice hranjive podloge (posebno organske dodatke) potrebno je dobro uskladiti temperaturu i vrijeme sterilizacije. Sterilizaciju hranjive podloge najčešće provodimo vrućom vodenom parom na temperaturi od 121 °C, 10 do 20 minuta i pri tlaku od 1,5 bara. Sterilizaciju vrućom vodenom parom pri povišenom tlaku nazivamo **autoklaviranje**. Neke komponente hranjive podloge se djelomično raspadaju tijekom autoklaviranja, dok u nekim slučajevima povišena temperatura dovodi do potpunog raspada molekula (nekih antibiotika, herbicida, vitamina i regulatora rasta), te se za termolabilne sastavnice koristi **hladna filtar sterilizacija**.

Kompletne hranjive podloge ili pojedine sastavnice podloge mogu se sterilizirati filtriranjem kroz filtere pora 0,2 μm (ili iznimno 0,45 μm). Podloge u koje je dodan agar ne mogu se filtar sterilizirati. U slučaju potrebe za filtar sterilizacijom kompletne hranjive podloge, ona se priprema u dvostrukoj koncentraciji (2x otopina svih komponenata), a agar se zasebno otapa u dH_2O (također 2x otopina) i sterilizira autoklaviranjem. Nakon hlađenja na temperaturu od oko 60 °C, otopljeni agar pomiješa se s filtar steriliziranom otopinom hranjive podloge kako bi se priredila filtar sterilizirana hranjiva podloga (1X).

Način sterilizacije hranjive podloge znatno utječe na konačni sastav podloge budući da se komponente hranjive podloge pri povišenoj temperaturi mogu djelomično ili potpuno raspadati, interagirati ili taložiti.

1.3. Priprema hranjivih podloga

Kako bi se pripremila osnovna hranjiva podloga (bez hormona i drugih dodataka) prvo je potrebno pronaći recept koji odgovara biljnoj vrsti i tipu kulture koji želimo uspostaviti te odrediti ukupni volumen podloge koji nam je potreban. Volumen ovisi o tipu posude u kojoj ćemo podlogu pripremati (potreban volumen razlikuje se ukoliko se radi o Petrijevim zdjelicama, epruvetama, tikvicama, četvrtastim Magenta posudama) i količini posuda, odnosno broju kultura koje želimo prirediti.

Hodogram pripreme hranjive podloge (ovisno o tipu podloge moguće su varijacije):

1. U dovoljno veliku čašu ulijte oko četvrtine potrebnog volumena destilirane vode.
2. Prvo dodajte organske dodatke u prahu (npr. šećeri) jer im treba dulje da se otope. U ovom koraku nikako **NE** dodajete agar!
3. Dodajte makro- i mikroelemente, te organske dodatke u otopini.
4. Podesite pH na željenu vrijednost.
5. Dolijte destiliranu vodu do konačnog volumena (i za krute podloge agar)*.
6. Sterilizirajte hranjivu podlogu (vidi poglavlje 1.2).

* Ovaj korak se razlikuje ovisno jel ćete sterilizirati ukupni volumen podloge te ga nakon sterilizacije (najčešće autoklaviranje) razdijeliti u manje posude za uzgoj (Petrijeve zdjelice) ili pak ćete prvo razdijeliti u posude za uzgoj (epruvete, tikvice, Magente) pa tek potom autoklavirati. U slučaju sterilizacije ukupnog volumena, nakon podešavanja pH, dolije se destilirane vode do konačnog volumena te se sav volumen prebaci u bocu, doda se agar i boca se lagano zatvori (čep se ne smije čvrsto zategnuti) te se autoklavira. Nakon autoklaviranja i rashlađivanja medija na oko 60 °C, po potrebi se dodaju filtar sterilizirane termolabilne komponente poput antibiotika (npr. higromicin B) ili herbicida (npr. amonijev glufosinat) i medij se u sterilnim uvjetima (laminar) rastoči u sterilne Petrijeve zdjelice. Ovo je uobičajena procedura prilikom nasađivanja i selekcije sjemenki uročnjaka *Arabidopsis thaliana*.

