

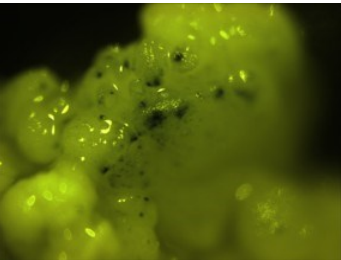
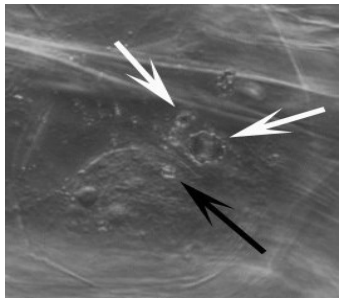
Lecția 4. TRANSFORMAREA GENETICĂ A PLANTELOR (II).

Metode directe de transformare genetică. Regenerarea, selecția și analiza eficienței transferului de gene



Conținut:

1. Utilizarea protoplastelor pentru transferul direct de ADN
2. Metoda biolistică de transfer a genelor
3. Aspecte generale privind cultura *in vitro* în obținerea plantelor modificate genetic
4. Gene marker utilizate în selecția plantelor modificate genetic
5. Analiza eficienței transferului de gene

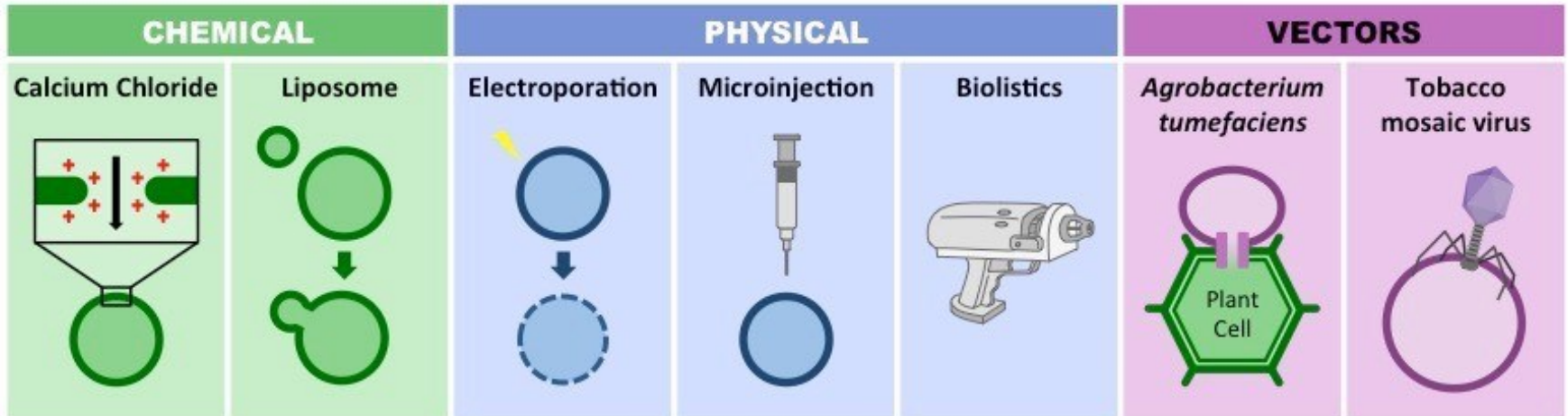
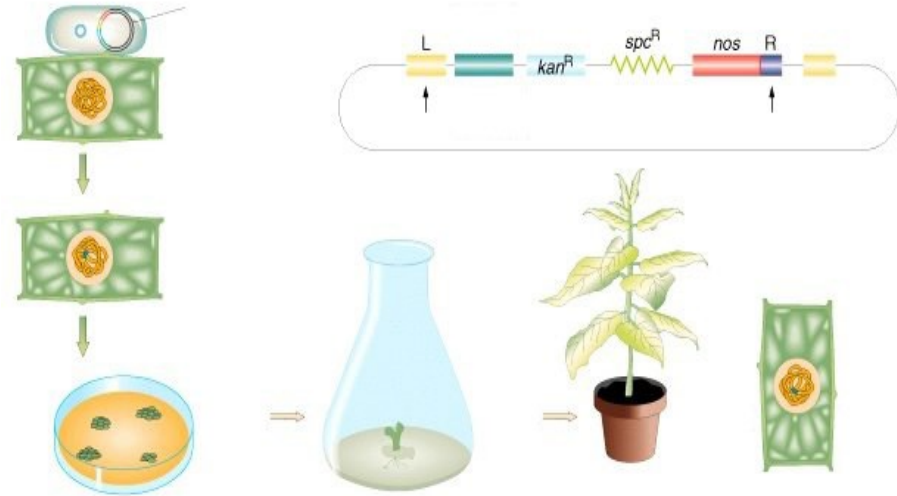


Recapitulare

1 – Identificarea și izolarea genei „de interes”;

2 – Obținerea ADN-ului recombinat (integrarea transgenei în vector);

3 – Transferul genei himere în celula vegetală prin metode directe sau indirecte



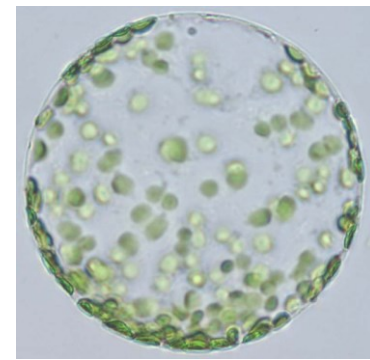
1. UTILIZAREA PROTOPLASTELOR PENTRU TRANSFERUL DIRECT DE ADN

Exemple de metode directe de transformare a protoplastelor

1. **Tratamente chimice cu agenți permeabilizanți (polietilenglicol – PEG)**
2. **Electroporare, sonicare**
3. **Utilizarea fibrelor de carbura de siliciu**
4. **Transferul ADN mediat de lipozomi**
5. **Transferul ADN prin electroforeză**
6. **Microinjectarea**

Metodele de transfer direct a genelor se realizează prin **procedee fizice, electrice și chimice**. În comparație cu sistemul biologic, acestea **nu sunt dependente de genotip**, însă eficiența lor variază în funcție de tipul celulei-țintă, de capacitatea lor de regenerare, întrucât majoritatea transformărilor se efectuează pe celule cultivate *in vitro*.

1.1. Tratamente chimice cu agenți permeabilizanți



Protoplastele sunt sisteme celulare utilizate pentru transferul de ADN și selecția transformanților.

Protoplaste - celulele vegetale lipsite de perete celular. Îndepărtarea peretelui celular elimină principala barieră în calea pătrunderii ADN străin în celula vegetală.

Izolarea protoplastelor acționează ca un factor de stres, fapt ce determină reacții de răspuns similare celor care au loc în caz de rănire. Aceste reacții de răspuns declanșează **starea de competență celulară (totipotență)** - criteriu important pentru transformarea genetică eficientă.

Suspensia de protoplaste se aseamănă cu o suspensie bacteriană având avantaje similare - **posibilitatea de a cultiva populații mari de celule individuale în medii de cultură bine definite.**

Tesuturile derivate din protoplaste au, în general, origine clonală provenind din celule individuale.

Eficiența selecției transformanților este mare în cazul protoplastelor, deoarece se evită formarea de himere, destul de frecvente la nivelul sistemelor multicelulare.

<https://www.youtube.com/watch?v=LjqmE3mnrQU>

Rice protoplast isolation

!!! Transferul genelor în protoplaste se bazează pe

- 1) proprietatea macromoleculilor de ADN de a traversa membrana plasmatică**
- 2) totipotentialitatea protoplastelor**

Primele cercetări (Draper și colab., 1982) care au indicat asupra posibilității de transformare genetică stabilă a protoplastelor s-au bazat pe **permeabilizarea reversibilă a membranei plasmatică pentru ADN-ul străin cu polietilenglicol**, formula chimică: **$\text{HOH}_2\text{C}-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$**

PRINCIPIUL tehnic

Suspensia de protoplaste în prezență de polietilenglicol în concentrații de 25-40%, supusă agitării continue în sens circular, timp de 30 minute, determină inițial deshidratarea și ulterior aglutinarea protoplaștilor. Se formează legături de hidrogen cu radicalii pozitivi ai proteinelor, fosfolipidelor și glucidelor. Acest proces este stimulat de concentrații ridicate de ioni de Ca^{++} și valori mari ale pH-ului.

Transformarea protoplastelor prin permeabilizare cu PEG a fost realizată cu succes pentru multe specii de plante, atât dicotiledonate cât și monocotiledonate, cheia succesului reprezentând existența unui protocol eficient de regenerare a plantelor din protoplaste.

!!! Deoarece PEG prezintă un anumit grad de toxicitate, iar în unele cazuri, determină formarea celulelor multinucleate prin fuziunea mai multor protoplaști, o metodă alternativă de transfer a ADN-ului în protoplaste este *electroporarea*.

1.2. Transferul genelor în protoplaste prin electroporare

Electroporarea implică permeabilizarea reversibilă a membranei plasmatică (formarea porilor tranzitorii prin care ADN străin pătrunde în citoplasmă) datorită unor impulsuri de curent continuu de amplitudine crescută și durată foarte scurtă.

