

Rekombinantne bakterije v agronomiji

Uspešen razvoj rastlin in visoke pridelke zagotavljajo genska osnova, dostopnost hranilnih snovi, prisotnost mikroorganizmov, ki pospešujejo rast, in odsotnost škodljivcev.

Mikroorganizmi, ki pospešujejo rast, delujejo:

- direktno na rastline preko fiksacije dušika, mobilizacije železa in fosforja ali preko rastnih hormonov, ki jih izločajo, ali pa
- posredno preko preprečevanja rasti patogenim organizmom v zemlji (antibioza: izločajo inhibitorne snovi ali jim odvzemajo rastne snovi).

Področja, kjer lahko vplivamo na rast preko mikroorganizmov:

- izboljšana fiksacija dušika (zmanjšana odvisnost od umetnih gnojil)
- izboljšane lastnosti simbiotskih bakterij, ki tvorijo nodule
- razvoj mikrobov, ki bi izločali snovi za vezavo železa (zavirajo rast fitopatogenov)
- razvoj mikrobnih sevov, ki bi izločali optimalne količine rastnih hormonov

Ker je delo z rekombinantnimi bakterijami lažje od dela z glivami, je večina razvojnega dela usmerjenega na bakterijske sisteme. Simbiotskih gliv ne moremo gojiti v laboratoriju.

Rekombinantne bakterije v agronomiji /2

Dušik iz zraka ni direktno uporaben za sintezo organskih molekul.

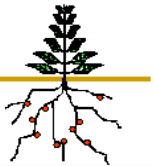
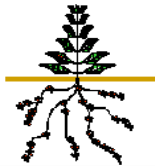
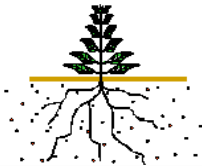
Fiksacija dušika je proces pretvorbe $N\equiv N$ v amoniak, kar zahteva velik vnos energije (ATP).

Posevki letno porabijo >100 milijonov ton fiksiranega dušika: 1/2 iz umetnih gnojil, 1/2 iz simbiotskih bakterij (*Rhizobium*, *Azotobacter*, *Frankia*, *Azospirillum*). Bakterije imajo omejen krog gostiteljev.

Bakterije so kot gnojila uporabljali že pred >50 leti v SZ, kjer so na 107 ha površine raztrosali mešanico 2 bakterij in v 60 % primerov dosegli za do 20 % povečane pridelke.

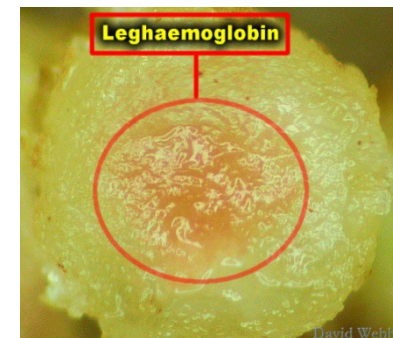
V ZDA sojo, ki je sicer v simbiozi z *Bradyrhizobium japonicum*, še dodatno gnojijo z umetnimi gnojili, čeprav bi fiksacijo dušika lahko izboljšali z uporabo izboljšanih sevov *B. japonicum*. S tem so v malem obsegu povečali pridelek za 25 % - 50 %.

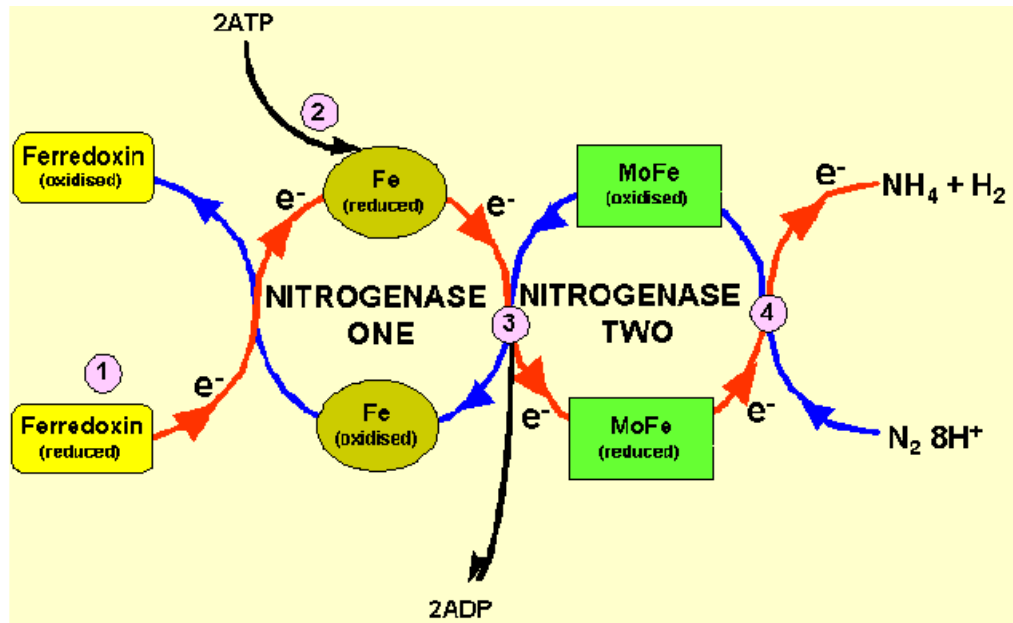
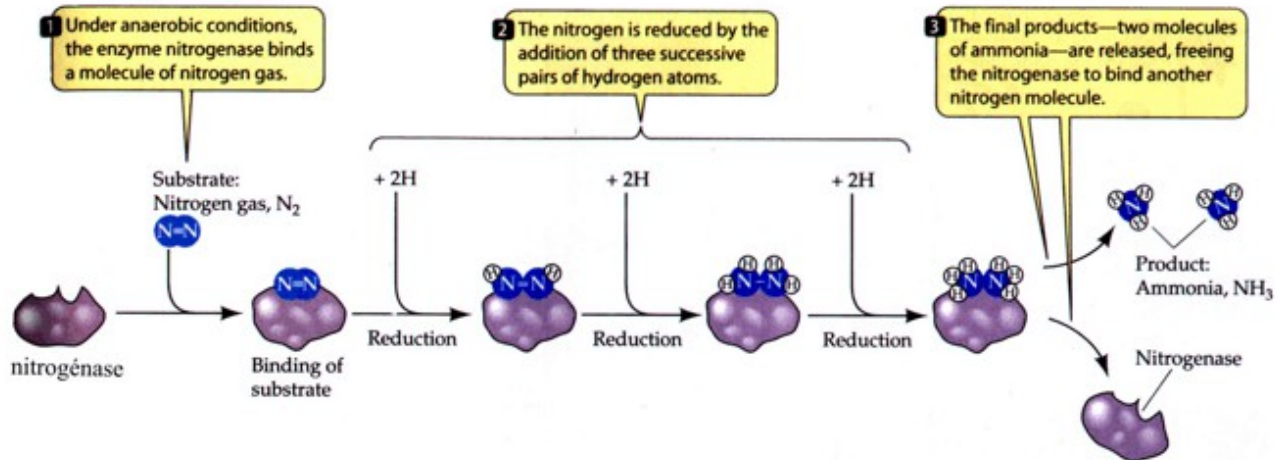
Fiksacija dušika

System of N ₂ fixation (and microbes involved) (N ₂ → NH ₃)	SYMBIOSIS (e.g. <i>Rhizobium</i>)	ASSOCIATION (e.g. <i>Azospirillum</i>)	FREE-LIVING (e.g. <i>Rhodospirillum</i>)
			
Energy source (Organic C)	Sucrose from the host plant	Root exudates from the host plant	Heterotroph (plant residues) Autotroph (photosynthesis)
Estimates of fixation rate (kg N/ha/y)	50-400	10-200	1-2 10-80



Koreninske bakterije se naselijo v koreninskih celicah, ki jih morfološko spremenijo, da oblikujejo nodule. V njih so bakterije brez lastnih sten in fiksirajo dušik s pomočjo encima **nitrogenaze**. Pred zračnim kisikom je encim zaščiteno s tem, da O₂ težko difundira v nodule in zaradi vezave na leghemoglobin (ki ga sintetizira celica s simbionti).





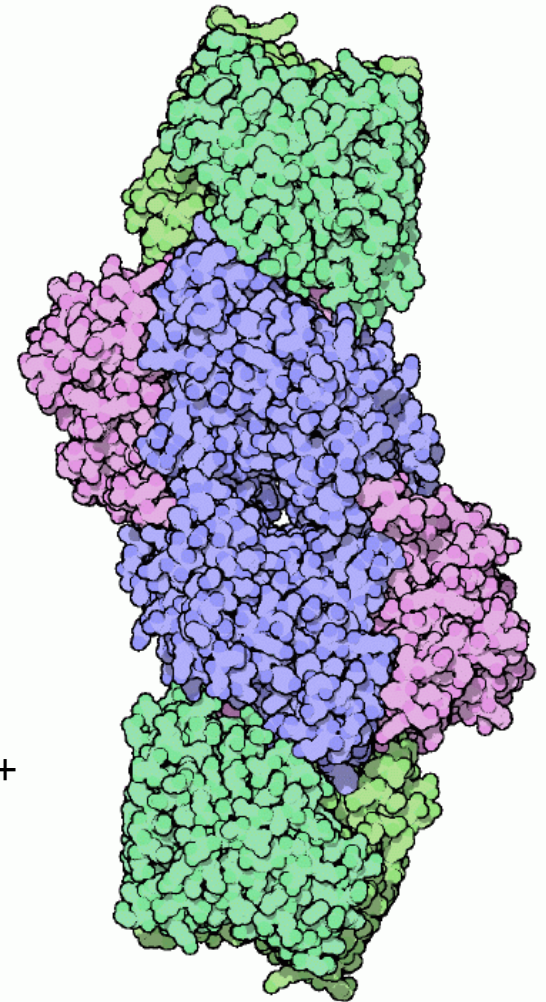
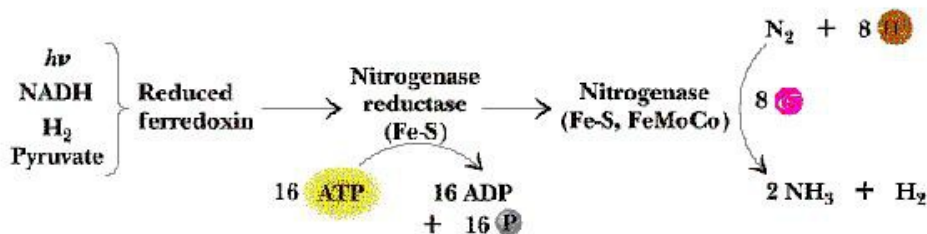
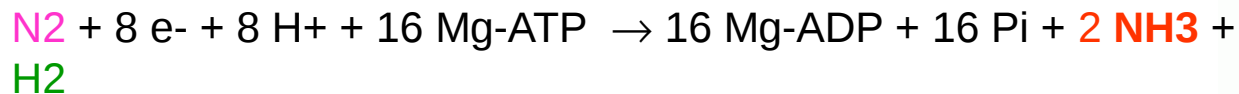
Nitrogenaza

