

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
AGRONOMSKI FAKULTET U ČAČKU



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF AGRONOMY ČAČAK

---

---

# **XVII SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI**

sa međunarodnim učešćem  
- ZBORNIK RADOVA -



Vol. 17. (19), 2012.

---

Čačak, 6 - 7. April 2012. godine

**XVII SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI**  
sa međunarodnim učesćem

**- Zbornik radova -**  
Vol. 17. (19), 2011.

**ORGANIZATOR I IZDAVAČ**  
*Agronomski fakultet, Čačak*

**Organizacioni odbor**

Prof. dr Drago Milošević, predsednik, prof. dr Ljiljana Bošković-Rakočević,  
mr Duško Brković, Jelena Kovačić, dipl. inž.

**Programski odbor**

Prof. dr Dragutin Đukić, predsednik, prof. dr Miroslav Spasojević, dr Radoslav Cerović,  
Snežana Pašalić, prof. dr Aleksandar Paunović, prof. dr Tomo Milošević, prof. dr Milica  
Cvijović, prof. dr. Snežana Bogosavljević-Bošković, prof. dr Vladeta Stevović, prof. dr  
Leka Mandić, prof. dr Milena Đurić, prof. dr Gordana Šekularac, prof. dr Nikola Bokan,  
doc. dr Lenka Ribić-Zelenović, doc. dr. Vladimir Kurčubić, doc. dr Mirče Balan, prof. dr  
Slobodan Jevtić, prof. dr Radoš Pavlović,

**Tehnički urednik**

prof. dr Drago Milošević

**Kompjuterska obrada i slog**

Slobodan Bajić

**Tiraž:** 150 primeraka

**Štampa:**

Štampanija „BAJIĆ“ Čačak

M.

Ver

Z. J

Dra

Mil

Bilj

Lau

M. A

Snež

Slad

walle

Vera

S. G

Vida

V. Po

M. Za

Sejett

R. Pa

Angel

Petrić

RAZM



CIP - Каталогизација у публикацији  
Народна библиотека Србије, Београд  
63(082)  
60(082)

САВЕТОВАЊЕ о биотехнологији са међународним  
учешћем (17 ; 2012 : Чачак)

Zbornik radova / XVII savetovanje o  
biotehnologiji sa međunarodnim učešćem,  
Čačak, 6-7. aprila 2012. godine ;  
(organizator) Univerzitet u Kragujevcu,  
Agronomski fakultet u Čačku = (organized by)  
University of Kragujevac, Faculty of  
Agronomy, Čačak, - Čačak : Agronomski  
fakultet, 2012 (Čačak : Bajić). - 545 str. :  
graf. prikazi, tabele ; 24 cm

Radovi na srp.i engl. jeziku. - Tiraž 150. -  
Napomene uz tekst. - Bibliografija uz svaki  
rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-87611-23-8

1. Агрономски факултет (Чачак)  
а) Пољопривреда - Зборници б)  
Биотехнологија - Зборници  
ЦОБИСС.СР-ИД 189995020

## POKUŠAJ *ex vitro* TRANSFORMACIJE *I. walleriana* L. POMOĆU *A. tumefaciens* I *A. rhizogenes*

Snežana Milošević, A. Cingel, Slavica Ninković, Marija Petrić, Milana Trifunović, Slađana Jevremović, Angelina Subotić

**Izvod:** Proučavana je *ex vitro* genetička transformacija *Impatiens walleriana* pomoću *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*, čiji je cilj bio dobijanje kompozitnih biljaka. Inokulisane biljke su lepo rasle i bolje se ožiljavale u odnosu na kontrolne. Uspešnost transformacije utvrđivana je PCR metodom. Iako je broj korenova kod inokuliranih biljaka bio veći, inkorporacija GUS i *pac1* gena u biljni genom nije potvrđena.

