

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
AGRONOMSKI FAKULTET U ČAČKU



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF AGRONOMY CACAK

---

# **XVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI**

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA -



---

Vol. 16. (18), 2011.

Čačak, 4 - 5. Mart 2011. godine

**XVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI**  
sa međunarodnim učešćem

**- Zbornik radova -**  
Vol. 16. (18), 2011.

**ORGANIZATOR I IZDAVAČ:**

*Agronomski fakultet, Čačak*

**Organizacioni odbor:**

prof. dr Nikola Bokan, prof. dr Drago Milošević,  
prof. dr Goran Dugalić, prof. dr Radojica Đoković, dr Mirča Balan doc.

**Programski odbor:**

prof. dr Dragutin Đukić, dr Radoslav Cerović, prof. dr Miroslav Spasojević,  
prof. dr Aleksandar Paunović, Snežana Pašalić, prof. dr. Snežana Bogosavljević-Bošković,  
prof. dr Tomo Milošević, prof. dr Vladeta Stevović, prof. dr Leka Mandić,  
prof. dr Milena Đurić, prof. dr Milica Cvijović, prof. dr Gordana Šekularac, prof. dr Nikola  
Bokan, dr Mirče Balan, dr Vladimir Kurčubić,

**Tehnički urednik:**

prof. dr Nikola Bokan

**Kompjuterska obrada i slog:**

Dušan Marković, dipl. ing.

**Tiraž:** 150 primeraka

**Štampa:**

Štamparija „Svetlost“ Čačak

CIP - Katalogizacija u publikaciji  
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

63(082)  
60(082)

SAVETOVANJE o biotehnologiji sa međunarodnim  
učešćem (16 ; 2011 ; Čačak)

Zbornik radova / XVI savetovanje o  
biotehnologiji sa međunarodnim učešćem,  
Čačak, 4-5. mart 2011. godine ; [organizator]  
Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet  
u Čačku = [organized by] University of  
Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cacak. -  
Čačak : Agronomski fakultet, 2011 (Čačak :  
Svetlost). - 668 str. : graf. prikazi, tabele  
; 24 cm

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

ISBN 978-86-87611-15-3  
1. Agronomski fakultet (Čačak)  
a) Poljoprivreda - Zbornici  
b) Biotehnologija - Zbornici  
COBISS.SR-ID 182201356

## GENETIČKA TRANSFORMACIJA *Impatiens hawkerii* Bull. POMOĆU *Agrobacterium tumefaciens* C58C1pac1

Snežana Milošević<sup>1</sup>, A. Cingel<sup>1</sup>, Slavica Ninković<sup>1</sup>, Ana Simonović<sup>1</sup>,  
Dragana Nikolić<sup>2</sup>, Slađana Jevremović<sup>1</sup>, Angelina Subotić<sup>1</sup>

**Izvod:** Proučavana je genetička transformacija *Impatiens hawkerii* Bull. pomoću *Agrobacterium tumefaciens* C58C1pac1, čiji je cilj bio stabilna integracija *pac1* gena u biljni genom i njegova ekspresija, a time dobijanje biljaka tolerantnih na viruse. Prilikom selekcije više koncentracije kanamicina su uslovile spor rast i razvoj malog broja bočnih pupoljaka i korenova. Eksplantati inokulisani dva sata i gajeni na podlozi sa CPPU su najbolje opstajali. Uočeno je rapidno propadanje transformanata na selektivnoj podlozi, a peti pasaž nije preživeo ni jedan klon. Nekroza biljnih ćelija transformisanih pomoću *A.tumefaciens* je posledica velike osetljivosti ove biljne vrste na kanamicin ili neuspešnosti transformacije.