Nitrogenaza ima dve komponenti, ki sta občutljivi za O₂ (ireverzibilna inaktivacija) za aktivnost pa je potrebnih še 15-20 dodatnih proteinov.

komponenta I (katalizira redukcijo dušika):
 2 x 50 kDa α-protein + 2 x 60 kDa β-protein +
 24 Fe + 2 Mo + kofaktor (FeMoCo)

komponenta II (donor elektronov za komponento I):
 2 x 32 kDa α-protein + n Fe

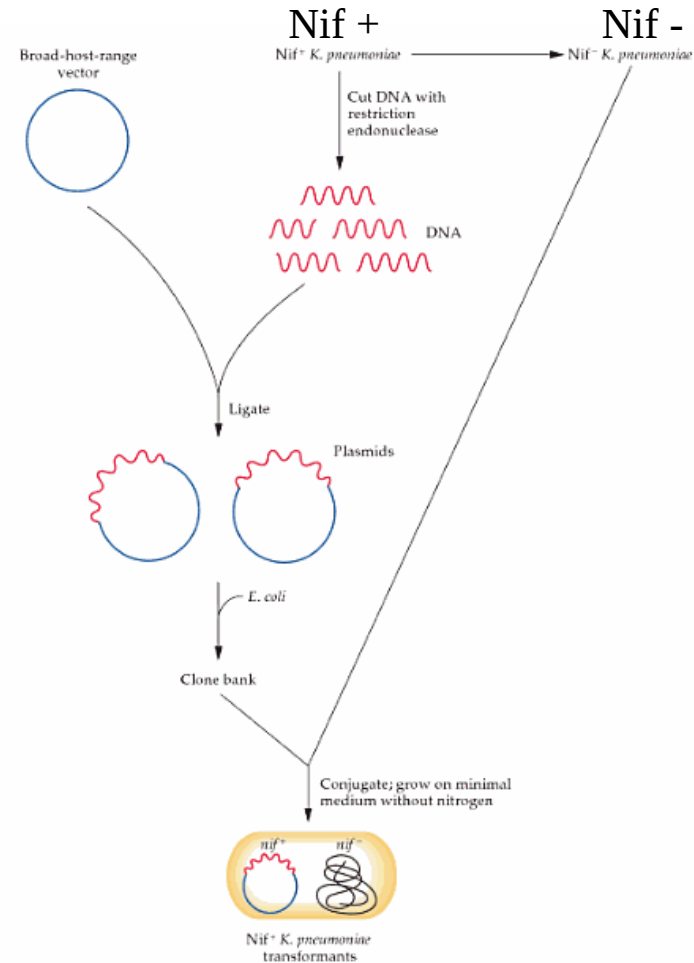
reakcija:



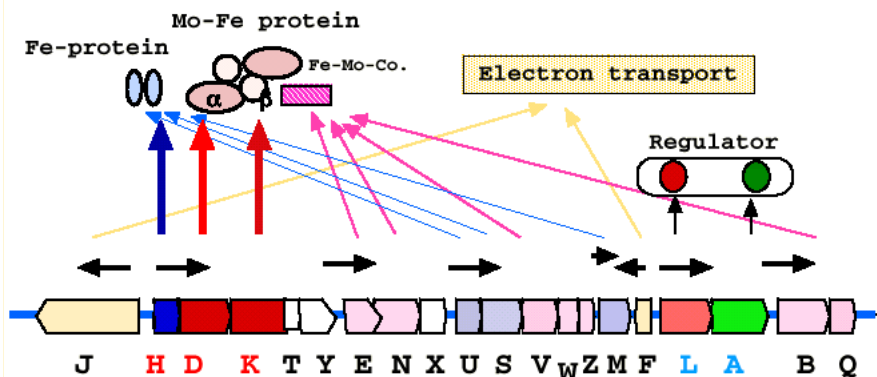
Nitrogenaza /2

Gene z zapisi za komponente, ki sodelujejo pri fiksaciji dušika (*nif*), so identificirali z gensko komplementacijo: poiskali so zapise v knjižnici wt mikroorganizma, ki so popravili fenotip organizmov z okvarami v fiksaciji dušika.

- Celice *Klebsiella pneumoniae* so obdelali s kemičnim mutagenom.
- Izbrali so celice (Nif -), ki so rasle samo v prisotnosti fiksiranega dušika (amonijevega klorida).
- Pripravili so ekspresijsko knjižnico wt *K. pneumoniae* v *E. coli*.
- Okvarjene celice *K. pneumoniae* so konjugirali z *E. coli* iz knjižnice.
- Transformirane celice so platirali na minimalno gojišče in s tem izbrali tiste, ki rastejo.



Nitrogenases



Physical associations of *nif* genes in *Klebsiella pneumoniae*

Table 1. The *nif*-gene Products and Their Role (Known or Proposed) in Nitrogen Fixation

<i>nif</i> -GENE	IDENTITY/ROLE
<i>nifH</i>	Dinitrogenase reductase. Obligate electron donor to dinitrogenase during nitrogenase turnover. Also is required for FeMo-co biosynthesis and apodinitrogenase maturation
<i>nifD</i>	α subunit of dinitrogenase. Forms an $\alpha_2\beta_2$ tetramer with β subunit. FeMo-co, the site of substrate reduction, is present buried within the α subunit of dinitrogenase
<i>nifK</i>	β subunit of dinitrogenase. P-clusters are present at the β subunit-interface
<i>nifT</i>	Unknown
<i>nifY</i>	In <i>K. pneumoniae</i> , aids in the insertion of FeMo-co into apodinitrogenase
<i>nifE</i>	Forms $\alpha_2\beta_2$ tetramer with NifN. Required for FeMo-co synthesis. Proposed to function as a scaffold on which FeMo-co is synthesized
<i>nifN</i>	Required for FeMo-co synthesis
<i>nifX</i>	Involved in FeMo-co synthesis. Specific role is not known
<i>nifU</i>	Involved in mobilization of Fe for Fe-S cluster synthesis and repair
<i>nifS</i>	Involved in mobilization of S for Fe-S cluster synthesis and repair
<i>nifV</i>	Homocitrate synthase, involved in FeMo-co synthesis
<i>nifW</i>	Involved in stability of dinitrogenase. Proposed to protect dinitrogenase from O_2 inactivation
<i>nifZ</i>	Unknown
<i>nifM</i>	Required for the maturation of NifH
<i>nifF</i>	Flavodoxin. Physiologic electron donor to NifH
<i>nifL</i>	Negative regulatory element
<i>nifA</i>	Positive regulatory element
<i>nifB</i>	Required for FeMo-co synthesis. Metabolic product, NifB-co is the specific Fe and S donor to FeMo-co
<i>fdxN</i>	Ferredoxin. In <i>R. capsulatus</i> , serves as electron donor to nitrogenase
<i>nifQ</i>	Involved in FeMo-co synthesis. Proposed to function in early MoO_4^{2-} processing
<i>nifJ</i>	Pyruvate:flavodoxin (ferredoxin) oxidoreductase. Involved in electron transport to nitrogenase

Možnosti za boljšo nitrogenazo

DNA iz izbranih klonov so uporabili kot sonde in tako identificirali še zaporedja, ki so bila v bližini in ki tudi zapisujejo za komponente Nif. Regija skupaj zajema 24 kb (7 operonov, 20 proteinov).

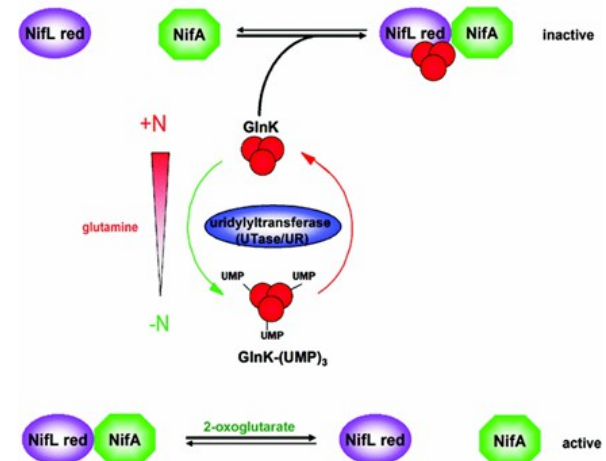
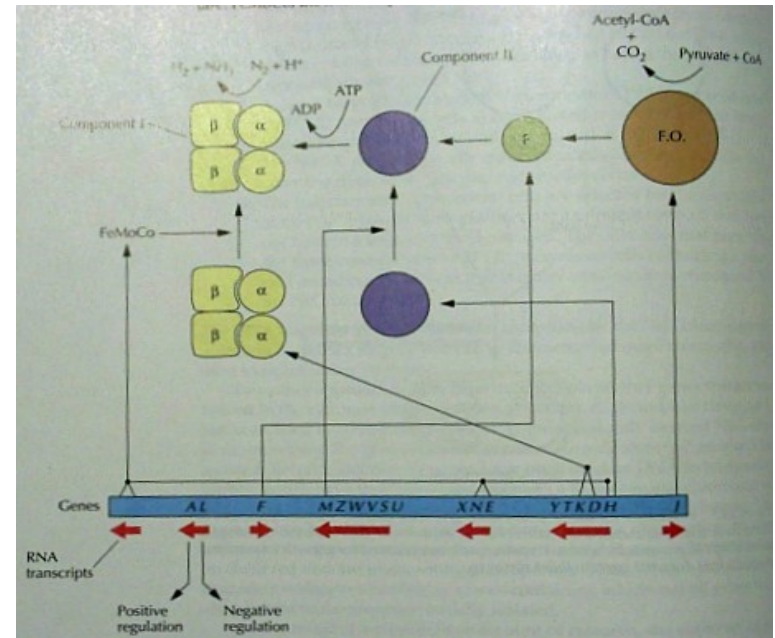
Regulatorja izražanja sta proteina **NifA** (pozitivni regulator) in **NifL** (negativni regulator; v prisotnosti kisika ali fiksanega dušika se veže na NifA in ga blokira).

Ta dva proteina sta glavni tarči za izboljšavo fiksacije dušika s postopki rDNA.

Detelja z dodatnimi kopijami gena *nifA* je proizvedla več biomase na hektar. Lahko pa bi genetsko spremenili zapis za NifL, da bi bil manj dovzeten za fiksan dušik v rastlini.

S povečevanjem fiksacije dušika pa se povečuje tudi potreba po energiji, kar negativno vpliva na donos.

Vnos celotnega genskega skupka *nif* v rastlinski genom ne bi bil smiseln, ker bi bil ključni encim neaktiven ob normalni ravni kisika v rastlinskih celicah.



