

Bakterije roda *Agrobacterium* i njihov značaj u biotehnologiji

Kočmar, Viktorija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:554320>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**BAKTERIJE RODA *Agrobacterium* I NJIHOV ZNAČAJ U
BIOTEHNOLOGIJI**

DIPLOMSKI RAD

Viktorija Kočmar

Zagreb, rujan, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**BAKTERIJE RODA *Agrobacterium* I NJIHOV ZNAČAJ U
BIOTEHNOLOGIJI**

DIPLOMSKI RAD

Viktorija Kočmar

Mentor:

doc. dr. sc. Nataša Hulak

Zagreb, rujan, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Viktorija Kočmar**, JMBAG 0178108510, rođen/a 02. kolovoza 1997. u Koprivnici,
izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

BAKTERIJE RODA *Agrobacterium* I NJIHOV ZNAČAJ U BIOTEHNOLOGIJI

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Viktorija Kočmar**, JMBAG 0178108510, naslova

BAKTERIJE RODA *Agrobacterium* I NJIHOV ZNAČAJ U BIOTEHNOLOGIJI

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Nataša Hulak mentor

2. doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur član

3. doc. dr. sc. Luna Maslov Bandić član

Zahvala

Ovime zahvaljujem baki na iskazanom strpljenju i potpori tijekom cijelog studiranja, a tako i tokom pisanja ovoga rada. Također, želim zahvaliti mami, teti i bratiću Nini na motivaciji za ostvarivanje željenih ciljeva. Želim zahvaliti dečku Svenu što je bio oslonac u vrijeme stresa. Na kraju, želim zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Nataši Hulak na usmjeravanju pisanja ovoga rada.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada	1
2. Područja djelovanja biotehnologije	2
2.1. Zelena biotehnologija	4
3. Taksonomija roda <i>Agrobacterium</i>	6
3.1. Taksonomija roda <i>Agrobacterium</i> u prošlom stoljeću	6
3.2. Taksonomski status roda <i>Agrobacterium</i> u ovom stoljeću	8
4. Vrste roda <i>Agrobacterium</i>	10
4.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
4.1.1. Infekcija	13
4.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
4.3. <i>Agrobacterium rubi</i>	16
4.4. <i>Agrobacterium vitis</i>	17
4.5. <i>Agrobacterium radiobacter</i>	18
4.6. <i>Agrobacterium bohemicum</i>	18
4.7. <i>Agrobacterium fabacearum</i>	19
4.8. <i>Agrobacterium pusense</i>	19
5. Odgovor biljke na infekciju.....	20
6. Upotreba roda <i>Agrobacterium</i> u biotehnologiji.....	23
6.1. Izrada vektora	26
6.2. Vrste roda <i>Agrobacterium</i> u biotehnologiji.....	29
6.3. Transgene biljke.....	34
7. Zaključak	38
8. Literatura	39
Životopis	44

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Viktorija Kočmar** naslova

BAKTERIJE RODA *Agrobacterium* I NJIHOV ZNAČAJ U BIOTEHNOLOGIJI

Zelena biotehnologija bavi se uporabom ekološki prihvatljivih rješenja kao alternativa tradicionalnoj poljoprivredi te na taj način nastoji smanjiti ovisnost poljoprivrede o mehaničkim i kemijskim inovacijama. Primjer zelene biotehnologije je proizvodnja transgenih biljaka uz pomoć mikroorganizama kao što su to agrobakterije. Rod *Agrobacterium* obuhvaća Gram-negativne mikroorganizme koji su poznati po svojoj patogenosti. Naime, vrste ovoga roda posjeduju Ti-plazmid uz pomoć kojeg stvaraju tumore vrata korijena ili Ri plazmid koji uzrokuje pojačani rast korijenovih dlačica. Infekcija nastaje preko ozljede biljke, nakon čega dolazi do transformacije biljnih stanica u tumorske stanice koje se dalje samostalno razmnožavaju. Svrha infekcije je da agrobakterija kontrolira mehanizme domaćina za sintezu nekih esencijalnih metabolita za vlastiti rast. Jedinstvenost roda *Agrobacterium* leži u mogućnosti genetske transformacije domaćina prenošenjem dobro definiranog segmenta DNA iz Ti-plazmida u genom stanice domaćina. Regija T-DNA je mobilni element koji je odgovoran za stvaranje tumora i biosintezu opina u biljci. Kako bi postali pogodni za uporabu u biotehnologiji, nekada korišteni sojevi *Agrobacterium* trebali su biti konstruirani od odabranih sojeva divljeg tipa. Neke prirodne značajke Ti-plazmida morale su se u potpunosti ukloniti (npr. geni odgovorni za stvaranje tumora), dok su karakteristike nekih komponenata mehanizama za transformaciju morale biti poboljšane. Uz poboljšane karakteristike Ti-plazmida vrste roda *Agrobacterium* postale su pogodne za izradu vektora, čime se mogu dobiti transgene biljke koje su rezistentne na štetočine, tolerantne na herbicide, te imaju poboljšani nutritivni sastav.

Ključne riječi: zelena biotehnologija, *Agrobacterium*, infekcija, Ti - plazmid, transgene biljke

Summary

Of the master's thesis – student **Viktorija Kočmar**, entitled

BACTERIA OF THE GENUS *Agrobacterium* AND THEIR IMPORTANCE IN BIOTECHNOLOGY

Green biotechnology deals with the use of environmentally-friendly solutions as an alternative to traditional agriculture and in that way seeks to reduce the dependence of agriculture on mechanical and chemical innovations. An example of green biotechnology is the production of transgenic plants with the help of microorganisms such as agrobacteria. The genus *Agrobacterium* includes Gram-negative microorganisms that are known for their pathogenicity. Moreover, species of this genus possess Ti-plasmid which causes crown gall or Ri-plasmid which causes increased growth of root hairs. Infection occurs through injury to the plant, followed by the transformation of plant cells into tumor cells that further proliferate independently. The purpose of infection is for the agrobacterium to control host mechanisms for the synthesis of some essential metabolites for its own growth. Uniqueness of the genus *Agrobacterium* lies in the possibility of genetic transformation of the host by transferring a well-defined segment of DNA from the Ti-plasmid into the genome of the host cell. The T-DNA region is the mobile element responsible for tumor formation and opine biosynthesis in the plant. To become suitable for use in biotechnology, once-used *Agrobacterium* strains had to be constructed from selected wild-type strains. Some natural features of Ti-plasmids had to be completely removed (e.g. genes responsible for tumor formation), while the characteristics of some components of the transformation mechanisms had to be improved. With the improved characteristics of Ti-plasmids species of the genus *Agrobacterium* have become suitable for vector construction, which can provide transgenic plants that are resistant to pests, tolerant to herbicides, and have improved nutritional composition.

Keywords: green biotechnology, *Agrobacterium*, infection, Ti- plasmid, transgenic plants

1. Uvod

Rizosfera, volumen tla koji okružuje korijenje, izuzetno je pogodno stanište za razvoj mikroorganizama. Rizosfera se još naziva i „hot spot“ jer se ondje nalazi znatno veći broj mikroorganizama u odnosu na okolno tlo. Mikroorganizmi svojim djelovanjem u području rizosfere imaju značajan kemijski, fizički i biološki utjecaj na sam korijen biljke. Eksudati korijena bogati su aminokiselinama, monosaharidima i organskim kiselinama koje mogu služiti kao primarni izvor hranjiva, te time podupirati dinamičan rast i aktivnost različitih mikroorganizama u blizini korijena. Mikroorganizmi koji koloniziraju korijen mogu živjeti na njemu, parazitirati ga ili biti saprofiti. Jedan od značajnih rodova koji imaju enormni utjecaj na rizoferu, tj. na samu biljku jest rod *Agrobacterium*. Zbog globalnog zatopljenja i promjene klime, postaje teže uzgajati usjeve jer vladaju drugačiji uvjeti u tlu i zraku. Ovdje do izražaja dolazi biotehnologija. U narednim poglavljima opisat će se benefiti biotehnologije u poljoprivredi, a ujedno će se detaljno opisati klasifikacija roda *Agrobacterium* kroz povijest te kako je klasificiran od 2000. godine na dalje. Osim toga opisat će se najstarije vrste iz roda *Agrobacterium*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium vitis* i *Agrobacterium radiobacter* te njihova moguća uporaba na području biotehnologije. Također, dat će se uvid u relativno nove vrste, *Agrobacterium boehemicum*, *Agrobacterium fabacearum* i *Agrobacterium pusense*. Ukratko će se prikazati izrada vektora te mogućnost stvaranja transgenih biljaka.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je na osnovu prikupljene literature opisati pojedine biotehnološki važne vrste roda *Agrobacterium* te navesti njihovu primjenu u biotehnologiji. Vektori služe za prijenos stranog genetičkog materijala u drugu stanicu, a u ovom radu opisat će se konstrukcija vektora pomoću T- DNA regije koja se izvorno nalazi u Ti plazmidu bakterije *A. tumefaciens*.

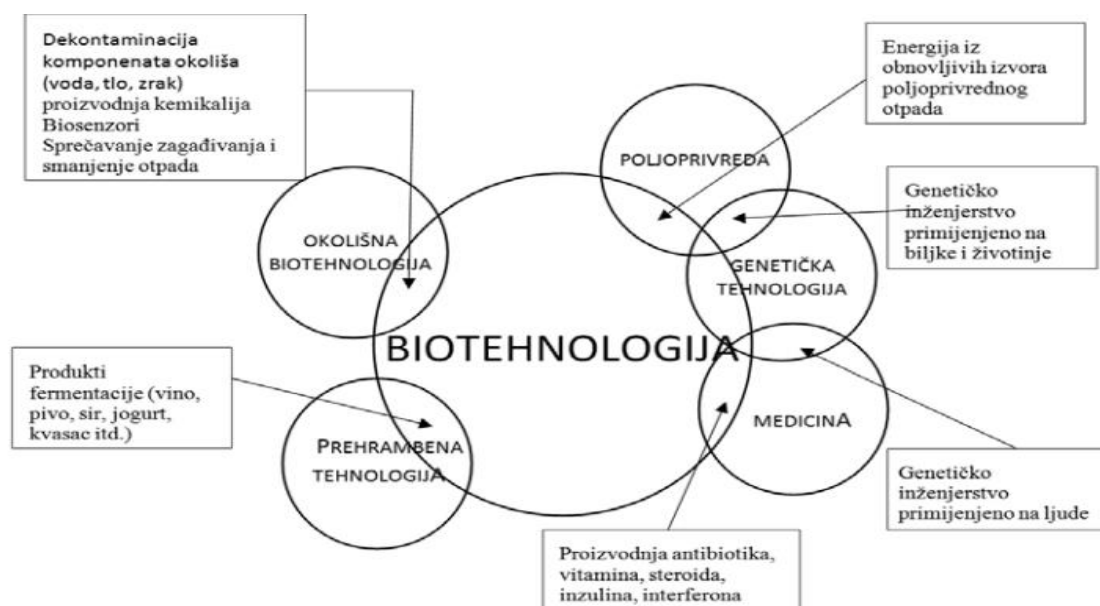
2. Područja djelovanja biotehnologije

Biotehnologija je jedno od najbrže rastućih područja znanosti te bilježi velik napredak u raznim područjima, kao što je to poljoprivreda, medicina, farmacija, industrija i znanost o okolišu. Pojam biotehnologija podrazumijeva ciljanu modifikaciju živih organizama te se široko koristi u poljoprivredi. Klimatske promjene sve će više utjecati na proizvodnju hrane u mnogim dijelovima svijeta. Lokalna promjena temperature od + 1 °C može ugroziti proizvodnju žitarica s kišom, dok će promjene od preko + 3 °C dovesti do velikih gubitaka usjeva. Prilagodba u održivom gospodarenju može djelomično ublažiti klimatske učinke, ali biotehnologija može pomoći u poboljšanju otpornosti na štetnike i bolesti, stabilnosti prinosa, te povećanju prehrambenih vrijednosti kultura. Klima koja se brzo mijenja zahtijevat će brzi razvoj novih biljnih sorti koje se mogu prilagoditi novonastalim uvjetima, a biotehnologija može povećati brzinu, dostupnost, fleksibilnost i učinkovitost uzgoja biljaka (Whitford i sur., 2010).

Biotehnologija primjenjuje znanstvene i inženjerske principe na žive organizme kako bi nastali proizvodi i usluge vrijedne za društvo. Program istražuje mikroorganizme, biljke i životinje u kontekstu otkrića, razumijevanja, poboljšanja i razvoja održivih proizvoda ili aktivnosti. Disciplina kombinira elemente iz mnogih područja kao što su molekularna genetika, mikrobiologija, imunologija, fizika, kemija, inženjerstvo i matematika. Biotehnologija je nastala iz područja zimotehnologije (stari pojam za proučavanje procesa fermentacije kvasca i bakterija u proizvodnji hrane i pića). U 19. stoljeću, usponom velikih industrija, naročito u Britaniji i Njemačkoj, znanstvenici su počeli izolirati mikroorganizme i proučavati ih. Prvom polovicom 20. stoljeća znanstvenici su počeli uključivati zimotehnologiju u primijenjene znanosti, analogno kemiji. Kasnije se počinju osnivati institucije za sakupljanje mikroorganizama. Koncept zimotehnologije proširen je na opći koncept biološke kemije, koji uključuje upotrebu bioloških molekula, kao što su to aminokiseline, proteini i enzimi u industrijskoj proizvodnji. Riječ "biotehnologija" osmislio je Karl Ereky u Mađarskoj 1919. godine kako bi opisao procese pretvaranja sirovina u korisne proizvode (Ghasemi i sur., 2015). Napredak na području molekularne biologije rezultirao je brзом identifikacijom i kvantifikacijom genetskih varijacija, kao i identifikacijom gena ili genomskih regija povezanih s istraživanjem kvalitativnih i kvantitativnih svojstva (Whitford i sur., 2010).