**Ključne reči:** *A. rhizogenes* A4M70GUS, *A. tumefaciens* C58C1*pac1*, *ex vitro*, *I. walleriana*

### Uvod

Transformacija biljaka podrazumeva stabilnu inkorporaciju gena od interesa u biljni genom (Slater i sar., 2004). Najčešće upotrebljavan metod indirektno transformacije je pomoću bakterija roda *Agrobacterium* (familija *Rhizobiaceae*), kada se uvodi ciljni gen bez dugog perioda selekcije karakterističnog za konvencionalno gajenje biljaka. Transformacijom su dobijene biljake rezistentne na herbicide (71%), insekte (28%), a samo 1% transformacija predstavljaju modifikacije građe biljaka, boje, mirisa i prolongiranu svežinu rezanih cvetova, rezistentnost na bolesti (virusne, gljivične, bakterijske) kao i otpornost na druge stresove uključujući visoku i nisku temperaturu i sušu (Simonović, 2010).

Od literaturnih podataka o *in vitro* transformacijama biljaka roda *Impatiens* postoji publikacija Milošević i sar. (2009), kojom je potvrđena osetljivost *I. hawkerii* biljaka na bakterije roda *Agrobacterium* (*A. rhizogenes* A4M70GUS i dokazno prisustvo *uidA*, *rolA/B* i *rolC* gena). Transformacija *I. hawkerii* pomoću *A. tumefaciens* C58C1*pac1* je

---

Snežana Milošević (autor za kontakte), Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([snezana@ibiss.bg.ac.rs](mailto:snezana@ibiss.bg.ac.rs))

Aleksandar Cingel, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([cingel@ibiss.bg.ac.rs](mailto:cingel@ibiss.bg.ac.rs))

Slavica Ninković, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([slavica@ibiss.bg.ac.rs](mailto:slavica@ibiss.bg.ac.rs))

Marija Petrić, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([marija.nikolic@ibiss.bg.ac.rs](mailto:marija.nikolic@ibiss.bg.ac.rs))

Milana Trifunović, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([milanag@ibiss.bg.ac.rs](mailto:milanag@ibiss.bg.ac.rs))

Slađana Jevremović, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([sladja@ibiss.bg.ac.rs](mailto:sladja@ibiss.bg.ac.rs))

Angelina Subotić, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, Srbija ([heroina@ibiss.bg.ac.rs](mailto:heroina@ibiss.bg.ac.rs))

za sada nezadovoljna kanamicin (Milošević LBA 4404 koji nosi p sar., 2010). Sistem za uspostavili su Milošević *pac1* konstrukt – odgo je bila niska, pa se zbo

*In vitro* model za Kompozitne biljke se pomoću *A. rhizogenes* razvili *ex vitro* model kulture tkiva čime se p skraćuje na nekoliko r dobijanje transformisanih genskih konstrukata. U biljnih virusa u kulturu metabolita, detoksifika

Za genetičke transformacije *A. rhizogenes* A4M70GUS pRiA4 plazmid. T<sub>R</sub>-DII manopin-sintetazu. Na esencijalni za *hairy root* (Tepfer i Casse-Delb glukuronidazu. U *A. tumefaciens* C58C1*pac1* inokulaciju biljnog tkiva (pri temperaturi 25 ± 2°C resuspendovane u 1/4x (A600).

Za transformaciju u stakleniku, dužine 10 cm natapane sa oko 7 ml su inkubirane na sobnoj temperaturi su kocke natapane MS medijama kamene vune osuše i bile zasićene dejonizovanom vodom.



za sada nezadovoljavajuća usled niske efikasnosti ili preosetljivosti biljaka na kanamicin (Milošević i sar., 2011). Transformacija *I. walleriana* pomoću *A. tumefaciens* LBA 4404 koji nosi plazmid pHB2829 sa nptII i S-GFP genima je bila uspešna (Dan i sar., 2010). Sistem za transformaciju *I. walleriana* pomoću *A. tumefaciens* C58C1pac1 uspostavili su Milošević i sar. (2010) i dobijene su transgene biljke koje nose aktivan pac1 konstrukt – odgovoran za tolerantnost biljaka na viruse. Efikasnost transformacije je bila niska, pa se zbog toga pokušalo sa dobijanjem kompozitnih biljaka.

