Inicijacija kalusa iz embrija vrste Brachypodium distachyon (L.) P. Beauv.

Čmelar, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:538718

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-13**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Karla Čmelar

Inicijacija kalusa iz embrija vrste *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.

Završni rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Inicijacija kalusa iz embrija vrste *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.

Karla Čmelar

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka

Mentor: Dr.sc. Lidija Begović, doc.

Kratak sažetak završnog rada: Dvoklasićasta kostrika (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) je jednogodišnja biljka koja pripada porodici Poaceae. Vrlo se jednostavno uzgaja, ima kratko generacijsko vrijeme, malen i kompaktan genom (~ 300 Mpb) te je filogenetski srodstvena s agronomski važnim kulturama kao što su pšenica (*Triticum aestivum* L.), soja (*Glycine max* L. Merr.), riža (*Oryza sativa* L.) i zob (*Avena sativa* L.) što ju čini prihvatljivim modelom u brojnim istraživanjima. Najčešće tehnike transformacije uključuju bombardiranje česticama (particle bombardment) te transformacija s bakterijom roda *Agrobacterium*. Za provođenje tih tehnika stvara se kultura kalusa od izoliranih embrija na različitim medijima. U ovom je radu optimizirane su metode stvaranja kulture kalusa iz embrija na različitim medijima.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Brachypodium distachyon***,** linija Bd21, kultura embrija, kultura tkiva

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study program in Biology
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

Callus initiation from embryo of *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.

Karla Čmelar

Thesis performed at: Laboratory of plant cell and molecular biology

Supervisor: Lidija Begović, PhD, assistant professor

Short abstract: *Brachypodium distachyon* (l.) P. Beauv. s an annual plant form Poaceae family. It is easily grown and has short generation period. Its genome is short and compact (~ 300 Mbp) and it is phylogenetically related to important species in agronomy such as wheat (*Triticum aestivum* L.), soy (*Glycine max* L. Merr.), rice (*Oryza sativa* L.) and oats (*Avena sativa* L.) which makes her acceptable as model in numerous research. Particle bombardment and *Agrobacterium* transformation are the most common techniques used on *Brachypodium distachyon.* Callus culture from isolated embryos is created for implementing those techniques on different kinds of medium. In this work methods of creating embryo culture are optimized using different growth medium.

Original in: Croatian

Key words: *Brachypodium distachyon***,** Bd21 line, embrio culture, tissue culture

Thesis deposited: On the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

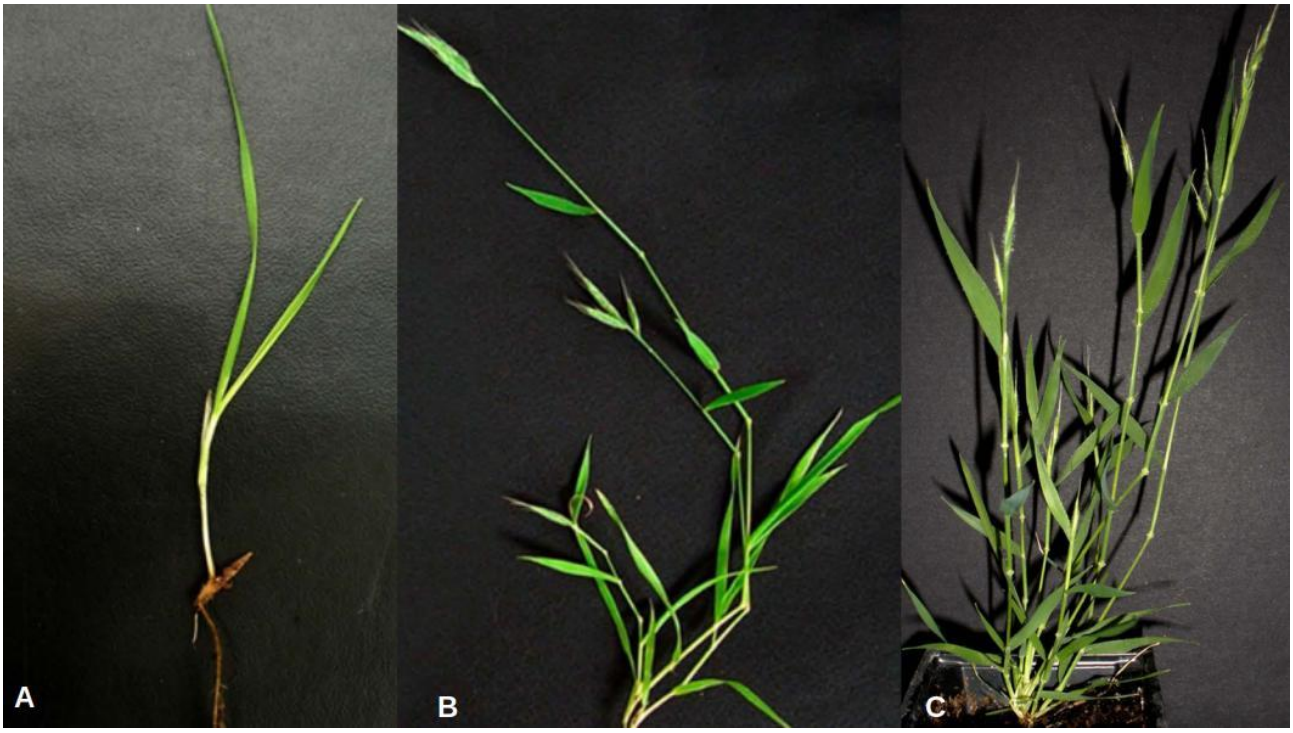
1. Uvod 1
1.1. Dvoklasićasta kostrika (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) 1
1.2. Kultura tkiva i kultura embrija 2
1.3. Cilj rada 4
2. Materijali i metode 5
2.1. Uzgoj *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beavu. linije Bd21 5
2.2. Priprema medija za inicijaciju kalusa 5
2.2.1. Linsmaier and Skoog medij (LS) 5
2.2.2. Murashige and Skoog medij (MS) 6
2.3. Izolacija i inokulacija embrija 7
3. Rezultati 10
3.1. Razvoj kalusnog tkiva na MS mediju 10
3.2. Razvoj kalusnog tkiva na LS mediju 11
4. Rasprava 13
5. Zaključak 15
6. Literatura 16