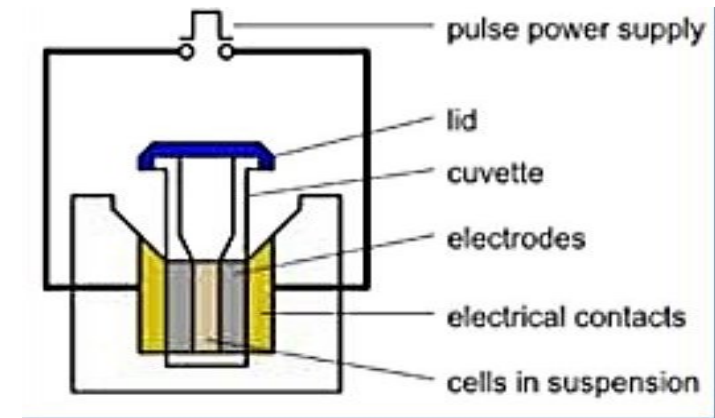
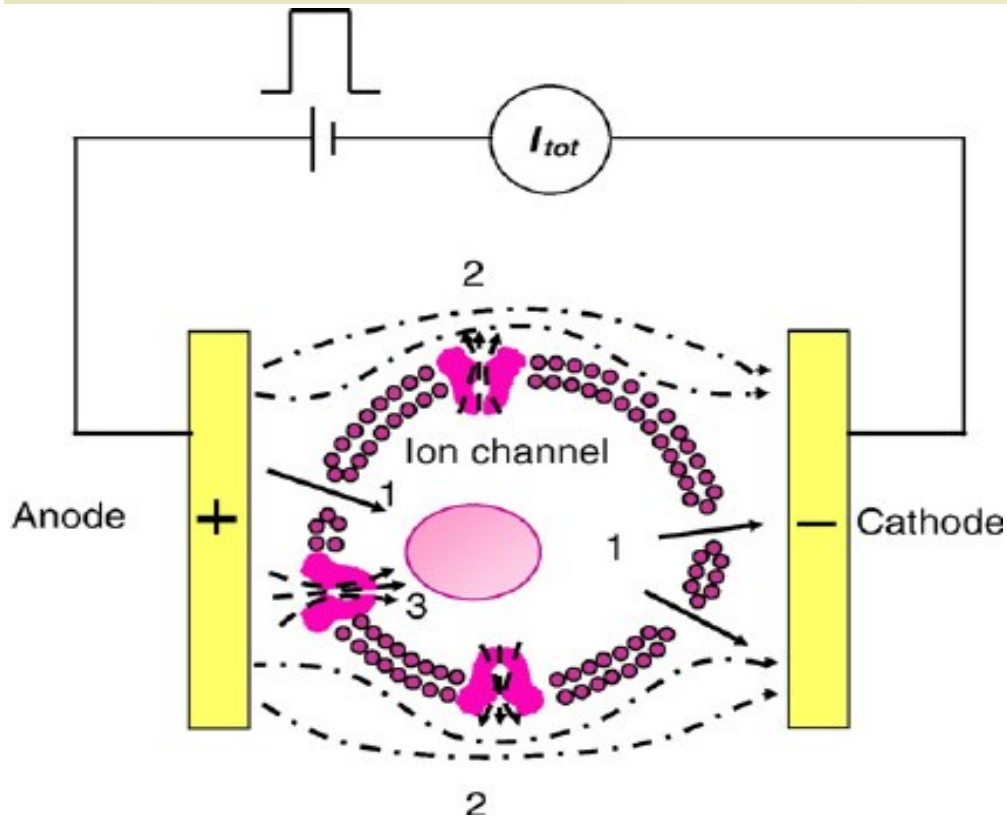
Electroporarea a devenit o metodă de rutină pentru transformarea **protoplastelor vegetale**, dar și pentru **celulele de mamifere** sau **bacteriene**.

Prin electroporarea protoplastelor se elimină necesitatea utilizării unor gene marker.

La plante electroporarea protoplastelor se folosește eficient, atât pentru analiza expresiei transiente a transgenelor, cât și pentru transformarea permanentă, pentru numeroase specii de plante incluzând cerealele.

PROCEDURA

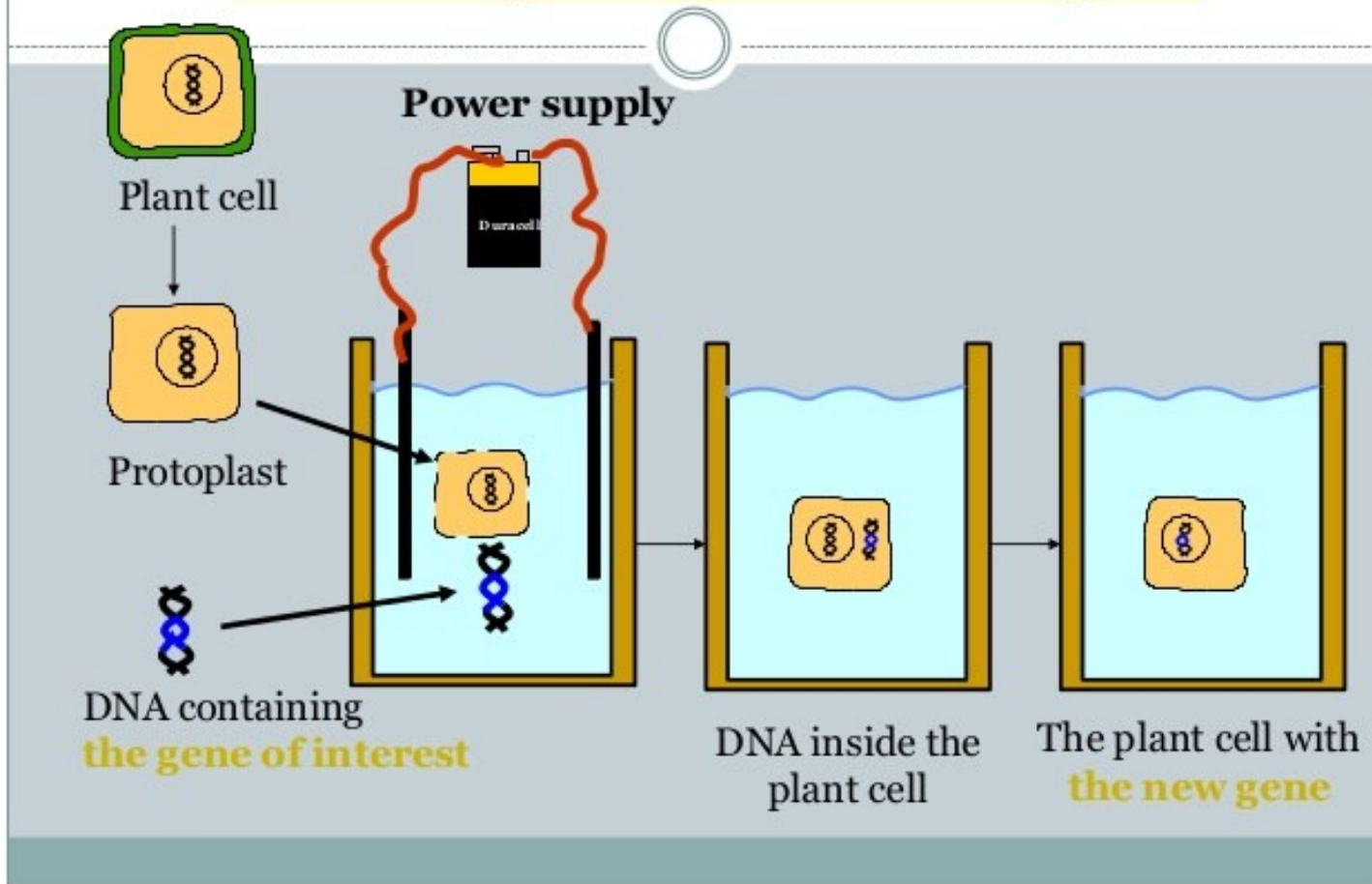
O suspensie de ADN plasmidial care conține gena clonată, în concentrație mare, se adaugă la o suspensie de protoplaste (receptoare de ADN) în cuva prevăzută pentru electroporare. Se aplică un șoc electric de 200-600 V/cm timp de 30-100 milisecunde. Ca rezultat, în membranele plasmatică se formează pori care permit pătrunderea ADN-ului exogen în citoplasmă.



<https://www.youtube.com/watch?v=ulA8xsVji80>
Electroporation

Avantajele electroporării - **eficiența crescută** a incorporării ADN străin, **reproductibilitatea** și **simplitatea** acestei metode.

Electroporation Technique

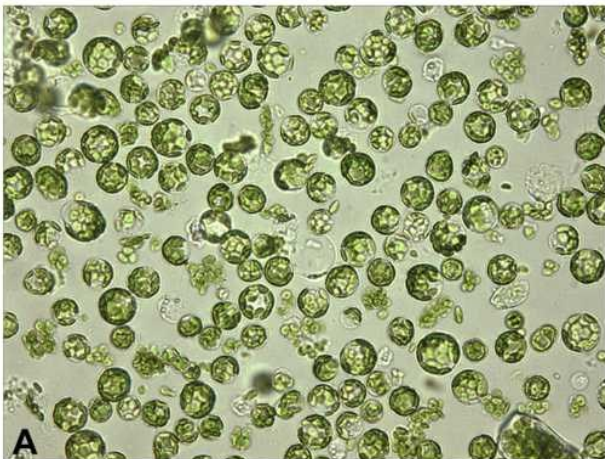


Sonicarea – permeabilizarea membranei protoplastelor în prezența **ultrasunetelor** s-a dovedit, de asemenea o metodă eficientă pentru transferul ADN în protoplaste vegetale. Ulterior metoda a fost aplicată și celulelor sau țesuturilor întregi, dar este utilizată pe scară mai redusă comparativ cu electroporarea.

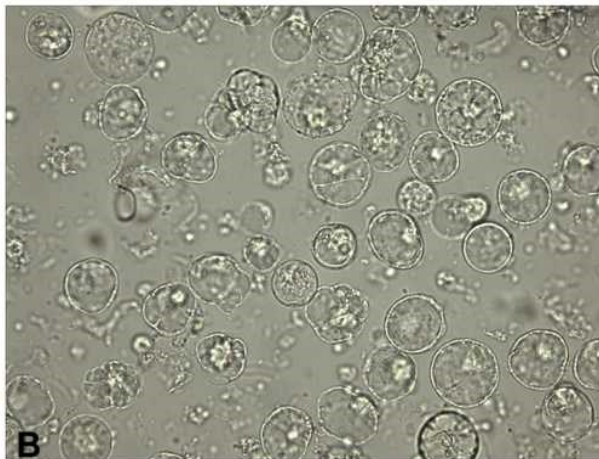
Eficiența transformării prin Electroporare și utilizarea PEG este influențată de o serie de parametri:

- greutatea moleculară și concentrația PEG,
- tensiunea, tipul și durata impulsului electric,
- dimensiunile și configurația plasmidei (superrăsucită sau liniarizată),
- starea fiziologică și stadiul din ciclul celular în care se află protoplastele-recipient, protocolul de regenerare pentru fiecare specie „de interes”

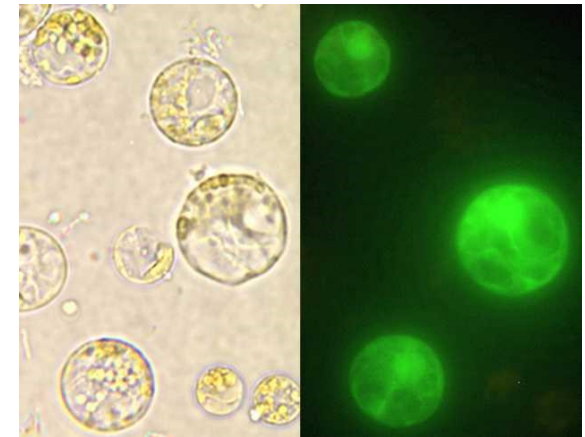
Un dezavantaj al transferului de gene în protoplaste este probabilitatea mare de a integra mai multe copii ale transgenei.



Frunze



Radacini



1.3. Utilizarea fibrelor de carbura de siliciu

Transferul direct al ADN-ului plasmidial prin utilizarea **fibrelor de carbura de siliciu** reprezintă o metodă relativ nouă, primele succese fiind înregistrate în anii 1990 la porumb.