U slučaju kada prvo trebamo razdijeliti ukupni volumen u posude u kojima ćemo uspostavljati kulturu (epruvete, tikvice, Magente), nakon podešavanja pH, dodajemo agar, potom u potpunosti otopimo agar u mikrovalnoj pećnici, dolijemo destilirane vode do konačnog volumena, dobro promiješamo te prelijemo određeni volumen u pripremljene posude. Posude zatvorimo (epruvete i tikvice zatvaramo vatom i aluminijskom folijom, a posude tipa Magenta imaju svoje poklopce) i autoklaviramo. Nakon autoklaviranja i hlađenja, podloge su spremne za upotrebu.

1.4. Eksperimentalni rad

1.4.1. Priprema hranjive podloge za kulturu torenije

Pripremite 500 mL MS podloge. U čašu od 500 ml natočite oko 300 ml destilirane vode, i prema **Tablici 1** dodajte potrebne volumene i mase (makro- i mikroelemente te organske dodatke, osim agara). Podesite pH na 5,7-5,9. Dodajte agar, rastopite agar postupnim zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Nadopunite destiliranom vodom do potrebnog volumena, dobro izmiješajte i rastočite u široke epruvete (2 epruvete po studentu; po 20 mL). Epruvete zatvorite vatenim čepovima i sterilizirajte autoklaviranjem 10 min na 121°C.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge MS za kulturu torenije *Torenia fournieri* Lind.

komponenta medija	koncentracija matične otopine	načna koncentracija u mediju (mg/L)
MAKROELEMENTI		
KNO_3	100 X	1900
NH_4NO_3	100 X	1650
$CaCl_2$ x H_2O	100 X	755
KH_2PO_4	100 X	170
$MgSO_4$ x 7 H_2O	100 X	370
MIKROELEMENTI		
H_3BO_3	1000 X	6,2
$CoCl_2$ x 6 H_2O		0,025
KI		0,83
Na_2MoO_4 x 2 H_2O		0,25
$CuSO_4$ x 5 H_2O		0,025
$MnSO_4$ x 4 H_2O		16,9
$ZnSO_4$ x 7 H_2O		8,6
$FeSO_4$ x 7 H_2O	200 X	27,8
Na_2EDTA		37,3
ORGANSKI DODACI		
glukoza	-	30 000
m-inozitol	-	100
hidrolizat kazeina	-	1000
nikotinska kiselina	1 mg/mL	0,5
piridoksin-HCl	1 mg/mL	0,5
tiamin-HCl	1 mg/mL	0,1
glicin	1 mg/mL	2
IBA	1 mg/mL	1
agar	-	9000

1.4.2. Priprema hranjive podloge za kulturu duhana

Priprema se 1250 mL osnovne hranjive podloge (bez hormona). U čašu od 2000 mL natočite oko 500 mL destilirane vode, i prema **Tablici 2** dodajte makro- i mikroelemente, saharozu te organske dodatke (osim agara). Dodajte destiliranu vodu do konačnog volumena, promiješajte i medij razdijelite u 5 Erlenmeyer tikvica po 250 mL, označenih slovima A-E i prema **Tablici 3** dodajte odgovarajuće hormone u svaki medij. Podesite pH svakog medija na 5,8-6,0. Dodajte agar i rastopite ga zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Medij rastočite u široke epruvete (1 epruveta **svakog** medija po studentu; 20 mL po epruveti) i epruvete zatvorite vatenim čepovima. Označite epruvete s pojedinim medijem. Sterilizirajte hranjive podloge autoklaviranjem 10 min na 121°C.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge MS za kulturu duhana *Nicotiana tabacum* L.