1.UVOD

1.1. Dvoklasićasta kostrika (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.)

Dvoklasićasta kostrika (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Poaceae. Zamijenila je uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) u istraživanjima orijentiranim na vrste jednosupnica koje su od agronomskog značaja kao što su pšenica (*Triticum aestivum* L.), soja (*Glycine max* L. Merr.), riža (*Oryza sativa* L.), zob (*Avena sativa* L.) i druge (Brkljačić i sur. 2011.). Karakteristična je za umjerena područja te je široko rasprostranjena na Mediteranu i Srednjem Istoku. Dvoklasićasta kostrika naraste 15 do 30 cm u visinu, sadrži 10 do 12 sjemenki u klasiću (S.Y. Hong i sur. 2011.) te može rasti u velikoj gustoći (1000 biljaka/m^2) u uzgojnoj komori (J. Vogel i J. Bragg 2009.). Ima kratko generacijsko vrijeme, a klijanje potiče stratifikacija u trajanju od dva do pet dana. Stadij vegetacijskog rasta pojavljuje se četiri do pet dana nakon sijanja te predstavlja period od pojave prvih listova do cvatnje tokom kojega biljka raste i razvija vegetativne organe (rast i razvoj korijena, internodija, nodija i listova). Stadij cvatnje pojavljuje se otprilike 30 do 35 dana nakon sijanja te je potrebno otprilike 12 dana da dođe do oplodnje, a životni ciklus završava otprilike 70 dana nakon sijanja (Hong i sur. 2011.) (Slika1). Za dvoklasićastu kostriku je karakterističan proces samooplodnje što je pogodno za očuvanje homozigotnih linija i oplemenjivanje (Vogel i Bragg, 2009.). Također, ima mali genom (2n=10, odnosno ~ 300 Mpb) što omogućava jednostavnije i učinkovitije manipuliranje genima. Projekt sekvencioniranja genoma *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. započeo je 2007. godine International Brachypodium Initiative, s naglaskom na Bd21 liniju (Vain. i sur. 2008.). Bd21, diploidna linija koja je korištena u ovom radu samo je jedna od velikog broja linija ove modelne vrste (Filiz i sur. 2009.). Postoji velik broj ekotipova dvoklasićaste kostrike od kojih su neki diploidni (2n= 10), tetraploidni (4n=20) i heksaploidni (6n=30) (Man Bo Lee i sur. 2011.) te su korišteni za razvoj hibridnih sorti. Razvijeno je 146 hibridnih sorti od 45 ekotipova koji su prikupljeni s 45 različitih geografskih regija u Turskoj (E. Filiz i sur. 2009.). Hibridne se sorte, kao i različiti ekotipovi, morfološki razlikuju u veličini biljke, obliku klasića, izgledu sjemenke. Postoje razlike u trajanju vernalizacije i fotoperiode za inicijaciju cvatnje (Vogel i Bragg, 2009.). Također, otpornost određenih sorti na različite patogene kao što su gljivice (Opanowicz i sur. 2008.), na stresne uvijete kao što je suša pri čemu neke sorte imaju veću stopu fotosinteze (Rivera-Contreras i sur. 2016.) te razlike u razvijanju kalusnog tkiva i učinkovitosti transformacije i regeneracije (Vogel i sur. 2006.). Kompaktni genom olakšava istraživanja određenih gena

značajnih za stvaranje sorti agronomski značajnih vrsta koje će biti prilagodljivije stresnim uvjetima ili će imati bolji prinos (Filiz i sur. 2009.).Nadalje, istraživanja otpornosti na herbicide i štetnike kao što su kukci te razne gljivične i virusne bolesti od velike su važnosti za poboljšanje poljoprivrednih kultura. Bd21 linija često se transformira pomoću bakterija roda *Agrobacterium* (Alves i sur. 2009.). Transformacija, odnosno ugradnja određenih gena provodi se pomoću bakterija koje imaju mogućnost ugradnje plazmida u genom biljke. Transformacija se provodi na nediferenciranim embrionalnim stanicama, odnosno na kalusnom tkivu. Uz transformaciji često je korištena i tehnika bombardiranja česticama (engl. *particle bombardment*) koja koristi kalusno tkivo za ugradnju gena u genom dvoklasićaste kostrike (Vogel i Bragg, 2009.).



Slika 1: (preuzeto i prilagođeno prema Molinari i sur. 2013.) Razvojne faze *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. A) *B. distachyon* u ranoj vegetativnoj razvojnoj fazi, B) reproduktivna razvojna faza i C) faza razvoja sjemena.