Zbog širokog spektra primjene, koriste se boje za razlikovanje glavnih područja istraživanja kao što su bijela (industrija), zelena (poljoprivreda), plava (vodene površine), te crvena (medicina) (slika 1). Bijela biotehnologija fokusira se na proizvodnju i preradu kemikalija, materijala i energije uz pomoć živih stanica poput kvasca, gljivica, bakterija, biljaka i enzima. Industrijskom biotehnologijom prvenstveno se nastoji smanjiti štetan utjecaj na okoliš (Beljo i sur., 2015). Procjenjuje se da industrijska biotehnologija može dovesti do smanjenja emisije CO₂ za čak 50%, potrošnju energije za 20%, a potrošnju vode za 75%. Također, bijela biotehnologija može imati i određenu ekonomsku prednost, na način da se upotrebom mikroorganizama smanjuju troškovi, a povećava se učinkovitost samoga proizvoda. Trenutno

se bijela biotehnologija koristi za proizvodnju organskih kiselina (limunska, octena, mliječna kiselina), zaslađivača (ksilitol, sorbitol, aspartam) i alkohola (Villadsen, 2007).



Slika 1. Područja primjene biotehnologije. Preuzeto iz Beljo i sur. (2015).

Plava ili morska biotehnologija nastoji koristiti morsku biološku raznolikost kako bi se dobili novi proizvodi. Također, koristi specifične gene morskih organizama kako bi se dobile biljke koje su otporne na okolišne uvjete kao što je to suša. Plava biotehnologija omogućuje i zaštitu okoliša kroz korištenje postupka bioremedijacije, koji detektira i uklanja zagađivače iz okoliša. Proteini i enzimi iz morskih organizama izuzetno su važni za industrijsku biotehnologiju jer imaju potencijal da doprinesu razvoju novih procesa u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Na primjer, biopolimeri morskog podrijetla korišteni su u biorazgradivoj plastici, farmaceutskim i medicinskim proizvodima, bioljepivima i zubnim biomaterijalima (Barcelos i sur., 2018).

Crvena biotehnologija podrazumijeva primjenu biotehnoških postupaka u medicini, a na taj se način razvijaju novi i bolji postupci liječenja bolesti srca, dijabetesa i ostalih bolesti. Crvena biotehnologija otvara i nove mogućnosti razvoja cjepiva i lijekova. Također, razvijaju se novi antibiotici koji suzbijaju infektivne organizme koji su razvili otpornost na postojeće antibiotike. Primjena biotehnologije u medicini omogućila je razvoj brzih testova za postavljanje točnih dijagnoza, ali i nove načine za transplataciju organa (WGU, 2018).

Zelena biotehnologija nastoji smanjiti ovisnost poljoprivrede o mehaničkim i kemijskim inovacijama primjenom manje agresivnih pristupa prema okolišu. Zelena biotehnologija tako doprinosi nastanku zdravije hrane, ali i povećanoj produktivnosti i smanjenju troškova proizvodnje (Barcelos i sur., 2018). Biotehnologija je smanjenjem upotrebe kemikalija u poljoprivredi donijela mnoge ekološke koristi našem društvu, a možda i svijetu, te je prouzročila gospodarski rast. Potrebne su značajne promjene u strukturi političkih pristupa i

istraživačkih tvrtki kako bi se dobili proizvodi koji udovoljavaju ekološkim i socijalno-ekonomskim kriterijima (Ghasemi i sur., 2015).

2.1. Zelena biotehnologija

Biotehnologija poboljšava proizvodnju, štedi vrijeme i novac te smanjuje uporabu kemijskih preparata. Bez obzira na to, drugi se aspekti biotehnologije, poput socioekonomskih aspekata, obično zanemaruju. S druge strane, tradicionalna poljoprivreda, bez obzira na primjenu ove tehnologije u održivoj poljoprivredi, vjeruje da su ove prednosti privremene, a dugoročno se smatraju ozbiljnom prijetnjom za ekosustav. Održiva poljoprivreda prakticira pravilno upravljanje prirodnim resursima za opskrbu ljudskih potreba za hranom i drugim dobrima uz očuvanje kvalitete okoliša i sprečavanje degradacije prirodnih resursa. U održivoj poljoprivredi glavni ciljevi su: smanjenje pritiska na zemlju i ekosustav, izbjegavanje upotrebe kemijskih pripravaka koji se nalaze u obliku gnojiva, pesticida i herbicida, te očuvanje prirodnih resursa i ljudskoga zdravlja (Ghasemi i sur., 2015).

Zelena biotehnologija prakticira se već duže vrijeme jer su ljudi selekcijom i uzgojem nastojali poboljšati poljoprivredno važne sorte. Primjer zelene biotehnologije je razvoj sorti pšenice (*Triticum* spp.) otpornih na bolesti i to na način da su se križale različite vrste pšenice (*Triticum* spp.), sve dok željena karakteristika za otpornost na bolest nije bila prisutna u novonastaloj sorti. Kod tradicionalnog uzgoja križanja se provode na relativno nekontroliran način, što bi značilo da uzgajivač sam odabire roditelje, ali na genetskoj razini rezultati su često nepredvidivi. DNA roditelja nasumično se kombinira, a poželjne osobine kao što je to otpornost na štetnike povezane su s nepoželjnim svojstvima kao što je to slabiji prinos. Tradicionalni uzgojni programi dugotrajni su i zahtjevni jer je potreban veliki trud da se odvoje nepoželjne od poželjnih osobina. Na primjer, biljke se moraju iznova križati tijekom mnogih sezona rasta kako bi se razdvojile nepoželjne karakteristike proizvedene slučajnim miješanjem genoma. Trenutne tehnike genetskog inženjeringa omogućuju odabir i pojedinačnu rekombinaciju segmenata DNA koji kodiraju gene za određenu karakteristiku u novom organizmu. Jednom kada se identificira gen (ili skupina gena) koji određuje poželjnu osobinu, on se može odabrati i prenijeti na potomstvo. Isto tako, geni koji kodiraju neželjene osobine mogu se ukloniti (utišavanjem ili utjecanjem na njihovu ekspresiju i/ili deleciju). Kroz ovu tehnologiju poželjna svojstva u biljci mogu se postići puno brže nego li je to slučaj sa tradicionalnim tehnikama uzgoja. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća napredak na području molekularne biologije pružio je znanstvenicima mogućnost manipulacije DNA na molekularnoj razini, a takva tehnologija naziva se genetski inženjering. Također, ova tehnika omogućuje prijenos DNA između udaljenijih organizama, što nije bilo moguće tradicionalnim tehnikama uzgoja. Danas je ova tehnologija dosegla fazu u kojoj znanstvenici mogu uzeti jedan ili više specifičnih gena iz gotovo bilo kojeg organizma, uključujući biljke, životinje, bakterije ili viruse, te ih uvesti u drugi organizam. Organizam koji je transformiran tehnikama genetskog inženjeringa naziva se transgenim organizmom ili genetski modificirani

organizam (GMO). Hrana koja se dobije iz transgenih biljaka naziva se „GMO hrana“, „GMP“ (genetski modificirani proizvod) ili „biotehnološka hrana“. Iako neki hranu koja je razvijena pomoću genetskog inženjerstva nazivaju "hranom s biotehnološkim poboljšanjima", drugi je nazivaju "frankenfood" i smatraju kako se takva hrana ne bi trebala konzumirati (Wieczorek, 2003). Valja naglasiti da je sam proces nastajanja GMO hrane, strogo kontroliran, te da je selekcija gena da se poboljša određeno svojstvo u takvoj hrani pomno istraživana kao i utjecaj na čovjekovu konzumaciju istih. Više o nastanku transgenih biljaka može se naći u poglavlju 6.3.

Biotehnologija se koristi za rješavanje problema u svim područjima poljoprivredne proizvodnje i prerade. To uključuje uzgoj biljaka radi podizanja i stabiliziranja prinosa, poboljšanje nutritivnog sadržaja hrane, te poboljšanje otpornosti na štetnike, bolesti i abiotске stresove (suša i hladnoća). Također, stvara nove alate za dijagnozu i liječenje biljnih i životinjskih bolesti, a može se koristiti i za ubrzavanje uzgojnog programa biljaka, stoke i riba (Ghasemi i sur., 2015).

Zelena biotehnologija omogućuje povećanje produktivnosti i razvoj prilagodljivih biljaka s većim energetske potencijalom, tražeći, između ostalog, proizvodnju biogoriva. Iz tog se razloga provode brojna istraživanja kako bi se povećala proizvodnja etanola. Biotehnologija je omogućila razvoj klonova šećerne trske (*Saccharum officinarum* L.) s većim udjelom saharoze, tolerancijom na sušu, visokim sadržajem staničnih vlakna, a sve to kako bi se promovirala proizvodnja etanola i smanjio štetan utjecaj na okoliš. Osim genetskog poboljšanja biljaka za proizvodnju etanola, zelena biotehnologija aktivna je i u genetskom poboljšanju sirovina za proizvodnju biodizela, poput soje (*Glycine max* L.) i ricinusova zrna (*Ricinus communis* L.). Baš kao u proizvodnji biogoriva, zelena biotehnologija sudjeluje i u uzgoju biljaka za proizvodnju biopolimera. Biopolimeri mogu biti biljnog podrijetla kao što su to alge (alginat, agar, karagenan), sjeme (guar guma), drveće ili njihovi eksudati (guma karaya, arapska guma), ali mogu biti i proizvodi biosinteze mikroorganizama (ksantan guma, gelan, dex tran, curdlan) ili kemijske modifikacije prirodnih polisaharida (pektin, želatina, škrob). Modifikacija škroba iz biljnih izvora, poput kukuruznog i krumpirovog škroba, može se upotrijebiti za dobivanje sirovina sa većom stabilnosti na uvjete skladištenja i manjom osjetljivosti na promjene vlage. Najvažniji su biopolimeri polilaktid, polihidroksialkanoat, škrobni polimeri i ksantanska guma. Industrija biopolimera istražuje uporabu neprehrambenih usjeva i nusproizvoda kao što su slama i vreće. Uz rastuću raznolikost biopolimera, svojstva poput fleksibilnosti, trajnosti, prozirnosti, otpornosti na toplinu, sjaja, itd., znatno se poboljšavaju. Prodajna cijena biopolimera je i do 50% veća od tržišnih cijena najčešćih sintetičkih polimera. Očekuje se da će se cijena smanjiti s 20% na 25% u sljedećih 5 godina, dok se očekuje porast cijene polimera dobivenih iz nafte kao posljedica povećane potražnje i cijene nafte. Brzi rast stanovništva povećao je potražnju za hranom, energijom, gorivom, lijekovima i raznim materijalima (plastika, tkanine, papir i tinte). Da bi zadovoljila ovu potražnju, poljoprivreda je od ključne važnosti u pružanju velike količine sirovina koje koriste industrije. Zelena biotehnologija može pozitivno pridonijeti povećanoj ponudi krajnjih potreba, poboljšavajući kvalitetu i sigurnost te smanjujući utjecaje na okoliš (Barcelos i sur., 2018).

3. Taksonomija roda *Agrobacterium*

Za samu taksonomiju može se reći da se sastoji od tri komponente: identifikacije, nomenklature i sistematike. Fenotipska klasifikacija temelji se na ukupnoj vrijednosti sličnosti i razlika između bakterija, dok se filogenetska klasifikacija temelji na zaključenim odnosima predaka bakterija (Young i sur., 2003). Rodovi *Agrobacterium*, *Allorhizobium* i *Rhizobium* pripadaju u porodicu *Rhizobiaceae*. Međutim, smještaj fitopatogene skupine bakterija, roda *Agrobacterium*, među bakterijama koje vežu dušik te nejasan položaj *Rhizobium galegae*, izazvali su kontroverzu u prethodnim taksonomskim istraživanjima. Kako bi se riješile nesigurnosti u taksonomiji i nomenklaturi unutar ove obitelji, proučavani su filogenetski odnosi generičkih članova porodice *Rhizobiaceae* (Musavi i sur., 2014). Za rodove *Agrobacterium* i *Rhizobium* odavno je poznata njihova uska povezanost. U Međunarodnom časopisu za sistematsku i evolucijsku mikrobiologiju ova dva roda često su isprepletena jer nema osnove kojom bi se smatrale zasebnim rodovima u fenotipskom ili filogenetskom smislu. Predloženo je da sve vrste budu objedinjene u jednom rodu - *Rhizobium*, koji se sastoji od patogenih, simbiotskih fiksatora dušika i nespecijaliziranih populacija tla. Osim problema svrstavanja vrsti unutar ovih rodova javlja se i problem u nomenklaturi samih vrsta. Također, postoji problem i raspoznavanja sojeva unutar vrsti kao i nošenje gena na različitim plazmidima patogenih i rizogenih populacija (Young i sur., 2003). Članovi roda *Agrobacterium* čine raznoliku skupinu organizama, koji su svi, kada sadrže određenu vrstu plazmida, sposobni prouzročiti neoplastične izrasline na biljkama domaćinima (Farrand i sur., 2003).