komponenta medija	koncentracija matične otopine	načna koncentracija u mediju (mg/L)
MAKROELEMENTI		
KNO_3	100 X	1900
NH_4NO_3	100 X	1650
$CaCl_2$ x H_2O	100 X	755
KH_2PO_4	100 X	170
$MgSO_4$ x 7 H_2O	100 X	370
MIKROELEMENTI		
H_3BO_3	1000 X	6,2
$CoCl_2$ x 6 H_2O		0,025
KI		0,83
Na_2MoO_4 x 2 H_2O		0,25
$CuSO_4$ x 5 H_2O		0,025
$MnSO_4$ x 4 H_2O		16,9
$ZnSO_4$ x 7 H_2O		8,6
$FeSO_4$ x 7 H_2O	200 X	27,8
Na_2EDTA		37,3
ORGANSKI DODACI		
saharoza	-	30 000
m-inozitol	-	100
nikotinska kiselina	1 mg/mL	0,5
piridoksin-HCl	1 mg/mL	0,5
tiamin-HCl	1 mg/mL	2
glicin	1 mg/mL	2
folna kiselina	1 mg/mL	0,5
Ca-pantotenat	1 mg/mL	0,5
glutamin	-	1
biotin	1 mg/mL	0,25
agar	-	8000

Tablica 3. Sadržaj hormona indol-3-octene kiseline (IAA) i kinetina (Kt) u hranjivim podlogama za kulturu duhana. Koncentracija matičnih otopina svih hormona je 1 mg/mL.

Podloga	IAA (konačna koncentracija)	Kt (konačna koncentracija)
A	3 mg/L	0,2 mg/L
B	3 mg/L	0,02 mg/L
C	0,03 mg/L	0,5 mg/L
D	-	0,2 mg/L
E	-	-

Napomena: regulatori rasta se najčešće otapaju u NaOH i značajno mijenjaju pH podloge, pa zbog toga treba podešavati pH tek kad se dodaju regulatori rasta!
Za one komponente koje ne mijenjaju pH dodavanje može ići i nakon podešenog pH (npr. dodatak GLA ili kanamicina, ili higromicina, u podlogu), ili se dodaje pufer (najčešće MES) kako pH ne bi varirao.

1.4.3. Priprema hranjive podloge za selekciju transgeničnih uročnjaka

Priprema se 250 mL osnovne hranjive podloge (bez hormona) prema **Tablici 4.** U čašu od 500 ml natočite oko 100 ml destilirane vode, dodajte makro- i mikroelemente, te organske dodatke (osim agara). Podesite pH na 5,8. Podesite volumen i priređeni medij pretočite bocu, te dodajte agar. Čep na boci samo labavo zavinite (da ne bi došlo do eksplozije boce u autoklavu). Autoklavirajte 10 minuta na 121°C. Nakon autoklaviranja i rashlađivanja medija na oko 60 °C dodajte filtar herbicid GLA i medij rastočite u sterilnim uvjetima (laminar) u sterilne Petrijeve zdjelice.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge MS za za selekciju transgeničnih biljaka uročnjaka *Arabidopsis thaliana* L.

komponenta medija	koncentracija matične otopine	konačna koncentracija u mediju (mg/L)
MAKROELEMENTI		
KNO_3	100 X	1900
NH_4NO_3	100 X	1650
$CaCl_2$ x H_2O	100 X	755
KH_2PO_4	100 X	170
$MgSO_4$ x 7 H_2O	100 X	370
MIKROELEMENTI		
H_3BO_3	1000 X	6,2
$CoCl_2$ x 6 H_2O		0,025
KI		0,83
Na_2MoO_4 x 2 H_2O		0,25
$CuSO_4$ x 5 H_2O		0,025
$MnSO_4$ x 4 H_2O		16,9
$ZnSO_4$ x 7 H_2O		8,6
$FeSO_4$ x 7 H_2O	200 X	27,8
Na_2EDTA		37,3
ORGANSKI DODACI		
m-inozitol	-	100
nikotinska kiselina	1 mg/mL	0,5
piridoksin-HCl	1 mg/mL	0,5
tiamin-HCl	1 mg/mL	1
glicin	1 mg/mL	2
agar	-	8000
GLA	30 mg/mL	30 µg/mL

VJEŽBA 2. ISPITIVANJE STANIČNE VIJABILNOSTI

Vijabilnost biljnih stanica može se ispitati korištenjem različitih fluorescencijskih boja. Često korištene boje su fluorescein diacetat (FDA) i propidij jodid (PI).

