
Aleksandar Vještica

Razmena plazmida putem konjugacije kod nekih vrsta roda *Agrobacterium*

*Konjugacija predstavlja jedan od načina razmene genetičkog materijala, hromozomalne ili plazmidne DNK, u bakterija. Ustanovljeno je da se putem konjugacije najčešće razmenjuju plazmidi, čak i između različitih vrsta bakterija. Korišćenjem modifikovane Hooykaas-ove metode, u ovom radu je ispitivana mogućnost razmene velikih plazmida između odabranih sojeva *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*. Primenom odgovarajućih selektivnih podloga dobijeni su mogući transkonjuganti.*

Uvod

Agrobakterije su gram negativne, štapičaste, pokretne, aerobne bakterije koje pripadaju familiji Rhizobiaceae. Fitopatogene su za veliki broj dikotiledonih vrsta biljaka, a zabeleženi su i neki slučajevi inficiranja monokotila. Klasifikacija agrobakterija izvršena je na osnovu njihove fitopatogenosti i to na: *A. tumefaciens* koji je izaziva "crown gall" bolest biljaka, *A. rhizogenes* koji izaziva pojavu "hairy root" bolesti biljaka, i *A. radiobacter* koji je avirulentan. S obzirom da je fitopatogenost ovih bakterija najvećim delom determinisana genima na 200-250 kb velikim plazmidima, Ti plazmid u slučaju *A. tumefaciens* i Ri plazmid u slučaju *A. rhizogenes*, ova stara klasifikacija ima ograničenu taksonomsku vrednost. Mehanizam infekcije biljaka fitopatogenim agrobakterijama podrazumeva prenos i inkorporaciju dela Ti odnosno Ri plazmida, poznatijeg kao T-DNK, u hromozomalnu DNK biljne ćelije izazivajući njenu transformaciju.

Plazmidi su cirkularne, nehromozomalne DNK strukture koje se javljaju kod bakterija. Plazmidi agrobakterija su složene strukture i sastoje se od više delova tj. regiona od kojih svaki region ima tačno određenu funkciju. Shematski prikaz plazmida se nalazi na slici 1.

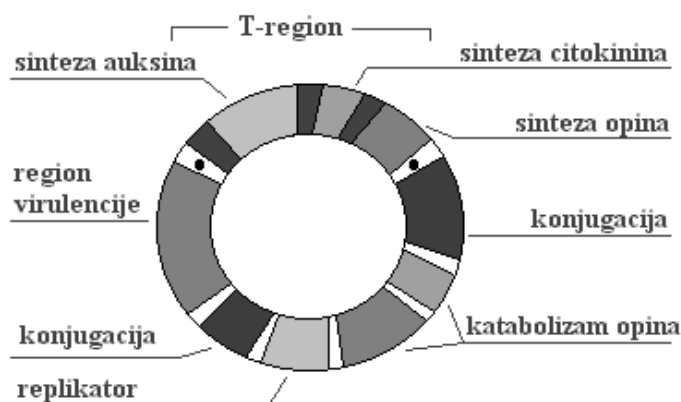
T region je glavni deo sistema inficiranja biljnih ćelija. Poznat je kao T-DNK. On nosi gene koji će biti preneti u hromozomalnu DNK. Produkti

Aleksandar Vještica
(1982), Čačak,
Kačanička 12/3,
učenik 3. razreda
Gimnazije u Čačku

MENTORI:

Ivana Momčilović,
Biološki institut
"Siniša Stanković"

Žaklina Marjanović,
ISP



Slika 1.
Šematski prikaz
plazmida.

Figure 1.
Plasmid (chematic).

auksinskih i citokininskih gena omogućavaju inficiranim biljnim ćelijama da se umnožavaju *in vitro* i bez prisustva odgovarajućih biljnih hormona u podlozi za gajenje. Za samu bakteriju najvažniji su geni za sintezu opina koji će obezbediti izvor energije za bakteriju u vidu neke vrste opina.