Možnosti za učinkovitejšo fiksacijo

Pri fiksaciji dušika nastaja tudi prosti vodik, za kar se porablja 50 % energije. **Sproščeni H₂ bi morda lahko uporabili za rast.** Nekateri sevi *Bradyrhizobium japonicum* uporabljajo H₂ kot vir energije v pogojih znižane koncentracije kisika. Encim **hidrogenaza** namreč pretvarja atmosferski H₂ v H⁺. Soja, okužena s sevom, ki ima hidrogenazo (Hup⁺), da več biomase kot soja, okužena s sevom Hup⁻.

Nekatere druge vrste simbiotskih bakterij pa imajo le redke seve, ki so Hup⁺. Za vnos hidrogenazne aktivnosti ne bi zadoščal le prenos enega gena. Zapisane so poiskali s komplementacijo. Pri *B. japonicum* obstajajo verjetno 3 transkripcijske enote znotraj 15 kb. Podoben sistem je tudi pri *B. leguminosarum*. Ko so prenesli hidrogenazni sistem v sev Hup⁻, so stročnice vezale več dušika in bile večje kot tiste, ki so bile okužene z bakterijami Hup⁻.

<i>B. japonicum</i> strain	Relative nitrogenase activity	Relative hydrogenase activity	Relative plant dry weight	Relative nitrogen content
SR	1.00	1.00	1.00	1.00
SR1	1.27	0.01	0.81	0.93
SR2	1.13	0.01	0.74	0.91
SR3	1.23	0.01	0.65	0.85

Adapted from Albrecht et al., Science 288:1255-1257, 1999.

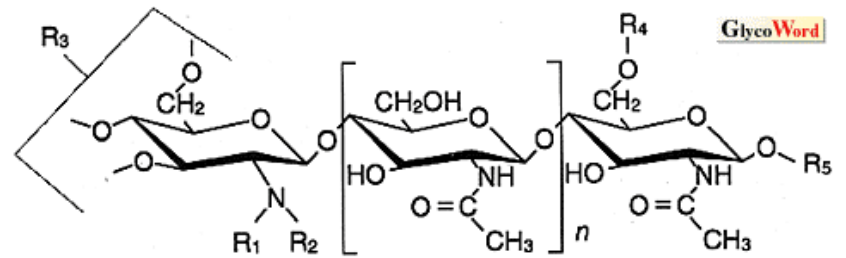
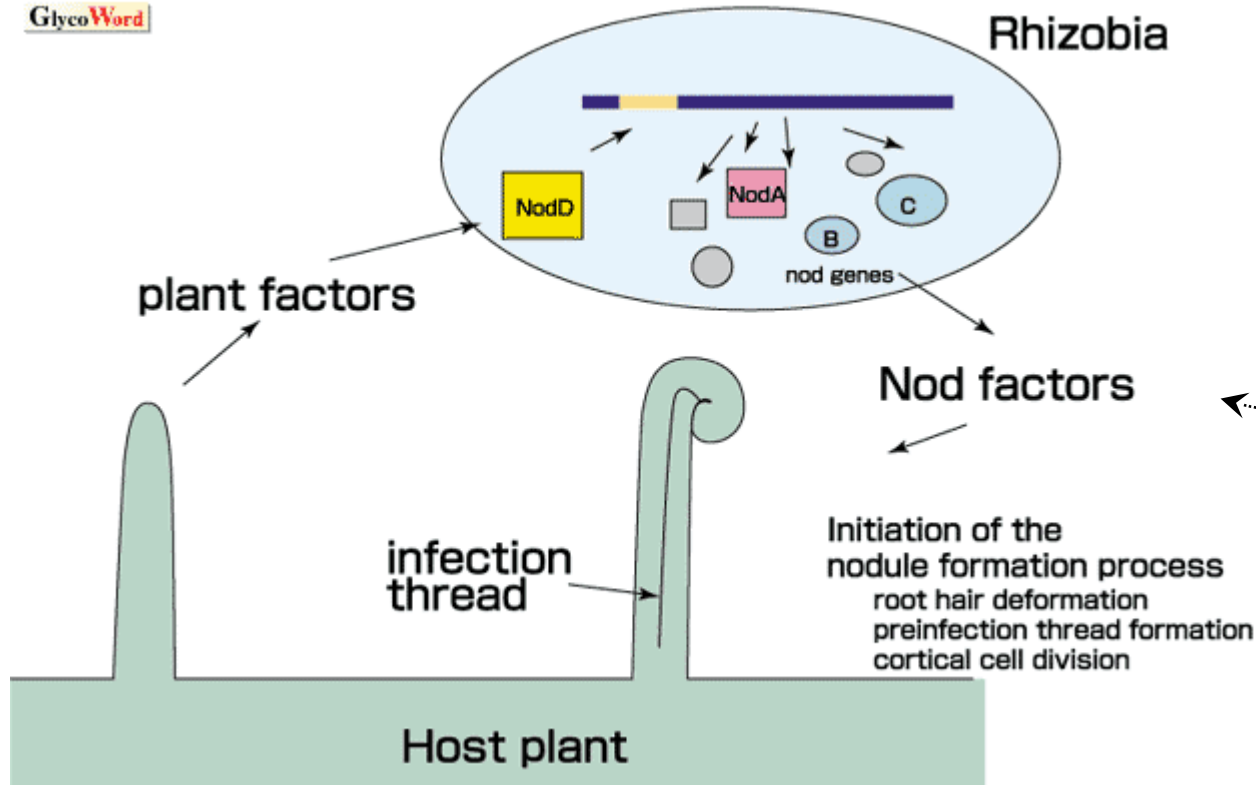
SR: wt (Hup⁺); SR1-3: 3 mutante Hup⁻

Bacterium	Hup ⁺ strains (%)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>leguminosarum</i>	93
<i>Rhizobium meliloti</i>	21
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	0
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	0
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	21
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	91

Adapted from Evans et al., Annu. Rev. Microbiol. 41:335-361, 1987.

Bacterial phenotype	Relative plant dry weight	Relative nitrogen amount	Relative leaf area
Hup ⁻	1.00	1.00	1.00
Hup ⁺	1.35	1.52	1.53

Adapted from Brewin and Johnston, U.S. patent 4,567,146, January 1986. The data have been normalized relative to the Hup⁻ parental strain.

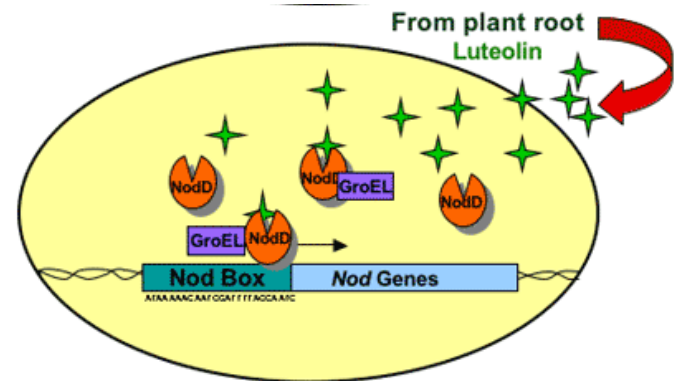
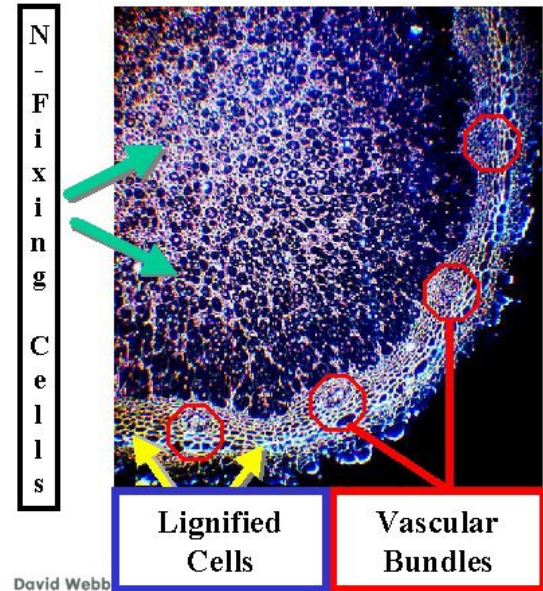


Nodulacijski geni

Gensko spremenjeni simbionti so sicer bolj učinkoviti pri fiksaciji dušika, vendar so manj uspešni pri tvorbi nodulov, ko tekmujejo z divjimi sevi v zemlji. Zato je treba prirejenim sevom izboljšati nodulacijsko sposobnost ali pa inhibirati divje seve.

Najprej so identificirali gene *nod* z genetsko komplementacijo pri *Sinorhizobium meliloti*. Pri nodulaciji sodeluje ~20 genov, ki spadajo v 3 skupine: skupni geni, za gostitelje-specifični geni, in regulatorni gen *nodD*, razen bakterijskih pa verjetno sodeluje še več gostiteljskih genov. Ugotovili so, da se na NodD veže flavonoid, ki je vrstno specifičen in določa spekter možnih gostiteljev.

Po vezavi flavonoida se NodD veže na nodulacijski promotor in dovoli prepisovanje genov *nod*. To spoznanje bi lahko uporabili pri širjenju spektra naravnih bakterij: npr. iz vrste *Rhizobium* s širokim spektrom gostiteljev bi gen *nodD* prenesli v vrsto z ozkim spektrom.



Biološka kontrola patogenov

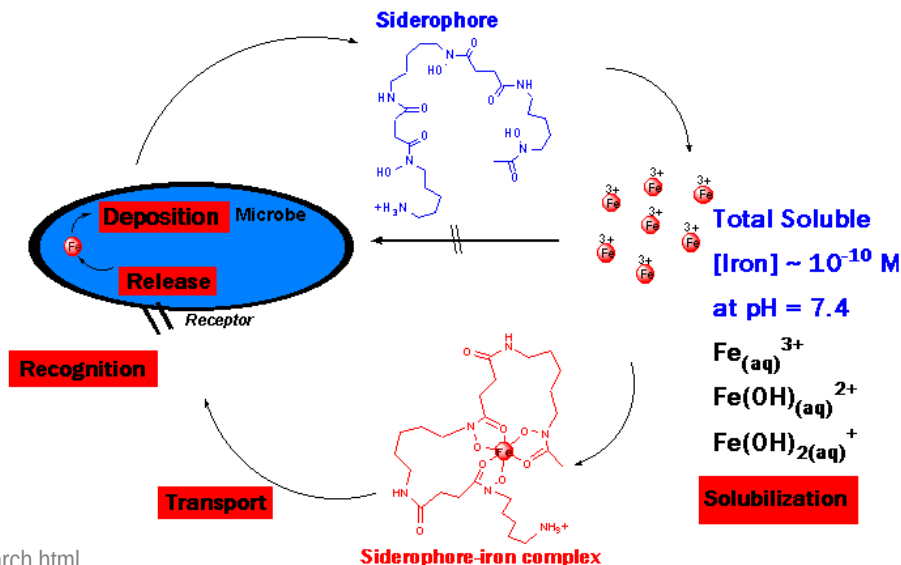
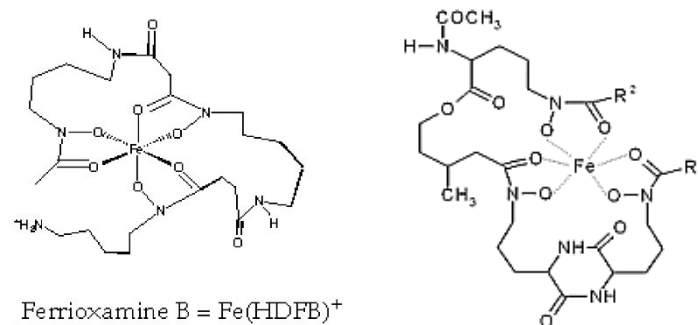
Zaradi škodljivosti kemičnih pesticidov za okolje bi se bilo smiselno bojevati proti fitopatogenom z biološkimi sredstvi, npr. z razvojem **transgenskih rastlin, ki bi bile odporne proti škodljivcem**, ali pa z uporabo **bakterij, ki bi izločale inhibitorje rasti patogenih mikroorganizmov**. Ti so **antibiotiki, siderofori, encimi in male molekule**. Razvoj še ni v fazi poljskih poskusov.