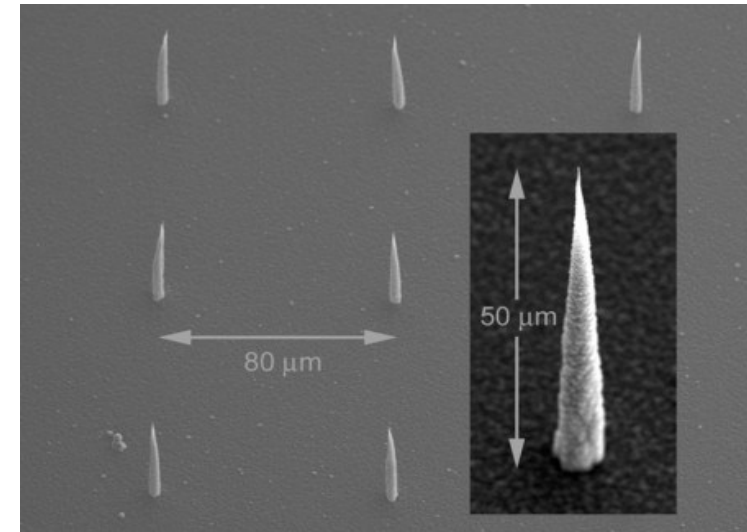
PRINCIPIUL tehnic

În tuburi ependorf se introduc suspensii de celule, ADN plasmidic și fibre de carbura de siliciu într-un mediu hipertonic, determinat de sorbitol 0,25 M și manitol 0,25 M. Aceste tuburi sunt inițial inversate și apoi vortexate. Ca urmare a coliziunilor între suspensiile celulare și fibrele ascuțite ca niște ace, peretele celular este perforat și ADN-ul pătrunde în citoplasmă.

Până în prezent metoda a fost folosită cu succes la porumb și tutun

Dezavantaje

- pot afecta transferul - modul și intensitatea agitării
- tipul de celule/țesut-țintă utilizat. Până în prezent s-a reușit utilizarea doar a suspensiilor cu celule mici cu perete celular subțire
- fibrele de carbura de siliciu pot fi cancerigene din cauza proprietăților similare cu fibrele de azbest.



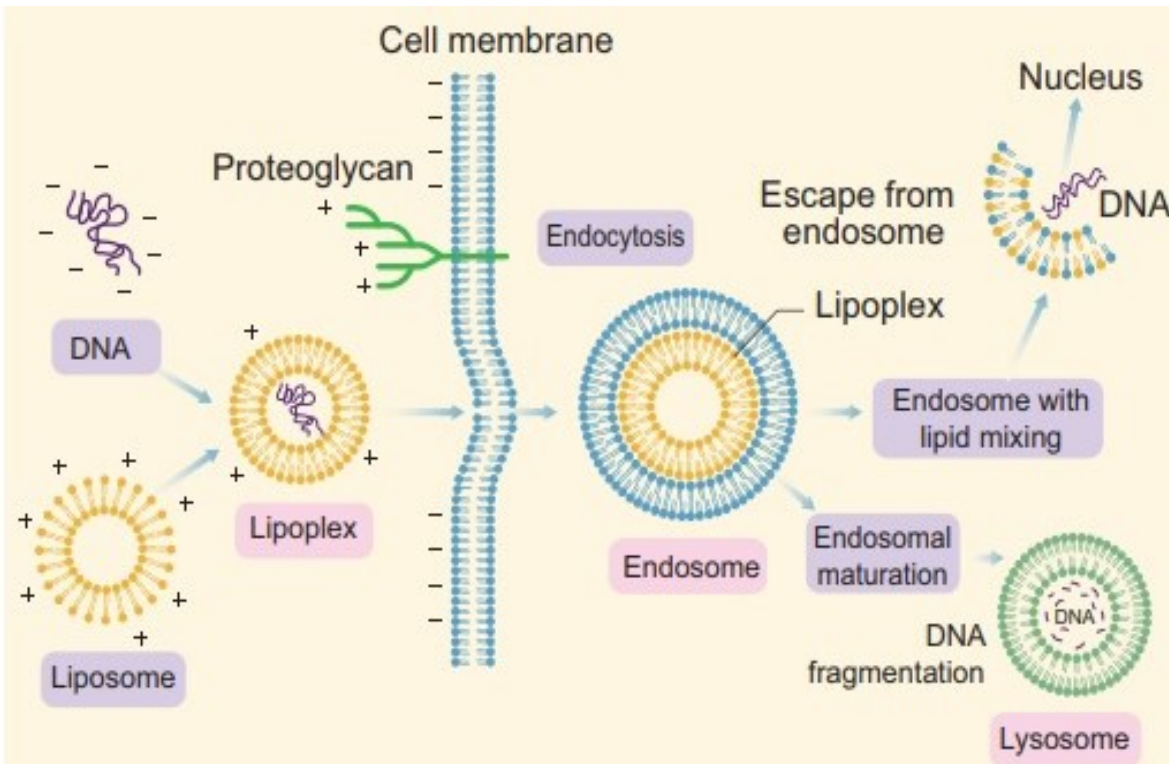
1.4. Transferul ADN mediat de lipozomi

PRINCIPIU

Posibilitatea fuziunii **lipozomilor încărcati cu ADN** cu membrana plasmatică a protoplastelor și ulterior eliberarea ADN străin în citoplasma celulelor recipient a fost demonstrată în 1990 (Cacboche, 1990).

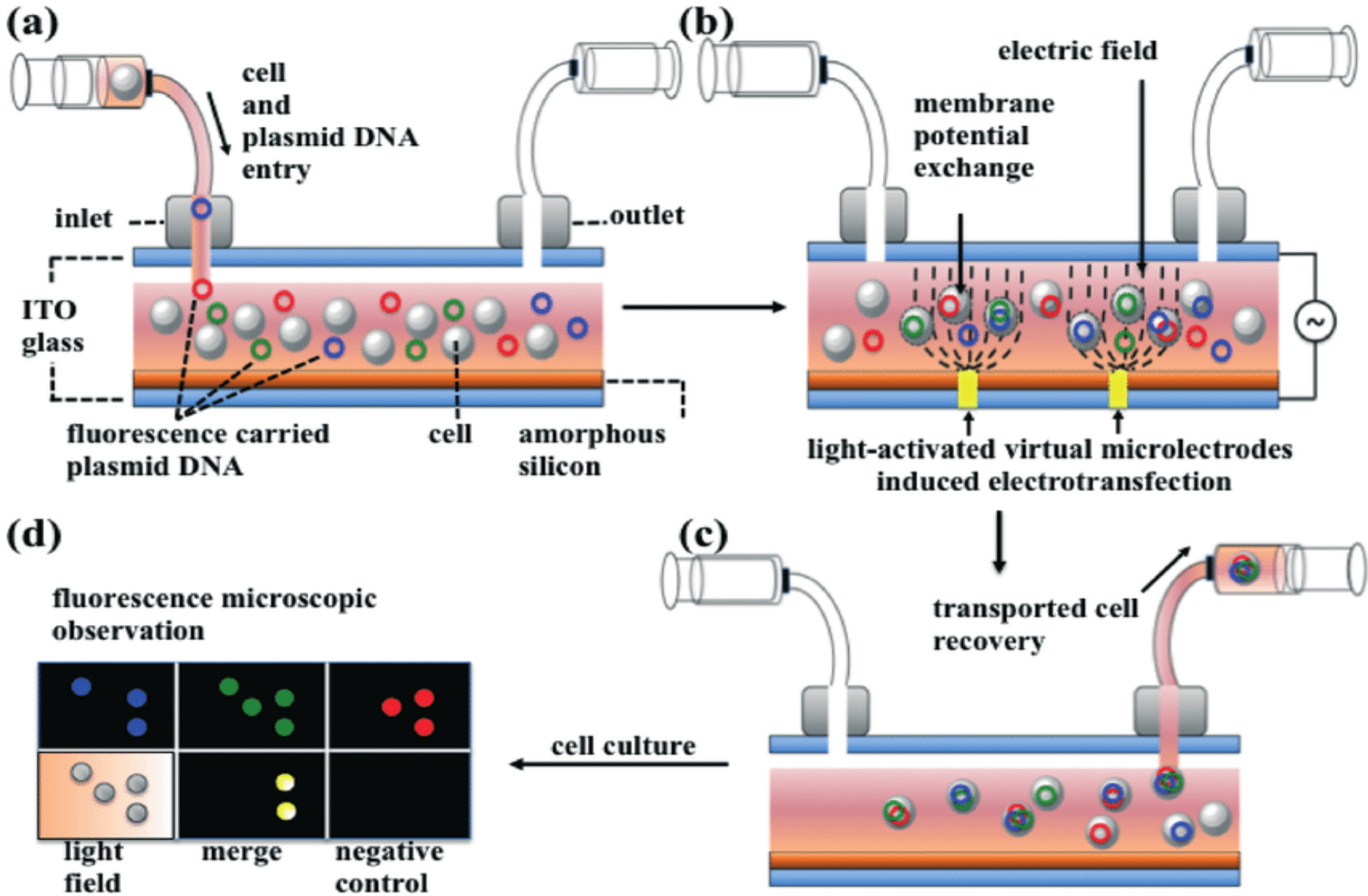
!!! Idei: transportul ADN în țesuturi întregi, fiind presupusă trecerea lipozomilor prin plasmodesme. S-a demonstrat că, peretele celular este o barieră pentru lipozomi iar plasmodesmele se închid ca răspuns la rănire.

- injectarea lipozomilor în vacuola celulelor. Are loc fuziunea lipozomilor cu tonoplastul și eliberarea ADN în citoplasmă. Această metodă are aplicații restrânse deoarece celulele vacuolate nu sunt totipotente



Metoda de transfer a ADN mediat de lipozomi nu prezintă avantaje deosebite comparativ cu alte metode de transfer direct, de aceea este mai puțin utilizată.

1.5. Transferul ADN prin electroforeză



1.6. Microinjectarea

Microinjectarea - introducerea ADN-ului în nucleul celulei vegetale, sub control optic. Metodă aplicată cu succes pentru prima dată în a doua jumătate a anilor '90 ai secolului trecut la tutun și lucernă. Microinjectarea celulei vegetale întregi sau a țesuturilor este, de asemenea posibilă, dar se realizează mai greu din punct de vedere tehnic.

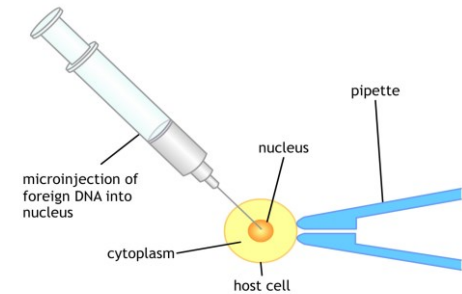
Dezavantaj

Este una dintre cele mai laborioase și complexe metode. Prezența peretelui celular constituie atât o barieră fizică, prezentând dificultăți în penetrarea peretelui, cât și o vizibilitate redusă a nucleului.

Prezența vacuolei mari, de asemenea, reprezintă o problemă, deoarece există riscul distrugerii tonoplastului în procesul penetrării spre nucleu.

Avantaje: permite controlul numărului moleculelor transferate, face posibil cotransferul de ADN, ARN, proteine sau chiar mitocondrii. Transferul moleculelor poate fi efectuat în celule izolate, structuri multicelulare cu mare competență pentru regenerarea plantelor.