Region virulencije (VIR) ima ulogu prilikom inficiranja biljne ćelije i prilikom inkorporiranja T-DNK u hromozomalnu DNK biljke. Zahvaljujući produktima *Vir* gena agrobakterija je u stanju da preživi u odbrambenim biljnim sekretima. Takođe, produkti nekih od *Vir* gena omogućavaju stvaranje pore u zidu biljne ćelije kroz koju će T-DNK proći, kao i inkorporiranje T-DNK u biljnu DNK.

Produkti gena za katabolizam opina omogućavaju bakterijskoj ćeliji da koristi kao hranu opinska jedinjenja koja se sintetišu u inficiranoj biljci. **Region konjugacije (CON region)** ima ulogu za vreme konjugacije bakterije i u njemu se zapravo nalaze geni koji rukovode ovim procesom. **Replikator** je region koji u kome su smeteni geni za sintezu proteina koji omogućavaju replikaciju dvostrukog DNK heliksa plazmida.

Kada dođe do mehaničke povrede biljke, ćelije oko povređenog mesta, u cilju odbrane od spoljnih faktora luče acetosiringon i hidroksi-acetosiringon, posebne supstance koje na agrobakterije deluju kao atraktanti. Ovo aktivira virulentni region agrobakterijalnog plazmida čiji produkti omogućavaju isecanje, prenos i ugradnju T-DNK u hromozomalnu DNK biljne ćelije-domaćina to zapravo i predstavlja mehanizam infekcije biljaka. T-DNK koja se stabilno vezala u hromozomalnoj DNK počinje da funkcioniše kao njen deo. Ćelije koje su zaražene počinju da se ubrzano dele i stvaraju tumor na osnovu aktivacije auksinskih i citokininskih gena.

Konjugacija je transfer DNK putem direktnog kontakta ćelija koji se najčeće javlja kod gram negativnih bakterija i predstavlja razmenu genetičkog materijala (bilo hromozomalne ili plazmidne DNK) u bakterija. Ustanovljeno je da se putem konjugacije najčeće razmenjuju plazmidi, čak i između različitih vrsta bakterija.

Bakterijska konjugacija je jednosmeran proces, kod koga se razlikuju dva tipa bakterija, donorske (F+) i recipijentne (F-). Donorske ćelije poseduju plazmide na kojima se nalaze geni (tra geni) za sintezu vie proteina. Zahvaljujući ovoj osobini donorske bakterije mogu da oforme posebne organele tzv. seksualne pilie, koje omogućavaju stvaranje proteinskog mosta među ćelijama. Kroz taj most mogu da prolaze molekuli vanhromozomske DNK tj. plazmidi.

Kada dve bakterije dođu u kontakt dolazi do interakcije između pilusa i membrane recipijenta. Stimulisan ovime pilus se kreće ka unutrašnjosti ćelije povlačeći za sobom recipijentovu membranu time stvarajući most kroz koji prolaze plazmidi. Po prolasku plazmida dolazi do pucanja mosta i ćelije se razdvajaju. Posledica veličine agrobaterijskih plazmida je otežana konjugacija i transfer plazmida iz jedne u drugu bakteriju.

Konjugativni transfer plazmida se obavlja replikativno, pri čemu se na kraju procesa i u donoru i recipijentu dobijaju kopije plazmida koje se sastoje iz jednog starog i jednog novosintetisanog lanca.

U ovom radu ispitivano je da li je konjugacijom moguća razmena velikih plazmida između odabranih sojeva agrobakterija *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* i njihova koegzistencija u jednoj ćeliji.

Materijal i metode

Bakterijski sojevi

U radu su korišćena dva soja *A. tumefaciens* i jedan soj *A. rhizogenes* koji su otporni na različite vrste antibiotika:

Hranljive podloge

Osnovne:

- LB medijum: tripton – 1%, ekstrat kvasca – 0.5%, NaCl – 0.8%
- LA medijum: LB medijum + 1% agara
- YEB medijum (tečni): pepton – 0.5%, mesni ekstrakt – 0.5%, ekstrat kvasca – 0.1%, saharoza – 0.5%, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0.05%
- YEB medijum čvrsti: YEB tečni medijum + 1% agara

Selektivne:

Kao selektivne podloge korišćene su osnovne hranljive podloge kojima je dodato 100mg/L neomicina i 50 mg/L streptomicina.