1.2. Kultura tkiva i kultura embrija

Kalusno tkivo ili staničje je nakupina nediferenciranih stanica koja na mediju pri optimalnim uvjetima može rasti neograničeno dugo te pripada tipu kulture stanica s neorganiziranim rastom. Kulture stanica koje karakterizira organizirani rast sadrže organizirane dijelove biljke koje na mediju nastavljaju svoj rast. Kalusno tkivo može se razviti *in vitro* od svih dijelova biljke te se ovisno o dijelu i vrsti biljke, kalusna tkiva morfološki razlikuju. Također,

uvjeti u kojima se staničje razvija kao što je sastav podloge ili intenzitet svijetla, ima znatnu ulogu u njegovoj morfologiji. Naime, kalusno tkivo bijele ili žute boje nastaje kada se razvija u mraku ili pri niskom intenzitetu svijetlosti, a kada se razvija na svijetlu u stanicama se sintetiziraju klorofil i karotenoidi. Za razvoj kalusnog tkiva žitarica najčešće se koriste embriji, klijanci, endosperm ili mezokotil klijanaca, a vrlo rijetko se koriste razvijeni biljni organi kao što je list (Jelaska, 1994.). Ukoliko se za razvoj kalusnog tkiva koriste embriji tada je riječ o kulturi embrija. Naime, za kulturu embrija mogu se koristiti nezreli ili zreli embriji, sjemeni zametak, cvjetovi ili samo njihovi dijelovi te embriji koji se nalaze u embrionskoj vreći što se naziva kulturom megagametofita. Za razvoj kulture embrija rijetko se koriste jako mali embriji jer postoji velika mogućnost da se oštete tijekom izolacije kao i zbog osjetljivosti na osmotski šok. Upravo se zbog toga koriste embriji koji su neovisni o endospermu koji služi kao glavni izvor hranjivih tvari tokom ranog razvoja embrija. Kalusno tkivo se razvija na mediju koji mora sadržavati mineralne soli, ugljikohidrate, vitamine i regulatore rasta kako bi stanice imale na raspolaganju sve potrebne tvari za rast i razvoj. Mineralne soli služe stanicama kao izvor makroelemenata (dušik, magnezij, kalij, kalcij) i mikroelemenata (jod, bor, mangan, cink, bakar, željezo, molibden, kobalt). Ugljikohidrati su potrebni kao izvor energije te se u većini slučajeva koristi saharoza. U kulturi embrija ugljikohidrati, osim što služe kao izvor energije, održavaju prihvatljiv osmotski okoliš i sprječavaju preuranjeno klijanje. Tiamin je jedini vitamin koji je nužan za razvoj kulture biljnih stanica jer biljne stanice nisu u mogućnosti sintetizirati ga u dovoljnoj količini. Ostali vitamini koji se mogu dodati u sastav podloge kako bi se kalus bolje razvijao su nikotinska kiselina i piridoksin hidroklorid. Što se tiče regulatora rasta najčešće se koriste hormoni auksini, 3-indoloctena kiselina, 2,4-diklorfenoksioctena kiselina, 3-indolmaslačna kiselina i 1-naftaloctena kiselina ili aminokiseline kao što su glicin i arginin. Još jedan važan čimbenik za razvoj kulture tkiva, a prvenstveno za kulturu embrija, je pH vrijednost koja varira između 5,5 i 6,5.

Murashige i Skoog (MS) je najčešće primjenjivana podloga koja je pokazala velik uspjeh u kulturi biljnih stanica. Karakterizira ju velika količina nitrata, kalija i ostalih anorganskih soli te se koristi kao kruta podloga i za kulture u suspenziji. Kada se određen tip podloge koristi samo se sastav mineralnih soli ne mijenja, a ostale se komponente prilagođavaju ovisno od koje se biljne vrste stvara kultura. Razvoj kalusnog tkiva na krutoj podlozi rezultira neravnomjernim rastom zato što je samo dio kalusa u dodiru s podlogom te je njegova rast određen gradijentom hranjivih tvari, izmjenom plinova i nakupljanjem suvišnih produkata između podloge i stanica kalusa. Također, na rast kalusa može djelovati izloženost

različitih dijelova kalusnog tkiva drugačijem intenzitetu svijetlosti. Površina podloge ili stijenke posude mogu biti ograničavajući za rast kalusnog tkiva. Supkultiviranje tkiva, odnosno prenošenje sa starog medija iz kojega su svi nutrijenti potrošeni, na novi medij provodi se jednako kao i izolacija u sterilnim uvjetima te je potrebno zadržati polarnost eksplantanata (Jelaska, 1994.).

1.3. Cilj rada

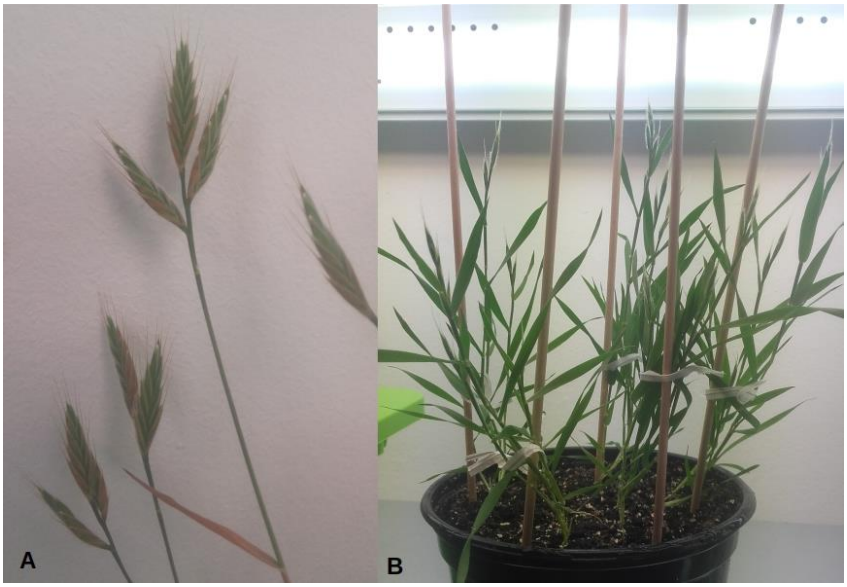
Inokulacijom mladih embrija na medij obogaćen hormonima inducira se dioba embrionalnih stanica, odnosno razvijanje kalusnog tkiva. Mediji za inicijaciju kalusnog tkiva iz mladih embrija razlikuju se ovisno o sastavu mineralnih soli i vitamina stoga je cilj ovog rada:

1. Izolirati embrije iz vrste *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. i potaknuti razvoj kalusa.
2. Optimizirati uvjete uzgoja kalusnog tkiva.
3. Usporediti razvoj kalusnog tkiva na dva različita hranjiva.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzgoj *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. linije Bd21

Za uzgoj je korištena sorta Bd21. Sjemenke su očišćene na način da su im uklonjene pljeve (zaštitni listići). Tako očišćene sjemenke stavljene su u petrijevu zdjelicu u kojoj je zemlja pomiješana s vermikulitom u omjeru zemlja : vermikulit = 4: 1. Kako bi se potakla germinacija sjemena sjemenke su ostavljene četiri dana u hladnjaku na temperaturi od + 4 °C u mraku nakon čega su posijane u prethodno pripremljen supstrat. U svaku je posudu posijano pet sjemenki. Biljke su uzgajane pri 150 μmol_{FOTONA} m^{-2} s^{-1} i 23 °C (±1°C) uz fotoperiodu od 18/6 h (dan/noć). Biljke su zalijevane svaki drugi dan. Dvanaest dana nakon cvatnje (Slika2), odnosno nakon pojave prašnika uslijedila je izolacija embrija.



Slika 2: B*rachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. (A) biljke treći tjedan nakon sijanja, faza razvoja klasića, (B) klasić dva tjedna nakon cvatnje, faza nalijevanja zrna.

2.2. Priprema medija za inicijaciju kalusa

2.2.1. Linsmaier and Skoog medij (LS)

LS medij za inicijaciju kalusa rađen je u laminaru u sterilnim uvjetima prema protokolu Vogel i Hill (2008.) (Tablica 1. i Tablica 2.). pH vrijednost namještena je na 5,8 s 1 M KOH. S obzirom da se nakon autoklaviranja pH vrijednost smanji, pH je namješten na 6. Na kraju je dodan biljni agar. Medij je autoklaviran 30 min na 121°C, nakon što se medij ohladio dodano je 10 mL LS-Vitamina . Medij je izliven u laminaru u sterilne petrijeve zdjelice

(dimenzije 60x65 mm) te je nakon hlađenja spremljen u hladnjak na 4°C do nasađivanja embrija.

Tablica 1: Sastav Linsmaier and Skoog medija

Priprema 1 L LS medija		
otopina	koncentracija	volumen
Makroelementi 1	10x	100 mL
Makroelementi 2	10x	100 mL
Mikroelementi	1000x	1 mL
FeNaEDTA	100x	10 mL
2,4-D	5 mg/mL	0,5 mL
$CuSO_4x5H_2O$	0,6 mg/mL	1 mL
LS-vitamini (Tiamn-HCl)	100x	10 mL
Agar-Agar, plant (Carl Roth)		7 g
Saharoza		30 g

Tablica 2: Sastav otopina mikroelemenata i makroelemenata

Makroelementi		Mikroelementi	
NH_4NO_3	1.6500 g/L	H_3BO_3	6.200 mg/L
$CaCl_2$	0.3322 g/L	$CoCl_2x6H_2O$	0.025 mg/L
$MgSO_4$	0.180690 g/L	MnSO4xH2O	16.900 mg/L
KNO_3	1.90 g/L		
KH_2PO_4	0.170 g/L		

2.2.2. Murashige and Skoog medij (MS)

MS medij za inicijaciju kalusa pripremljen je prema Alves i sur. (2009.) (Tablica 3 i 4). Standardne temeljne otopine mikroelemenata i makroelemenata autoklavirane su 30 min na 121°C. Otopina vitamina je filter-sterilizirana u laminaru te spremljena na -20°C u mraku (umotana u aluminijsku foliju). pH otopina namješten na 5.8 s 1 M KOH. Za pripremu otopine CuSO4x5H_2O koncentracije 1 mg/mL otopljeno je 10 mg u 10 mL destilirane H_2O te je otopina također filter-sterilizirana u laminaru. Medij je izliven u sterilne petrijeve

zdjelice (dimenzije 60x65 mm) i spremljen u hladnjak na 4 °C do nasađivanja embrija. Medij za regeneraciju je rađen po protokolu za MS medij uz dodatak kinetina (0.1 mg/ml).

Tablica 3: Sastav Murashige and Skoog medija

Priprema 1 L MS medija		
otopina	koncentracija	volumen
Makroelementi	10x	100 ml
Mikroelementi	100x	10 ml
Fe-EDTA	100x	10 ml
2,4-D	5 mg/ml	0.5 ml
$CuSO_4x5H_2O$	1 mg/ml	0.6 ml
MS-vitamini	100x	10 ml
Agar-Agar, plant (Carl Roth)		7 g
Saharoza		30 g

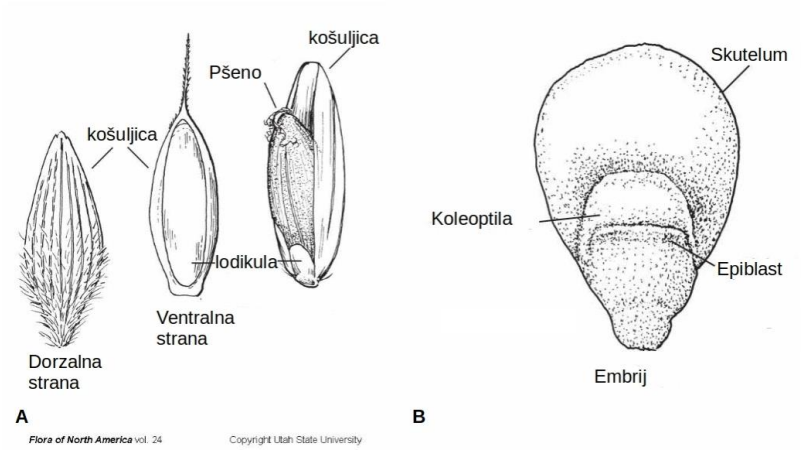
Tablica 4: Sastav otopina mikroelemenata, makroelemenata i vitamina