Siderofori: zaradi slabe topnosti Fe(III) je železa za optimalno rast talnih mikrobov premalo. Bakterije zato sintetizirajo in izločajo LMW molekule (400-1000 Da), ki vežejo železo z visoko afiniteto in ga nato internalizirajo preko receptorja.

Bakterije lahko zberejo in potencialnim patogenom odtegnejo veliko železa.

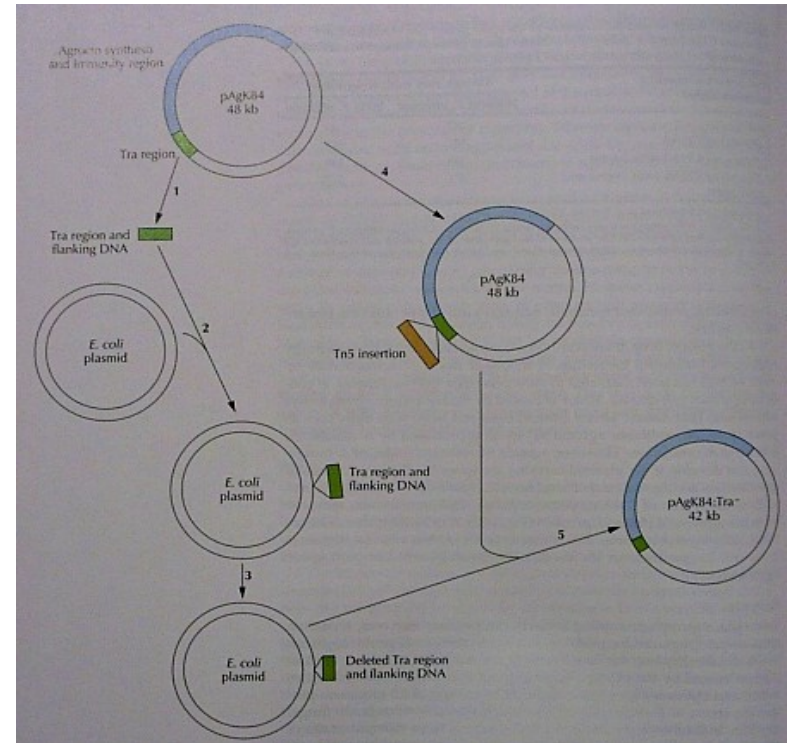
Rastline za svojo rast potrebujejo dosti manj železa kot mikroorganizmi.

Iz genske knjižnice *Pseudomonas putida* so poiskali 13 kozmidov, ki so komplementirali 28 mutacij. Skupaj pokrivajo 5 skupkov genov; eden od teh je dolg 33,5 kDa in ga sestavlja 7 genov.

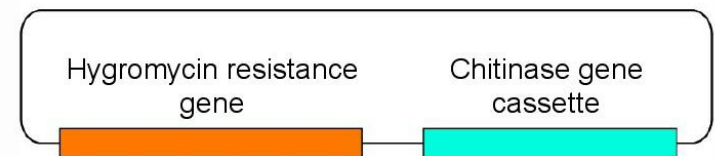


Biološka kontrola patogenov /2

Antibiotiki: Naravne talne bakterije sintetizirajo več vrst antibiotikov (agrocini, herbikolin, oomicin, pirolnitrin,...). Zapise zanje bi lahko prenesli v bakterije, ki pomagajo pri rasti rastlin tudi z drugimi sredstvi. Na svetovnem tržišču je eno samo sredstvo tega tipa: sev *Agrobacterium radiobacter*, ki proizvaja agrocin 84, ta pa učinkuje proti povzročitelju tumorjev na mandljevcih in breskvah (*Agrobacterium tumefaciens*). Vendar so plazmidi lahko prešli na povzročitelja in povzročili odpornost. Zato so kasneje iz plazmida izločili del zapisa za prenos plazmida (regija *tra*).



Encimi: nekatere bakterije proizvajajo encime, ki lahko razgradijo glivno steno (hitinaze, lipaze, proteaze). Gen za hitinazo je že uspelo prenesti v bakterije, ki fiksirajo dušik in dobljene rekombinantne bakterije so imele večjo antimikotično aktivnost.



Rekombinantni insekticidi

Sintetični insekticidi se akumulirajo v prehranjevalni verigi, imajo dolgo razpolovno dobo, so nespecifični in insekti nanje sorazmerno hitro razvijejo odpornost. Biološki insekticidi so običajno zelo specifični, razgradljivi in odpornost proti njim se razvije počasneje. Vendar je priprava draga in substance bistveno manj močno delujejo od sintetičnih. S tehnikami rDNA lahko povečamo moč delovanja.

Tržišče insekticidov je veliko 20 mrd USD/leto, od tega biološka sredstva trenutno obsegajo le 1 % vsote.

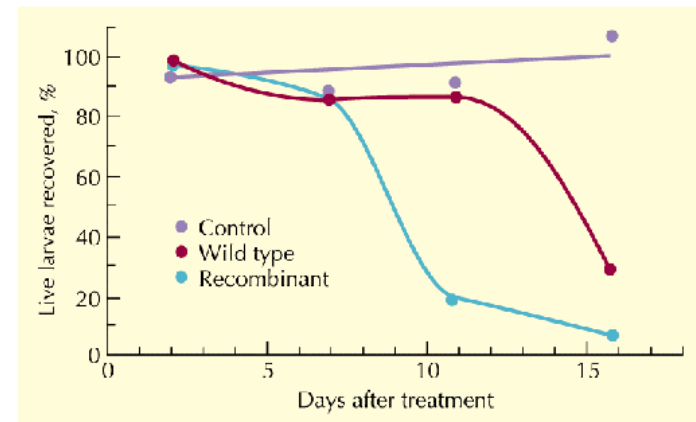
Bakulovirusi:

Insekti običajno poginejo po ~10 ciklih pomnoževanja virusov, torej ne prej kot v ~6 dneh; tedaj 25 % suhe teže živali predstavljajo polihedroni. Različne vrste virusov imajo ozko specifičnost, zato jih lahko uporabljamo zelo selektivno. Odpornost se razvije le izjemoma. Ker pa imajo kmetje in gozdarji raje učinkovine širokega spektra, bi bilo treba razširiti spekter gostiteljev. Za specifičnost verjetno odgovarja le 79 bp dolg fragment DNA znotraj zapisa za helikazo p143, zato bi z mutagenezo tega fragmenta lahko pripravili mutante s spremenjenim ali razširjenim spektrom gostiteljev.

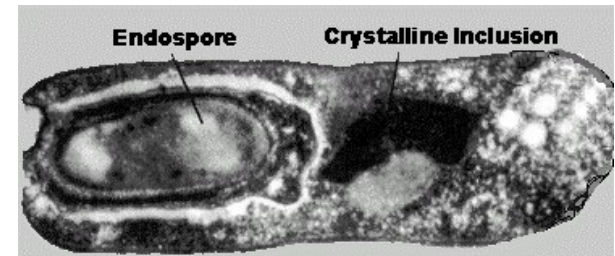
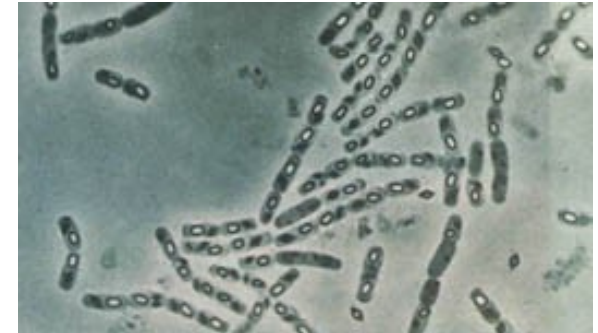
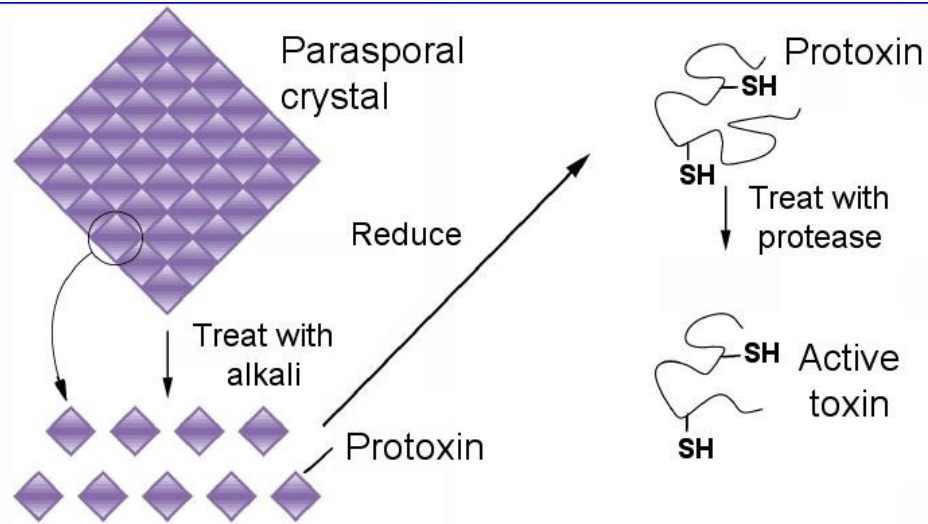
Za povečanje virulentnosti so v bakuloviruse vgradili zapise za različne efektorske proteine.

Gene	Effect on host insect of introduced gene
Diuretic hormone	Reduced hemolymph volume
Juvenile hormone esterase	Feeding cessation
<i>B. thuringiensis</i> toxin	Feeding cessation
Scorpion toxin	Paralysis
Mite toxin	Paralysis
Wasp toxin	Premature melanization, low weight gain

Adapted from Maeda, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:313–319, 1995.