**Ključne reči:** *A. tumefaciens* C58C1pac1, CPPU, *I. hawkerii*, kanamicin, TDZ

### Uvod

Kombinovanjem metoda gajenja biljnih ćelija, tkiva i organa u kulturi *in vitro* sa metodama molekularne biologije otvoreno je široko polje istraživanja i primene navedenih metoda u biotehnologiji. Kao i druge ukrasne vrste, *I. hawkerii* Bull. se u komercijalnoj proizvodnji razmnožava vegetativno, pa postoji velika verovatnoća prenosa virusa sa matičnih biljaka na potomstvo (Gera, 2006). Virusne infekcije utiču na kvalitet i troškove proizvodnje ukrasnih biljaka, a nekoliko poznatih virusa je infektivno za biljke roda *Impatiens*, među kojima su najznačajniji *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) i *Impatiens necrotic spot virus* (INSV). Nova saznanja iz molekularne genetike biljnih virusa i odbrambenih sistema njihovih domaćina imaju za rezultat razvoj novih načina za kontrolu virusnih bolesti biljaka. Za dobijanje zdravog biljnog materijala, osim kulture *in vitro*, primenjuju i se genetičke transformacije, najčešće pomoću bakterija roda *Agrobacterium*. Iz *Schizosaccharomyces pombe* je izolovan gen *pac1* koji kodira ribonukleazu specifičnu za dvolančane RNK intermedijere (dsRNA) nastale u toku replikacija RNK virusa. Transformacije brojnih biljnih vrsta pomoću *A. tumefaciens* koji nosi *pac1* gen rađene su sa ciljem dobijanja biljaka tolerantnih ili rezistentnih na različite viruse i viroide: TSWV, INSV, *Tobacco mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus-Y* soj, *Potato virus Y-T* soj, *Chrysanthemum stunt viroid* i *Potato spindle tuber viroid* (Ishida, 2002; Ogawa, 2005). U našoj laboratoriji *pac1* gen je po prvi put korišćen za transformaciju *Impatiens* vrsta

<sup>1</sup> Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Beograd, Srbija (snezana@ibiss.bg.ac.rs)

<sup>2</sup> Institut za molekularnu genetiku i genetički inženjering, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 444a, 11010 Beograd, Srbija

(Milošević, 2010a). U ovom radu je prikazan pokušaj transformacija biljaka *I. hawkerii* Bull.

### Materijal i metode rada

Kao preduslov za transformaciju razvili smo sistem za regeneraciju nezaraženih biljaka *I. hawkerii* Bull. u kulturi *in vitro*. Epikotili sterilno isključivih semena gajeni su na MS podlozi sa različitim koncentracijama (0,01, 0,1 i 1  $\mu\text{M}$ ) tidiazurona (TDZ) i fenil-N'-(2-hloro-4-piridil)uree (CPPU). *In vitro* kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji, pri temperaturi  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  i pri fotoperiodu 16 h svetla. Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe *Tesla* Pančevo, jačine 65 W i intenziteta bele svetlosti  $47 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ .

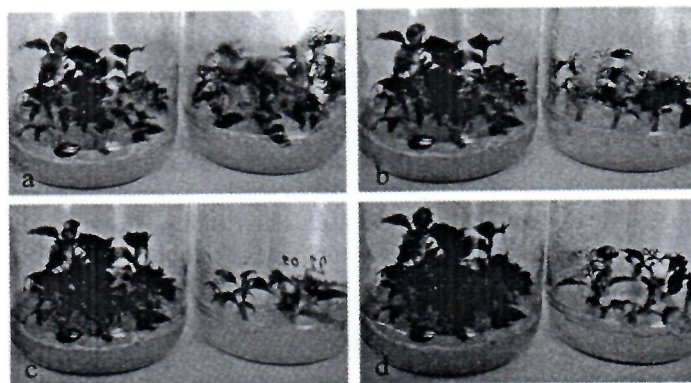
Da bi smo odredili selektivnu koncentraciju antibiotika na kojoj se pouzdano može razlikovati transformisano tkivo od netransformisanog, urađen je test osteljivosti biljaka na različite koncentracije kanamicina (10, 25, 50 i 100  $\text{mg l}^{-1}$ ) dodatog u MS podlogu.