3.1. Taksonomija roda *Agrobacterium* u prošlom stoljeću

Rod *Agrobacterium* uveo je Herbert William Conn koji ga je uključio u porodicu *Rhizobiaceae* zajedno s rodом *Rhizobium*. U petom izdanju Bergeyjeva priručnika za determinativnu bakteriologiju, vrste uključene u rod *Agrobacterium* bile su *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*. U 6. izdanju ovog priručnika uključena je biljna tumorska vrsta *Agrobacterium rubi*, koja je diferencirana od *A. tumefaciens* na temelju sposobnosti redukcije nitrata u nitrite. U 7. izdanju ovog priručnika vrste *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium pseudotsugae* i *Agrobacterium gypsophilae* dodane su u rod, ali je to kasnije revidirano te su ove vrste smještene u druge rodove. 8. izdanje Bergeyjeva priručnika uključivalo je samo četiri vrste: *A. radiobacter*, koja je bila nepatogena, *A. rhizogenes*, koja je inducirala korijenove dlačice, te *A. tumefaciens* i *A. rubi*, koje su inducirale tumore vrata korijena. Diferencijacija ovih vrsta temeljila se na nekim fenotipskim karakteristikama zajedno s njihovom sposobnošću da proizvode različite simptome u različitim biljkama. Ove su četiri vrste uključene u potvrdne liste Skerman i sur., koji su naznačili da je *A. tumefaciens* tipiska vrsta roda *Agrobacterium* (Flores-Felix i sur., 2020).

Pojedini autori pozabavili su se teškim i kontroverznim pitanjem taksonomije dvaju rodova, *Agrobacterium* i *Allorhizobium*, unutar porodice *Rhizobiaceae*. Tijekom posljednja tri desetljeća to je postajalo redovito pitanje, a dijelom proizlazi iz diferencijacije roda *Agrobacterium* od roda *Rhizobium* kao skupine dušikovih vrsta rizobija koje ne fiksiraju dušik, već proizvode "druge vrste hipertrofija". Iz trenutnog shvaćanja velikog broja opisnih djela, jasno je da vrste unutar roda *Agrobacterium* ne čine monofiletsku skupinu. Ovaj zaključak nije ograničen na rod *Agrobacterium*, odnosi se i na druge rodove iz porodice *Rhizobiaceae*, a nedavno je doveo do podjele roda *Rhizobium* na nekoliko rodova uključujući *Rhizobium*, *Mesorhizobium* i *Sinorhizobium*. Prijedlozi o načinu rješavanja pitanja taksonomije *Agrobacterium* pojavljivali su se s vremena na vrijeme, ali nisu imali puno utjecaja na to kako su pripadnici ovog roda opisani i imenovani u znanstvenoj literaturi. U istom radu istražuje se povijest ovog taksonomskog pitanja, a zaključak je da se svi pripadnici rodova *Agrobacterium* i *Allorhizobium* uvrste u rod *Rhizobium*. Nema sumnje da je rod *Agrobacterium* polifiletičan. Također, nema sumnje da agrobakterije i rizobije čine paradoksalno raznoliku skupinu srodnih članova α -proteobakterija. Na temelju biokemijskih i fenotipskih analiza, predloženo je da se rod *Agrobacterium* podijeli na dva biovara. Potom je opisana treća skupina, biovar 3 koja uključuje izolate iz vinove loze (*Vitis vinifera* L.). U novije vrijeme, analiza sekvenci 16S rRNA podržava ovu podjelu. Biovar 1 izolira sve skupine zajedno i skuplja se s *Allorhizobium undicola* i nekoliko atipičnih vrsta *Rhizobium*, uključujući *Rhizobium galegae* i *Rhizobium huautlense*. Ova skupina dobro korelira sa skupinom *Agrobacterium tumefaciens*. Analize 16S rRNA stavljaju izolate *Agrobacterium rubi* u ovu skupinu. Na temelju fenotipskih analiza, *A. rubi* je netipičan, ali opet, najuže je povezan s izolatima biovara 1. Biovar 1 pokazuje fenotipska svojstva koja ih jasno razlikuju od pripadnika roda *Rhizobium* kao i od ostalih agrobakterija. Štoviše, čak i kad se čini da su osobine identične, potreban je oprez jer fiziologija, biokemija pa i genetska struktura koja leži u osnovi ovih vrsta, može biti različita. Na primjer, gotovo svi članovi porodice *Rhizobiaceae* kataboliziraju laktozu, čineći ovu osobinu naizgled nediskriminirajućom. Međutim, biovar 1 agrobakterija katabolizira ovaj šećer i neke druge disaharide, poput saharoze. Biovar 2 čini drugu skupinu i na temelju analize sekvence 16S rRNA, ovdje se grupiraju s nekoliko članova roda *Rhizobium*, uključujući *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* i *Rhizobium tropici*. Skupina biovar 2 odgovara skupini *Agrobacterium rhizogenes*. Položaj izolata biovar 3 ostaje neizvjestan. Na temelju biokemijskih i metaboličkih karakteristika, ova skupina reklasificirana je u vrstu, *Agrobacterium vitis* (Farrand i sur., 2003).

Tijekom 70-ih i 80-ih godina prošlog stoljeća provedeno je nekoliko istraživanja koje je uključivalo izolaciju sojeva iz različitih izvora, na temelju čega je revidirano postojanje različitih sorti, biovara i/ili biotipova. Neki su autori predložili da vrste *A. tumefaciens* i *A. radiobacter* (kasnije nazvanu *A. radiobacter* var. *tumefaciens*) čine jednu vrstu. Prvo izdanje Bergeyjevog Priručnika za sistemske bakteriologiju objavljenom 1984. godine, obuhvaćalo je četiri vrste, *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rubi*, i *A. rhizogenes*. U ovom izdanju Priručnika zabilježen je veći broj fenotipskih karakteristika za vrste *Agrobacterium*, ali njihova se diferencijacija i dalje temelji na fenotipskim i fitopatogenim testovima. Početkom 90-ih predloženo je nekoliko promjena u rodu *Agrobacterium*, uključujući opis novih vrsta. Međutim, nijedna od tih promjena nije zabilježena u devetom i posljednjem izdanju

Bergeyjevog Priručnika za determinativnu bakteriologiju objavljenom 1994. godine, koji je obuhvaćao iste vrste koje su opisane u prvoj verziji ovog Priručnika. Godine 1992. uključeno je nekoliko sojeva izoliranih iz morskih izvora u nekoliko vrsta roda *Agrobacterium* koji nadopunjuju *A. stellulatum*, *A. ferrugineum* i *A. gelatinovorum*. No, nove vrste *Agrobacterium atlanticum* i *Agrobacterium meteori* nisu bile uključene u potvrdni popis Skermana i sur. Sve ove vrste kasnije su reklasificirane u druge rodove. Vrsta *Agrobacterium atlanticum* reklasificirana je u *Ruegeria atlantica*. Sojevi vrste *Agrobacterium ferrugineum* reklasificirani su u *Pseudorhodobacter ferrugineus* i soj LMG 128 u *Hoeflea marina*. *Agrobacterium stellulatum* je klasificiran u *Stappia stellulata*, a *Agrobacterium gelatinovorum* klasificiran je u *Ruegeria gelatinovorans*, a kasnije u *Thalassobius gelatinovorus*. Godinu dana kasnije, Sawada i sur. revidirali su taksonomski status vrsta roda *Agrobacterium* opisan do 1990. godine. U tom radu dobivene su sekvence gena 16S rRNA (rrs) reprezentativnih sojeva biovara 1 (*A. tumefaciens*, *A. radiobacter*), biovara 2 (*A. rhizogenes*), biovara 3 (*A. vitis*) i *A. rubi* te su uspoređeni s nekoliko vrsta iz različitih rodova α -*Proteobacteria*, uključujući i rod *Rhizobium*. Analiza ovih gena pokazala je da su sojevi iz biovara 1 povezani s *A. rubi*, ali oni iz biovara 2 i 3 bili su filogenetski različiti. Sojevi iz biovara 2 bili su vrlo usko povezani s vrstom sojeva *R. tropici* (Flores-Félix i sur., 2020).

3.2. Taksonomski status roda *Agrobacterium* u ovom stoljeću

Najznačajnija promjena u taksonomskom statusu roda *Agrobacterium* dogodila se 2001. godine kada je predložena reklasifikacija cjelokupnog roda *Agrobacterium* u rod *Rhizobium*. Dakle, *Agrobacterium* vrste reklasificirane su kao *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi* i *Rhizobium vitis*. Reklasifikaciju koja se temeljila na analiziranju sekvenca rrs gena pomoću metode maksimalne vjerojatnosti i pridruživanja susjednih gena nisu prihvatili mnogi autori. Oni su smatrali kako samo biovar 2 pripada rodu *Rhizobium* i to klasičnim i molekularnim podacima koji podupiru tvrdnju kako su *Agrobacterium* i *Rhizobium* različiti rodovi. Kasnije je predložena reklasifikacija vrste *Agrobacterium larrymoorei*, koja se od 2001. godine naziva *Rhizobium larrymoorei*. Ova vrsta nije bila uključena u 2. izdanje Bergeyjevog Priručnika, koje je uključivalo samo vrste *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* i *A. radiobacter*. Nakon reklasifikacije roda *Agrobacterium* u rod *Rhizobium*, nove vrste koje su opisane od 2001., a izvan su Službenog časopisa za opis novih vrsta prokariota (IJSEM), imenovane su *Agrobacterium*. Isti slučaj zabilježen je sa vrstom *Agrobacterium albertimagni* koja je izdvojena kod vodenog bilja, a u njen opis uključen je rrs gen. Vrste koje su opisane unutar spomenutog časopisa nazvane su *Rhizobium*, a analizom gena potvrđeno je da ne sadrže rrs gen. Primjer takve vrste je *Rhizobium pusense* koja je izolirana iz rizosfere slanutka (*Cicer arietinum* L.), zatim *Rhizobium nepotum* koja je izolirana iz tumora različitih biljaka, te *Rhizobium skierniewicense* izolirane iz tumora krizanteme (*Chrysanthemum indicum* L.) i trešnje (*Prunus avium* L.). Paralelno, sojevi *Agrobacterium* iz različitih vrsta raspoređeni su u genomske skupine od G1 do G9, G11, te dvije neimenovane genomske skupine i G13. U razdoblju kada su Flores-Felix i sur. provodili istraživanje, genomska skupina G4 uključivala je sojeve *A.*

tumefaciens i *A. radiobacter*, G11 je uključivao *A. rubi*, G10 je uključivao *A. rhizogenes*, a dvije neimenovane skupine uključivale su *A. larrymoorei* i *A. vitis*. Kasnije se pokazalo kako G8 skupina odgovara vrsti *A. fabrum*, G2 skupina vrsti *R. pusense*, a nova genomska skupina nazvana G14 odgovara vrsti *R. nepotum*. Taksonomski status ovih vrsta ponovno se promijenio kada je na temelju analize *rrs*, *recA*, *atpD* i *rpoB* gena, predložen premještaj *R. pusense*, *R. nepotum* i *R. skierniewicense* u rod *Agrobacterium*, te premještaj *R. vitis* (u početku *A. vitis*) u rod *Allorhizobium*, kao nove kombinacije, koje su bile kasnije potvrđene u IJSEM-u. Vrsta *A. rhizogenes* zadržana je kao *Rhizobium rhizogenes* u rodu *Rhizobium*, koji također sadrži i relativno novu vrstu *Rhizobium tumorigenes* koja je poznata po tome što inducira biljne tumore. Od 2015. na osnovu analiza *rrs* gena te nekoliko generičkih gena, opisano je nekoliko novih vrsta roda *Agrobacterium*. Neke od njih su izolirane iz biljnih tumora, kao što je to slučaj kod *Agrobacterium arsenijevicii* i *Agrobacterium rosae*. Neke su izolirane iz nodula mahunarki kao što je to *Agrobacterium deltaense* i *Agrobacterium salinitolerans*, dok su neke izolirane iz biljnog otpada poput *Agrobacterium bohemicum*. U nekim istraživanjima spominje se soj KB-105 (ATCC31113) iz *Agrobacterium viscosum*, međutim ova vrsta nije službeno predložena i još uvijek se ne može smatrati valjanom vrstom. Što se tiče starih vrsta roda *Agrobacterium*, koje nisu prenesene u druge rodove, vraćaju se svojim početnim imenima, kao što su to *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rubi* i *A. larrymoorei*. (Flores-Felix i sur., 2020). Vrste koje su trenutno obuhvaćene u rod *Agrobacterium*, kao i ostale vrste iz porodice *Rhizobiaceae* koje uzrokuju tumore kod biljaka, prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Vrste koje su trenutno uključene u rod *Agrobacterium* i vrste koje uzrokuju tumore ili korijenove dlačice, a trenutno su uključene u druge rodove porodice *Rhizobiaceae*.