Rekombinantni insekticidi /2



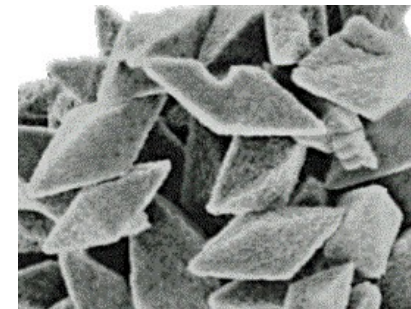
Endotoksin delta iz bakterije *Bacillus thuringiensis*:

To je najpogosteje uporabljeni biološki insekticid.

Različni sevi bakterije izražajo različne toksine z omejenim spektrom delovanja. Toksin je v bakteriji shranjen v posebni strukturi, paraspornem kristalu, ki se razvije ob sporulaciji. Kristale, ki jih sestavljajo proteinski agregati (95 %) in nekaj ogljikovih hidratov (5 %), lahko v rahlo bazičnem ob dodatku

reducenta disociiramo do podenot.

V agregatu najdemo protoksine, ki jih aktivirajo prebavne proteaze žuželk v rahlo alkalnem.

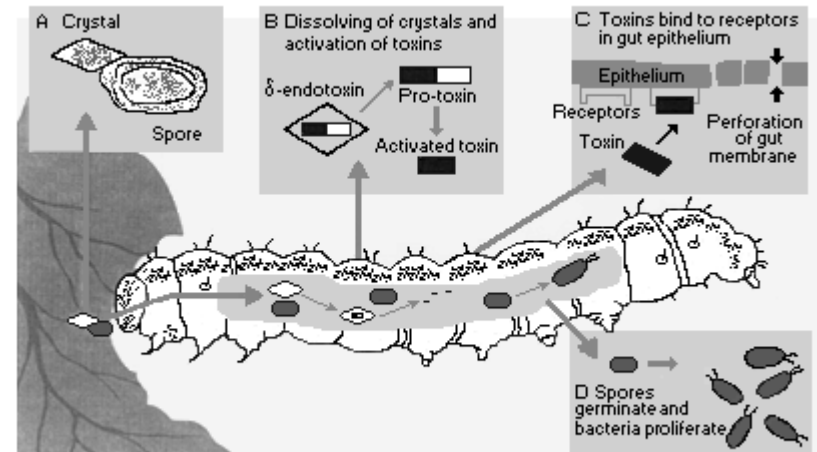
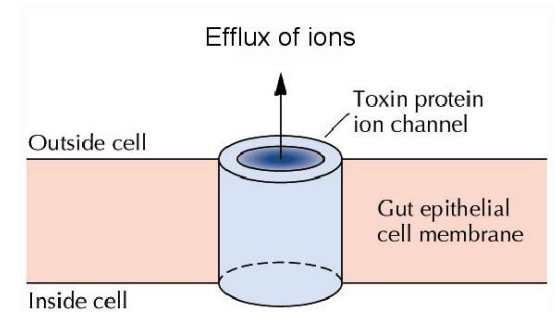


Rekombinantni insekticidi /3

Aktivni toksin se vstavi v membrano in ustvari ionski kanal, skozi katerega celice izgubljajo ATP. ~15 min. po nastanku kanala se celični metabolizem ustavi, insekt se preneha prehranjevati in lahko pogine.

Problemi:

- toksin mora priti v prebavila
- spore običajno razpršujejo po listih, zato ne deluje na insekte, ki vrtajo v liste ali obžirajo korenine
- toksin je občutljiv na svetlobo, zato ima kratek razpolovni čas
- pri uporabi v temi se razvijajo odporni insekti (spremenjen membranski receptor)

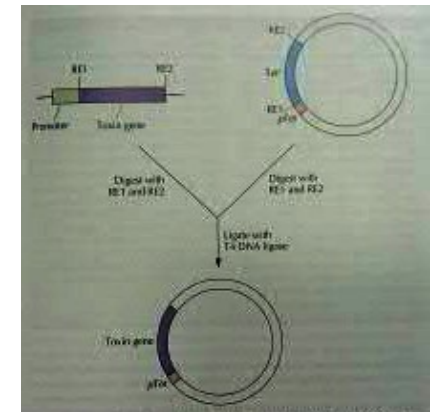


Rekombinantni insekticidi /4

Pri *B. thuringiensis kurstaki* je zapis za protoksin na plazmidu dolžine 71 kb (enem od 7 različno velikih plazmidov).

Da bi lahko proizvedli **večje količine** naravnega toksina, so pripravili varianto, ki se prepisuje tudi v vegetativni fazi rasti. To so naredili tako, da so gen prenesli pod kontrolo promotorja Tet.

Da bi razširili **spekter delovanja**, so zamenjali gene za posamezne protoksine med sevi in poskusili tudi s fuzioniranjem delov zaporedij.



<i>B. thuringiensis</i> strain or subspecies	Toxin class	Prototoxin size (kDa)	Target insects	Serotype
<i>berliner</i>	CryI	130–140	Lepidoptera	1
<i>kurstaki</i> KTO, HD-1	CryI	130–140	Lepidoptera	3
<i>entomocidus</i> 6.01	CryI	130–140	Lepidoptera	6
<i>aizawai</i> 7.29	CryI	130–140	Lepidoptera	7
<i>aizawai</i> IC 1	CryI	135	Lepidoptera, Diptera	7
<i>kurstaki</i> HD-1	CryII	71	Lepidoptera, Diptera	3
<i>tenebrionis</i> (san diego)	CryIII	66–73	Coleoptera	8
<i>morrisoni</i> PG14	CryIV	125–145	Diptera	8
<i>israelensis</i>	CryIV	68	Diptera	14

Adapted from Lereclus et al., p. 37–69, in Entwistle et al., (ed.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, 1993.

	Domain I	Domain II	Domain III	Toxic to <i>S. exigua</i>	Competes for CryIC site	Competes for CryIE site
CryIC	█	█	█	+	+	-
CryII	█	█	█	-	-	+
G27	█	█	█	+	-	+
r26	█	█	█	-	+	-

Nadalje so zaradi nestabilnosti plazmidov zapise za protoksine prenesli na kromosome gostiteljskih celic.



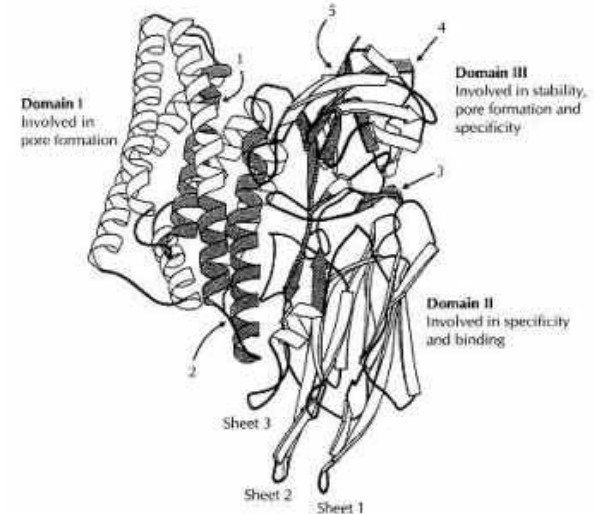
Nadalje so zaradi nestabilnosti plazmidov zapise za protoksine prenesli na kromosome gostiteljskih celic.

Rekombinantni insekticidi /5

Toksini več tipov so sestavljeni iz 3 domen: N- in C- končni oblikujeta kationski kanal, osrednja je odgovorna za vezavo na receptorje.

Razvoj odpornosti bi lahko otežili s kombiniranjem domen. Če bi se hibridni protein vezal na več različnih receptorjev, je verjetnost, da bi se jih spremenilo več (hkrati) precej majhna.

Proti vodnim žuželkam so pripravili vodne bakterije in rdeče alge, v katere so vključili zapis za toksin iz *B. thuringiensis*. Insekticidna aktivnost *in vitro* je bila velika, v naravnem okolju pa so bili rekombinantni organizmi slabo obstojni. Zato so kasneje pripravili rekombinantno aerobno bakterijo, ki živi tik pod površjem vode. Lahko jo razpršujejo ne da bi se potopila in priprava večjih količin je poceni.



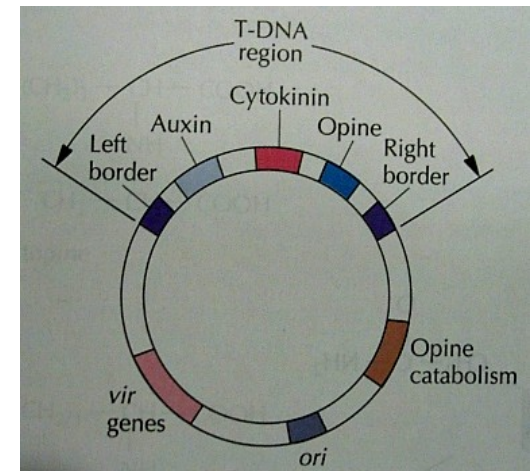
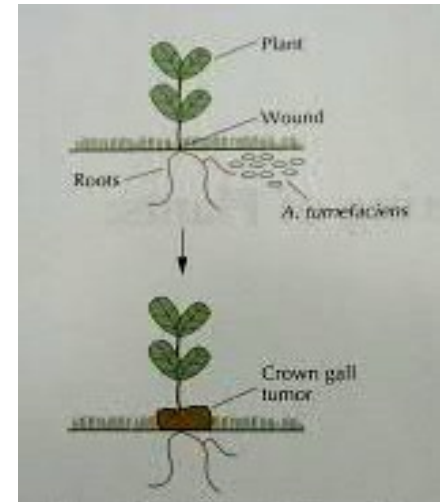
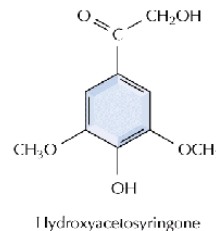
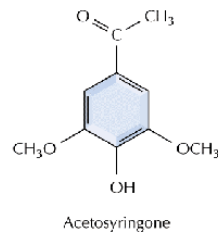
Izražanje tuje DNA v rastlinah

DNA lahko vnesemo v rastlinske celice direktno (biolistično) ali pa uporabimo povzročitelje rastlinskih tumorjev, bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, ki vsebujejo plazmid Ti.

A. tumefaciens je Gram-negativna talna bakterija, ki povzroči nastanek tumorske strukture na rastlini.

Plazmid Ti (tumor-inducing) nosi zapis za virulenčne dejavnike (*vir*) in ~20 kb dolgo regijo T-DNA (12-24 kb), ki se integrira v genom okužene rastline.