Makroelementi (10x)		Mikroelementi (1000x)		Vitamini MS (100x)	
NH_4NO_3	16.50 g/L	$Na_2MoO_4x2H_2O$	25 mg/L	piridoksin-hidroklorid	0.04 g/L
KNO_3	19.0 g/L	H_3BO_3	620 mg/L	tiamin-hidroklorid	0.04 g/L
KH_2PO_4	1.7 g/L	$MnSO_4xH_2O$	1120 mg/L	cistein	4 g/L
$CaClx2H_2O$	4.4 g/L	$ZnSO_4x7H_2O$	580 mg/L	glicin	0.2 g/L
$MgSO_4x7H_2O$	3.7 g/L	KI	80 mg/L		
		$CuSO_4x5H_2O$	2.5 mg/L		
		$CoCl_2x6H_2O$	2.5 mg/L		

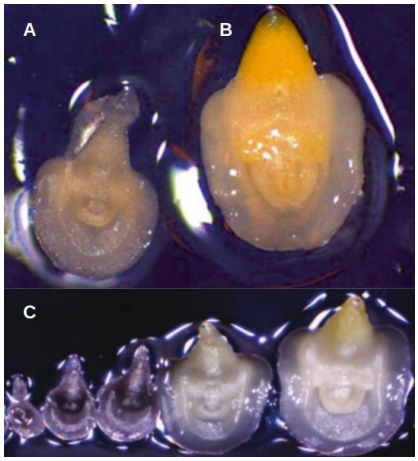
2.3. Izolacija i inokulacija embrija

Izolacija se provodila pod lupom u laminaru u sterilnim uvjetima. Klasići su odvojeni od biljke i sterilizirani pet minuta u 10 mL 4% otopine varikine, zatim isprani tri puta u sterilnoj H_2O i stavljeni u sterilnu petrijevu zdjelicu. Zatim su uz pomoć sterilnih histoloških iglica izolirani embriji. Embrij je stavljen na medij tako da je skutelum (Slika 3) okrenut prema

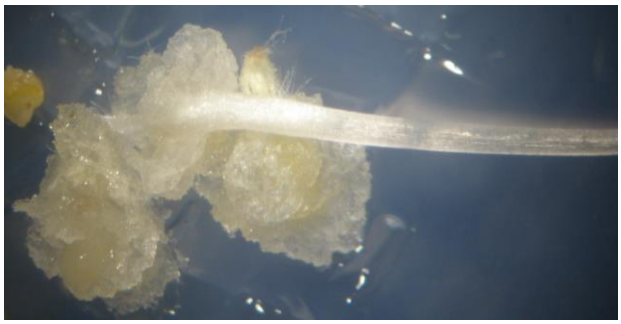
dolje i u kontaktu s medijem. Na medij su inokulirani samo mali (0.3–0.5 mm) i prozirni embriji jer će oni za razliku od većih, starijih i žućkastih razviti kalusno tkivo (Slika 4). Na LS medij je inokulirano četiri do šest embrija po petrijevoj zdjelici, dok je na MS medij inokulirano sedam do devet embrija. Dva do tri dana nakon inokulacije pojavili su se korjenčići koji su uklonjeni kako bi se povećala vjerojatnost razvoja kalusnog tkiva (Slika 5).



Slika 3: (Web 1 prilagođeno) (A) Prikazani su dijelovi cvijeta i pricvjetni listovi i (B) dijelovi embrija.



Slika 4: Embriji različite starosti . Mladi embriji koji će razviti kalusno tkivo (A i C) i stariji embriji koji ne razvijaju kalusno tkivo i ne koriste se u inokulaciji (B). (A i B preuzeto i prilagođeno prema Vogel i sur. 2015. i C) preuzeto i prilagođeno prema Hong i sur. 2010.).



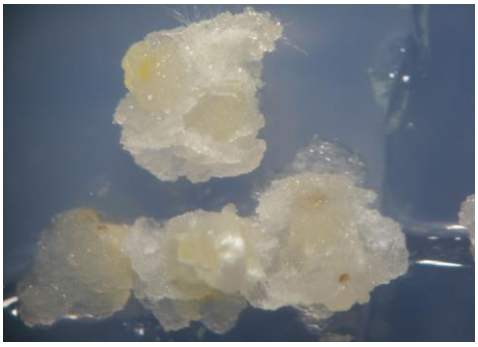
Slika 5: Korjenčić razvijen na kalusnom tkivu tri dana nakon inokulacije na MS medij.

Embriji inokulirani na medij inkubirani su tri do četiri tjedna u mraku na sobnoj temperaturi od 24 ± 1°C, šest do sedam embrija po petrijevoj zdjelici. Nakon tri do četiri tjedna razvijena kalusna tkiva su izrezana na manje dijelove i supkultivirana u drugu petrijevu zdjelicu s medijem, također u sterilnim uvjetima u laminaru pod lupom, kao u postupku inokulacije embrija. Od jednog kalusnog tkiva, izrezano je tri do četiri presadnice bijele boje i biseraste strukture. Žuti i tvrdi dijelovi nisu supkultivirani. Nekoliko je uzoraka premješteno s LS medija na MS medij nakon izrezivanja.