Optimizare: imobilizarea protoplastelor recipiente într-un strat foarte subțire de mediu solidificat cu agaroză. Protoplastele sunt imobilizate deasupra unei grile care permite localizarea și monitorizarea prin fotografiere a protoplastelor microinjectate, respectiv a celulelor sau calusurilor derivate din acestea.



© ABPI 2017

<https://www.youtube.com/watch?v=R2OVe1qx444>

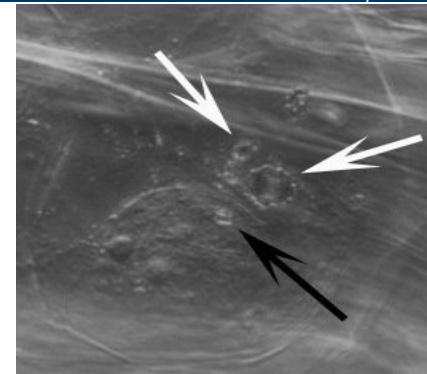
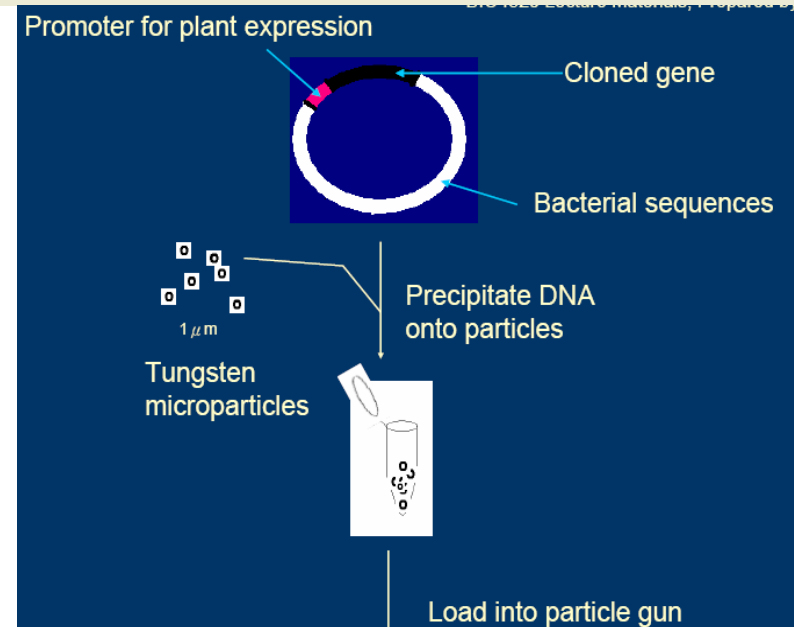
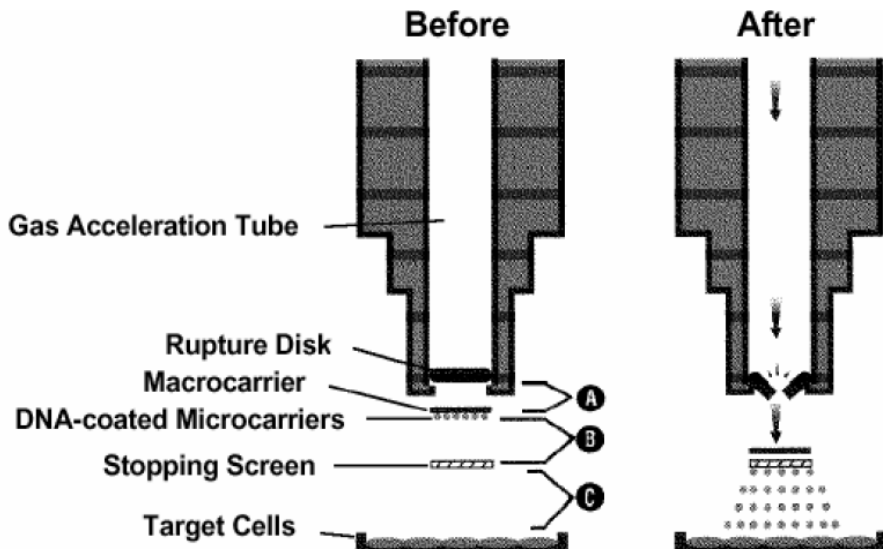
Microinjection

2. METODA BIOLISTICĂ DE TRANSFER A GENELOR

Metoda biolistică (în engleză *biologic ballistic - biolistic*), elaborată în 1987, se consideră a fi un progres esențial în manipularea genetică, întrucât realizează transferul genelor în plantele pentru care nu sunt eficiente transferul mediat de *Agrobacterium* sau metodele bazate pe utilizarea de protoplaste.

Principiul metodei constă în utilizarea unor microproiectile lansate cu viteză mare pentru introducerea ADN-ului în celulele vii.

ADN-ul este precipitat cu clorură de calciu la suprafața unor particule de aur coloidal sau tungsten, cu diametrul mai mic de $1\mu\text{m}$ diametru.



Procedură generală

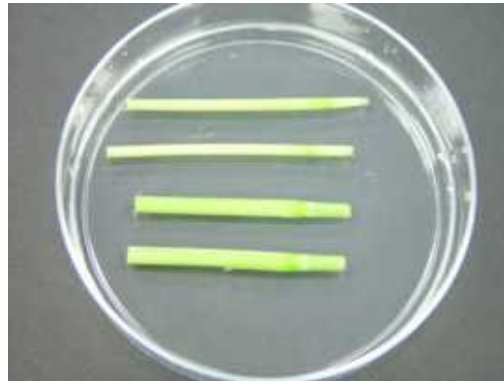
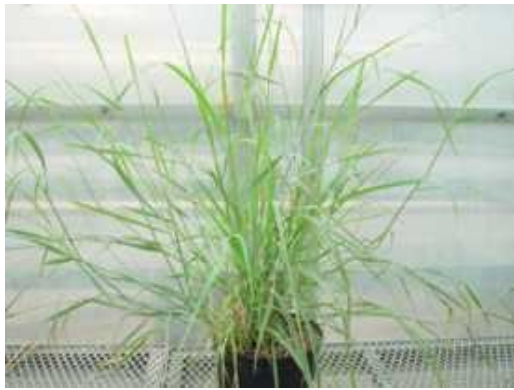
- Particulele sunt amplasate într-un glonț de plastic (macroproiectil), introdus în țeava unui dispozitiv special construit în acest scop.
- Țesutul vegetal țintă este plasat în apropierea unui mic orificiu de la capătul țevii. Țeava pistolului și camera cu țesut se află în vid. În caz contrar, rezistența aerului reduce viteza macroproiectilului.
- Macroproiectilul este propulsat spre țesut, dar este stopat de o placă de protecție, astfel încât particulele pe care le poartă pătrund prin orificii și lovesc celulele.
- După „bombardare”, celulele sunt transferate în cultură pentru regenerarea plantelor.

Avantaje

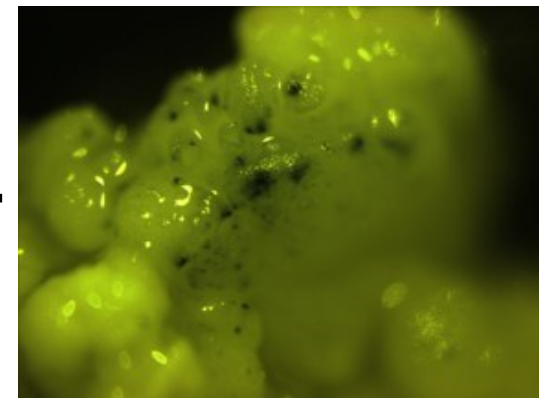
- este o metodă ușor de aplicat,
- printr-o procedură pot fi țintite mai multe celule,
- celulele supraviețuiesc după transferul ADN,
- genele purtate de particule își păstrează activitatea biologică,
- particulele ajung la nivel superficial sau în profunzimea unui organ vegetal,
- celulele/țesutul țintă pot fi foarte diferite: polen, celule în suspensie, embrioni imaturi, celule din țesuturi diferențiate sau chiar meristeme.

S-a reușit transferul direct în țesuturi vegetale a celulelor bacteriene întregi.

Material țintă pentru transferul genelor prin metoda biolistică



Biolistic



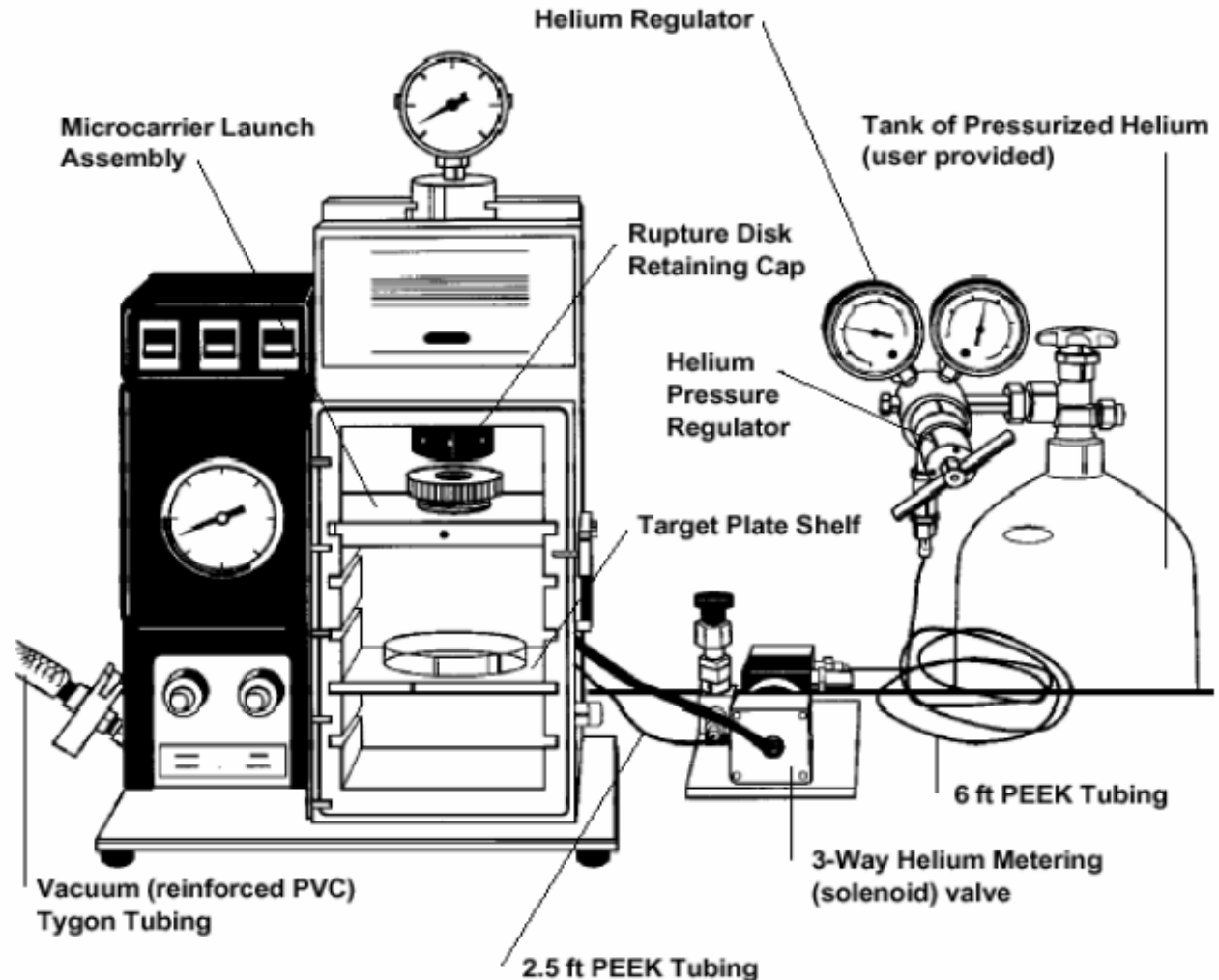
Metoda biolistică este utilizată în numeroase laboratoare