*In vitro* model za dobijanje kompozitnih biljaka dali su Hansen i sar. (1989). Kompozitne biljke se dobijaju transformacijom apikalnih izdanaka mladih biljaka pomoću *A. rhizogenes*, na kojima se formiraju *hairy roots*. Collier i sar. (2005) su razvili *ex vitro* model i njegova prednost u odnosu na *in vitro* je eliminisanje koraka kulture tkiva čime se period potreban za dobijanje transgenih biljaka sa nekoliko meseci skraćuje na nekoliko nedelja. *Ex vitro* je brz, jednostavan i ekonomičan metod za dobijanje transformisanih biljaka u nesterilnim uslovima uz upotrebu standardnih genskih konstrukata. Takođe, ovaj metod se može koristiti za proizvodnju i čuvanje biljnih virusa u kulturi *hairy roots*, proizvodnju proteina (vakcina) i sekundarnih metabolita, detoksifikaciju životne sredine i fitoremedijaciju (Veena i Taylor, 2007).

#### Materijal i metode rada

Za genetičke transformacije *I. walleriana* korišćeni su bakterijski sojevi: *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* C58C1pac1. *A. rhizogenes* A4M70GUS nosi pRiA4 plazmid. T<sub>R</sub>-DNK sadrži gene koji kodiraju agropin-sintetazu (*aux1* i *aux2*) i munopin-sintetazu. Na T<sub>L</sub>-DNK su ORF 10, 11, 12 i 15 (*rolA*, B, C i D) koji su esencijalni za *hairy root* bolest. Između *rolC* i *rolD* je umetnuta *uidA* (GUS) sekvenca (Tepfer i Casse-Delbart, 1987), koja predstavlja reporterski gen za enzim β-glukuronidazu. U *A. tumefaciens* C58C1 ubačen je plazmid pKT-Lpac1 sa dve genske kasete: *pac* gen vođen sa 35S promotorom i *nptII* gen za neomicin fosfotransferazu II (NPT II) vođen sa nopalina sintetaza promotorom (Toguri i sar., 2003). *Pac1* transgeni sistem dizajniran je za proizvodnju biljaka rezistentnih na biljne RNK viruse, obzirom da se njihova replikacija dešava preko dsRNK intermedijera koji mogu biti meta *pac1* enzima. *A. rhizogenes* A4M70GUS gajen je na čvrstoj *Yeast Extract Broth* (YEB) hranljivoj podlozi, uz dodavanje neomicina u koncentraciji od 100 mg l<sup>-1</sup>, a *A. tumefaciens* C58C1pac1 na *Luria-Bertani* (LB) podlozi sa 100 mg l<sup>-1</sup> kanamicina. Za inkulaciju biljnog tkiva korišćene su bakterije gajene na adekvatnim tečnim podlogama (pri temperaturi 25 ± 2° C, na šejkeru, preko noći), centrifugirane na 3000 g 10 min i resuspendovane u 1/4x MS (Murashige and Skoog) podlozi do optičke gustine ~ 0,3 (A600).

Za transformaciju su korišćeni apikalni odsecci izdanaka *I. walleriana* gajenih u stakleniku, dužine 10 cm, koji su zabadani u Fibrgro<sup>®</sup> kocke (Slika 1a), kocke su natapane sa oko 7 ml smeše bakterijskih suspenzija, poklapane staklenim posudama i inkubirane na sobnoj temperaturi preko noći. Kao kontrola korišćeni su izdanci kojima su kocke natapane MS podlogom bez bakterija. Potom je vršeno otklapanje da se kocke kamene vune osuše i biljni materijal počne da vene (Slika 1b), a nakon toga su kocke bile zasićene dejonizovanom vodom i ponovo poklapane (Slika 1c). Kompozitne biljke

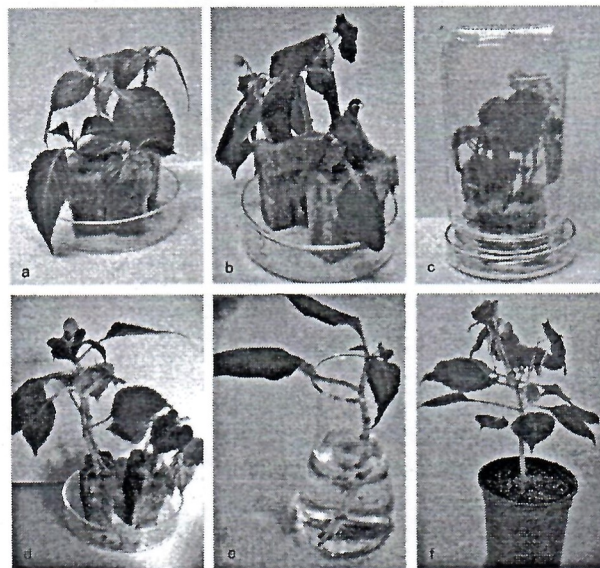


su gajene u klimatizovanoj prostoriji, pri temperaturi  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  i pri fotoperiodu 16 h svetla. Kada je uočen razvoj korenova (Slika 1d) Fibrgro materijal je uklonjen i biljke su zasađene u supstrat i gajene u stakleniku.