3. REZULTATI

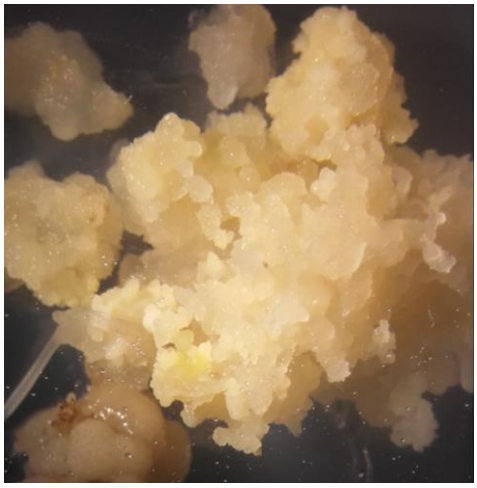
3.1. Razvoj kalusnog tkiva na MS mediju

Embriji nasađeni na MS medij dobro su se razvijali te ih je nakon tri do četiri tjedna bilo moguće izrezati na presadnice (Slika 6). Iz embrija se dva do tri dana nakon inokulacije razvio korjenčić kojeg je bilo potrebno odmah ukloniti kako se ne bi smanjio razvoj kalusa. Razvio se kompaktni embrionalni kalus biseraste strukture koji ima sposobnost daljnjeg razvitka. Nepravilnog je oblika te boja varira od bijele boje do svijetlo žute na nekim dijelovima. Navedeni su dijelovi kalusnog tkiva korišteni za izrezivanje i supkultiviranje na svježi medij tri do četiri tjedna nakon inokulacije. Tvrdo kalusno tkivo smeđe i tamnije žute boje nije dalje korišteno za supkultivaciju jer te stanice nemaju mogućnost daljnjeg razvoja kalusnog tkiva.

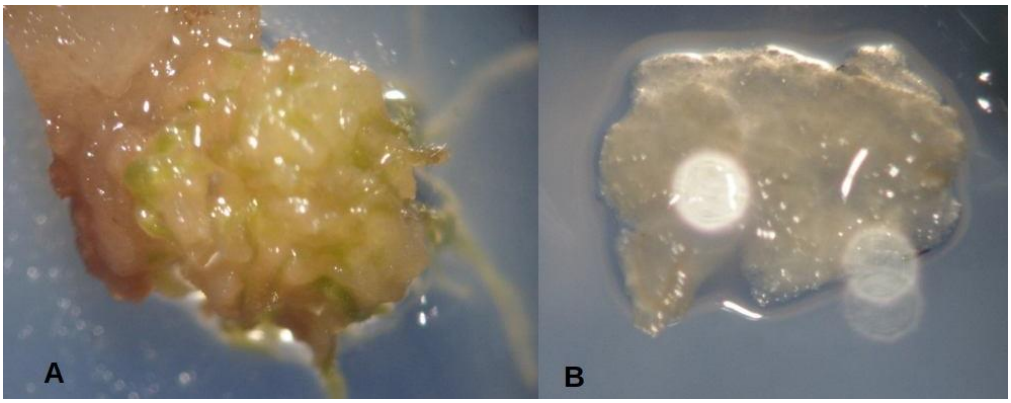


Slika 6: Kalusno tkivo na MS mediju tri do četiri tjedna nakon inokulacije, bijeli i biserasti dijelovi su korišteni za nasađivanje na novi MS medij.

Tri tjedna nakon supkultivacije razvilo se kalusno tkivo koje se dalje može koristiti za regeneraciju biljke (Slika 7). Regeneracija je potaknuta na kalusnom tkivu koje se razvilo na MS mediju (Slika 8 A).



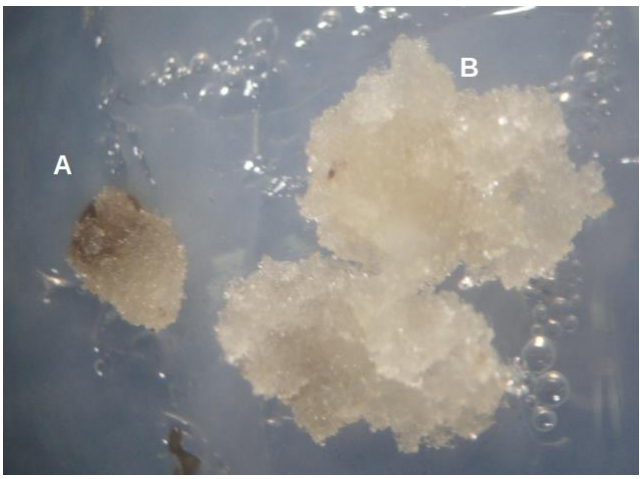
Slika 7: Razvijeno kalusno tkivo na MS mediju tri tjedna nakon supkultiviranja.



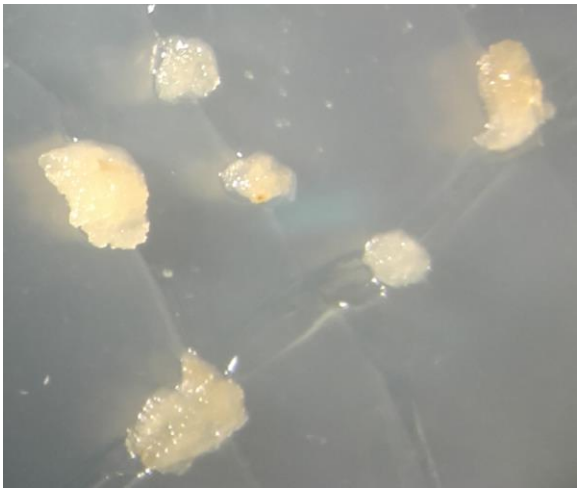
Slika 8: Regeneracija potaknuta na kalusnom tkivu koje se razvilo na MS mediju (A) i kalusno tkivo razvijeno na LS mediju čija se regeneracija nije potakla (B).