Prilagođeno iz Flores-Felix i sur. (2020).

Vrsta	Izvor izolacije	Simptomi patogenosti
Rod <i>Agrobacterium</i>		
<i>A. radiobacter</i>	Tlo i biljna rizosfera	Nepatogeni
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Malus</i> sp. tumori	Tumori
<i>A. rubi</i>	<i>Rubus</i> sp. tumori	Tumori
<i>A. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i> tumori	Tumori
' <i>A. albertimagni</i> '	<i>Potamogeton pectinatus</i>	Nema podataka
' <i>A. fabrum</i> '	<i>Prunus</i> sp., <i>Humulus lupulus</i> , <i>Euonymus alata</i> , <i>Rubus macropetalus</i> tumori	Tumori
<i>A. pusense</i>	rizosfera <i>Cicer arietinum</i>	Nema podataka
<i>A. nepotum</i>	<i>Prunus</i> , <i>Vitis</i> i <i>Rubus</i> tumori	Tumori
<i>A. skierniewicense</i>	<i>Chrysanthemum</i> i <i>Prunus</i> tumori	Tumori
<i>A. arsenijevicii</i>	<i>Prunus</i> i <i>Rubus</i> tumori	Tumori
' <i>A. deltaense</i> '	noduli <i>Sesbania cannabina</i>	Nema podataka
<i>A. salinitolerans</i>	noduli <i>Sesbania cannabina</i>	Nema podataka
' <i>A. bohemicum</i> '	<i>Papaver somniferum</i>	Nepatogeni
<i>A. rosae</i>	<i>Rosa x hybrida</i> tumori	Tumori
Rod <i>Allorhizobium</i>		
<i>A. vitis</i>	<i>Vitis vinifera</i> tumori	Tumori
Rod <i>Rhizobium</i>		
<i>R. rhizogenes</i>	<i>Malus</i> sp.	Bolest „dlakavog korijena“
' <i>R. tumorigenes</i> '	<i>Rubus</i> sp. tumori	Tumori

4. Vrste roda *Agrobacterium*

Agrobakterije su skupina Gram-negativnih bakterija koje žive u tlu, ali ne tvore spore i često su izolirane iz proliferirajućeg biljnog tkiva. Ove pokretne (sadrže do šest bičeva po stanici), aerobne (koriste kisik kao konačni akceptor elektrona tijekom staničnog disanja), štapićaste bakterije imaju prilično sporo (od jednog do nekoliko sati) generiranje čak i u optimalnim laboratorijskim uvjetima. Agrobakterije su sposobne katabolizirati veliku raznolikost metabolita. Sojevi nekih vrsta napadaju vrat korijena, korijenje, stabljike mnogih dikotiledona i nekih golosjemenjača. Infekcija nastaje preko ozljeda biljke, nakon čega dolazi do transformacije biljnih stanica u tumorske stanice koje se samostalno razmnožavaju. Uzrokuju tumor/rak/korijena i korijenovog vrata zbog prijenosa određenog segmenta njihovog Ti ili Ri plazmida (Lacroix i Citovsky, 2013).

Četiri vrste *Agrobacterium* uzrokuju neoplastične bolesti na raznim biljkama (slika 2):

- *Agrobacterium tumefaciens* uzrokuje tumor vrata korijena
- *Agrobacterium rhizogenes* pospješuje rast korijenovih dlačica
- *Agrobacterium rubi* uzrokuje tumor trske
- *Agrobacterium vitis* uzrokuje tumor vinove loze



Slika 2. (1) Tumora vrata korijena na jabuci (*Malus domestica* Borkh); (2) Pojačani rast korijenovih dlačica na jabuci (*M. domestica*).

Izvor: <https://www.plantdiseases.org/hairy-root-crown-gall-apple>. Pristupljeno 26. svibnja 2021.

Virulentne vrste *Agrobacterium* sposobne su zaraziti nekoliko stotina različitih biljnih vrsta. Među četiri gore spomenute vrste, *A. tumefaciens* je daleko najvažnija i najbolje proučavana

vrsta (Păcurar i sur., 2011). U nastavku slijedi pregled najznačajnijih vrsta roda *Agrobacterium*.

4.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je Gram-negativna rizoplanska bakterija (živi na površini korijena). Radi se o obligatno aerobnoj bakteriji, štapićastog oblika čije su dimenzije 1x3 µm. Štapići nose bičeve koji su poredani subpolarno oko cilindričnog opsega stanice, što se naziva obodno bičevanje. Kada stanice *A. tumefaciens* percipiraju biljne fenolne spojeve, geni virulencije koji se nalaze u Ti plazmidu (tumor-inducing) dolaze do ekspresije, što rezultira stvaranjem duge savitljive niti zvane T-pila. Aktivacija VirA (tablica 2) isključuje pokretljivost obodnih bičeva kada se stanice *A. tumefaciens* spoje na biljne stanice. Vezivanje na biljne stanice preduvjet je za pokretanje prijenosa T-DNA u biljnu stanicu. Obodni bičevi i T-pile imaju bitnu ulogu u virulenciji, vjerojatno zbog dovođenja bakterijske stanice na cilj, nakon čega slijedi vezivanje za biljnog domaćina. U kulturi na podlogama koje sadrže ugljikohidrate, stanice proizvode velike količine izvanstaničnih polisaharida, dajući kolonijama voluminozan, sluzav izgled (Arya i Kumar, 2018).

Tablica 2. Prikaz glavnih komponenata gena Vir te njihove funkcije.
Preuzeto iz Arya i Kumar (2018).

Vir regija	Funkcija
VirA	- receptor koji reagira na prisutnost fenolnih spojeva (npr. acetosiringon ili acetovanilon) koji izlaze iz oštećenog biljnog tkiva
VirB	- kodira proteine koji proizvode pore ili strukture poput pila
VirC	- vrsta proteina helikaze - veže overdrive slijed
VirD1	- kodira za topoizomerazu koja opušta dvostruku zavojniciu
VirD2	- proizvodi endonukleaze koje ciljaju izravne granice ponavljanja segmenta T-DNA
VirD4	- vezni protein koji djeluje u interakciji s T-pilom
VirE1	- protein koji je vrsta pratitelja koji pomaže u presavijanju virE2
VirE2	- veže se na T-lanac i štiti ga od napada nukleaze - interkalira s lipidima da tvore kanale u biljnim membranama kroz koje T kompleks prolazi
VirG	- aktivira ekspresiju vir-gena nakon vezanja na konsenzusni slijed (nakon što ga je virA fosforilirao)
VirH	- odgovoran za specifičnost domaćina

Fitopatogena bakterija *A. tumefaciens* uzročnik je bolesti tumora vrata korijena na širokom spektru biljnih vrsta. Više od jednog stoljeća ovaj je patogen iz različitih razloga fascinirao biologe. Smatra se da bi otkrivanje tajne tumora vrata korijena kod biljaka moglo pomoći u razumijevanju mehanizama onkogeneze, što bi se moglo koristiti za liječenje raka kod životinja i ljudi (Păcurar i sur., 2011). Obično biljne stanice rastu, razvijaju se i množe pod strogo kontroliranim uvjetima. Postoji međusobna ravnoteža radi održavanja staničnog reda i diferencijacije. S druge strane, stanice tumora vrata korijena množe se i stvaraju tkiva koja se ne ograničavaju te oporezuju okolnu staničnu zajednicu svojom energijom i resursima (Kado, 2014). Tumor vrata korijena (slika 3) prvi put je opisan davne 1853. godine kao neoplastična bolest koja pogađa razne biljne vrste. Godine 1897. Fridiano Cavara opisao je identifikaciju bakterije, nazvane *Bacillus ampelopsorae*, kao uzročnika tumora vrata korijena kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Ovo je prvo izvješće koje povezuje tumor vrata korijena s bakterijom. Deset godina kasnije, dokazano je da je *Bacterium tumefaciens* (danas *A. tumefaciens*) uzročnik tumora vrata korijena kod višegodišnjih vrsta *Bellis perennis*. Dugo vremena znanstvenici su bili zaokupljeni otkrivanjem mehanizama stvaranja tumora vrata korijena, vođeni nadom da bi njihovim razumijevanjem mogli dobiti tragove o mehanizmima onkogeneze. Ova je hipoteza na kraju odbačena, a zanimanje za tumor vrata korijena uglavnom se smanjivalo sve dok nije predloženo da se tumorske strukture tvore kao rezultat "principa koji izaziva tumor" (TIP). Promjena normalnih stanica domaćina u stanice tumora dogodila se kada je TIP prenesen iz agrobakterije u stanice domaćina. Kasnije, 1970-ih otkriveno je da je TIP zapravo T-DNA (prenesena DNA) regija agrobakterije, Ti plazmida koji je integriran u genom domaćina u stanicama tumora vrata korijena (Păcurar i sur., 2011).



Slika 3. Tumor vrata korijena. Preuzeto iz Păcurar i sur. (2011).

Nakon vezivanja bakterije za biljne stanice i ekspresije gena višestruke virulencije (vir), nekoliko efektorskih proteina, zajedno s T-DNA, transportira se u biljnu stanicu sustavom sekrecije tipa IV. Biljni čimbenici pomažu u integraciji T-DNA u biljni genom. Nakon integracije, ekspresija onkogeni kodiranih T-DNA (*iaaH*, *iaaM* i *ipt*) inducira biosintezu

auksina i citokinina. Povećana razina ovih fitohormona rezultira pojačanom proliferacijom i stvaranjem tumora vrata korijena. Unatoč prijenosu bakterijskih proteina u biljnu stanicu, većina sojeva *Agrobacterium* ne izaziva senzibirajući odgovor domaćina, koji je povezan s brzim i lokaliziranom smrću stanica. Takav odgovor često se javlja kada bakterijski patogen izaziva imunološki sustav biljke domaćina, a služi za ograničavanje rasta i širenja patogena na druge dijelove biljke. Sukladno tome, ne javlja se sustavni odgovor otpora širokog spektra u biljci (sistemski stečena rezistencija, SAR). U prvim nekoliko sati zajedničkog uzgoja, putevi obrane patogena aktiviraju se više ili manje snažno, ovisno o biljnom sustavu i genotipu agrobakterije koji se koristi za infekciju. Obrambeni odgovori postaju jači tijekom razvoja tumora vrata korijena. Nadalje, fiziološko ponašanje transformiranih stanica drastično se mijenja (Gohlke i Deeken, 2014).

4.1.1. Infekcija

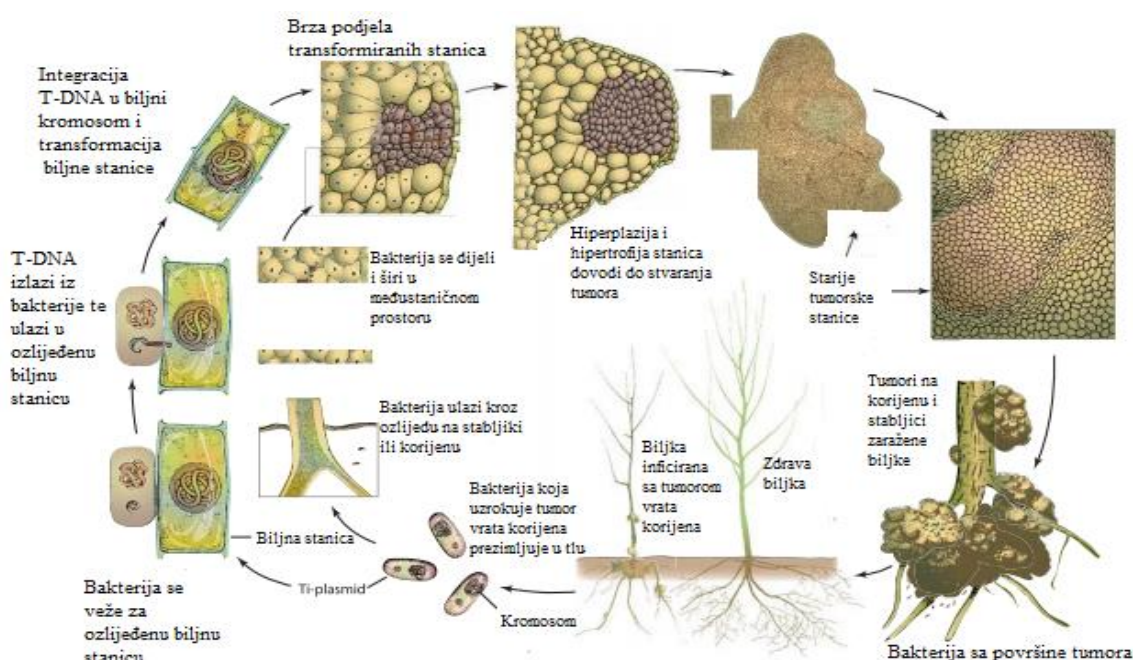
Patogeni sojevi *A. tumefaciens* mogu saprofitno živjeti u tlu čak 2 godine. Ova bakterija može bez problema preživjeti u mnogim tlima s dobrom prozračnošću, kao što je to pjeskovita ilovača. Bakterija može preživjeti i na površini korijena (rizoplan) mnogih korova u voćnjaku. Prilikom mehaničkog oštećenja biljnog tkiva koji mogu prouzročiti insekti blizu linije tla ili neka druga sredstava, dolazi do oslobađanja signalnih molekula koje privlače agrobakteriju koja živi u neposrednoj blizini (Arya i Kumar, 2018).