https://www.youtube.com/watch?v=VqklR_8YRfA

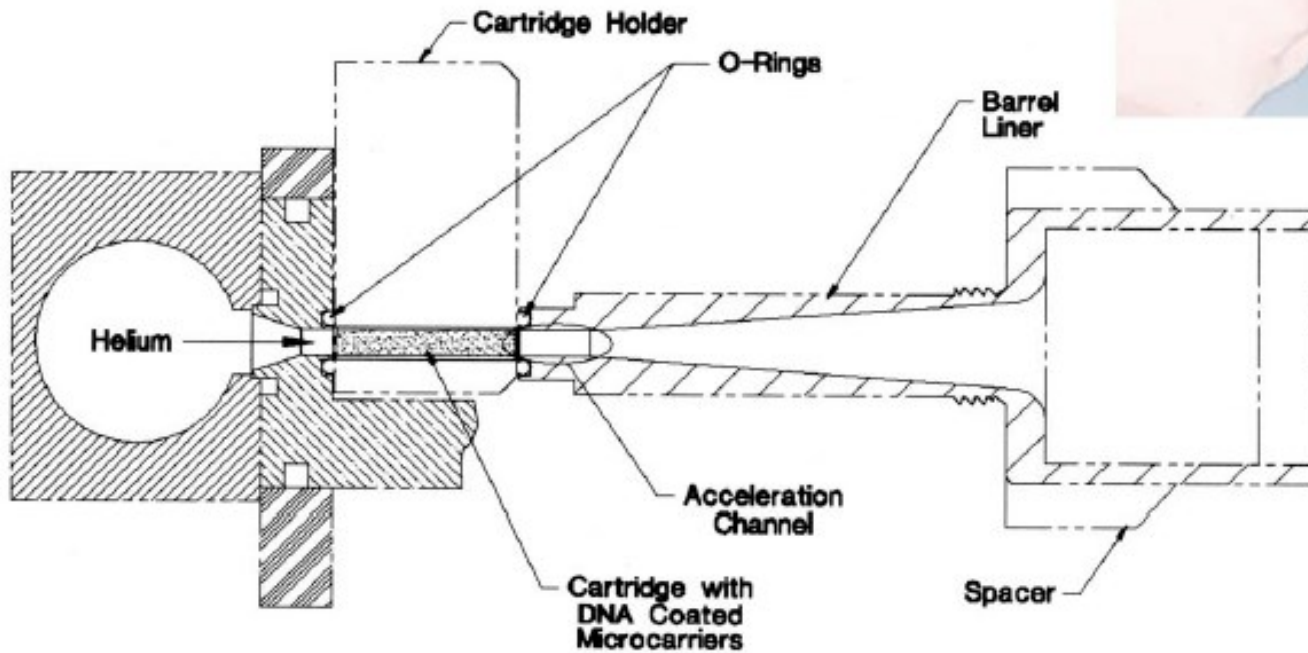
<https://www.youtube.com/watch?v=8kS5TOLRKdc>



PDS 1000-HE
~\$20,000



Helios Gene Gun System



Microșintirea – o varianta a metodei biolistică/balistică

Microșintirea – sunt generați aerosoli printr-un șoc de presiune, ulterior aceștea sunt accelerați într-un capilar foarte îngust. Prin intermediul acestui sistem, 80% din totalul particulelor ajung într-o regiune cu diametrul de numai 150 de microni: meristemul. Această metodă balistică ameliorată este folosită pentru transformarea inflorescenței și meristemelor florale.

Principalii factori limitativi sunt: masa și materiile prime ale particulelor, care trebuie să reprezinte metale inerte din punct de vedere chimic; natura, forma și concentrația ADN-ului.

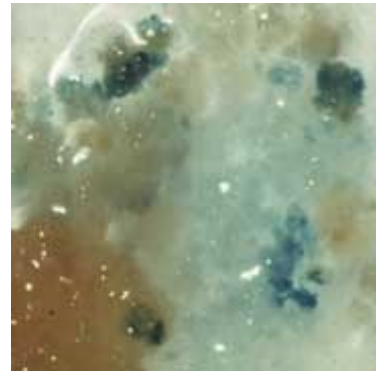
Pentru învelirea particulelor metalice cu ADN, se recurge la aditivi (spermidina, clorura de calciu).

Alți parametrii cu incidență asupra fiziologiei țesutului sunt: temperatura, fotoperioada și umiditatea în care sunt menținute plantele-donor, explantele și țesuturile transformate.

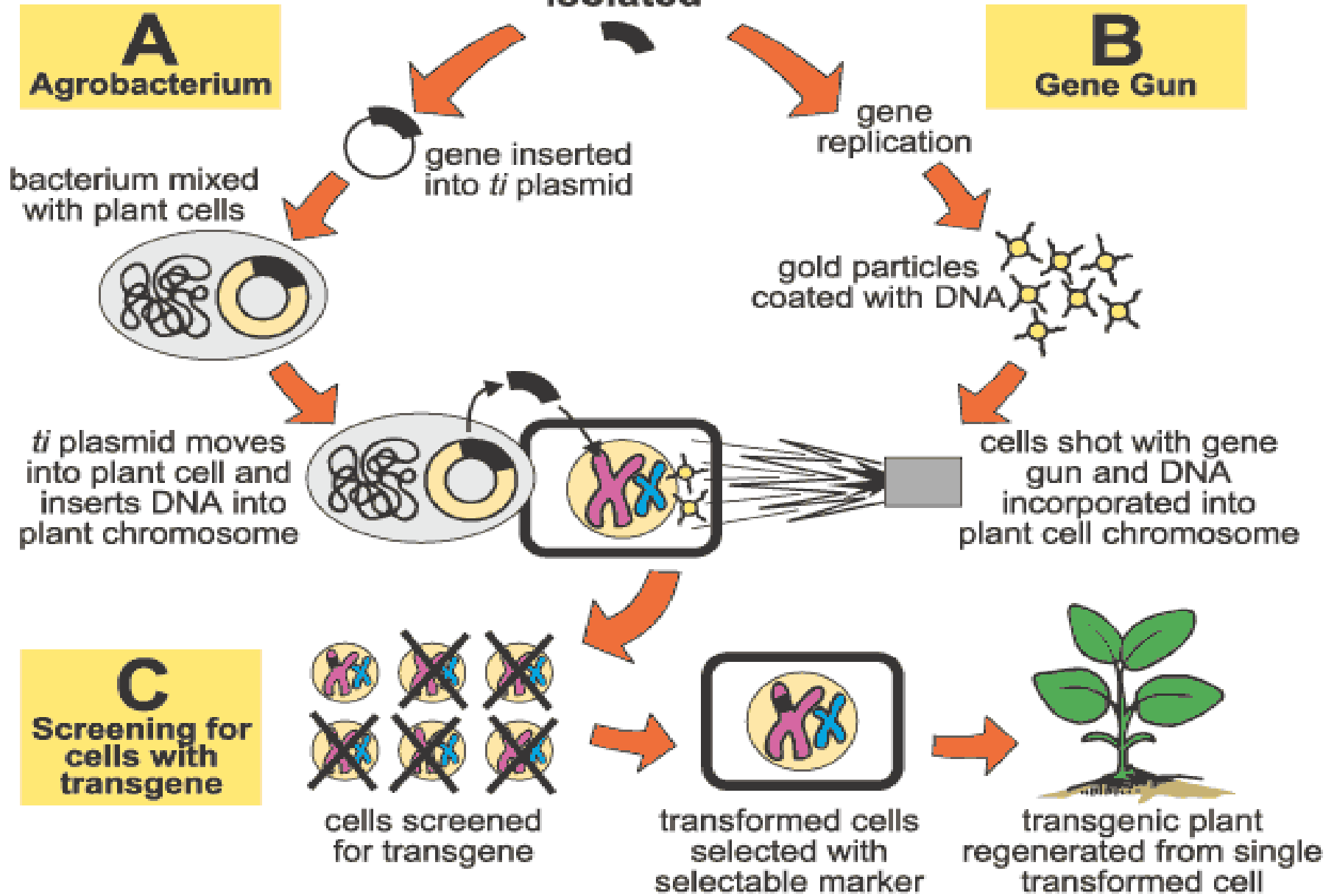
Avantajele acestei tehnici constau în transformarea țesuturilor organizate, potențial regenerabile.

Insuccesul transgenezei

- Selințierea transgenei
- Efect de poziție
- Secvențele ADN se modifică prin metilare
- Inhibiția procesingului ARNm, transportul și translația în proteine



GENE identified and isolated

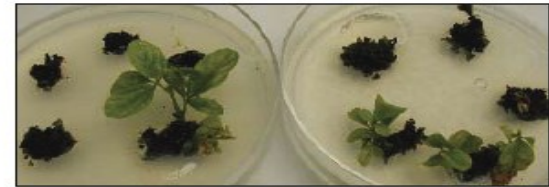
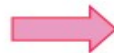


3. ASPECTE GENERALE PRIVIND CULTURA *in vitro* ÎN OBȚINEREA PMG

Regenerarea, selecția și testarea plantelor reprezintă componente esențiale ale unui protocol de transformare genetică.

Totipotența este caracteristică de bază care asigură posibilitatea **celulelor transformate genetic** de a regenera în **plante transgenice**. Atingerea acestui obiectiv are loc prin **tehnologia culturii *in vitro***.

Plantele **potențial transformate** se supun unor etape intermediare de selecție în laborator și ulterior în câmp pentru o testare a **stabilității expresiei transgenei** în condiții naturale.



Material-țintă

Selecția și regenerarea



Creșterea și dezvoltarea

Înrădăcinarea

Cultură *in vitro* include, atât cultura **explantelor** care își păstrează integritatea - **embrioni zigotici, meristeme**, cât și a celor pentru care condițiile *in vitro* determină inițial o **dediferințiere celulară**, mai mult sau mai puțin pronunțată.