Za transformaciju su korišćeni nodalni odsečki izdanaka *I. hawkerii* Bull. sa aksilarnim pupoljkom gajeni *in vitro*. Plazmid je dobijen na poklon od dr Toshihiro Toguri, iz kompanije Kirin u Japanu, a ubacivanje u *A. tumefaciens* C58C1 izvršeno je elektroporacijom. Štok *A. tumefaciens* C58C1*pac1* je gajen na čvrstoj Luria-Bertani (LB) podlozi sa 100  $\text{mg l}^{-1}$  kanamicina. Za inokulaciju biljnog tkiva korišćena je bakterijska suspenzija optičke gustine  $\approx 0,6$  ( $A_{600}$ ) u tečnoj LB podlozi. Kao kontrola korišćeni su eksplantati koji su potapani u tečnu LB podlogu bez bakterija. Inokulacija je rađena 50 min, 2 h i 20 h. Nakon četiri dana kokultivacije eksplantati su prenošeni na selektivnu MS podlogu (500  $\text{mg l}^{-1}$  cefotaksima i 50  $\text{mg l}^{-1}$  kanamicina), sa 0,1  $\text{mg l}^{-1}$  TDZ ili CPPU. Nakon četiri sedmice rasta na ovim podlogama, eksplantati su prenošeni na svežu MS podlogu sa 500  $\text{mg l}^{-1}$  cefotaksima i 100  $\text{mg l}^{-1}$  kanamicina, bez citokinina.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Prilikom regeneracije biljaka iz epikotila, nakon četiri sedmice gajenja u kulturi *in vitro*, najveći broj izdanaka formiran je u prisustvu 0,1  $\mu\text{M}$  CPPU. Na 10 puta nižoj koncentraciji ovog citokinina konstatovana je najveća dužina izdanaka, broj korenova i njihova dužina. Primenom viših koncentracija oba citokinina dobili smo biljke izmenjenog habitusa, čiji kvalitet nije ispunjavao kriterijume za komercijalnu proizvodnju. Regenerisane biljke sa dobro razvijenim korenovima zasađene su u žardinjere i 90% priživelo je aklimatizaciju na uslove u stakleniku.

Rast biljaka na različitim koncentracijama kanamicina upoređivan je sa rastom kontrolnih biljaka gajenih na podlozi koja nije sadržala antibiotike. Na podlozi sa 10  $\text{mg l}^{-1}$  kanamicina skoro da nisu postojale razlike (Slika 1a). Kod biljaka gajenih na 25  $\text{mg l}^{-1}$  kanamicina razvijao se manji broj korenova po eksplantatu u odnosu na kontrolu (Slika 1b), dok se biljke na 50 i 100  $\text{mg l}^{-1}$  kanamicina nisu uopšte ožiljavale, sporo su rasle i skoro da nisu razvijale bočne izdanke (Slika 1c i d).



Slika 1. Test osetljivosti izdanaka *I. hawkerii* Bull. na kanamicin. Na svakoj slici levo – MS podloga, desno – MS sa: a) 10, b) 25, c) 50, d) 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kanamicina  
 Figure 1. Test of sensivity of *I. hawkerii* Bull. shoots to kanamycin. In all figures left – MS medium, right – MS with: a) 10, b) 25, c) 50, d) 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kanamycin

Inokulisano je ukupno 158 eksplantata (82 je gajeno na MS podlozi sa TDZ, a 76 na CPPU). Vreme inokulacije uticalo je na umnožavanje i brzinu rasta izdanaka, a najbolji su bili izdanci inokulisani tokom 2 h. Kontrola gajena na selektivnoj podlozi prva je počela da propada, ali je propadao i veliki broj potencijalnih transformanata (Slika 2). Kraće ili duže vreme inokulacije od 2 h pokazalo se kao neoptimalno i dovelo je do propadanja većeg broja eksplantata (Tabela 1).

Tabela 1. Stopa preživljavanja transformanata *I. hawkerii* Bull.  
 Table 1. Survival rate of *I. hawkerii* Bull. transformants

Vreme inokulacije Time of inoculation	Citokinini (0,1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ) Cytokinins	Br. inokulisanih eksplantata No. of inoculated explants	Br. klonova nakon 3. pasaža na kanamicinu No. of clones after third pasage at kanamycin	Br. klonova nakon 4. pasaža na kanamicinu No. of clones after fourth pasage at kanamycin
50 min	TDZ	16	2 (12,5%)	0
	CPPU	13	0 (0%)	0
2 h	TDZ	32	19 (59,38%)	0
	CPPU	32	10 (31,25%)	4 (12,5%)
20 h	TDZ	34	2 (5,88%)	0
	CPPU	31	10 (32,26%)	2 (6,45%)
Ukupno Total		158	43 (27,22%)	6 (3,80%)