Biljno tkivo inficirano bakterijom *A. tumefaciens* prolazi kroz fiziološke promjene. Tumori, koji nastaju prvenstveno na mjestu infekcije, potječu iz kambija čije nediferencirane stanice nakon transformacije postaju nesposobne diferencirati se u normalne žile floema i ksilema, što utječe na transport vode i hranjivih sastojaka. Kao posljedica toga, inficirane biljke mogu pokazati slab rast koji izravno utječe na prinos, a u ekstremnim situacijama može doći do smrti cijele biljke. Razvoj tumora vrata korijena zahtijeva dva elementa: transformaciju i onkogenezu. U prirodi *Agrobacterium* može osjetiti i prepoznati signalne molekule, poput nisko molekularnih fenolnih (acetosiringon, hidroksi-acetosiringon) i šećernih spojeva, koji se oslobađaju ranjavanjem biljnog tkiva. Kemotaksijom bakterija se kreće prema osjetljivom biljnom tkivu, gdje ulazi i kolonizira međustanične prostore domaćina (Păcurar i sur., 2011). Prijem biljnih signala potiče ekspresiju gena bakterijske virulencije (vir). Nakon toga se proizvode proteini Vir, a iz DNA lanca Ti plazmida sintetiziraju se jednolančane molekule T-DNA. T-kompleks, tj. T-DNA povezana je s određenim proteinima Vir, ubrizgava se u citoplazmu domaćina. Sofisticirana mreža bakterijskih i biljnih čimbenika posreduje u translokaciji T-DNA na krajnje odredište, jezgru stanice domaćina. Tada agrobakterija uvodi supstrate (T-DNA i proteine virulencije, uključujući VirD2, VirE2, VirE3, VirD5 i VirF) u stanicu domaćina sustavom sekrecije tipa IV. Ova se strategija također koristi za isporuku mikrobioloških čimbenika od strane drugih biljnih patogena, uključujući *Xanthomonas campestris* i *Burkholderia*. Isto tako, patogeni sisavaca, poput *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella* spp. i *Helicobacter pylori*, koriste se mehanizmima tipa IV za izvoz efektorskih proteina u izvanstanični prostor ili stanični citosol. Izuzetno je to što u laboratorijskim uvjetima agrobakterije mogu genetski transformirati gotovo bilo koju vrstu

eukariota, počevši od kvasca pa sve do ljudskih stanica. T-kompleks, koji se sastoji od T-DNA, proteina bakterijske virulencije (VirE2, VirD2) i faktora domaćina VIP1 (protein 1 koji ima interakciju sa VirE2) uvozi se u jezgru. Nakon toga se proteinske komponente uklanjaju oslobađajući T-DNA iz T-kompleksa. Ovaj se korak oslanja na razgradnju VirE2, VirD2 i VIP1 od strane SCF (Skp1-Cul1-F-box protein) proteosomskih mehanizama. SCF kontrolira mnoge biološke procese, uključujući interakcije domaćina i patogena. Ako se T-kompleks raspadne prije nego što dođe u kontakt s kromosomom domaćina, isporučeni transgeni ekspimiraju se samo nekoliko dana. Gubitak aktivnosti transgena u kasnijim fazama vjerojatno je rezultat razgradnje T-DNA nukleazama domaćina (Pitzschke, 2013).

A. tumefaciens transformira biljnu stanicu vrlo rano, nakon izlaganja svježim ranama. Proliferacija stanica i mehanizmi replikacije DNA uključeni su u ranjavanje biljnog tkiva. Ovdje procesi biljne rekombinacije i/ili aktivnosti enzima za popravak DNA, poboljšavaju integraciju T-DNA. Formiranje tumora na mjestima zaraze nakon nekoliko dana zahtijeva isporuku i integraciju onkogene T-DNA u biljni genom (transformacija). T-DNA nosi dva seta gena. Primarni (*iaaM*, *iaaH* i *ipt*) i sekundarni (*6b* i *5*) onkogeni geni kodiraju enzime koji sudjeluju u sintezi fitohormona (auksin i citokinin) te u modificiranju učinaka fitohormona u stanici. Njihova aktivnost dovodi do stvaranja tumora (onkogeneza). U međuvremenu, drugi set T-DNA gena kodira enzime koji sudjeluju u sintezi opina. Ovi spojevi, nastali kondenzacijom aminokiselina i šećera, pružaju selektivnu prednost bakteriji unutar tumora vrata korijena. Rezultat je promjena biljnog sekundarnog metabolizma, što rezultira abnormalnom proliferacijom stanica i sintezom hranjivih spojeva, koje *A. tumefaciens* koristi kao izvore ugljika i dušika (Păcurar i sur., 2011). Dobiveno tkivo je nediferencirano te je bijele ili kremaste boje, a stanice mogu imati jednu ili više jezgri. Ovo se tkivo nastavlja povećavati i na korijenu ili stabljici biljke, što rezultira nastajanjem tumora, ovisno o mjestu ranjavanja. Bakterije zauzimaju međustanične prostore oko periferije tumora i ne nalaze se u središtu tumora koji se povećava. Razvoj tumora vrata korijena prikazan je na slici 4. Tumor nije zaštićen epidermom, ostavljajući tkivo osjetljivim na sekundarne patogene, insekte i saprofite. Razgradnja tumora od strane sekundarnih napadača uzrokuje smeđu ili crnu promjenu boje te oslobađa stanice *A. tumefaciens* natrag u tlo kako bi se odnijele zemljom ili vodom ili ostaju u tlu do sljedeće sezone rasta. U višegodišnjim biljkama dio zaraženog tkiva može ostati živ i u njemu živi *A. tumefaciens*, koji, čak i ako se tumor odvojio, može nastaviti u sljedećoj sezoni uzrokovati novi tumor na istom mjestu. Svrha infekcije je da agrobakterija kontrolira mehanizme domaćina za sintezu nekih esencijalnih metabolita za vlastiti rast. Agrobakterija zahtijeva i može metabolizirati neke posebne aminokiseline kao što su to opini. Iako su enzimi i putevi odgovorni za metabolizam opina prisutni u agrobakteriji, sinteza opina ne događa se u bakteriji, već se njihova sinteza pokreće prilikom infekcije biljne stanice. Opini su spojevi male molekularne mase koji se proizvode u tumorima vrata korijena ili na dlakavim korijenima, a agrobakterija ih koristi za prehranu. Biosintezu opina kataliziraju specifični enzimi kodirani genima koji su prisutni u Ti plazmidu. Ti plazmidi klasificiraju se prema vrsti opina koji oni kodiraju. Biokemijski, postoje dvije kategorije opina (a time i Ti plazmida). Jedna kategorija je nastala kondenzacijom aminokiselina koja uključuje najčešće imenovane opine (nopalini i oktapini).

Skupina nopalina nastaje od α -ketoglutarata, a skupina oktapina od piruvata kao biokemijskog prekursora (Arya i Kumar, 2018).



Slika 4. Razvojni ciklus tumora vrata korijena. Prilagođeno iz Arya i Kumar (2018).

4.2. *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes je Gram-negativna bakterija koja obitava u rizosferi. Prema kriterijima fiziološke i DNA homologije, *A. rhizogenes* usko je povezana s pripadnicima skupine biotipa 1 *A. tumefaciens*. *A. rhizogenes* razlikuje se od *A. tumefaciens* po tome što uzrokuje bolest korijenovih dlačica, bolest koju karakterizira bujan rast korijena iz zaražene biljne rane (White i Nester, 1980).

Korijenove dlačice različitih biljaka iskorištavaju se za *in vitro* proizvodnju vrijednih proizvoda, koji imaju široku upotrebu kao farmaceutski proizvodi, pesticidi, kozmetika, aditivi za hranu itd. Mnogi vrijedni sekundarni metaboliti sintetiziraju se u korijenima u *in vivo* uvjetima, a često je sinteza povezana s diferencijacijom korijena. *A. rhizogenes* posjeduje Ri plazmid (root-inducing) koji inducira korijen, a sadrži prijenosnu DNA koja kodira genske lokuse korijena (rol) (rolA, rolB i rolC). Upravo je plazmid odgovoran za stabilno uvođenje genetskog materijala u stanice domaćina. To može pokrenuti obilnu proizvodnju jako razgranatih korijenovih dlačica na mjestu infekcije (Singh i sur., 2020). U novije vrijeme proizvodnja korijenovih dlačica posredovana *A. rhizogenes* koristi se kao biotehnološki alat u raznim biljnim vrstama kako bi se otkrili novi biološki potencijali. Funkcija metaboličkih enzima može se odrediti prekomjernom ekspresijom gena ili

interferencijom RNA, korištenjem dlakave transformacije korijena, npr. pronalaženjem enzima koji sudjeluje u biosintezi piridin alkaloida u duhanu (*Nicotiana glauca* L.). Kultura dlakavih korijena (slika 5) je u posljednje vrijeme postala jedna od odabranih metoda za proizvodnju sekundarnih metabolita u različitim nekultiviranim ili ugroženim ljekovitim biljkama. Ovi korijeni pokazuju genetsku stabilnost i mogu se neograničeno razmnožavati na sintetičkom mediju bez upotrebe regulatora rasta biljaka. Korijenove dlačice daju visoku razinu sekundarnih metabolita za razliku od stanične kulture, prednost koju ima zbog diferencijacije tkiva. Neoplastični korijeni proizvedeni infekcijom *A. rhizogenes* karakterizira lako održavanje, genetska stabilnost, brz rast i rast u medijima bez hormona (Huang i sur., 2014).



Slika 5. Bolest dlakavog korijena kojeg uzrokuje *A. rhizogenes*.

Izvor: https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizobium/Rhizobium_rhizogenes.htm.

Pristupljeno 26. svibnja 2021.

4.3. *Agrobacterium rubi*

Agrobacterium rubi je Gram-negativna štapičasta bakterija koja se prenosi zemljom. Ova bakterija pokazuje fitopatogenu aktivnost te uzrokuje tumore na plodnim trsima biljaka *Rubus* spp., kao što je to malina (*Rubus idaeus* L.) i kupina (*Rubus fructus* L.). Tumori se razvijaju kao bjelkaste erupcije koje kasnije postaju smeđe i crne nakon čega se počinju raspadati, a njihova prisutnost uzrokuje proizvodnju suhih, sjemenskih bobica i sprječava stvaranje novih trsova. *A. rubi* posjeduje karakterističan Ti plazmid koji sadrži gene potrebne za onkogenezu. Do stvaranja tumora dolazi zbog sposobnosti patogena da prenese T-DNA, dio Ti plazmida, u genom stanice domaćina, što je događaj koji je uvjetovan prepoznavanjem i apsorpcijom bakterije na domaćinu (Gargiulo i sur., 2008). Bolesti uzrokovane bakterijama koje se prenose tlom (tumor vrata korijena - *A. tumifaciens* i tumor trske - *A. rubi*) mogu zaraziti biljku samo na mjestu ranjavanja. Rane mogu proizaći iz prirodnih uzroka (npr. hranjenje insekata, oštećenja od mraza) ili mehaničkih uzroka (npr. obrezivanje, obrađivanje, berba). Bakterije se zatim šire prskanjem kiše, tekućom vodom, te uzgojem i rezidbom zaraženih biljaka (Demchak, 2017).

4.4. *Agrobacterium vitis*

Agrobacterium vitis uzrokuje tumor vinove loze (*V. vinifera*) (slika 6), ozbiljnu bolest koja se može pronaći u svim dijelovima svijeta, a rezultira slabim rastom i smrću vinove loze (*V. vinifera*). Uz pojavu tumora, *A. vitis* izaziva nekrozu specifičnu za domaćina na vinovoj lozi (*V. vinifera*) te sličan HR (hipersensitive response) na biljkama koje nisu domaćini, poput duhana (*Nicotiana tabacum* L.). HR podsjeća na oblik programirane stanične smrti u biljkama, odnosno brze lokalizirane smrti biljnih stanica povezane s rezistencijom na bolest (Hao i Burr, 2006).

Tumor je jedna od najvažnijih bakterijskih bolesti vinove loze (*V. vinifera*) u svijetu. *A. vitis* je dominantna vrsta koja uzrokuje ovu bolest. Obično infekcije započinju na mjestima mehaničkog oštećenja na trsima koje uzrokuju temperature smrzavanja ili druge kulturne prakse. Uz tumor, *A. vitis* inducira istjecanje elektrolita i jaku nekrotičnu leziju na korijenu vinove loze (*V. vinifera*). Prijenos *A. vitis*, koji je prilagođen životu u krvožilnom sustavu biljaka vinove loze (*V. vinifera*), događa se vegetativnim razmnožavanjem zaraženih reznica. Budući da su vinogradarska tla isključena kao izvor zaraze *A. vitis*, širenje bolesti može se spriječiti korištenjem propagacijskog materijala bez patogena (Tolba i Zaki, 2011). Nekoliko znanstvenika pokušalo je otkriti biološko sredstvo za kontrolu tumora vinove loze (*V. vinifera*), tako je otkriven soj *A. vitis* F2/5. Ovaj soj proizvodi bakteriocin i učinkovito inhibira stvaranje tumora na mjestima rane na vinovoj lozi (*V. vinifera*) (Kawaguchi i sur., 2008).