Metode sterilizacije

Sterilizacija posuđa vršena je u autoklavu na 135°C i 2.5 bara u periodu od 1 časa. Sterilizacija hranjivih podloga vršena je u autoklavu na 114°C i 0.8 bara u periodu od 25 min. Sterilizacija rastvora antibiotika vr-

šena je pomoću membranskog filtera sa dijametrom pora od 0.2 μm . Sterilizacija instrumenata je vršena iskuvavanjem 20 min.

Metoda konjugacije

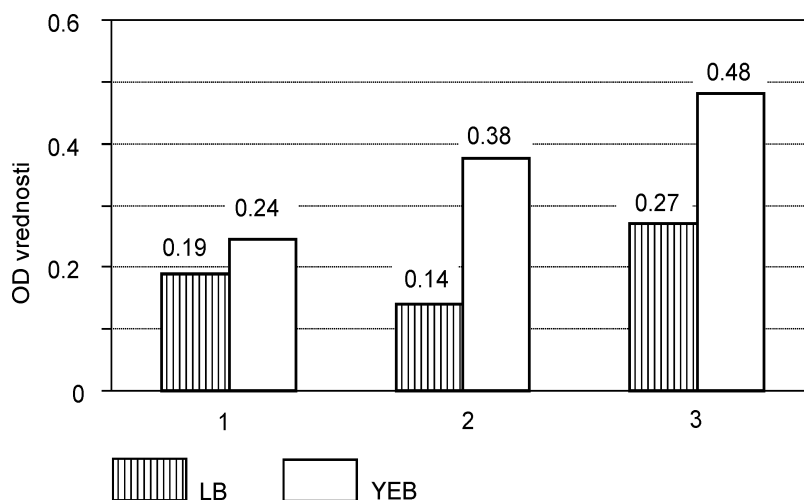
Za ovaj postupak je korišćena izmenjena metoda po Hooykaas-u (1988). Svi bakterijski sojevi su zasađeni na tečnu YEB i LA podlogu.

1. Kulture su ostavljene da se inkubiraju tokom noći (12 h) na 28°C.
2. Izmerene su OD (Optical density) vrednosti za 666 nm preko noćnih kultura na spektrofotometru, pri čemu su dobijeni rezultati dati na slici 2.
3. Odgovarajuće zapremine preko noćnih kultura *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404, kao i *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404/pBi121 pomešane su uz dodavanje svežeg LA ili YEB medijuma da bi OD vrednost svakog soja u smeši bila podešena do 0.1.
4. Suspenzije su ostavljene da se tokom noći (12 časova) inkubiraju.
5. Od preko noćnih kultura uzeto je po 4 mL i profiltrirano kroz membranski filter dijametra pora od 0.2 μm .
6. Membranski filter sa agrobakterijama je postavljen na odgovarajuću (LA ili YEB) čvrstu hranjivu podlogu i ostavljen da se inkubira 12 časova.
7. Posle inkubacije filter je prebačen u 10 mL fiziološkog rastvora, gde se njegovim snažnim mućkanjem dobila bakterijska suspenzija.
8. Od dobijenih suspenzija uzeto je po 50, 100 ili 200 μL i zasejano na odgovarajuće selektivne podloge.
9. Kulture su ostavljene da se razvijaju i praćen je njihov razvoj.

Rezultati

Posle preko noćne inkubacije (12 sati) na selektivnim podlogama koje su bile zasejane suspenzijom *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404/pBi121 razvile su se kolonije. Broj kolonija je premašio sva očekivanja i bilo je nemoguće izbrojati ih jer su se razrastanjem spojile.

Kao kontrast ovome na selektivnim podlogama koje su bile zasejane suspenzijom *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404 nije došlo do pojave kolonija posle preko noćne inkubacije. Nakon 24 časa od početka inkubacije, u Petri kutiji sa YEB podlogom koja je bila zasejana sa 200 μL bakterijske suspenzije *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404, javila se jedna kolonija.



Slika 2.
OD vrednosti
prekonoćnih kultura
bakterija:
1. *A. rhizogenes*
A4M70GUS
2. *A. tumefaciens*
LBA4404
3. *A. tumefaciens*
LBA4404 / pBi121.