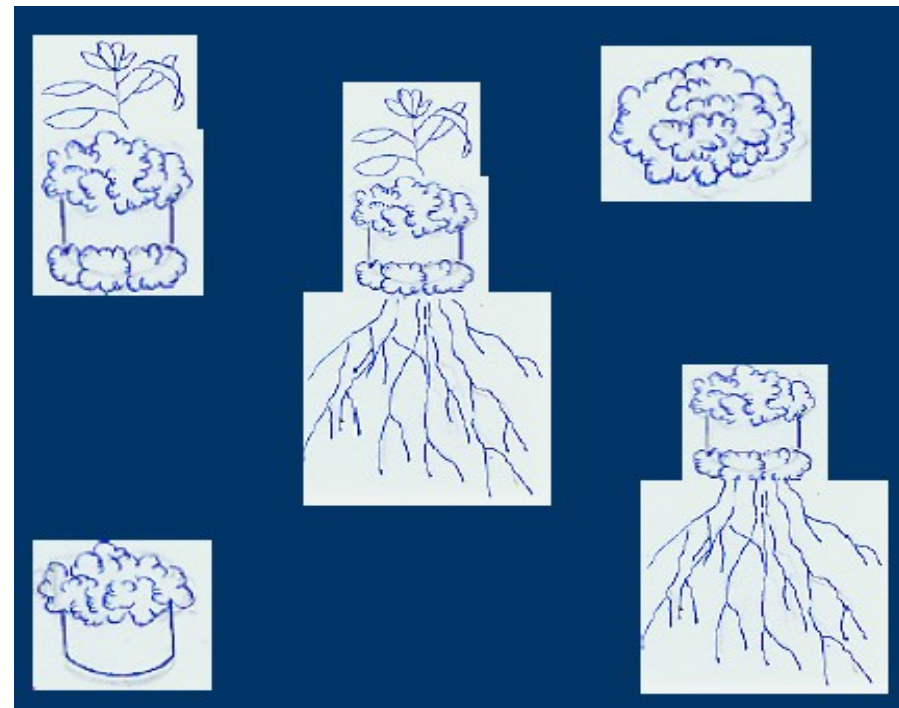
Dediferențierea este procesul prin care celulele unui țesut/organ pierd capacitatea de a realiza funcția și dezvoltarea, devenind apte de a se divide cu formarea unei mase de celule parenchimatice numit **calus**.

Pentru a obține calus pot fi folosite diferite părți ale organelor plantei.

Prin excizia explantului se induce un răspuns de rănire la nivelul secțiunii lezate. Aceste explante cultivate în prezența hormonilor din mediu, formează **calus**.

Organogeneza se realizează prin modificarea raportului de substanțe reglatoare de creștere prezent în mediul de cultivare *in vitro* a calusului.

Prin **organogeneză** se formează lăstari care, transferați pe un mediu lipsit de hormoni sau cu un conținut scăzut de **auxină**, vor înrădăcina. Plantele astfel obținute vor fi transferate în seră și, ulterior, în câmp.



Lăstarii se pot forma *in vitro* direct pe explantele diferențiate: frunze, tulpini, hipocotile, inflorescențe, rădăcini. În acest caz, aceste structuri își au originea în zone rămase în stare meristematică, sau pot rezulta din diferențierea anumitor celule (calus).

Deși etapa de regenerare *de novo* prin calus nu este o cerință obligatorie pentru a genera plante transgenice, aceasta reprezintă o etapă generală în majoritatea protocoalelor de transformare.

<https://www.youtube.com/watch?v=cD9CFtpLL2s>

<https://www.youtube.com/watch?v=aTUpW4zQcvw>

Production of healthy plant materials by shoot tip meristem culture



Factori/condiții care scad eficiența regenerării PMG in vitro

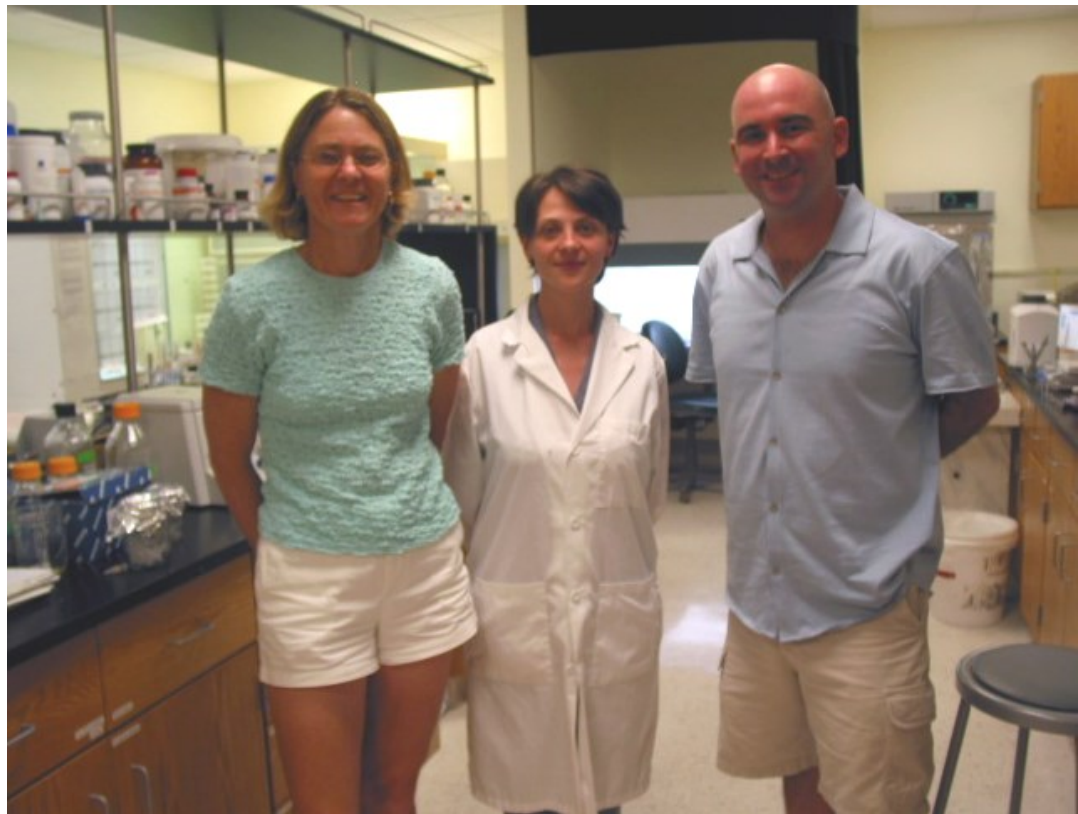
Eficiența regenerării *in vitro* a plantelor variază și este influențată de genotip și de metoda de transfer.

În cazul transformării mediate de *Agrobacterium*, regenerarea plantelor poate fi influențată negativ de **concentrații înalte ale bacteriei și perioada lungă de cocultivare – factori esențiali în eficiența transformării**. Astfel, este necesar de a găsi un echilibru între *frecvența obținerii celulelor transformare și viabilitatea țesutului*.

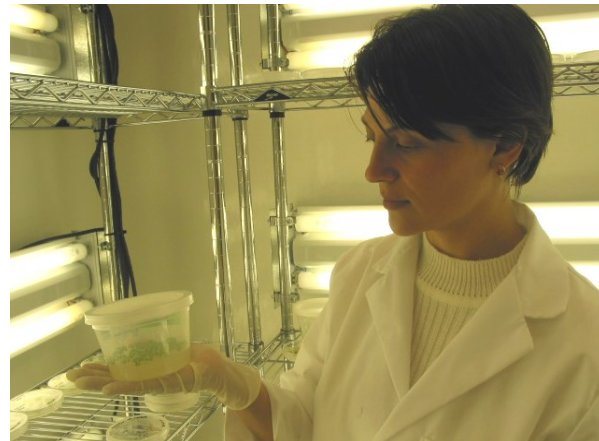
Modul în care materialul vegetal este cultivat înainte și după infectare cu bacterii, și în special prezența în mediu a hormonilor, diferitor substanțe: antioxidanți sau antibiotice poate influența, atât competența pentru transformare genetică, cât și capacitatea de regenerare ulterioară.

Depășirea unor dificultăți este posibilă prin aplicarea metodelor de transformare directă a structurilor celulare cu potențial natural de regenerare, cum sunt **embrionii și meristemele**. Dezvoltarea transformanților din astfel de explanți este asociată cu un număr mai mic de manipulări ale tehnicii culturii *in vitro*.

Cu cât este mai redus gradul de organizare a țesutului și cu cât este mai lung timpul petrecut în această stare, cu atât este mai mare amplitudinea fenomenului de variație somaclonală (variabilitate genetică generată în timpul culturii de țesuturi).



„Obținerea și analiza OMG”, Centrul de transformare genetică.
Universitatea din Riverside, California, SUA, 2005



4. GENE MARCHER UTILIZATE ÎN SELECȚIA PLANTELOR MODIFICATE GENETIC

Indiferent de metoda de transfer utilizată, frecvența de integrare a alogenelor în genomul plantei este redusă, iar dintre celulele care conțin alogene, doar cele totipotente regenerează clone transformate. Din această cauză genei „de interes” îi este asociată o **genă-marker, care permite selecția celulelor vegetale transformate.**

Genele marker sunt acele gene care permit selecția celulelor MG, iar **genele raportoare** sunt gene care codifică proteine ușor de evidențiat în celule sau extracte celulare. Unele gene pot avea rol, atât gene marker cât și raportoare.

Cele mai folosite gene-marker selectabile conferă rezistență la **un antibiotic** sau un **erbicid**. Produsul unei asemenea gene este de obicei o enzimă care inactivează o substanță toxică și astfel permite celulelor transformate să supraviețuiască pe un mediu de cultură adiționat cu antibioticul sau erbicidul respectiv și să regenereze.

S-au dezvoltat și metode de selecție pozitivă - utilizarea genelor bacteriene ce permit metabolizarea unui anumit substrat (manoză sau xiloză)

Tomato Transformation Program Cascade (Syngenta)

- 120 primary transformants
- 80 with normal phenotype
- 20 with PG* enzyme activity (<10%)
- 3 with single insertion site
- 2 stable inheritance

Gene-marker utilizate în transformarea genetică a plantelor

Exemple

□ **gena *npt II/neo*** -codifică *neomicinofosfotransferaza* II, implicată în neutralizarea unor antibiotice aminoglucozidice: neomicina și kanamicina. Pentru selecția PMG se recomandă concentrația de 100 mg/l kanamicină. Gena *nptII* poate fi pusă sub controlul elementelor reglatoare de origine bacteriană, astfel nu va fi expresată în plante sau poate fi controlată de un promotor eucariot care va determina expresia ei în planta-receptor.