Slika 6. Tumor vinove loze (*Vitis vinifera* L.) uzrokovan *A. vitis*.

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/agrobacterium-vitis>.

Pristupljeno 26. svibnja 2021.

4.5. *Agrobacterium radiobacter*

Rod *Agrobacterium* sastoji se od nekoliko fitopatogenih vrsta koje se javljaju u tlima. Jedna je vrsta, *Agrobacterium radiobacter*, povremeno izolirana iz kliničkih uzoraka, ali njezinu je patogenu ulogu u tim slučajevima teško utvrditi budući da su agrobakterije obično izolirane zajedno s drugim bakterijama (Potvliege i sur., 1989). *A. radiobacter* jedina je poznata nefitopatogena vrsta u rodu *Agrobacterium*. Specifični epitet "radiobacter" prvi puta spominje se zajedno sa *Bacillus radiobacter* u istraživanju saprofitnih bakterija u tlu povezanih s korištenjem dušika. Nakon toga, vrsta je sukcesivno prekvalificirana u rodove *Bacterium*, *Rhizobium*, *Achromobacter* i *Alcaligenes* prije nego što ih je Conn 1942. opisao kao novi rod *Agrobacterium* (Young i sur., 2006).

Iako je *A. radiobacter* klasificiran prema pozitivnom odnosu s biljkama, prepoznat je kao oportunistički patogen među ljudima. Slučajevi infekcije spomenutom bakterijom otkriveni su kod imuno kompromitirajućih ljudi (pacijenti s rakom ili HIV-om), što upućuje na to da njezina virulencija nije izravna i ciljana. Osjetljiva je na brojne antibiotike, uključujući cefalosporine treće generacije, β -laktame, karbapeneme, amikacin. Infekcija najčešće prati prisutnost stranog materijala poput katetera ili implantata leće, što ukazuje da je unošenje bakterija u tijelo nozokomijalno (Potvliege i sur., 1989). Zhang i sur. (2014.) u svom istraživanju opisali su sekvencu cijelog genoma soja tipa *A. radiobacter* DSM 30147T (ujedno i prva opisana sekvenca *A. radiobacter*), te su je usporedili s dostupnim genomom *Agrobacterium*. Sojevi *A. radiobacter* široko su rasprostranjeni u rizosferi biljaka i u kliničkim uzorcima. Izvješteno je da soj *A. radiobacter* pojačava fitoremedijaciju arsena u tlu, što ukazuje na potencijalnu primjenu u procesu bioremedijacije. Ova bakterija sadrži kružni i linearni kromosom, ali ne i plazmid koji inducira stvaranje tumora (Ti).

4.6. *Agrobacterium bohemicum*

Češka je eminentni svjetski proizvođač maka za prehrambenu industriju. Veliku poljoprivrednu važnost imaju istraživanja koja proučavaju patogene maka (*Papaver somniferum* L.) i bakterije povezane s rizosferom. Soj *Agrobacterium* sp. R89-1 posjeduje snažnu biotransformaciju kodeina u 14-OH-kodein. Naknadna analiza *Agrobacterium* sp. genomske sekvence R89-1 sugerirala je neovisni položaj ovog soja u filogeniji *Agrobacterium*. Budući da je soj R89-1 obuhvaćen patentom, glavni razlog izolacije soja R90T bio je pronalazak drugog usko povezanog soja *Agrobacterium* koji se može detaljno proučiti i biti dostupan znanstvenoj zajednici. Na temelju polifaznog pristupa, sojevi R90T i R89-1 smatraju se predstavnicima nove vrste u rodu *Agrobacterium*. Za ime novonastale vrste predlaže se *Agrobacterium bohemicum* sp. nov. *A. bohemicum* imenovan je u čast Bohemijskog vrta, mjesta u Češkoj, gdje su izolirani sojevi. Stanice *A. bohemicum* su Gram-negativne, obligatno aerobne i pokretne, nalaze se u obliku štapića ($0,5\text{--}0,7 \times 1,5\text{--}2,5\text{ }\mu\text{m}$), te tvore pojedinačne stanice i hrapave aggregate. Optimalna temperatura za rast je $28\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$, a optimalan pH je 7.5 (Zahradník i sur., 2018).

4.7. *Agrobacterium fabacearum*

Delamuta i sur. (2020.) otkrili su najnoviju vrstu iz roda *Agrobacterium* u istraživanju u kojem su provodili filogenetsku analizu na sojevima izoliranim iz kvržica korijena mahunarki. Treba istaknuti kako ova vrsta uključuje sojeve izolirane iz različitih okruženja, uključujući tlo (rasuta zemlja iz Francuske), rizosferu duhana (*N. tabacum*) i žute vučike (*Lupinus luteus* L.) te iz tumora vrata korijena. Iako nisu u mogućnosti ponovno nodulirati domaćina, pretpostavlja se da su neki sojevi *Agrobacterium* endofiti u kvržicama mahunarki, gdje bi mogli pridonijeti rastu biljaka. Dobiveni rezultati potvrđuju da sojevi (CNPSO 675T i *Agrobacterium* sp. *genomospecies* G1) čine novu vrstu, za koju je predložen naziv *A. fabacearum*. Stanice *A. fabacearum* su Gram-negativne i aerobne. Kolonije su kružne, prozirne, s umjerenom proizvodnjom sluzi. Kolonije su promjera 3 mm kada se uzgajaju u modificiranom YMA mediju koji sadrži kongo crveno nakon 2–3 dana inkubacije na 28 °C. Sojevi proizvode kiselu reakciju u modificiranom YMA s bromotimol plavim. Rastu na LB mediju na 37 °C, na pH 4,0 i pH 8,0 ili s 1% NaCl, te su pozitivni na aktivnost ureaze.

4.8. *Agrobacterium pusense*

Lawsonov čempres (*Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) Parl.) zimzeleno je drvo porijeklom sa sjeverozapada SAD-a. Kao najstarije drvo s ekološkim i ekonomskim značajem, Lawson čempres široko se sadi u vrtovima i parkovima širom svijeta. Sorte Lawson čempresa uzgajaju se u različite svrhe, uključujući i kao ukrasno bilje, šumsko drveće, ljekovito bilje, ali i za proizvodnju građevinskog materijala. Kao rezultat gubitaka zbog truljenja korijena uzrokovanom *Phytophthora lateralis*, Lawson čempres uvršten je na popis „gotovo ugroženih vrsta“ u SAD-u. Tumor je ozbiljno zahvatio rasadnike, a ekonomski gubici koje je bolest nanijela procijenjeni su na milijune dolara godišnje. U mnogim zemljama, agrobakterije koje induciraju tumor odgovorne su za velike ekonomske gubitke u rasadnicima biljaka. Tumor vrata korijena smatra se glavnom bakterijskom bolešću u rasadnicima za uzgoj koštičavog voća i orašastih plodova. Neke vrste *Agrobacterium*, *Allorhizobium* i *Rhizobium* uzrokuju tumore vrata korijena i stabiljike u širokom rasponu vrsta dvosupnica. Ovi biljni patogeni kompetentni su stanovnici tla, mogu se pridržavati za čestice tla i mogu preživjeti godinama u odsutnosti osjetljivih domaćina. *Agrobacterium pusense*, ranije *R. pusense*, izoliran je iz rizosfere slanutka (*Cicer arietinum* L.). Identificirani su neki izolati *A. pusense* koji djeluju kao oportunistički patogeni, a u vezi su s bolničkim infekcijama. Za sad, *A. pusense* nije prijavljen kao biljni patogen. Simptomi tipični za bolest tumora vrata korijena primijećeni su na sadnicama Lawson čempresa prvi put u rasadnicima biljaka provincije Mazandaran. Učestalost opažene bolesti varirala je između 30% i 40% u različitim rasadnicima. Pogodene sadnice pokazale su progresivan pad, gubitak snage tijekom vremena i isušivanje (Basavand i sur., 2021).

5. Odgovor biljke na infekciju

U svojim prirodnim staništima biljke žive u bliskom kontaktu s velikim brojem mikroorganizama. Asocijacije biljaka i mikroorganizma mogu biti uzajamno korisne, poput simbioze korijena s bakterijama koje vežu dušik. Nasuprot tome, patogene gljive ili bakterije otežavaju razvoj biljaka i uzrokuju različite simptome bolesti kod njihovih domaćina. Gram-negativni *A. tumefaciens* iz porodice *Rhizobaceae* je po mnogočemu specifičan. To je biotrofni patogen, koji značajno mijenja fiziologiju i morfologiju zaražene biljke domaćina. Ono što *Agrobacterium* čini tako posebnim je njegova sposobnost prijenosa gena između različitih vrsta (Pitzschke, 2013). U prirodi divlji tip *A. tumefaciens* (kao i *A. rhizogenes* i *A. vitis*) uzrokuje tumor vrata korijena, koju karakterizira rast tumorskih struktura na domaćinima. Infekcija biljke domaćina od strane agrobakterije opisana je u poglavlju 4.1.

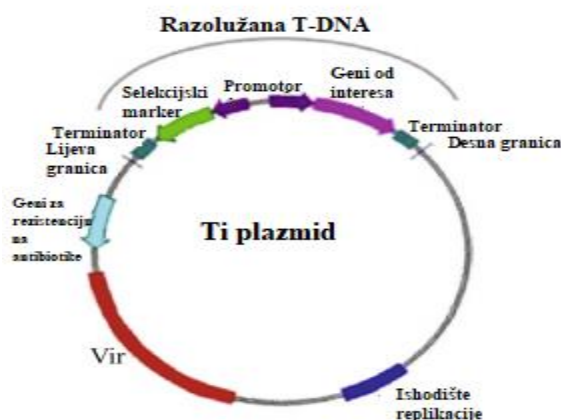
Mikroorganizmi koji pokušavaju napasti svoje domaćine okružuju se prisutnošću tzv. molekularnih obrazaca povezanih s mikroorganizmima ili patogenima (MAMP ili PAMP). Ove molekule pokreću prvu liniju obrane, poznatu kao PAMP (Pathogen associated molecular patterns) - pokrenuti imunitet (PTI). Patogen zauzvrat ima za cilj prevladati aktivaciju PTI-a ubrizgavanjem određenih efektorskih proteina u citoplazmu domaćina. Percepcija kodiranih efektor (srodnim unutarstaničnim biljnim proteinima) podiže drugu liniju obrane, efektor pokrenuti imunitet (ETI). Ovaj odgovor karakterizira indukcija lokalizirane apoptoze (HR) te sistemsku obrambenu signalizaciju. Biljke sposobne za aktiviranje ETI mogu na taj način, ne samo ograničiti širenje patogena, već se mogu ojačati i od naknadnih napada. MAMP se opisuje kao „molekularni potpis“ koji je tipičan za vrstu mikroorganizama. Ova vrsta obrane domaćina je ujedno i više specijalizirana od PTI obrane jer odgovara direktno na proteinske efektore koji dolaze od patogena u biljku. Percepcija MAMP-a putem specifičnih proteina koji se nalaze na površini stanice („receptori za prepoznavanje uzorka“) strategija je urođenog eukariotskog imunološkog sustava. Budući da MAMP pokreću obrambene odgovore kod mnogih biljnih vrsta, oni se nazivaju i "općim elikatorima". Istaknuti primjeri MAMP-a uključuju oligopeptidne elikatore poput onih izvedenih iz EF-tu (faktor produljenja termo nestabilan), flagelin i kriptogein (gljivični protein koji uklanja sterol), kao i glikolkonjugate, uključujući bakterijske lipopolisaharide i peptidoglikane, te gljivični hitin i hitozan oligosaharidi β -glukan. Dva nesumnjivo najbolje okarakterizirana MAMP receptora u biljkama su FLS2 i EFR. Ovi receptori imaju sposobnost prepoznavanje EF-te. Zahvaljujući svojoj strukturi, ove membrane smještene u sredini bogatoj leucin kinazom, pretvaraju i prenose uočene "signale napada" u unutrašnjost stanica kako bi pokrenule odgovarajuće obrambene reakcije. Nasuprot tome, primarni „ciljevi“ patogena su opskrba hranjivim sastojcima te umnažanje u velikom broju u domaćinu. Da bi izbjegli ili blokirali obrambene reakcije tijekom ranih stadija infekcije, patogeni imaju dvije mogućnosti: izbjeći prepoznavanje i "ušuljati se" ili "samosvjesno ući" i suprotstaviti se napadu. Patogen se može ušuljati na način da isporučuje efektore u citosol domaćina, a u isto vrijeme producira npr. koronatin koji biljka najčešće percipira prilikom napada herbivora na površini lista. Na taj način alarmira sasvim drugačiji tip obrane, a isti je vrlo energetski „skup“, te se domaćin ne može podjednako jako braniti u isto vrijeme na „dvije fronte“.