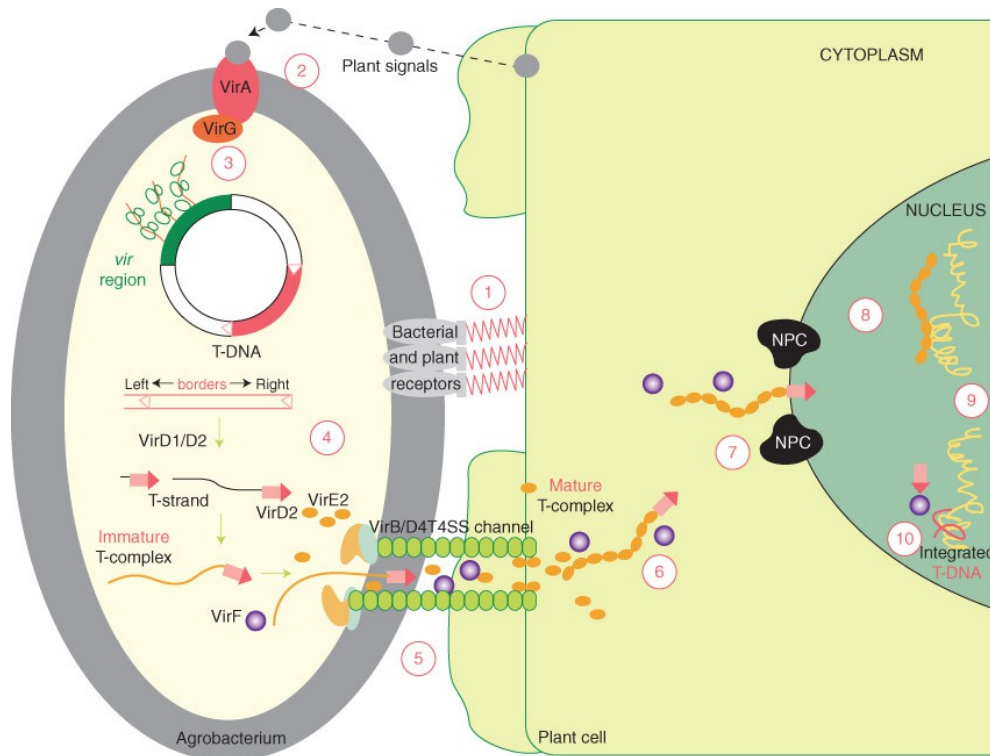
Do okužbe pride na mestu, kjer je rastlina poškodovana. Do infekcije pride zaradi sproščanja fenolnih spojin iz poškodovane rastline. Te snovi aktivirajo virulenčne gene na plazmidu Ti, ki obsegajo ~35 kb (izven regije T). Produkti teh genov (7-8) so pomembni za prenos in integracijo T-DNA.



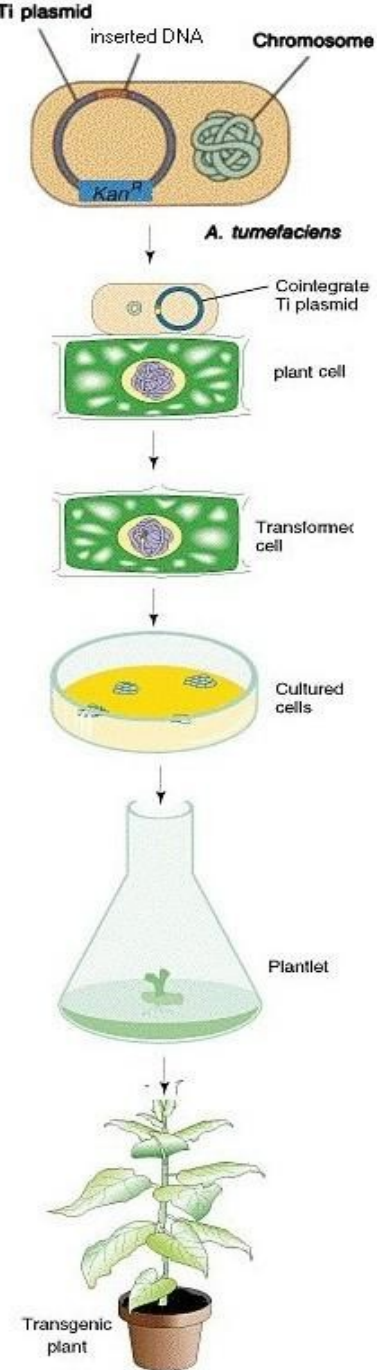
Izražanje tuje DNA v rastlinah /2

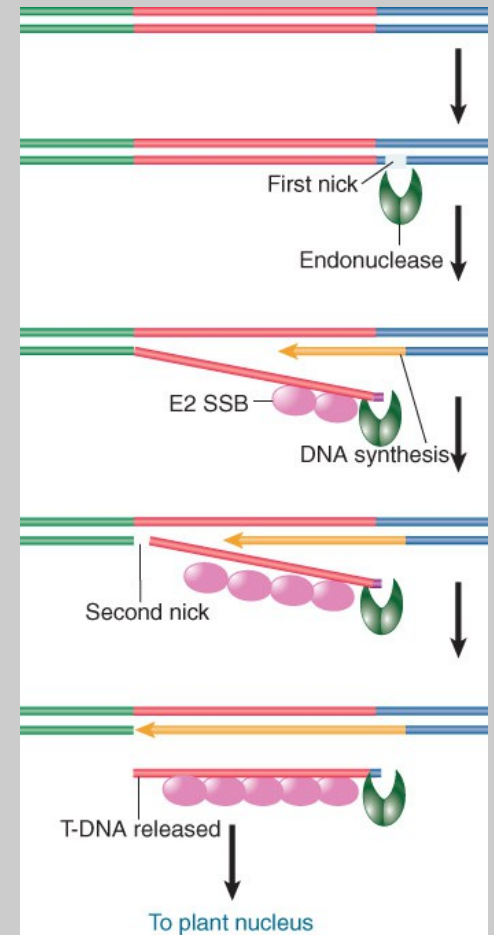
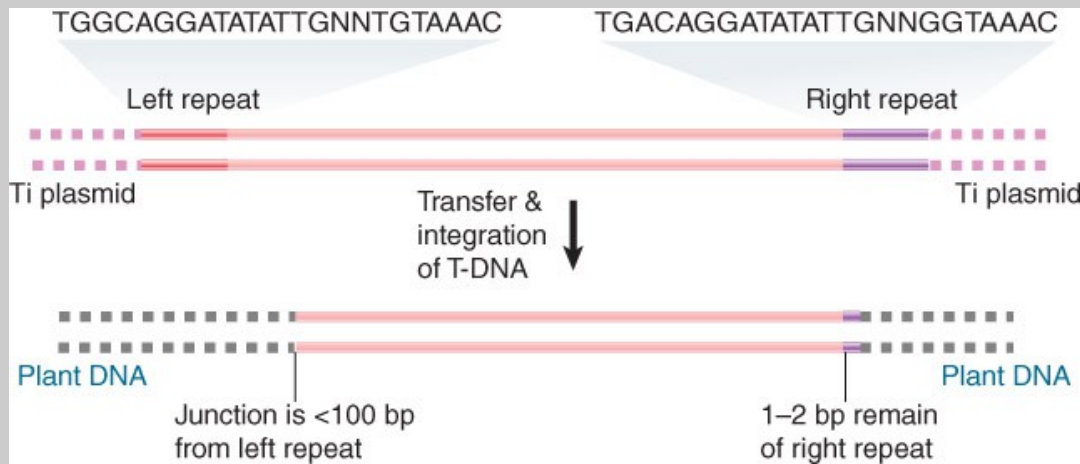
Po pritrditvi bakterijske celice s plazmidom na gostiteljsko rastlinsko celico pride do prenosa T-DNA v procesu, ki je podoben kot pri konjugaciji: ssDNA v linearni obliki.

Za vključitev v rastlinski genom so odgovorna zaporedja na desnem robu (5'-konec ssDNA), kjer so ponovitve 25 bp dolgega zaporedja. Geni znotraj T-DNA se aktivirajo šele po vključitvi v genom. Gre za encime, ki sintetizirajo avksin, citokinine (oboje so odgovorni za nastanek tumorja) in opine (kondenzacijske produkte aminokislin in keto-kislin, ki služijo kot vir ogljika za bakterije).



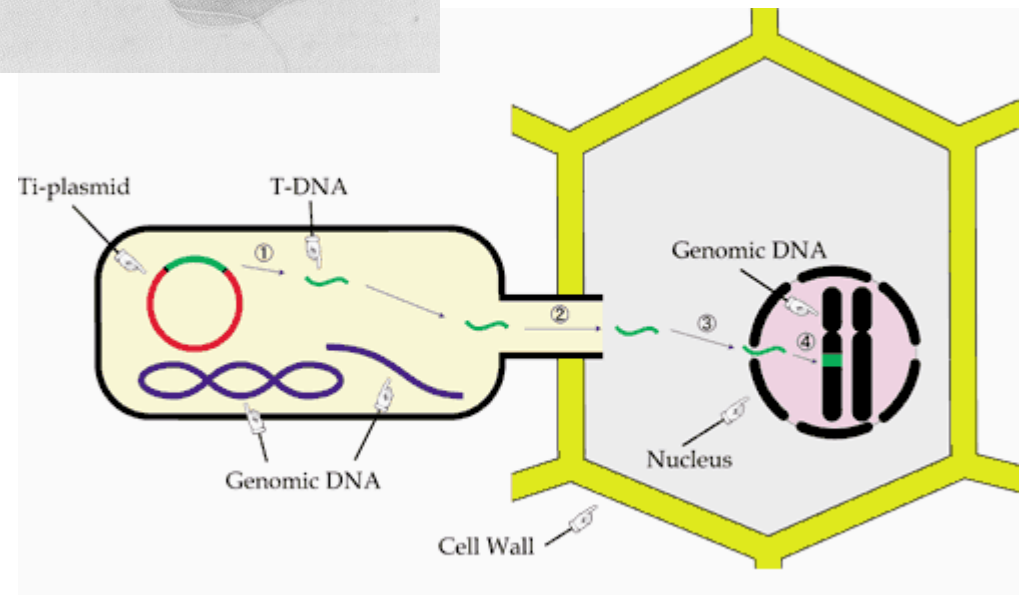
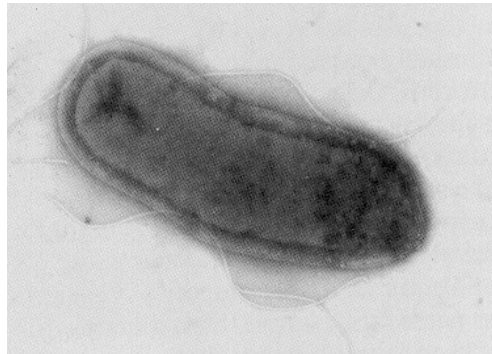
Lewin's Essential Genes 3





Izražanje v rastlinah: vnos preko *A. tumefaciens*

A. tumefaciens deluje le z nekaterimi dvokaličnicami (~140 rodov). Okužba lahko poteka preko poškodbe na rastlini ali preko protoplastov. Za nekompatibilne vrste je treba uporabiti alternativne metode vnosa.