Ukupna genomska DNK iz listova i korenova izolovana je po metodi Zhou i sar. (1994) i kvantifikovana na spektrofotometru (Agilent 8453). PCR analiza je vršena kao za *in vitro* transformisane *I. hawkerii* (Milošević i sar., 2009) i *I. walleriana* (Milošević i sar., 2010).

### Rezultati istraživanja i diskusija

U ovom radu smo primenjivali *ex vitro* transformaciju *I. walleriana* imajući u vidu da efikasnost transformacije kod biljaka koje nisu model sistemi zavisi od primenjenih tehnologija, a da je niska kod *in vitro* transformacija (Dan i sar., 2010; Milošević i sar., 2010). *Ex vitro* metod za proizvodnju kompozitnih biljaka primenjen je kod oko 20 biljnih vrsta (Veena i Taylor, 2007).



Slika 1. Transformacija *I. walleriana*: a) postavka ogleda, b) zasušivanje Fibrgro<sup>®</sup> kocki, c) gajenje kompozitnih biljaka, d) razrastanje korenova kroz Fibrgro<sup>®</sup>, e) formirani korenovi, f) aklimatizacija kompozitnih biljaka

Figure 1. *I. walleriana* transformation: a) experimental design b) drying of Fibrgro<sup>®</sup> cubes c) composite plants cultivation d) roots growth through Fibrgro<sup>®</sup> e) rooted plant f) acclimatized composite plant

Inokulisano je 50 biljaka. Sve biljke su rasle podjednakom brzinom, ali je transformacija uticala na povećanje efikasnosti formiranja korenova (Slika 1e), čiji je broj kod tretiranih biljaka bio 27% veći. U toku aklimatizacije došlo je i do cvetanja biljaka (Slika 1f). Iako su Collier i sar. (2005) pokazali da 20 do 60% korenova

kompozit  
nije potv  
transgen  
fluoresce  
korenova

Za ra  
walleriana  
kada neza  
plazmide  
unaprediti

Autori  
ovom radu  
nauke Rep

Collier, R  
compe  
Journa  
Dan, Y., B  
efficie  
Agrob  
Biolog  
Hansen, J.  
short c  
Milošević,  
genetic  
Agrobe  
Milošević,  
Jevrem  
walleri  
12<sup>th</sup> C  
Missou  
Milošević,  
A. (201  
Journal  
(1), 23-



u 16 h  
biljke

i sar.  
na kao  
lošević

u vidu  
njenih  
i sar.,  
oko 20

kompozitnih biljaka može biti transgeno, prisustvo GUS i *pac1* gena kod *I. walleriana* nije potvrđeno ni u listovima ni u korenovima kompozitnih biljaka. Osim neuspješne transformacije, razlog za to može biti i primena neadekvatnog sistema za identifikaciju transgenog tkiva *I. walleriana*. Identifikacija transgenih korenova pomoću GFP (*green fluorescent protein*) vizualizacije olakšala bi selekciju i eliminisanje netransformisanih korenova (Veena i Taylor, 2007).

### Zaključak

Za razliku od *in vitro* transformacija *Impatiens* vrsta, *ex vitro* transformacija *I. walleriana* pomoću smeše *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* C58C1*pac1* je za sada nezadovoljavajuća. Buduća istraživanja usmerićemo na uvođenje *GFP* gena u plazmide kako bi smo vizuelno mogli pratiti uspešnost transformacije, i na taj način unaprediti postupak dobijanja kompozitnih biljaka.