Patogen za to vrijeme nesmetano isporučuje efekte u citosol domaćina. Biotrofi, poput *Pseudomonas syringae*, *A. tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* i *Botrytis cinerea*, razvili su sofisticirane strategije za blokiranje obrambene signalizacije kod svojih domaćina. Jedan od ranih unutarstaničnih događaja nakon percepcije patogena je transdukcija i pojačavanje signala kroz mitogenaktivirane proteinske kinaze (MAPK). MAPK kaskade su očuvani eukariotski signalni moduli. Njihove minimalne komponente, MAPK kinaza kinaza (MAPKKK), MAPKK i MAPK, predstavljaju multigene obitelji. Egzogene ili razvojne signale opaža receptor koji naknadno (izravno ili neizravno) pokreće MAPK kaskadu. Jednom aktiviran, MAPKKK fosforilira svoj nizvodni MAPKK, koji se fosforilira i time aktivira svoj nizvodni MAPK. MAPK posredovana fosforilacija ciljnih proteina može promijeniti njihova svojstva, poput međustaničnog položaja, specifičnosti vezanja DNA, enzimske aktivnosti ili stabilnosti. Postoji obilje dokaza za poremećenu MAPK signalizaciju koja značajno utječe na toleranciju na biotski i abiotski stres. U kontekstu obrane agrobakterija i patogena, jedan član MAPK- a zaslužio je posebnu pozornost: MPK3. Ovaj se protein aktivira u roku od nekoliko minuta nakon tretmana patogenima ili peptidima izvedenim iz bakterijskog elikatora, poput flg22 i elf18. MPK3 važan je pozitivni regulator u obrambenoj signalizaciji. S gledišta patogena, treba izbjegavati aktiviranje MPK3 kako bi se izostavilo odbijanje. U skladu s tim, agrobakterije su razvile strategije za kooptiranje indukcije ove kinaze. MPK3 fosforilira proteina domaćina VIP1 i time pokreće cito-nuklearnu translokaciju ovog bZIP transkripcijskog faktora. VIP1 ulazi u jezgru interakcijom s importinom alfa, potom inducira ekspresiju obrambenih gena kao što je PR1 (protein povezan s patogenezom). S druge strane, agrobakterije otimaju VIP1 kao „kapsulu“ za nuklearni uvoz T-kompleksa. Brojne biljne vrste nemaju pretpostavljene homologe VIP1; ipak ove vrste posjeduju sposobnost transformacije. Ovaj prividni paradoks riješen je otkrićem i karakterizacijom faktora virulencije VirE3. VirE3 funkcionalno zamjenjuje funkciju kapsule VIP1, osiguravajući tako nuklearni uvoz T-DNA. Za razliku od VIP1, VirE3 nije transkripcijski faktor i stoga je malo vjerojatno da će (izravno) potaknuti ekspresiju obrambenog gena. VirE3 stoga može biti privlačna meta za biotehnoške pristupe. Biljke pokazuju zadivljujuću ustrajnost u svojoj borbi protiv mikrobne manipulacije. Čak i nakon neuspjelih pokušaja bijega od genetičkog ponovnog programiranja izazvanog agrobakterijom, stanica domaćin se ne predaje. Umjesto toga, transformirane stanice koriste mehanizme za prigušivanje gena kako bi ograničile razinu transkripata izvedenih iz T-DNA. Male interferirajuće RNA (siRNA) usmjerene protiv T-DNA onkogena (triptofan 2-monooksigenaza i agropin sintaza) otkrivene su u lišćima *Nicotiana benthamiana* L., tri dana nakon infiltracije virulentnim agrobakterijama. Dodatni eksperimenti u *Arabidopsis*-u naglasili su važnost utišavanja gena kao strategije ograničavanja bolesti. Utvrđeno je da su genetski modificirane biljke s nedostatkom RNA (rdr6, u kojima nedostaje RNA-ovisna RNA polimeraza) preosjetljive na agrobakterijsku infekciju, što dokazuje opsežno stvaranje tumora. Provedena su istraživanja infekcije na lišću i stabljima *N. benthamiana* koji nose post-transkripcijski utišan gen za izvještavanje (zeleni fluorescentni protein, GFP). Ovaj pristup omogućio im je da pokažu da je strategija zaštite siRNA protiv T-DNA gena učinkovita samo u ranim fazama infekcije: jaka zelena fluorescencija, visoke koncentracije mRNA, GFP i niske koncentracije siRNA posebno su otkrivene u mladim tumorima. Kasnije u procesu zaraze patogen preuzima zapovjedništvo. Specifičnom inhibicijom sinteze siRNA,

agrobakterije induciraju stanje protiv prigušivanja zvuka - osiguravajući tako ekspresiju onkogeni i sazrijevanje tumora. Novija istraživanja dokumentirala su da metilacija DNA ima presudnu ulogu u regulaciji razine transkripcije T-DNA (Pitzschke, 2013).

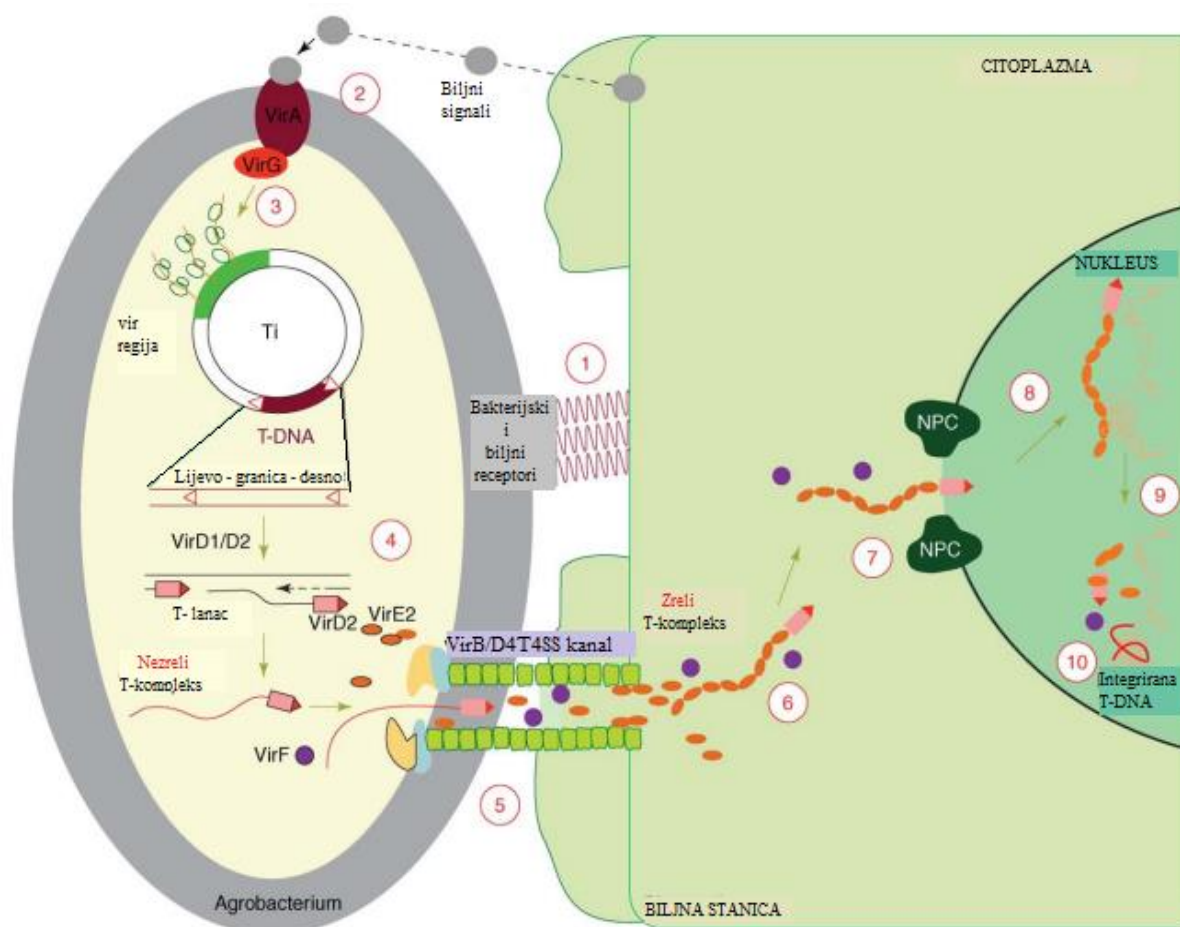
6. Upotreba roda *Agrobacterium* u biotehnologiji

Rod *Agrobacterium* genetski transformira svog domaćina prenošenjem definiranog segmenta DNA iz Ti plazmida u genom stanice domaćina. U prirodi prenesena DNA (T-DNA) nosi skup onkogena i gena za katabolizam opina, čija ekspresija u biljnim stanicama dovodi do neoplastičnog rasta transformiranog tkiva i stvaranja opina, aminokiselinskih derivata koje agrobakterija koristi, gotovo isključivo, kao izvor dušika. Rekombinantni sojevi *Agrobacterium*, u kojima je nativna T-DNA zamijenjena genima od interesa, najučinkovitija su sredstva koja se danas koriste za unošenje stranih gena u biljke i za proizvodnju transgenih biljnih vrsta. Dakle, biologija i biotehnologija, koja koristi *Agrobacterium* bile su predmet brojnih studija tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, što je rezultiralo raznim primjenama mnogih sojeva, plazmida i utvrđivanjem novih protokola agrobakterija, jedinstveno prilagođenih genetskoj transformaciji različitih biljnih vrsta. Molekularni mehanizmi potrebni za proizvodnju i transport T-DNA u stanicu domaćina sadrže proteine koji su kodirani skupom bakterijskih kromosomskih (*chv*) gena i gena Ti plazmidne virulencije (*vir*). Uz to, utvrđeno je da su različiti proteini domaćini tijekom kasnijih faza procesa genetske transformacije posredovane agrobakterijom, uglavnom se radi o unutarstaničnom transportu T-DNA, te integraciji nukleusa. Budući da *Agrobacterium* usvaja postojeće stanične procese (npr. transport DNA i proteina, ciljane proteoliza i popravak DNA) kako bi transformirao svog domaćina, razumijevanje ovih općih bioloških mehanizama biljne stanice može pomoći u širenju raspona domaćina agrobakterija kao alat genetskog inženjeringa, kao i olakšavanje kontrole procesa transformacije i njegovog ishoda tijekom proizvodnje transgenih biljaka. Regija *vir* smještena je na Ti plazmidu koji kodira većinu proteina bakterijske virulencije (Vir). Bakterija takve proteine koristi za proizvodnju svoje T-DNA te za njezinu isporuku u biljnu stanicu. U sojevima *Agrobacterium* „divljeg tipa“, područje T-DNA (definirano s dva direktna ponavljanja od 25 parova baza nazvanih lijeva i desna granica T-DNA) nalazi se u *cis*-u do regije *vir* na jednom Ti plazmidu. U sojevima *Agrobacterium* (slika 7), gdje je nativna regija T-DNA uklonjena iz Ti plazmida, rekombinantna regija T-DNA obično se nalazi na malom, autonomnom binarnom plazmidu te se nalazi u *trans vir* regiji (Tzfira i Citovsky, 2006).



Slika 7. Sojevi *Agrobacterium* u kojima je T-DNA uklonjena iz Ti plazmida. Prilagođeno iz Zerbini i sur. (2014).

Proces transformacije započinje vezivanjem bakterije i biljke (slika 8; korak 1), nakon čega slijedi indukcija ekspresije *vir* regije određenim signalima domaćina (slika 8; koraci 2 i 3). Zatim se kombiniranim djelovanjem bakterijskog VirD1 proizvodi jednolančana (ss) molekula T-DNA (T-lanac) (slika 8; korak 4) i VirD2 proteini. U bakterijskim stanicama T-DNA postoji kao ssDNA-proteinski kompleks (nezreli T-kompleks) s jednom molekulom VirD2 kovalentno vezanom na 50 kraj T-lanca. Ovaj kompleks, zajedno s nekoliko drugih virusa Vir, izvozi se u stanicu domaćina (slika 8; korak 5) sustavom sekrecije tipa VirB/D4 tipa IV. Ovaj korak zahtijeva interakciju bakterijskih T-pila s barem jednim proteinom specifičnim za domaćina. Kada se nađe u citoplazmi stanice domaćina, smatra se da T-DNA postoji kao zreli T-kompleks u kojem je cijela dužina molekule T-lanca prekrivena brojnim molekulama VirE2. Te molekule daju T-DNA strukturu i zaštitu potrebnu za njen prijenos (slika 8; korak 6) do jezgre stanice domaćina. To se uglavnom odvija tijekom posljednjih koraka procesa transformacije, gdje *Agrobacterium* koristi različite stanične mehanizme za postizanje genetske transformacije svog domaćina, kao što je to: transport kroz citoplazmu (slika 8; korak 6), nuklearni uvoz (slika 8; korak 7), unutarstanični transport (slika 8; korak 8), transformacija T-DNA (Slika 8; korak 9) i integracija (Slika 8; korak 10) (Tzfira i Citovsky, 2006).



Slika 8. Model genetske transformacije posredovane agrobakterijom.
Prilagođeno iz Tzfira i Citovsky (2006).