□ ***hpt* sau *hph*** - genă izolată tot de la bacteria *E. Coli*, codifică enzima *higromicinofosfotransferaza*, determină rezistență la higromicina, concentrația de 50 mg/l;

□ ***bar* - gena *bar***, izolată de la bacteria *Streptomyces hygrosopicus* și gena *pat* de la *S. viridochromogenes*, ambele codifică enzima *fosfinotricin-acetiltransferaza*, determină rezistență la bialafos (fosfinotricină sau PPT), concentrația de 50 mg/l PPT. Fosfinotricina este compusul activ cel mai mult utilizat ca erbicid de selecție a plantelor transformate genetic,

□ ***epsps*** - codifică enzima *enolpiruvilșikimat-3-fosfatintaza* (EPSPS), conferă rezistență la glifosat, concentrația 0,5 mM glifosat.

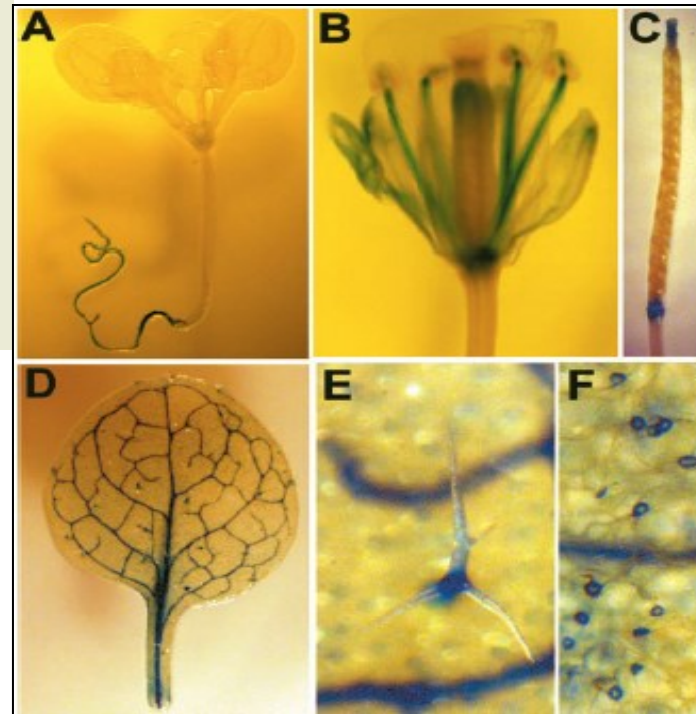
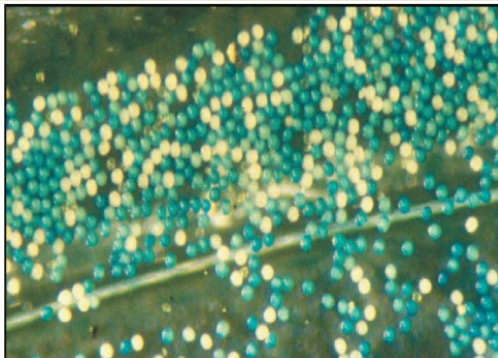
Gene reporter utilizate în monitorizarea celulelor vegetale MG

Gene raportoare codifică proteine/ enzime detectabile cu substraturi cromogene, fluorogene, care emit fotoni ce pot fi detectați pentru a monitoriza expresia genelor „de interes”

!! Genele raportoare, spre deosebire de **markerii de selecție** nu conferă celulelor rezistență față de un anumit compus. Ele codifică proteine care pot fi detectate direct sau catalizează reacții specifice ai căror produși pot fi detectați prin metode relativ simple.

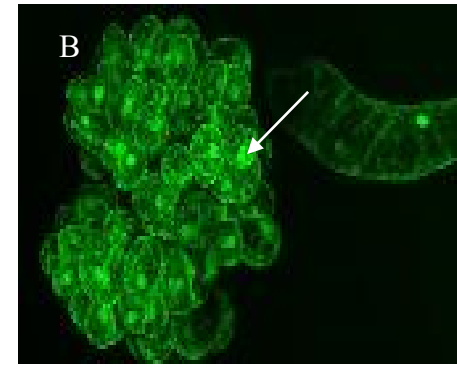
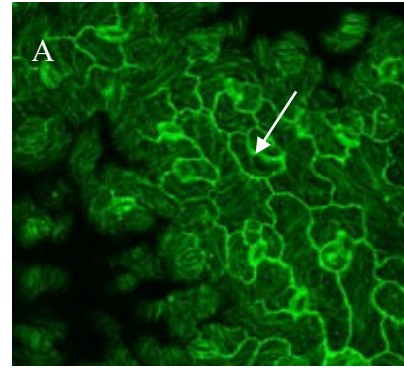
Genele raportoare permit studiul factorilor de transcripție, în condițiile transformării tranziente sau permanente, precum și monitorizarea și optimizarea tehnologiei de transformare.

Gena *gus* - (*uidA*, izolată de la *E. coli* K12) codifică enzima β -glucuronidaza care în prezența unui substrat cromogen – acidul 5-brom-4-clor-3-indolil- β -glucuronic sau *X-gluc* formează un compus albastru, stabil, bine pronunțat detectabil prin identificarea histochimică (țesuturi fixate)



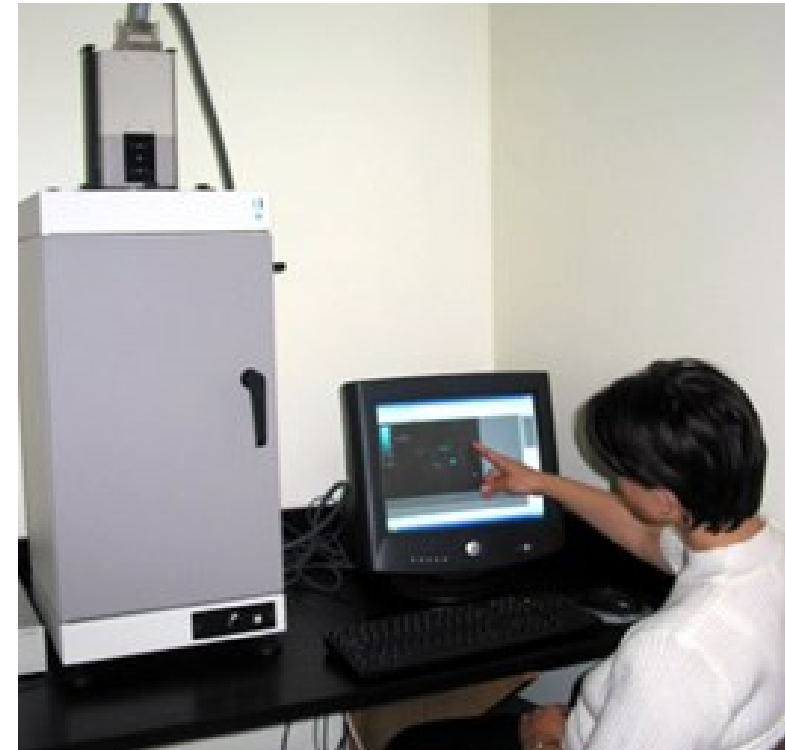
Gena *gfp* pentru proteina cu fluorescență verde (Green fluorescent protein, GFP, izolată de la meduza *Aequorea victoria*)

Se evidențiază în țesuturi intacte *in vitro* și *in vivo*, în lipsa substratului, datorită prezenței unui cromofor fluorescent care emite luminescență verde în urma excitării la lumina albastră sau UV (maximum de adsorbție la $\lambda = 395 \text{ nm}$).



Detectarea *in vivo* a proteinei GFP la *Athaliana* (A) și *N. tabaccum* (B)
săgețile indică prezența GFP

Gena *luc*, izolată de la o specie de licurici (*Photinus pyralis*) din America de Nord, codifică enzima *luciferaza* (61 kDa) care scindează luciferina ca substrat în prezența de ATP și ionilor de calciu, rezultând bioluminescență ce poate fi cuantificată.



Selectarea unei gene marker adecvate scopului se bazează pe informația cunoscută.

De exemplu:

- metodele enzimatiche de elucidare a activității proteinelor raportoare GUS, LUC sunt mai sensibile decât detecția fluorescenței emise de GFP,
- stabilitatea înaltă a proteinelor GFP, GUS *in vivo* nu permite de a identifica modificările rapide în expresia genelor. Pentru acest scop este mai eficientă LUC, întrucât timpul de degradare a proteinei în celulele vii este de 2-3 ore.

Proteinele *GFP* sunt cele mai utilizate în calitate de markeri în transformarea genetică. Acestea permit detecția vizuală, nedistructivă a celulelor transgenice prin microscopie fluorescentă. **Sistemul GFP este independent de genotip și de țesutul analizat și prezintă un nivel jos de toxicitate.**

Reieșind din avantajele și dezavantajele fiecărui sistem de marcare/raportor, cel mai rar utilizate în tehnologia ADN-recombinant sunt genele *LUC*.



Importanța utilizării genelor raportoare în analiza expresiei temporal-spațiale a transgenei

- ✓ Atașarea genei raportoare la regiunea promotor permite de a cerceta rolul acestuia în expresia genei respective la nivel de transcripție.
- ✓ Înlocuirea secvenței codificatoare a genei „de interes” cu cea a genei raportoare cu păstrarea regiunilor care codifică secvența de la capătul 5' netranslabil al ARNm permite de a aprecia rolul acestei succesiuni nucleotidice în procesul transportului ARNm din nucleu în citoplasmă și inițierea translării.
- ✓ Prin combinarea secvențelor codificatoare ale genei „de interes” și raportoare se poate determina, în unele cazuri direct, cantitatea proteinei active în celule, interacțiunea cu alte proteine, polipeptide, acizi nucleici, membrane etc.

5. ANALIZA EFICIENȚEI TRANSFERULUI DE GENE

Eficiența transformării genetice se apreciază la diferite etape de obținere a PMG prin utilizarea biotestelor aplicate atât în condiții *in vitro*, cât și *in vivo*.