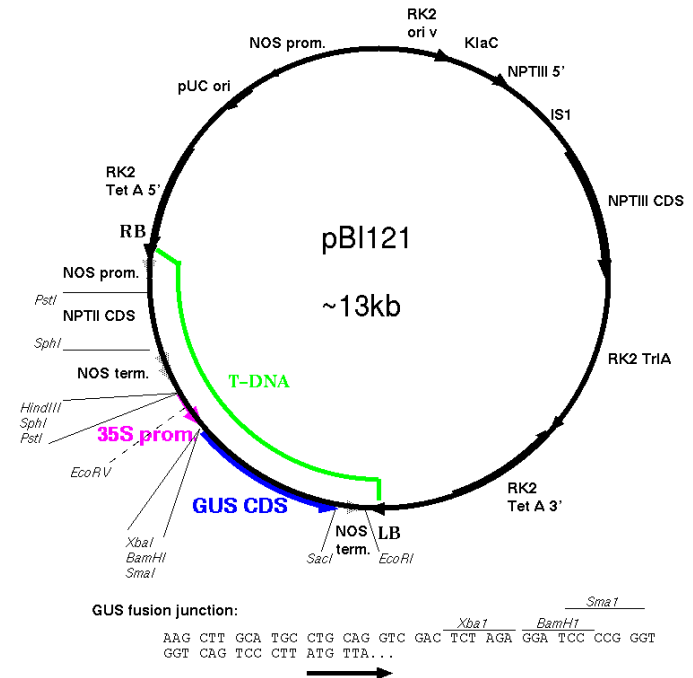
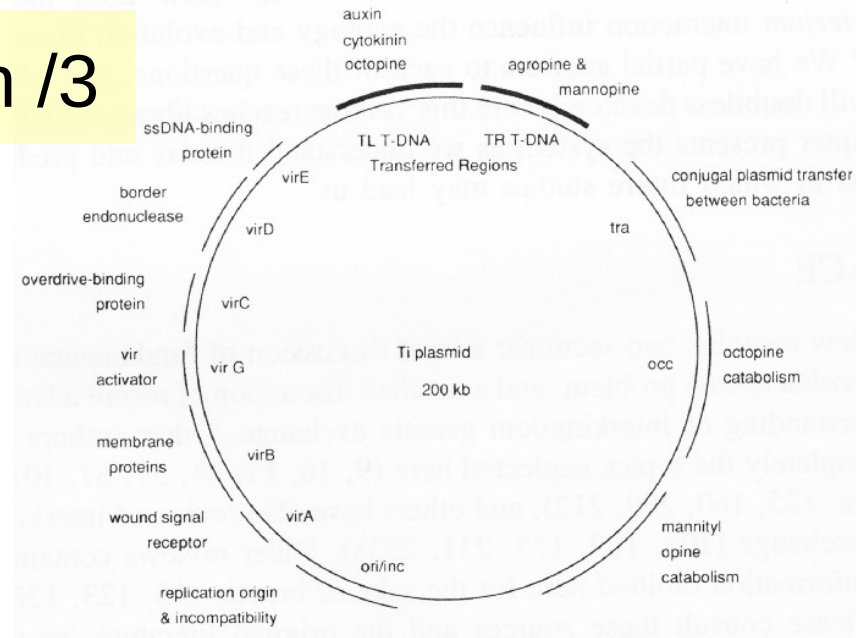


Izražanje tuje DNA v rastlinah /3

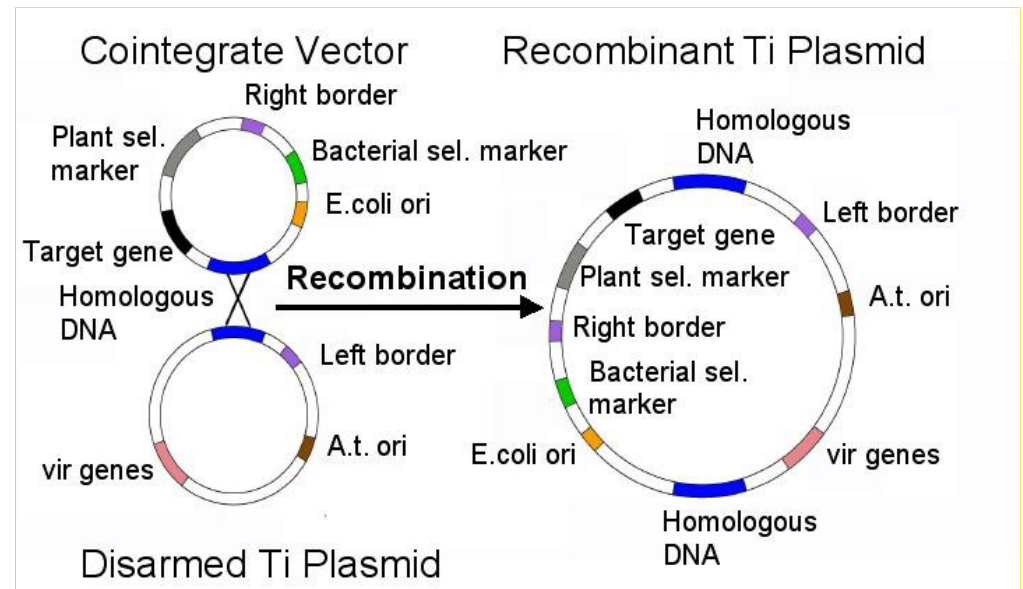
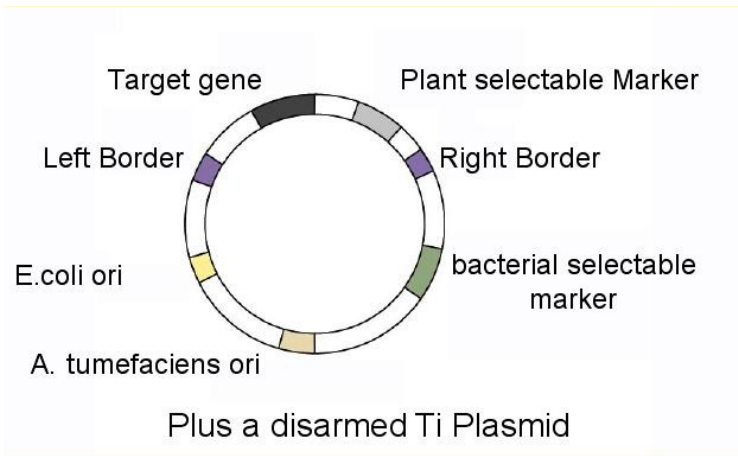
Za delo v laboratoriju so naravni plazmidi Ti zelo omejeno uporabni, saj so preveliki (~200 kb), zaradi zapisov za hormone preprečujejo regeneriranje celih rastlin po okužbi in se ne podvojujejo v *E. coli*.

Zato so razvili bolj uporabne vektorje. Ti nosijo zapis za selekcijski marker (npr. KanR pod kontrolo evkariontskega promotorja), *ori* za *E. coli*, desno robno zaporedje T-DNA in polilinker. Regije, ki inducirajo nastanek tumorja, manjkajo, prav tako regije *vir*.

Da do prenosa T-DNA sploh pride, so geni regije *vir* nujno potrebni. Zato v enem sistemu uporabljamo **prenosljive vektorje**: konstrukt pripravimo v *E. coli*, nato pa ga prenesemo v *A. tumefaciens*, ki jo dodatno okužimo z mutiranim ('razoroženim') plazmidom Ti (brez T-DNA, a s funkcionalnim *vir*). V drugem sistemu (**kointegracijski vektorski sistem**) pa v *A. tumefaciens* pride do rekombinacije med vektorjem in 'razoroženim' plazmidom Ti, tako da se v tak plazmid Ti vključi celoten klonirni vektor.



Vektorski sistemi za rastline



Vnos genov z *A. tumefaciens* deluje le pri nekaterih vrstah dvokaličnic. Okužba lahko poteka preko poškodbe na rastlini ali preko protoplastov.

Za nekompatibilne vrste je treba uporabiti alternativne metode vnosa, predvsem mikrobombardiranje.

Direktni vnos v protoplaste, vnos preko elektroporacije in liposomske fuzije s protoplasti lahko uporabimo le pri tistih protoplastih, ki jih lahko regeneriramo v celo rastlino.



Table 17.4 Plant Cell Reporter and Selectable Marker Gene Systems

	Enzyme activity	Selectable marker	Reporter gene
antibiotics	Neomycin phosphotransferase	Yes	Yes
	Hygromycin phosphotransferase	Yes	Yes
	Chloramphenicol acetyltransferase	Yes	Yes
	Gentamycin acetyltransferase	Yes	Yes
	Streptomycin phosphotransferase	Yes	Yes
	Bleomycin resistance	Yes	No
herbicides	Blasticidin <i>S. deaminase</i>	Yes	Yes
	<i>enol</i> -Pyruvylshikimate-3-phosphate synthase	Yes	No
	Phosphinothricin acetyltransferase	Yes	Yes
	Acetolactate synthase	Yes	No
	Bromoxynil nitrilase	Yes	No
	Firefly luciferase	No	Yes
reporter enzymes	Bacterial luciferase	No	Yes
	Threonine dehydratase	Yes	Yes
	Metallothionein II	Yes	Yes
	Nopaline synthase	No	Yes
	Octopine synthase	No	Yes
	β -Glucuronidase	No	Yes
	β -Galactosidase	No	Yes
	Dihydrofolate reductase	Yes	Yes
	Green Fluorescent protein et al.	No	Yes

Pogosti konstitutivni promotorji:
 CaMV 35S: promotor za rRNA 35 S virusa mozaika cvetače
 aktinski promotor riža
 ubikvitinski promotor koruze

Inducibilni:

- tkivno-specifični
- uravnjavani s hormoni, svetlobo, stresom
- samo v določeni razvojni stopnji