3.2. Razvoj kalusnog tkiva na LS mediju

Embriji nasađeni na LS medij znatno su se sporije razvijali za razliku od embrija nasađenih na MS medij. Također je bilo potrebno ukloniti korjenčiće koji su se razvili dva do tri dana nakon inokulacije. Mali je broj embrija razvio kompaktni embrionalni kalus tri tjedna nakon inokulacije te su u usporedbi s kalusom razvijenim na MS mediju znatno manji. Ostali su embriji poprimili crnu boju ili se nisu razvili (Slika 9). Jednako se slabo razvijalo kalusno tkivo koje je inokulirano na LS medij, ali je supkultivirano na MS medij (Slika 10). Kalusno tkivo koje se slabo razvijalo na LS medij prebačeno je na MS medij za regeneraciju međutim regeneracija se nije potakla (Slika 8 B).



Slika 9: Kalusno tkivo razvijeno na LS mediju tri tjedna nakon inokulacije. Nedovoljno razvijeno kalusno tkivo koje je poprimilo crnu boju i počelo propadati (A) i bolje razvijeno kalusno tkivo koje je moguće supkultivirati (B).



Slika 10: Embriji koji su razvili kalusno tkivo na LS mediju te su supkultivirani na MS medij. Tri tjedna nakon supkultivacije nije se razvilo kalusno tkivo.

4. RASPRAVA

Koristeći liniju Bd21 vrste *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. potaknut je razvoj kalusnog tkiva na dva različita medija. Linija Bd21 je standard u istraživanjima koja se temelje na transformaciji pomoću bakterije roda *Agrobacterium* jer je pokazala veliki potencijal za razvoj kalusnog tkiva i učinkovitu regeneraciju i transformaciju (Vain i sur. 2008). Prednost dvoklasićaste kostrike kao modelne biljke je kratko generacijsko vrijeme te jednostavni uvjeti uzgoja. Ona je biljka umjerenog područja te je potrebna stratifikacija sjemena na + 4°C kako bi se potaknulo klijanje. Fotoperioda, odnosno trajanje dana utječe na rast i razvoj biljke na način da biljka ranije dostiže stadij cvatnje prilikom čega se ne razvija velika biomasa te biljka naraste približno 15 cm u visinu. Produljivanjem fotoperiode kod nekih linija, među kojima je i Bd21, smanjuje se potreba za vernalizacijom koja također ubrzava proces cvatnje (Vogel i sur. 2006; Vogel i Hill, 2008). Tako je fotoperioda 18/6 h (dan/noć) intenziteta 150 $\mu mol_{FOTONA}\ m^{-2}\ s^{-1}$ ubrzala cvatnju koja je uslijedila pet tjedana nakon sijanja.

Starost embrija ima značajnu ulogu u razvoju kalusnog tkiva pri čemu je zabilježeno kako mlađi i nezreli embriji imaju bolju sposobnost razvijanja kalusnog tkiva (Lee i sur. 2011). Slab razvoj kalusnog tkiva, prvenstveno na LS mediju posljedica je inokulacije embrija koji nisu imali sposobnost razvoja kompaktnog embrionalnog kalusa. Izbor embrija za inokulaciju je subjektivna procjena veličine embrija te je moguće kako je za inokulaciju na LS medij izabran veći broj neprikladnih embrija nego što je izabrano za inokulaciju na MS medij. Embriji su vrlo osjetljivi te je potrebna preciznost prilikom izolacije kako se ne bi uzrokovalo oštećenje. Kako je pribor koji se koristio u izolaciji nakon svakog uzorka steriliziran na plameniku moguće je oštećenje embrija ukoliko se pribor nije dovoljno ohladio.

Pojava korjenčića negativno utječe na razvoj kalusnog tkiva jer se natječe s razvojem kalusa te ih je bilo potrebno ukloniti čim su se pojavili (Alves i sur. 2009). U postupku uklanjanja korjenčića također postoji mogućnost oštećenja embrija. Nadalje, moguće je i oštećenje već razvijenog kalusnog tkiva prilikom izrezivanja presadnica za supkultiviranje. Neoprezna izolacija može biti uzrok oštećenja embrija što u konačnici rezultira propadanjem tkiva i nemogućnosti razvoja kulture (Jelaska, 1994). Sljedeći bitan čimbenik u razvoju kalusnog tkiva ima gustoća inokuliranih embrija pri čemu se kalusno tkivo učinkovitije razvija ukoliko je veća gustoća embrija te je potrebno da se embriji međusobno ne dodiruju (Jelaska, 1994).

Na LS mediju je inokulirano četiri do šest embrija po petrijevoj zdjelici što je znatno manja gustoća u odnosu na sedam do devet inokuliranih embrija na MS mediju. Slabiji razvoj kalusnog tkiva na LS mediju može biti posljedica manje gustoće inokuliranih embrija. Dijelovi kalusnog tkiva razvijenog nakon tri do četiri tjedna razlikuju se po boji i po strukturi te sukladno tome i po mogućnosti stvaranja kalusnog tkiva (Vogel i sur. 2006). Dijelovi kalusa koji su žute boje i biseraste strukture imaju veću mogućnost stvaranja kalusnog tkiva za razliku od rahlijih, prozirnih ili smeđih dijelova (Alves i sur. 2009). Određivanje i izdvajanje dijelova kalusa koji imaju veću sposobnost razvoja kalusnog tkiva je jednako kao i određivanje optimalnih embrija, subjektivna procjena. Nakon supkultiviranja na LS mediju se nije razvijalo kalusno tkivo što može biti rezultat loše procijene prilikom izrezivanja presadnica za supkultiviranje.