### Napomena

Autori se zahvaljuju dr Tocihiro Toguri za poklonjeni plazmid *pac1*. Istraživanja u ovom radu deo su projekta TR 31019 koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

### Literatura

- Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Lutke, W.K. and Taylor, C.G. (2005): *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal*, 43: 449-457.
- Dan, Y., Baxter, A., Zhang, S., Pantazis, C. J., Veilleux, R. E. (2010): Development of efficient Plant Regeneration and Transformation System for *Impatiens* Using *Agrobacterium tumefaciens* and Multiple Bud Cultures as Explants. *BMC Plant Biology*, 10: 165.
- Hansen, J., Jorgensen, J.E., Stougaard, J and Marcker, K.A. (1989): Hairy roots – a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Report*, 8: 12-15.
- Milošević, S., Subotić, A., Cingel, A. Jevremović, S. and Ninković, S. (2009): Efficient genetic transformation of *Impatiens hawkerii* Bull. (*Balsamiaceae*) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Archives of Biological Sciences*, 61 (3): 467-474.
- Milošević, S., Subotić, A., Cingel, A., Ninković, S., Majić, D., Trifunović, M., Jevremović, S. (2010): *Agrobacterium* – mediated transformation of *Impatiens walleriana* with a *Tomato spotted wilt virus* resistance gene Proceedings of the 12<sup>th</sup> Congress of International Association for Plant Biotechnology, St. Louis, Missouri, 180.
- Milošević, S., Cingel, A., Ninković, S., Nikolić, D., Jevremović, S., Tadić, V., Subotić, A. (2011): Uspostavljanje model sistema za transformaciju biljaka *I. hawkerii* Bull. *Journal of Scientific Agricultural Research/Arhiv za poljoprivredne nauke* 72, 257 (1), 23-27, ISSN: 0354-5695.

gro®  
e)

gro®  
plant f)

ali je  
, čiji je  
vetanja  
renova



- Simonović, A. (2011): Biotehnologija i geneti~ko in`injerstvo biljaka. NNK Internacional, Beograd. ISBN 978-86-6157-003-2, 401.
- Slater, A., Scott, N.W., Fowler, M.R. (2004): Plant Biotechnology. The Genetic Manipulation of Plants. Oxford University Press, New York: 35-52.
- Tepfer, M. and Casse-Delbart, C. (1987): *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for the transforming higher plants. Microbiological Sciences, 4: 21-28.
- Toguri, T., Ogawa, T., Kakitani, M., Tukahara, M. and Yoshioka, M. (2003): Agrobacterium-mediated transformation of *Chrysanthemum (Dendranthema grandiflora)* plants with a disease resistance gene (*pac1*). Plant Biotechnology, 20 (2): 121-127.
- Veena, V. and Taylor, C.G. (2007): *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 43: 383-403.
- Zhou, X., Guangcheng, C., Rufa, L., Yongru, S., Wenbin, L. (1994): A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. Proceedings of IPBA, Rogla: 171-175.

***Ex vitro* TRANSFORMATION OF *I. walleriana* L. WITH *A. tumefaciens* AND *A. rhizogenes***

*Snežana Milošević, A. Cingel, Slavica Ninković, Marija Petrić, Milana Trifunović, Slađana Jevremović, Angelina Subotić*

**Abstract**

To obtain composite *Impatiens walleriana* plants carrying GUS and *pac1* genes, *ex vitro* *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation was examined. Inoculated plants exhibited better growth and root formation compared to the control. Transformation efficiency was examined by PCR analysis. Despite inoculated plans exhibited enhanced rooting presence of GUS and *pac1* genes was not confirmed.

**Key words:** *A. rhizogenes* A4M70gus, *A. tumefaciens* C58C1pac1, *ex vitro*, *I. walleriana*

PARAM

Vera Đek

**Izvod:** U (Jadran i Din Kragujevac tol zrna (g). Pros intervalu od 3. intervalu od 4. prinos, tako i signifikantne r:

**Ključne r**

Ječam se kvalitetna korr komponenta u su važnosti za jarog ječma u odlikovati viso niza godina.

Stabilnost selekciji i prep godinama zbog neprilikama u uzgajanog podr na stresne uslo mestu i ispred upotrebe. Agro na prinos, nego uslovima proizv

Nove sorte prevazilaze star iznad 9 t/ha, zat

\* Vera Đekić, Centa Mirjana Staletić, Jelena Milivojević Miodrag Jelić, Po (miodragjelic@yahc Vera Popović, Ins (vera.popovic@ifvc)