Optimizacija vremena inokulacije i ko-kultivacije je preduslov uspesne transformacije svake biljne vrste. U radu Clarke (2008) prilikom transformacije *Euforbia pulcherrima* bakterijama *A. tumefaciens* koje nose gen za otpornost na *Poinsettia mosaic virus* optimalno vreme inokulaciju je 5 min uz blago mešanje, a ko-kultivacije 72 h.

Treći pasaž na kanamicinu preživelo je svega 3,80% inokulisanih eksplantata i to onih koji su gajeni na CPPU (Tabela 1). Thirukkumaran (2009) je pokazao da prilikom transformacije *P. x hybrida* pomoću *A. tumefaciens* TDZ dvostruko povećava efikasnost transformacije u poređenju sa ranijim eksperimentima u kojima je korišćena slična sorta *P. x hybrida*, a podloga bila sa kombinacijom auksina i citokinina. U slučaju transformacije *I. hawkerii* Bull. CPPU se pokazao kao efikasniji regulator rasta od TDZ. Jones (2007) je zaključio da citokinini stimulišu ćelijske deobe čime se povećava broj ćelija koje ulaze u S/G2 fazu ćelijskog ciklusa i da se njihov efekat na transformacije biljaka zasniva na kombinaciji uticaja na homologne rekombinantne aktivnosti i deobu ćelija.



Slika 2. Transformanti na podlozi sa 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> cefotaksima i 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kanamicina:  
a) kontrola nakon četiri sedmice, b) transformanti nakon četiri sedmice,  
c) transformanti nakon 20 sedmica od inokulacije.

Figure 2. Transformants on the medium with cefotaxim 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> i kanamycin 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>:  
a) control b) transformants after four weeks of inoculation,  
c) transformants after 20 weeks of inoculation.

Nakon petog pasaža na kanamicinu ni jedan transformisani klon *I. hawkerii* Bull. nije preživio selekciju.

Uspešnost transformacije biljaka zavisi od većeg broja faktora: osetljivosti biljne vrste na bakterijsku infekciju, unete genske kasete i promotora upotrebljenog za njenu ekspresiju, tipa eksplantata, veličine povrede, selekcionih procedura i regeneracionog kapaciteta biljke (Kim, 2005). Vrsta *Impatiens* u kulturi *in vitro* pokazuje nizak regenerativni potencijal, što za posledicu ima relativno mali broj publikacija ali je osetljiva na infekciju sojevima roda *Agrobacterium* (Milošević, 2009, 2010a; Dan, 2010). Transformacija *I. walleriana* L. pomoću *A. tumefaciens* LBA 4404 koji nosi plazmid pHB2829 sa *nptII* i S-GFP genima nije bila uspešna (Dan, 2010), jer su eksplantati menjali boju u braon i propadali bez obzira na optimizaciju brojnih faktora tokom transformacije (variranje kokultivacionih podloga, pH vrednosti podloga, vremena inokulacije i ko-kultivacije, bakterijskih sojeva i selekcionih tretmana).

Povređivanje može znatno uticati na ponašanje eksplantata u uslovima *in vitro*. Što je veća površina povrede veća je mogućnost stvaranja etilena, koji ima važnu ulogu u regeneraciji, ćelijskoj deobi i morfologiji dobijenih organa.

Tip selekcije je takođe jedan od faktora koji može uticati na efikasnost transformacije. Najčešće korišćen selektabilni marker kod transformacije biljaka

pomoću *A. tumefaciens* je *iptII* gen koji kodira neomicin fosfotransferazu i omogućava biljkama rezistentnost na kanamicin i srodne antibiotike (neomicin i G-418). Koncentracija kanamicina od 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> smatra se adekvatnom za kontrolu rasta netransformisanih ćelija *I. walleriana* L. (Milošević, 2010a, Dan, 2010), ali je za selekciju *I. hawkerii* Bull. verovatno potrebno primeniti niže koncentracije ili izostaviti selekcionni agens ranije i uraditi PCR analizu potencijalnih transformanata.