FDA ulazi u stanice, a u živim stanicama enzimi konvertiraju FDA u flourescein. FDA je neobojana molekula koja ne fluorescira, a fluorescein obasjan plavom svjetlošću fluoresceira zeleno. Budući da samo žive stanice posjeduju aktivne esteraze koje mogu metabolizirati FDA, zelena fluorescencija unutar stanice koristi se kao indikator vijabilnih stanica.

PI je boja koja se interkalira u DNA mrtvih stanica budući da ne može proći kroz stanične membrane živih stanica, a fluorescira crveno nakon obasjavanja zelenom svjetlošću. Dodatno, PI se u biljnoj biologiji, osim za detekciju mrtvih stanica koristi i za vizualizaciju staničnih stijenki.

Vijabilnost stanica tretiranih fluorescentnim bojama može se odrediti epi-fluorescencijskom mikroskopijom.

2.1. Protokol

Otopina FDA priprema se otapanjem 1 mg praha FDA u 1 mL acetona. Otopina PI priprema se otapanjem 1 mg praha PI u 1 mL destilirane vode.

Pripremite radnu otopinu dodatkom 10 µL matične otopine FDA (1 mg/mL) i/ili 10 µL matične otopine PI u 1 mL stanične suspenzije dobivene iz embriogenog kalusa bundeve. Nakapajte stanice na predmetno stakalce, pokrijte pokrovnicom i promatrajte stanice pod epi-fluorescencijskim mikroskopom te im odredite vijabilnost.

VJEŽBA 3: UMNAŽANJE BILJAKA METODOM ADVENTIVNIH PUPOVA

3.1. Rad u sterilnim uvjetima

Za uspješnost kulture tkiva potrebno je osigurati sterilne uvjete. Suđe koje koristimo za *in vitro* manipulacije sterilizira se suhom sterilizacijom (u sušioniku, na 150-200 °C) ili autoklaviranjem. Sve se više upotrebljava plastično suđe koje se sterilizira γ-zračenjem. Metalni pribor za usitnjavanje i manipuliranje biljnim materijalom steriliziramo „flambiranjem“, tako da pribor uranjamo u 96%-tni etanol i spaljujemo. Sve manipulacije sa sterilnim biljnim materijalom provode se u komori sa horizontalnim propuhivanjem sterilnog zraka, tzv. laminaru. Prije početka i u tijeku rada, radnu površinu potrebno je prebrisati vatom natopljenom 70%-tnim etanolom. U većini slučajeva izvor kontaminacije kultura je sam manipulator. Najčešće se biljne kulture zagađuju zbog pričanja u laminaru, diranja tkiva rukama, iznošenja tkiva izvan sterilnog prostora, te zbog izvođenja nepotrebnih kretnji te prljave odjeće i kose manipulatora.

3.2. Umnažanje biljaka metodom adventivnih pupova

Rast i morfogeneza *in vitro* ovise o međudjelovanju prirodnih (endogenih) regulatora rasta u tkivu i onih dodanih (egzogenih) u hranjivu podlogu, te o kapacitetu stanice da reagira na hormon (eng. *cell signaling*). Biljke mogu stvarati adventivne organe, odnosno imaju sposobnost stvaranja začetaka organa na neuobičajenim mjestima. Tako na primjer iz listova mogu izrasti izdanci, ili iz internodalnih segmenata stabljike može nastati korijenje. Razvoj adventivnih organa moguće je potaknuti u uvjetima *in vitro*, a kontroliran je sastavom hranjive podloge i uvjetima kultiviranja.