U sastav medija ulaze makroelementi i mikroelementi koji služe kao izvor svih elemenata potrebnih stanici za rast i razvoj. Kao izvor energije služe ugljikohidrati te je u ovom radu kao izvor hranjivih tvari korištena saharoza čija je uloga također sprječavanje rasta prijevremenog korjenčića te očuvanje embrija od osmotskog šoka (Jelaska, 1994). Nadalje, vitamini i hormoni su potrebni kako bi se pospješio rast stanica. Dodatak CuSO4 dodatno pospješuje i potiče rast i stvaranje kompaktnog embrionalnog kalusa kod dvoklasičaste kostrike Bd21 sorte (Alves i sur. 2009). Nema razlike u konačnoj koncentraciji $CuSO_4$ u LS i MS mediju. U mnogim je radovima zabilježen uspješan razvoj kulture kalusnog tkiva na LS mediju stoga je velika vjerojatnost da je uzrok slabog razvijanja kalusa na LS mediju posljedica lošeg odabira embrija za inokulaciju te oštećenja prilikom postupaka inokulacije i supkultiviranja. Embriji inokulirani na MS medij su imali veći potencijal za razvoj kalusnog tkiva. Kalusno tkivo koje se razvilo tri do četiri tjedna nakon inokulacije na MS medij bilo je veće od kalusa razvijenog na LS medij te je zbog toga bilo jednostavnije precizno izdvojiti dijelove kalusa koji imaju veći potencijal za stvaranje kompaktnog embrionalnog kalusa. Također tokom postupaka inokulacije i supkultiviranja prouzročeno je manje oštećenja kalusnog tkiva na MS mediju. Tri do četiri tjedna nakon inokulacije bilo je potrebno razvijeno kalusno tkivo prebaciti na novi, svježi medij jer su hranjive tvari zajedno s makroelementima i mikroelementima potrošene za razvoj i rast stanica (S. Jelaska 1994.). Izrezivanje kalusnog tkiva na manje dijelove pospješuje daljnje dijeljenje stanica i rast kalusnog tkiva te se kvalitetnije kalusno tkivo razvija ukoliko se češće razdjeljuju (S. C Alves i sur. 2009.). Uspješna se regeneracija potakla na kalusnom tkivu koje se razvilo na MS mediju, dok se regeneracija nije uspjela potaknuti na kalusnom tkivu razvijenom na LS mediju. S obzirom da su kalusna tkiva inokulirana na isti medij nemogućnost regeneracije

kalusa s LS medija upućuje na to da se tokom supkultiviranja oštetilo kalusno tkivo ili se razdijelilo tkivo koje nema potencijal daljnjeg razvitka i regeneracije.

4. ZAKLJUČAK

Dvoklasićasta kostrika (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) je novija modelna biljka za istraživanja na žitaricama i koristi se u genetičkom inženjerstvu.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Uhodane se metode izolacije embrija iz dvoklasićaste kostrike (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.
- Optimizirane su metode razvoja kulture tkiva, posebice kalusnog tkiva koje se dalje može koristiti za transformaciju.
- Kalusno tkivo uspješno je potaknuto na regeneraciju.

6. LITERATURA

Filiz, E., B.S. Ozdemir, B.S., Budak, F., Vogel, J. P., Tuna, M., Budak, H. (2009) Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. Genome 52: 876–890.

Molinari, H. B. C., Pellny, T. K., Freeman, J., Shewry, P. R., Mitchell, R. A. C. (2013). Grass cell wall feruloylation: distribution of bound ferulate and candidate gene expression in Brachypodium distachyon. Frontiers in plant science, 4: 50.

Rivera-Contreras, I. K., Zamora-Hernández, T., Huerta-Heredia, A. A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., Peña-Castro, J. M (2016) Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor, Nature scientific reports 6:27686.

Brkljacic,J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, P. D., Vain, F., Brutnell, T., Sibout, R., Bevan, M., Budak, H., Caicedo, A. L., Gao, C., Gu, Y., Hazen, S. P., Holt, B. F. III, Hong, S-Y., Jordan, M., Manzaneda, A. J., Mitchell-Olds, T., Mochida, K., Mur, L. A. J., Park, C-M., Sedbrook, J., Watt, M., Zheng, S. J., Vogel, J. P. (2011) Brachypodium as a model for the grasses: today i the future, Plant Physiology 157: 3-13.

Vogel, J., Hill, T. (2008) High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3, Plant Cell Reports 27:471–478.

Vogel, J., Bragg J. (2009) *Brachypodium distachyon*, a new model for the titiceae, Genetics and Genomics of the Triticeae 7: 427-449.

Vogel, J. P., Garvin, D. F., Leong, O. M., Hayden, D. M. (2006) Agrobacterium-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 199–211.

Opanowicz, M., Vain, P., Draper, J., Parker, D., Doonan, J. H. (2008) Brachypodium distachyon: making hay with a wild grass. Trends in plant science 13: 172-177.

Lee, M.B., Jeon, W.B., Kim, D.Y., Bold, O., Hong, M.J., Lee, Y.J., Park, J.H., Seo, Y.W. (2011) Agrobacterium-mediated transformation of Brachypodium distachyon inbred line Bd21 with two binary vectors containing hygromycin resistance and GUS reporter genes. Journal of Crop Science and Biotechnology 14: 233-238.

Vain, P., Worland, B., Thole, V., McKenzie, N., Alves, S.C., Opanowicz, M., Fish, L.J., Bevan, M.W., Snape, J.W. (2008) Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass Brachypodium distachyon (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. Plant biotechnology journal 6: 236-245.

Jelaska, S. (1994) Kultura biljnih stanica i tkiva, temeljna istraživanja i primjena, Školska knjiga, Zagreb.

Alves, S. C., Worland, B., Thole, V., Snape, J. W., Bevan, M. W., Vain, P. (2009) A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of Brachypodium distachyon community standard line Bd21 Nature protocols, 4: 638.

Hong, S. Y., Park, J. H., Cho, S. H., Yang, M. S., & Park, C. M. (2011). Phenological growth stages of Brachypodium distachyon: codification and description. Weed Research 51: 612-620.

Web 1: http://www.herbarium.lsu.edu/keys/gloss/callus_palea.jpg
http://www.herbarium.lsu.edu/keys/gloss/embryo_grass.jpg (1.7.2019.)