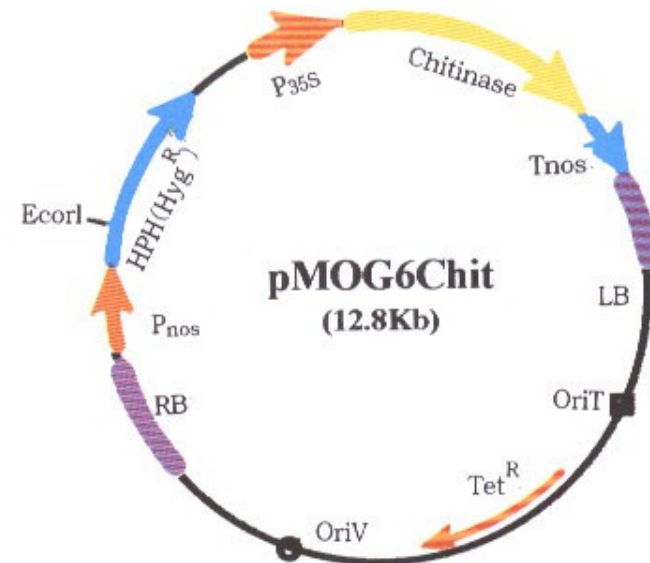
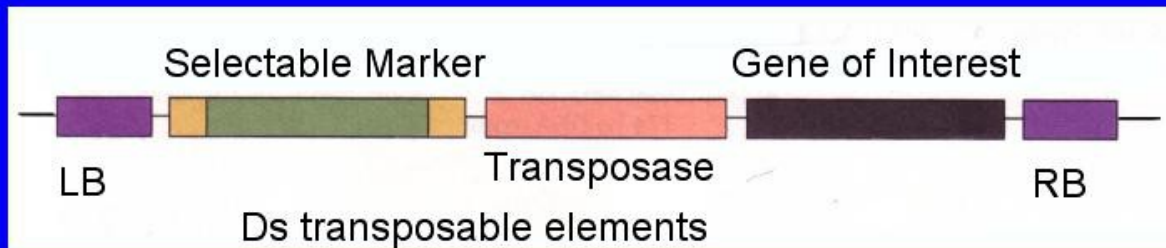
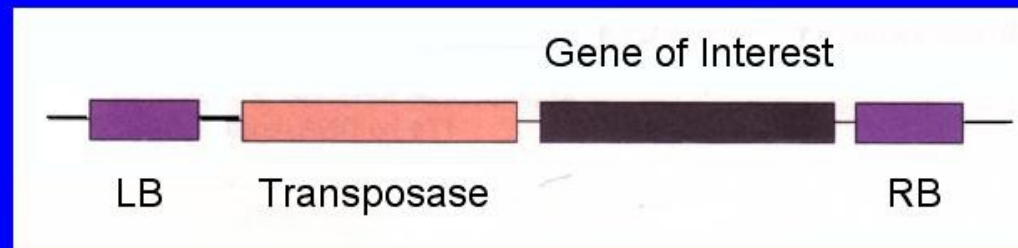


Fig 17.18 Production of Marker Free Transgenic Plants - 2



↓ Transposition



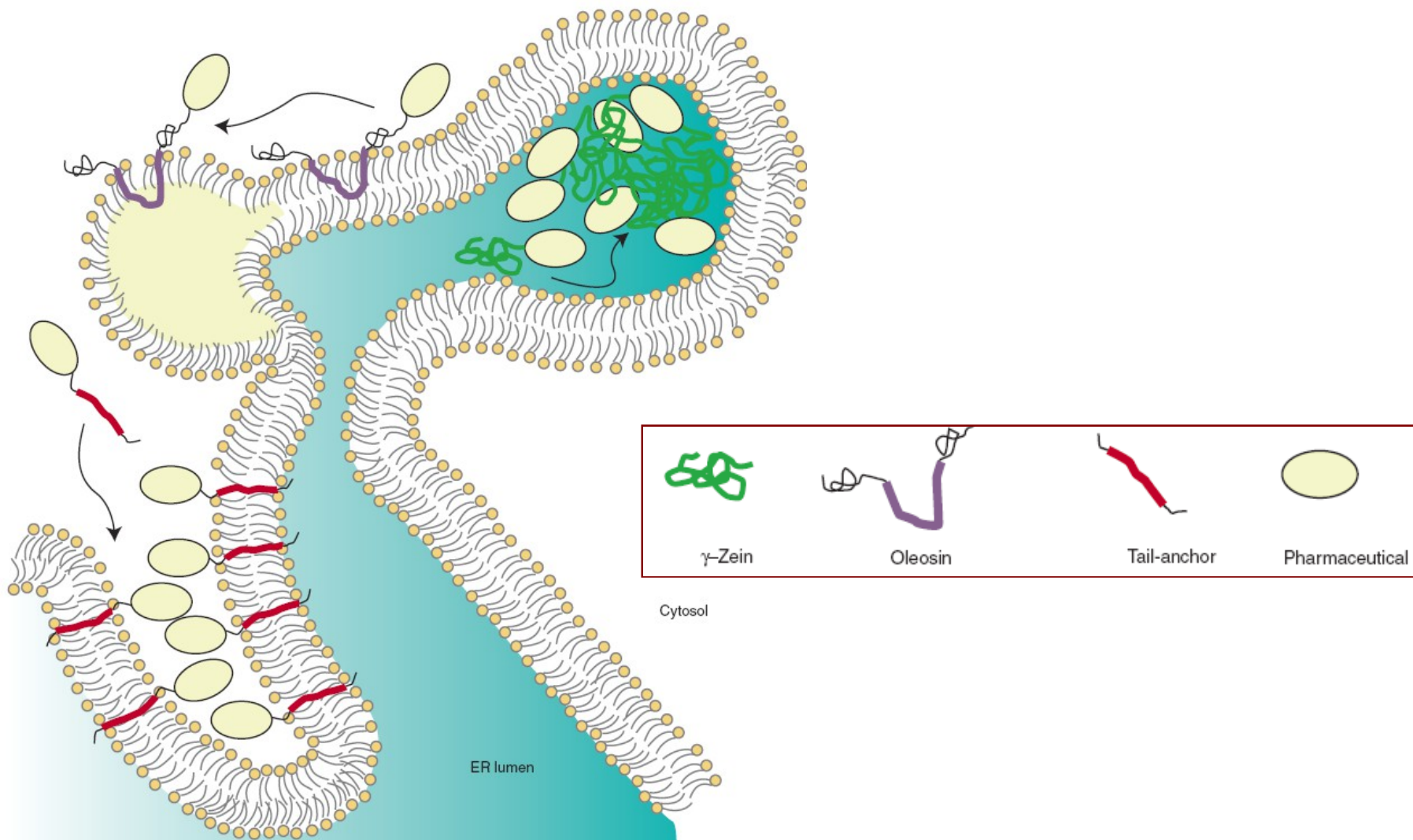


Figure 3. Strategies to accumulate high amounts of recombinant pharmaceuticals in the ER and ER-derived oil bodies. Through the use of plant protein domains (e.g., zein domains, oleosins, or tail-anchors), multiple protein fusions have been examined. Zein domains allow protein body formation within the ER lumen. Oleosin fusion products are first inserted into the external monolayer of the ER bilayer and then integrated into a nascent oil body (yellow). The tail anchor “anchors” recombinant proteins to the ER surface; upon overexpression, the ER can be commandeered in this way to develop distinct topologies that increase the stability of recombinant proteins. The hydrophobic domains of oleosin and of tail-anchored proteins are indicated in violet and red, respectively. Note that the N-terminal and C-terminal domains of oleosin are in the cytosol, and the very short C-terminal sequence of the tail-anchor is instead luminal.

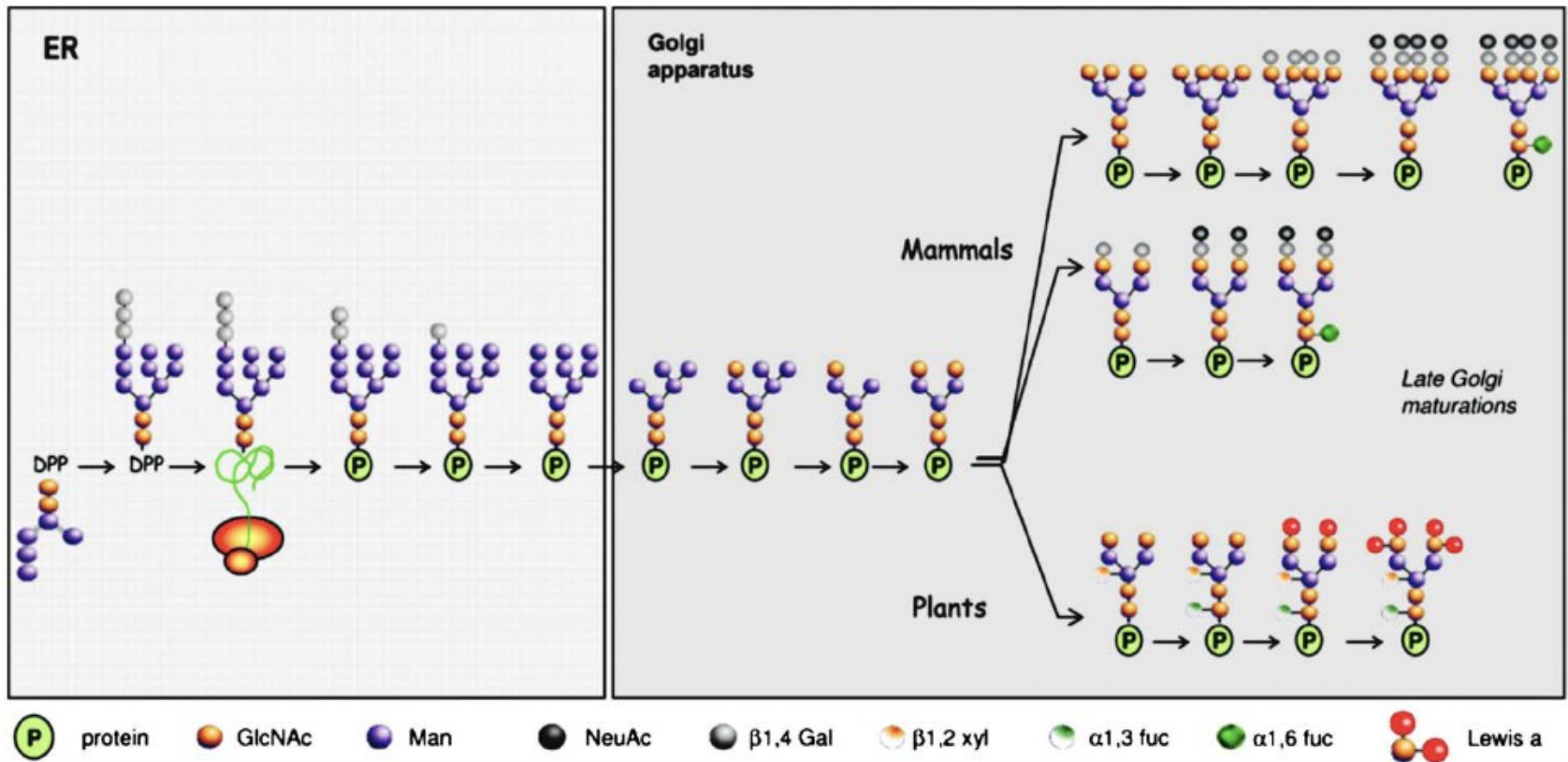


Fig. 1. Addition and processing of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus of plant and mammalian cells. A precursor oligosaccharide assembled onto a lipid carrier is transferred on specific Asn residues of the nascent growing polypeptide. The N-glycan is then trimmed off with removal of glucosyl and most mannosyl residues. Differences in the processing of plant and mammalian complex N-glycans are late Golgi maturation events.