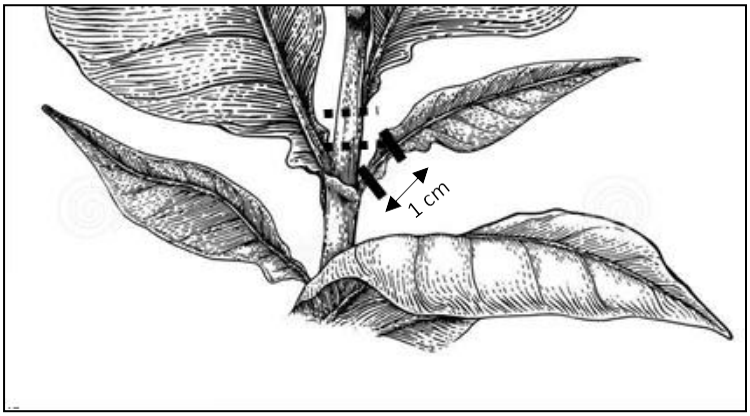
Uobičajeno dodatak citokinina potiče razvoj izdanaka, a dodatak auksina razvoj korijenja. Vrsta, količina i omjer regulatora rasta koje je potrebno dodati u hranjivu podlogu, da bi se rast usmjerio u željenom pravcu, ovisni su o biljnoj vrsti (sorti, jedinki), tipu i starosti eksplantata koji se uzima te o sastavu ostalih sastojaka u hranjivoj podlozi. Regeneracija adventivnih organa može biti neposredna (kada izdanci i/ili korijenje izrasta direktno iz eksplantiranog tkiva) ili posredna (kada se na eksplantiranom tkivu najprije razvija kalus, a zatim iz njega izrastaju adventivni organi).

Tkivo regenerirano metodom adventivnih pupova, zbog somaklonske varijabilnosti, ne mora nužno biti genetički identično tkivu na kojem je potaknuto. Metoda adventivnih pupova, ako je učinkovita, se koristi za mikropropagaciju ali i za dobivanje novih varijeteta biljaka. Ukoliko imamo uspostavljen učinkovit postupak regeneracije adventivnih izdanaka ovu metodu možemo koristiti za regeneraciju transgeničnih biljaka (unos transgena agrobakterijama ili metodom biolistic, a potom regeneracija biljaka iz transformiranih stanica) ili za namjerno uvođenje mutacija u svrhu dobivanja biljaka s promijenjenim svojstvima (otpornost na slanost, sušu, promjena fenotipa itd.).

Zadatak: Utvrditi učinak regulatora rasta na kontrolu morfogeneze u kulturi duhana *Nicotiana tabacum* L.

3.3. Protokol za umnažanje duhana metodom adventivnih pupova:

1. Sterilnom pincetom pomaknite sterilne papire što više unutar laminara, kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije.
2. Uklonite vateni čep i provlačenjem kroz plamen sterilizirajte otvor epruvete.
3. Sterilnom pincetom izvadite čitavu biljku i položite je na sterilne papire.
4. Pincetom odvojite sve listove od stabljike, pazeći da se pritom ne oštete peteljke listova.
5. Sterilnim skalpelom izrežite **peteljke listova**, okvirne veličine 0,5 – 1 cm (crtež dolje; ravne linije). Pazite da ne spalite tkivo vrućim priborom. Na taj način pripremite pet eksplantata peteljke (za pet tipova medija pripremljenih u prvoj vježbi).



6. Sterilnim skalpelom izrežite **internodalne segmente stabljike**, okvirne veličine 0,5 cm (crtež; isprekidane linije). Pazite da ne spalite tkivo vrućim priborom. Na taj

način pripremite pet eksplantata. *Neke biljke duhana imaju vrlo kratke stabljike čiji su nodiji položeni vrlo blizu, zbog čega nije moguće izrezati internodalne segmente. Ukoliko dobijete takvu biljku, iskoristite njene peteljke, a za internodalne odsječke uzmite drugu biljku. Izbjegavajte dijelove stabljike iz kojih raste korijenje.*

Sljedeći postupak vrijedi za svih 5 tipova medija (epruvete označene slovima A – E):