### Zaključak

Transformacija *I. hawkerii* Bull. pomoću *A. tumefaciens* C58C1*pac1* je za sada nezadovoljavajuća usled niske efikasnosti ili preosetljivosti biljaka na kanamicin. Buduća istraživanja usmerićemo na usavršavanja protokola transformacije i optimizaciju selekcije transformanata. Metoda genetičke transformacije opisana u ovom radu u perspektivi može naći praktičnu primenu u hortikulturi.

**Napomena:** Autori se zahvaljuju dr Tocihiro Toguri za poklonjeni plazmid *pac1*. Istraživanja su sprovedena u okviru projekta TR 31019 koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

### Literatura

- Clarke, J.L., Spetz, C., Haugslie, S., Xing, S., Dees, M.W., Moe, R., Blystad, D.R. (2008): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers to *Poisettia mosaic virus*. Plant Cell Reports, 27: 1027-1038.
- 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.
- Gera, A., Zeidan, M. (2006): New and emerging virus deseises in ornamental crops. Acta Horticulturae, 722: 175-180.
- Ishida, I., Tukahara, M., Yoshioka, M., Ogawa, T., Kakitani, M., Toguri, T. (2002): Production of anti-virus, viroid plants by genetic manipulations. Pest Managments Science, 58: 1132-1136.
- Jones, M.P.A., Cao, J., O'Brien, R., Murch, S.J., Saxena, P.K. (2007): The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. Plant Cell Report, 26:1481-1490.
- Kim, J.B. (2005): Development of efficient regeneration and transformation systems in *Alstroemeria*. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands: 1-100.
- Milošević, S., Subotić, A., Cingel, A., Jevremović, S., Ninković, S. (2009): Efficient genetic transformation of *Impatiens hawkerii* Bull. (*Balsamiaceae*) using *Agrobacterium rhizogenes*. Archives of Biological Sciences, 61 (3): 467-474, IF 0,238, 2009; Biology 70/73, ISSN: 0354-4664.



- Milošević, S. (2010a): Regeneracija i genetička transformacija biljaka *Impatiens walleriana* L. i *Impatiens hawkerii* Bull. u kulturi *in vitro*. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Beograd, 1-180.
- Milošević, S., Subotić, A., Cingel, A., Ninković, S., Majić, D., Trifunović, M., Jevremović, S. (2010b): *Agrobacterium* – mediated transformation of *Impatiens walleriana* ornamental 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.
- Ogawa, T., Toguri, T., Kudoh, H., Okamura, M., Momma, T., Yoshioka, M., Kato, K., Hagiwara, Y., Sano, T. (2005): Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against *Chrysanthemum Stunt Viroid* and *Tomato Spotted Wilt Virus* in transgenic *Chrysanthemum* plants. *Breeding Science*, 55: 49-55.
- Thirukkumaran, G., Ntui, V.O., Khan R.S., Mii, M. (2009): Thidiazuron: an efficient plant growth regulator for enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 109-115.

### GENETIC TRANSFORMATION OF *Impatiens hawkerii* Bull. WITH *Agrobacterium tumefaciens* C58C1*pac1*

Snežana Milošević, A. Cingel, Slavica Ninković, Ana Simonović,  
Dragana Nikolić, Slađana Jevremović, Angelina Subotić

#### Abstract

Genetic transformation of *Impatiens hawkerii* Bull. plants with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1*pac1*, with the aim of stable integration of the *pac1* gene into the genome, its expression and generation of virus-tolerant plants was studied. The application of higher concentrations of kanamycin during the selection process caused growth retardation and development of few lateral buds and roots. The explants inoculated for two hours and grown on a medium supplemented with CPPU thrived the best. A rapid decay of transformants on selective medium has been observed, while none of the clones survived the fifth passage. The necrosis of the plant cells transformed with *Agrobacterium* may be a consequence of either high sensitivity of this species to kanamycin or unsuccessful transformation.

**Key words:** *A. tumefaciens* C58C1*pac1*, CPPU, *I. hawkerii*, kanamycin, TDZ