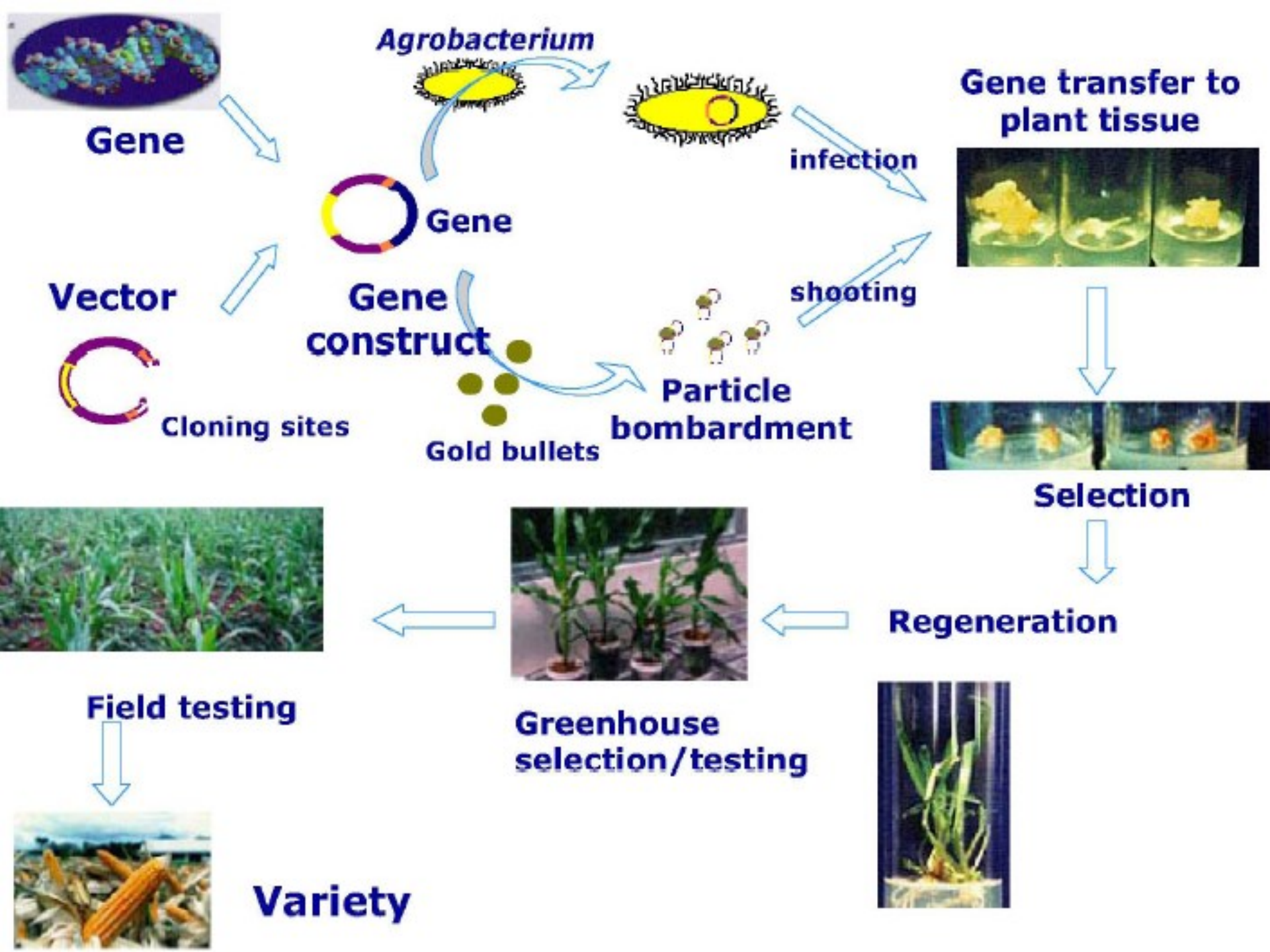
1) **Testul aplicat plantelor cultivate *in vitro*** prevede creșterea și dezvoltarea plantelor din semințe, explante de frunze, calus etc. pe medii nutritive speciale suplimentate cu factorul de selecție (erbicid, antibiotic etc.). **În calitate de criteriu de apreciere a prezenței transgenelor servesc plantele dezvoltate normal datorită toleranței/rezistenței față de agentul de selecție.**

2) **Testul de expresie fenotipică a alogenelor (simplu în realizare),** poate fi realizat în cazul în care activitatea alogenei se manifestă la o anumită etapă de dezvoltare și prevede tratarea exogenă a plantelor cultivate *in vivo* cu factorul de selecție, prin stropire foliară. **Principiul de selecție - plantele susceptibile non-MG vor manifesta simptome de cloroză sau necroză.**

De exemplu:

- prezența genei marker *nptII* este confirmată prin imersarea frunzelor în soluții cu *kanamicină*, se urmărește procesul de depigmentare a frunzelor.
- pentru selectarea semințelor MG se recomandă germinarea lor în prezența concentrației 100 mg/l *kanamicină*. Analiza rezultatelor se efectuează după 1-2 zile, în baza numărului de semințe germinate ale PMG față de control.

Ultima verificare a reușitei protocolului de transgeneză în cazul speciilor de interes economic se face în teste de câmp. Aceste teste au drept scop determinarea stabilității genetice în manifestarea caracterului nou introdus și evaluarea altor însușiri cu impact asupra calității producției vegetale.



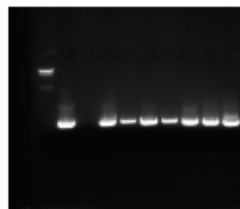
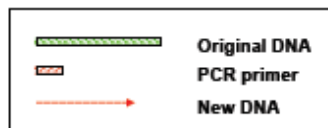
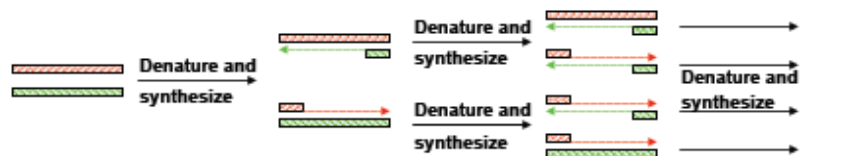
Metode de detecție a transgenelor

În detecția și identificarea modificărilor genetice se utilizează în mod preponderent metode de analiză moleculară bazate pe **reacția de polimerizare în lanț (PCR)** cu primeri specifici. Prezintă sensibilitate și eficiență înaltă.

Testul de analiză enzimatică (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) este unul de alternativă analizei PCR și permite identificarea proteinelor (enzimelor) codificate de transgene, cum ar fi, de exemplu, neomicinofosfotransferaza (nptII), EPSPS, proteinele Bt. Alte teste de identificare a proteinelor ca produse de expresie a transgenelor includ electroforeza combinată cu transferul pe membrane *Western Blot*

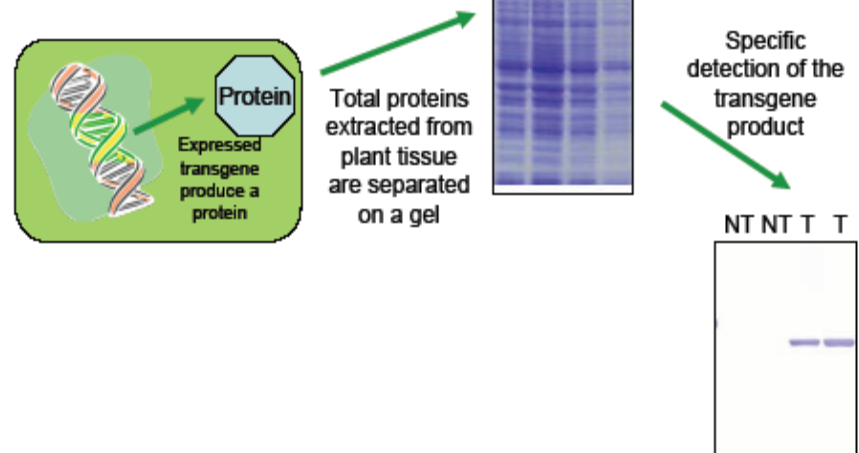
The Polymerase Chain Reaction (PCR)

- A rapid procedure for *in vitro* enzymatic amplification of a specific segment of DNA

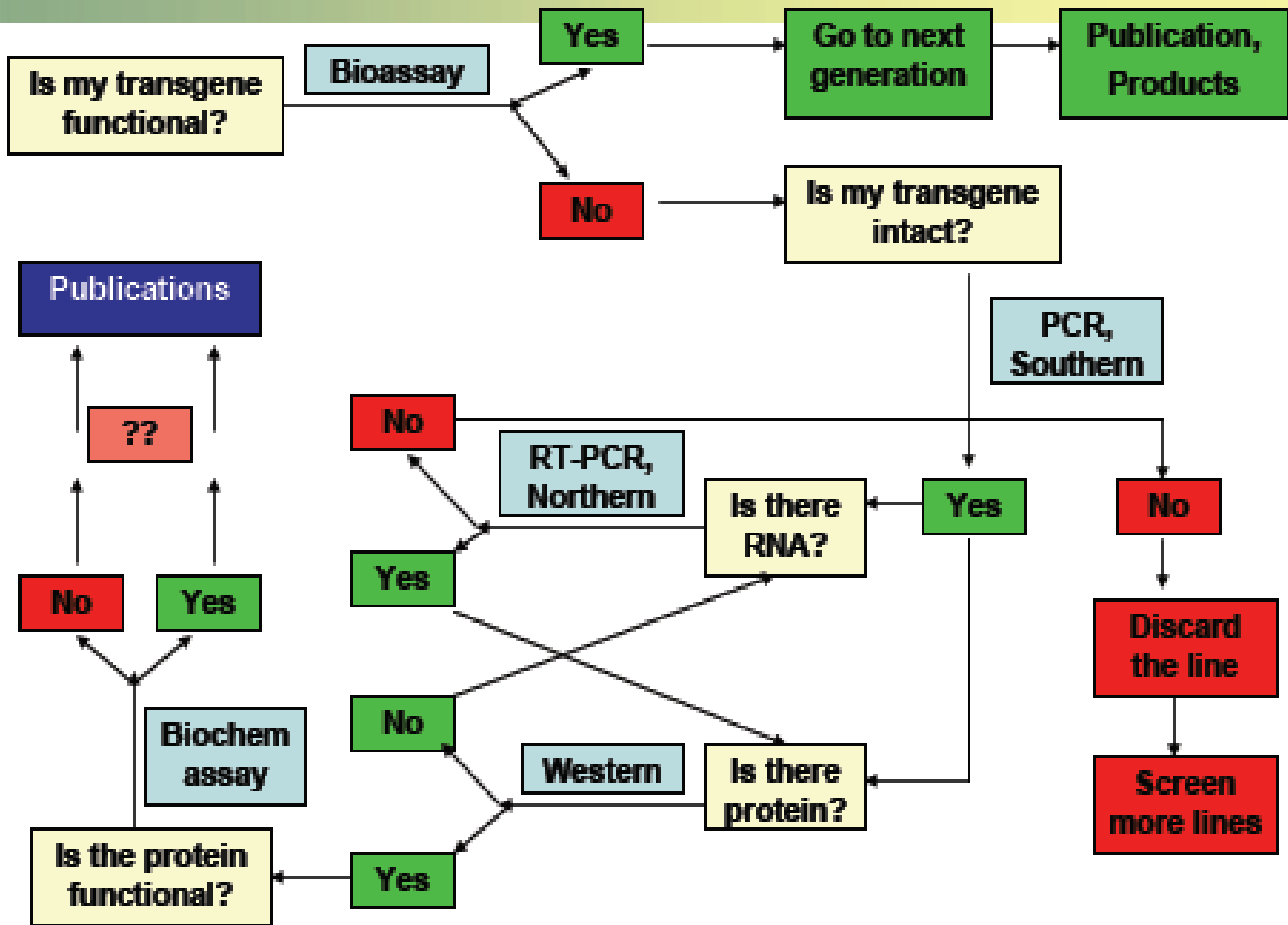


Protein detection

- Western blot blot



Steps in transgenic plant analysis



Succesul transformării genetice depinde de ? ...

Ingeniozitatea cercetătorului de a optimiza

- metoda de transfer,
- **ptotocolul de selecție a transformanților (T),**
- protocolul de regenerare a plantelor adaptat pentru fiecare specie, și
scopul
proiectului!



Mulțumesc pentru atenție