7. S epruvete s pripremljenom hranjivom podlogom skinite foliju i vatu odložite na sterilnu podlogu (najbolje na sterilni komad papira). *Ovu vatu nemojte dodirivati rukama niti bilo kakvim nesterilnim predmetima jer ćete je ponovno koristiti za zatvaranje epruvete.*
8. Provlačenjem epruvete kroz plamen sterilizirajte otvor epruvete.
9. Najdužom sterilnom pincetom na površini medija načinite dva plitka utora.
10. Sterilnom i dobro ohlađenom pincetom horizontalno utisnite jedan eksplantat stabljike i jedan eksplantat peteljke u hranjivu podlogu te označite odgovarajuća mjesta slovima S (stabljika) i P (peteljka) na vanjskoj stijenci epruvete.
11. Provlačenjem epruvete kroz plamen sterilizirajte otvor epruvete.
12. Sterilnom pincetom nataknite vatu u grlo epruvete tako da vrlo malo vate viri van. Spalite vatu i prekrijte komadićem aluminijske folije.
13. Na epruvetu napišite svoje inicijale.
14. Epruvete s nasađenim eksplantatima prebacite na metalne stalke označene papirićima na kojima je navedena vrsta biljke (duhan) i vrsta medija (A – E).

VJEŽBA 4: UMNAŽANJE BILJAKA METODOM NODALNIH SEGMENATA

4.1. Umnažanje biljaka metodom nodalnih segmenata

Pod nazivom kultura pojedinačnog nodija podrazumijevamo izolaciju pupa zajedno s komadićem pripadajuće stabljike radi poticanja razvitka izdanka. Ovo je najprirodnija metoda vegetativnog razmnožavanja biljaka *in vitro* jer se primjenjuje i *in vivo*. Svaki pup koji se nalazi u pazušcu lista, a također i vršni, može se odvojiti od biljke i kultivirati na hranjivoj podlozi radi razvoja izdanka. Pupovi u pazuščima listova novo-formiranog izdanka mogu ponovno biti supkultivirani za razvitak izdanaka iz njih. Postupak se može kontinuirano ponavljati do ostvarivanja željenog broja izdanaka. Paralelno ili naknadno potiče se zakorijenjivanje izdanaka, nakon čega slijedi prijenos u zemlju. Kultura nodalnih segmenata i vegetacijskoga vrška tehnika je koja, načelno, ne traži dodavanje citokinina za prekid apikalne dominacije, no dodatak citokinina u medij za nodalne segmente inducira razvoj višestrukih izdanaka. Kod rozetastih biljaka, kao što su bromelije i gerbere primjenjuje se metoda aksilarnog pupanja, pri čemu se u podlogu dodaju citokinini. Oni poništavaju apikalnu dominaciju i induciraju rast višestrukih pupova iz vegetacijskog vrška/vršnog meristema.

Metoda aksilarnih izdanaka najvažnija je metoda u razmnožavanju biljaka *in vitro* zbog svoje jednostavnosti, visoke stope umnažanja biljaka i genetičke stabilnosti.

4.2. Protokol za umnažanje torenije metodom pojedinačnih nodija



1. Sterilnom pincetom pomaknite sterilne papire što više unutar laminara, kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije.
2. Provlačenjem epruvete kroz plamen sterilizirajte otvor epruvete.
3. Sterilnom pincetom izvadite čitavu biljku i položite je na sterilne papire.
4. Sterilnim i dobro ohlađenim skalpelom izrežite **dio stabljike s bočnim pupom i pripadajućim listićem,** okvirne veličine 1 cm (vidi crtež gore desno). Na taj način pripremite četiri eksplantata.
5. S epruvete s pripremljenom hranjivom podlogom skinite foliju i vatu odložite na sterilnu podlogu (najbolje na sterilni komad papira). *Ovu vatu nemojte dodirivati*

rukama niti bilo kakvim nesterilnim predmetima jer ćete je ponovno koristiti za zatvaranje epruvete.