Figure 2.
OD values of
overnight culture
incubation:
1. *A. rhizogenes*
A4M70GUS
2. *A. tumefaciens*
LBA4404
3. *A. tumefaciens*
LBA4404 / pBi121.

Diskusija

Plazmidi pRiA4M70 i pAL4404, koje poseduju korišćeni sojevi agrobakterija, pripadaju grupi velikih plazmida za koje je specifično da imaju mali broj kopija po ćeliji. Stoga je interesantno bilo ustanoviti da li je moguća njihova koegzistencija u istoj bakterijskoj ćeliji. Ukoliko jeste, u transformaciji biljaka bilo bi moguće koristiti transkonjugante sa oba plazmida, gde bi svaki plazmid posedovao T-DNK sa različitim genskim konstruktima. Obzirom da plazmid pRiA4M70 nosi gen otpornosti na neomicin, a pAL4404 na streptomycin, potencijalni transkonjuganti pokazivali bi otpornost prema oba antibiotika.

Dobijeni rezultati za konjugacionu razmenu plazmida *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404/pBi121 bili su donekle neočekivani. Postavilo se pitanje da li su sve dobijene kolonije transkonjuganti i ukoliko nisu, kako je moguć njihov razvitak na selektivnoj podlozi. Rešenje proističe iz činjenice da soj *A. tumefaciens* LBA4404/pBi121 pored velikog plazmida pAL4404 poseduje i pBi121 koji nosi *npt II* gen, čiji produkt razgrađuje i kanamicin i neomicin. Bakterijske kolonije koje su se pojavile na selektivnoj podlozi sa neomicinom i streptomycinom verovatno su *A. tumefaciens* LBA4404/pBi121, mada postoji verovatnoća da su se javili i transkonjuganti. U ovom slučaju podjednako uspešno su se pokazale obe podloge.

Dobijeni kolonije koje su se razvile na YEB podlozi pri korišćenju sojeva *A. rhizogenes* A4M70GUS i *A. tumefaciens* LBA4404 ukazuje na to da je konjugacija uspešla, odnosno da su se pojavili transkonjuganti otporni na oba antibiotika. Takođe se pokazalo da je za ovaj eksperiment efikasnije koristiti YEB nego LA podlogu.

Metoda kojom je rađen eksperiment je bila uspešna ali je zapažen razvitak malog broja kolonija, i to tek kada je 200 μ L bakterijske suspenzije zasejano na selektivnu podlogu, dok se po zasejavanju metodom predviđenih količina suspenzije, kolonije nisu razvile. Ovo ukazuje na mali broj slučajeva uspešnog transfera velikih plazmida putem konjugacije.

Zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje transkonjuganata. Mogući transkonjuganati koji su otporni na korišćene antibiotike ukazuju na sposobnost agrobakterija da razmenjuju svoje plazmide putem konjugacije.

U cilju otklanjanja i najmanje sumnje po pitanju postojanja transkonjuganata potrebno je sprovesti dalja istraživanja, koja bi uključila metode molekularne biologije tj. izolaciju i karakterizaciju plazmida.

Literatura

Hooykaas, P. J. J. 1988. *Agrobacterium* molecular genetics. In: *Plant Molecular Biology Manual*, A4. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, pp. 1-13.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*, (second edition: A Laboratory Manual). New York: Laboratory Press Cold Spring Harbor.

Aleksandar Vještica

Conjugative Transfer of Plasmids in *Agrobacterium* sp.

The bacteria from the genus *Agrobacterium* are well known as gene vectors for plant cells. This role is based on mechanism of infection that include transfer of a defined piece of DNA (T-DNA) from Ti or Ri agrobacterial plasmids into the plant chromosomal DNA. Ti and Ri plasmids are 200-250 kb large, conjugative plasmids. Because of size, there is only few copies of this plasmids per bacterial cell. In our project we examined the possibility of conjugative transfer of large plasmids between agrobacterium strains harboring Ti or Ri plasmids. For this purpose, we modified method developed by P. J. J. Hooykaas (1988) and used different strains of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*. As a result a possible transconjugants have been selected.