6. Provlačenjem epruvete kroz plamen sterilizirajte otvor epruvete.
7. Sterilnom i dobro ohlađenom pincetom **vertikalno** (u smjeru kako su rasli) utisnite eksplantate u hranjivu podlogu, po dva eksplantata u jednu epruvetu. *Vrhom epruvete uhvatite bazu eksplantata, utisnite pincetu u podlogu, a zatim lagano razdvojite vrhove pincete i izvucite je van – eksplantat će ostati nasađen u podlogu.*
8. Provlačenjem epruvete kroz plamen sterilizirajte otvor epruvete.
9. Epruvetu zatvorite sterilnom vatom tako da vrlo malo vate viri van. Spalite vatu i prekrijte komadićem aluminijske folije.
10. Na epruvetu napišite svoje inicijale.
11. Epruvete s nasađenim eksplantatima prebacite na metalni stalak s papirićem na kojem piše 'Torenia'.

VJEŽBA 5: SELEKCIJA TRANSGENIČNIH BILJAKA UROČNJAKA

5.1 Sterilizacija biljnog tkiva

Biljke koje se žele uzgajati u uvjetima *in vitro* moraju biti sterilne, tj. oslobođene mikroorganizama. To podrazumijeva oslobađanje biljaka od bakterija, kvasaca i gljivica. Mikroorganizmi mogu rasti i razmnožavati se na površini biljke ili u međustaničnim prostorima. Ako biljno tkivo nije sterilno, mikroorganizmi će se razmnožiti na mediju i onemogućiti daljnji rast biljnoga tkiva zbog kompeticije za hranjive tvari iz medija te inhibicije rasta biljnoga tkiva spojevima koje ispuštaju u hranjivu podlogu.

Postupak sterilizacije biljnog tkiva ovisi o biljnoj vrsti, tipu tkiva koje steriliziramo te o uvjetima u kojima je biljka rasla prije same sterilizacije. Uobičajeni postupak sterilizacije uključuje dobro ispiranje biljnog tkiva vodom, kratko uranjanje u 70% etanol, te u sterilizacijsko sredstvo (natrij-hipoklorit, kalcij-hipoklorit, živin klorid...). Sterilno biljno tkivo se u sterilnim uvjetima laminara dobro ispire sterilnom destiliranom vodom i eksplantira na sterilnu podlogu. Ovim postupkom uklanjaju se mikroorganizmi sa površine biljke.

Transformacija uročnjaka metodom Floral dip podrazumijeva uranjanje cvatova uročnjaka u suspenziju agrobakterija. Agrobakterije prenose T-DNA u biljne stanice i tako ih transformiraju. Ukoliko agrobakterije transformiraju zigotu razvit će se transgenični embrio iz kojeg možemo regenerirati transgeničnu biljku. Nakon transformacije uročnjaka metodom Floral dip u sjemenkama često budu prisutne i agrobakterije koje je, kao i druge mikroorganizme, potrebno ukloniti.

5.1.1 Sterilizacija sjemenki uročnjaka i nasađivanje sjemenki na selekcijsku hranjivu podlogu

Sastav otopine za sterilizaciju

- 1% Izosan G (Pliva)
- 0,1% Mukazol

Pripremite 10 mL sterilizacijske otopine za cijeli turnus. Sterilizacijska otopina priprema se u destiliranoj vodi.

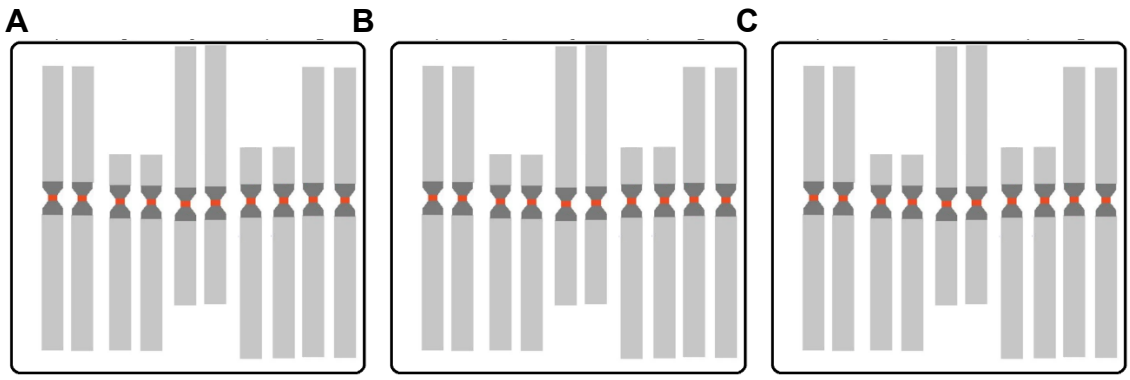
Postupak

1. Sjemenke prebacite u epruvetu od 1,5 mL i dodajte 1 mL 70%-tnog etanola.
2. Inkubirajte 1 min uz lagano protresanje.
3. Izbacite supernatant i dodajte 1 mL sterilizacijske otopine.
4. Inkubirajte 10 min uz konstantno miješanje.
5. Supernatant izbacite pipetiranjem.
6. Isperite sjemenke pet puta s po 1 mL sterilne destilirane vode.
7. Sjemenke ostavite u posljednjoj destiliranoj vodi.
8. Otvorite Petrijevu zdjelicu s pripremljenom podlogom za selekciju transgeničnih biljaka.
9. Pomoću pipete rasporedite 50-tak sjemenki po površini hranjive podloge.
10. Zatvorite Petrijevu zdjelicu i omotajte je parafilmom te na nju napišite što ste nasadili i svoje inicijale.
11. Petrijeve zdjelice s nasađenim sjemenkama prenesite u klima komoru u uvjete dugog dana (24 °C, 16 svjetlo/8 h tama).

5.2. Selekcija homozigotnih transgeničnih linija

Uročnjak je samooplodna diploidna biljka (2n=10), a transformacijom agrobakterijama (metoda Floral dip) iz transformirane zigote razviti će se sjemenka s transgeničnim embrijem. Agrobakterije u biljne stanice prenose T-DNA i ona se u biljni genom ugrađuje nasumično na jedno, dva ili više mjesta. Dvadesetak dana nakon transformacije metodom Floral dip u komuškama će mali dio sjemenki (manje od 1%) biti s transformiranim embrijem. Budući da je transformacija agrobakterijama nasumična, svaki primarni transformant (T1) je zasebna transgenična linija u koju je T-DNA ugrađena na specifičnom mjestu (ili na više mjesta) u genomu. Poželjno je iz primarnih transformanata regenerirati homozigotne biljke koje imaju jednu T-DNA inserciju, jer u suprotnom kroz generacije, nakon samooplodnje, može doći do gubitka transgena (T-DNA). Na T-DNA se nalazi gen za otpornost na glufosinat amonij (GLA) pa će (samo) embriji u čiji je genom ugrađena T-DNA moći rasti na mediju s ovim herbicidom.

Zadatak 1
Skicirajte genotip tri primarna transformanta (T1) uročnjaka s jednom (**A**), dvije (**B**) i tri (**C**) insercije T-DNA.



Zadatak 2
Samooplodnjom biljaka generacije T1 dobiva se sjeme generacije T2. Kojeg će genotipa biti sjeme generacije T2, ukoliko je u genom ugrađena jedna T-DNA (A dio zadatka 1) ili ukoliko su ugrađene dvije T-DNA (B dio zadatka 1)?
Prikažite križanje (samooplodnja).

Na koji način, koristeći samo selekcijsku hranjivu podlogu, možete razlučiti linije T1 s jednom T-DNA insercijom, od linija s dvije ili više insercija?
Koliki postotak sjemena T2 će regenerirati klijance na selekcijskoj podlozi?

Zadatak 3
Koristeći selektivnu hranjivu podlogu i linije s jednom T-DNA insercijom, kako možete utvrditi koje biljke T2 generacije su homozigoti, a koje heterozigoti?