Gusta struktura citoplazme sastoji se od mreže mikrotubula, aktina i srednjih mreža filamenta, što uvelike ograničava Brownovu difuziju velikih makromolekula. Stoga je vrlo vjerojatno da se T-kompleks, sličan mnogim DNA virusima, doprema u staničnu jezgru uz pomoć mehanizma unutarstaničnog transporta domaćina. Zapravo, koristeći biofizičke metode praćenja čestica i fluorescentno obilježen kompleks VirE2 – ssDNA, nedavno je sugerirano da su dineini potrebni za usmjereno kretanje T-kompleksa prema jezgri. Ideja o tome da *Agrobacterium* koristi biljni citoskelet za svoje međustanično kretanje prema jezgri vrlo je zanimljiva. Stanična organizacija radijalnih mikrotubula u biljnim stanicama, orijentirana njihovim minus-krajem prema jezgri, dodatno podupire ideju da *Agrobacterium* koristi još neidentificirani biljni mehanizam sličan dineinu kako bi isporučio T-kompleks u jezgru. Veličina zrelog T-kompleksa (vanjski promjer 15,7 nm) sugerira na aktivni mehanizam za njegov unos. Utvrđeno je da obje komponente proteina T-kompleksa (VirD2 i VirE2) komuniciraju s proteinima domaćina radi njihovog unosa u stanice domaćina. VirD2 komunicira s AtKAPa, članom obitelji *Arabidopsis* karioferina, koja je posrednik u nuklearnom uvozu u permeabiliziranim stanicama kvasca. VirE2 je u interakciji s biljnim VirE2-interakcijskim proteinom 1 (VIP1) i njegovim funkcionalnim homologom, bakterijskim proteinom VirE3. Oba proteina djeluju kao molekularni adapteri između VirE2 i karioferina stanice domaćina. Kako su za unos ssDNA potrebni VirD2 i VirE2, za translokaciju zrelog T-kompleksa u stanicu domaćina potrebno je kombinirano djelovanje proteina bakterija i domaćina. Unutar jezgre, T-kompleks treba putovati do točke integracije i oduzeti mu prateće proteine prije integracije u genom domaćina. *Agrobacterium* koristi afinitet VIP1, a možda i druge čimbenike transkripcije, kako bi biljni kromatin ciljao T-kompleks na mjesto integracije. Nadalje, biološki dokazi ukazuju da *Agrobacterium* koristi proteolizu usmjerenu na uklanjanje T-lanca svojih srodnih proteina. Molekularna osnova ovog ciljanog mehanizma proteolize je sposobnost da VIP1 preda trostruki kompleks s VirE2, VirF i bakterijskim F-box proteinom. Presudna uloga proteasomske razgradnje u procesu transformacije dokazana je sposobnošću da VirF cilja VirE2 i VIP1, čime dolazi do razgradnje u stanicama kvasca te se pospješuje destabilizacija VIP1 u biljnim stanicama. Od svih koraka genetske transformacije, integracija T-DNA možda je najviše ovisna o staničnim procesima domaćina. Danas je poznato da niti jedna komponenta bakterijskih proteina T-kompleksa ne posjeduje funkcije popravljavanja DNA same po sebi potrebne za integraciju T-DNA. Utvrđeno je da je nekoliko proteina (potrebnih za popravak i pakiranje DNA) neophodno za integraciju T-DNA u kvascu i biljnim stanicama, te da imaju ulogu kromosomskih dvolančanih prekida (DSB) u privlačenju T-DNA. Potraga za određenim faktorima domaćina koji su uključeni u proces integracije ukazala je na širok spektar proteina i gena koji su predloženi za funkcioniranje u različitim fazama procesa transformacije. Kao što je gore spomenuto, to uključuje proteine koji su uključeni u početnu interakciju bakterija-domaćin, unos T-kompleksa te njegov unutarstanični transport (transformacija i integracija). Iako je specifična molekularna funkcija mnogih od ovih proteina domaćina još uvijek nepoznata, pokazalo se da prekomjerna ekspresija tri takva opisana gena u transgenim biljkama čini biljke osjetljivijima na infekciju *Agrobacterium*. Prekomjerna ekspresija VIP1 (biljnog proteina bitnog za nuklearni uvoz T-DNA) u biljkama duhana (*N. tabacum*) značajno je povećala njihovu osjetljivost na genetsku transformaciju posredovanu agrobakterijom. Prekomjerna ekspresija proteina u interakciji s VirB2 (BTI), biljnog proteina za kojeg se

izvještava da je u interakciji s proteinom VirB2, povećala je osjetljivost biljaka *Arabidopsis* na infekciju *Agrobacterium*. Dakle, prekomjerna ekspresija ključnih proteina domaćina koji funkcioniraju ne samo u unosu, ciljanju kromatina i integracijskim koracima procesa transformacije (tj. koraci koji se događaju unutar stanice domaćina i u kojima se *Agrobacterium* u velikoj mjeri oslanja na stanicu domaćina), ali i tijekom početnog kontakta *Agrobacterium*-domaćin, korisna je za povećanje učinkovitosti transformacije biljaka. Vrlo niska stopa homologne rekombinacije između T-DNA i biljne DNA glavni je nedostatak u razvoju toliko potrebne i vrlo željene tehnologije za ciljanje gena u biljnim stanicama. Zabilježeno je nekoliko primjera ciljane integracije homologne rekombinacije u višim biljkama. Eksperimentalni dokazi sugeriraju da nedostatak homologne rekombinacije između T-DNA i biljne DNA može biti izravna posljedica njegovog mehanizma integracije (Tzfira i Citovsky, 2006).

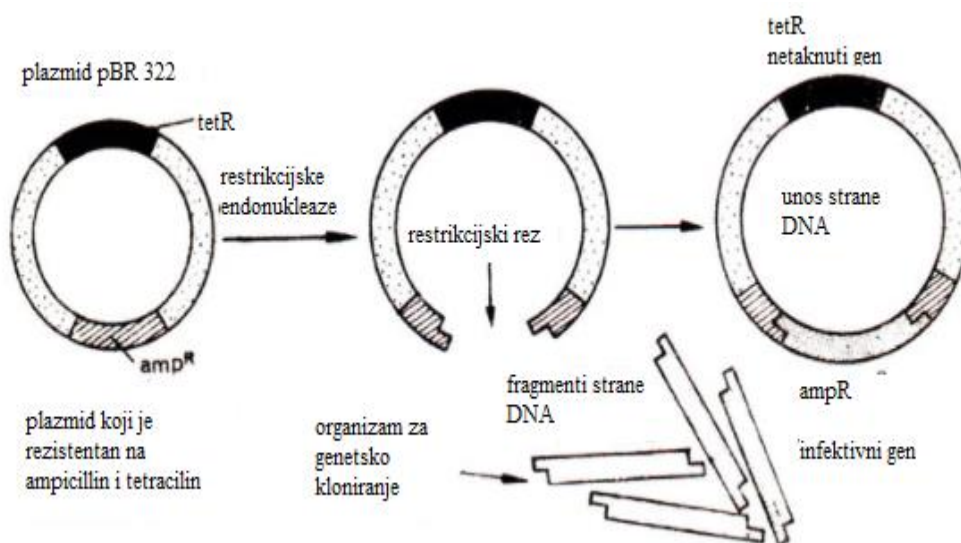
Nekoliko tipičnih egzopolisaharida koje proizvodi *Agrobacterium* privuklo je veliku pozornost zbog moguće primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Provedena su brojna istraživanja na sukcinoglikanu (vrsta heteropolisaharida koji se uglavnom sastoji od glukana u koje su sukcinilne skupine vezane za neke hidroksilne skupine monomera glukopiranoze) i kurdlanu (linearan homopolisaharid sastavljen od β - 1, 3 – glukana) koje proizvodi *Agrobacterium*. Sukcinoglikan pokazuje veliku stabilnost čak i pod ekstremnim radnim uvjetima (visoka temperatura i tlak, ekstremni pH) te se koristi kao sredstvo za zgušnjavanje, stabiliziranje, emulgiranje, teksturiranje i želiranje. Rod *Agrobacterium*, u usporedbi s ostalim bakterijskim sojevima koji proizvode sukcinoglikan, bio je najranije korišten u industriji. Izvješteno je kako sukcinoglikan mogu proizvoditi *A. radiobacter* i *A. tumefaciens*. Kurdlan proizveden iz roda *Agrobacterium* koristi se kao: aditiv u hrani, čepići s produljenim oslobađanjem, inhibicija koagulacije krvi i liječenje demencije. Štoviše, kurdlan se može koristiti kao glavna komponenta potencijalnih antitumorskih i anti-HIV tretmana koji zahtijevaju specifična funkcionalna svojstva (Wu i sur., 2016).

6.1. Izrada vektora

Posljednjih godina postignut je impresivan tehnički napredak u razvoju proizvodnih procesa i industrijskih postrojenja, temeljenih na različitim pristupima, uključujući pristup koji se temelji na virusnim vektorima. Vektori biljnih virusa razvijeni su kao bi se dobile stabilno transformirane transgene biljke zbog nekih očekivanih prednosti kao što je to: brzina ekspresije gena, smanjene troškova/trajanje istraživanja, dobivanje biljaka koje su otporne na okolišne uvjete (npr. suša), povećani biljni prinos... Istraživanja su pomogla unaprijediti tehničku korisnost vektora biljnih virusa, dizajnirajući vektore koji nisu samo kopije virusa divljeg tipa koji nose heterologni genski slijed, već su oni poboljšani na razne načine, kao što je to ograničavanje funkcija na agrobakterije ili biljne domaćine, omogućujući tako učinkovitiji, svestraniji, kontrolirani i sigurniji postupak (Gleba i sur., 2013).

U posljednjim desetljećima plazmidni vektori postali su ključni alat u molekularnoj biologiji. Plazmidi se širom svijeta koriste za poticanje biotehnološkog napretka, od proizvodnje inzulina rekombinantnim sojem *Escherichia coli* za liječenje dijabetesa pa sve do usjeva kukuruza koji sadrže gen *Bacillus thuringiensis* (Nora i sur., 2019). Bakterija *B. thuringiensis* poznata je po tome što stvara kristal u obliku dijamanta iz svojih kristalnih proteina (Cry proteina), te ga koristi za obranu grabežljivca, insekata i patogena. Genetskim inženjeringom stvaraju se transgene biljke u koje se umeće *Bt* toksin te takve biljke postaju otporne na insekte (Ibrahim i sur., 2010).

Nekoliko je načina unosa stranog genetičkog materijala u biljnu stanicu, jedan od njih je i korištenje endonukleaza. Prvi korak u tom postupku je identifikacija i izolacija gena koji kodira za željeni protein, nakon čega se odabire željeni vektor. Odabir vektora najviše ovisi o veličini gena koji se želi prenijeti, ali također ovisi i o vrsti stanice. Nakon što se odabrao odgovarajući vektor, slijedi faza u kojoj se izrezuje pomoću restriksijske.....te potom ugrađuje gen pomoću DNA ligaze. Konstruirani vektor unosi se u prokariotsku ili eukariotsku stanicu te slijedi zadnja faza u kojoj se odabiru transformanti na temelju njihove umetnute rezistencije na antibiotike (kasnijim postupcima se ta rezistencija može ukloniti), koji služe za diferencijaciju pozitivno transformiranih vektora, nakon čega slijedi ekspresija transgena (Nora i sur., 2019). Konstrukcija vektora prikazana je na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz konstrukcije vektora.

Izvor:

https://biocyclopedia.com/index/genetics/genetic_engineering_and_biotechnology_recombinant_dna/plasmids_as_vectors.php. Pristupljeno 3. svibnja 2021.

Do sada je postignut najveći napredak s RNA virusnim vektorima, a najnapredniji vektori koriste samo nekoliko vrsta biljnih virusa kao platformu. Poželjni vektori prije svega uključuju: Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV), virus mozaika duhana (TMV), virus krumpira X (PVX), virus mozaika lucerne (AMV) i virus mozaika krave (CPMV).

Najnoviji podaci pokazuju da se vektori koji se temelje na nekim DNA virusima, poput Beanpatuljaka (BeYDV), također mogu uspješno koristiti kao vektori. Virusi divljeg tipa sposobni su za obavljanje različitih funkcija, uključujući početnu infekciju domaćinom, pojačavanje/replikaciju nukleinske kiseline, translaciju proteina, skupljanje zrelih viriona, širenje na velike udaljenosti, reprogramiranje biosintetskih procesa domaćina... Samo neke od ovih funkcija su potrebne ili čak poželjne u učinkovitom vektoru, koji bi, uz to, trebao biti u stanju izvršiti barem jednu novu funkciju, ekspresiju na visokoj razini jednog ili više heterolognih gena. Danas postoje dva različita pristupa koja se mogu koristiti za razvijanje učinkovitog procesa virusnog vektora/domaćina. Povijesno gledano, prvi pristup bio je oblikovanje vektora koji je sposoban zaraziti biljku na isti način kao virus divljeg tipa, ali koji je, osim toga, konstruiran da nosi i izražava heterolognu sekvencu koja kodira određeni gen (ovaj pristup je nazvan vektorskom strategijom "punog virusa"). Napredak je u ovom slučaju rezultat opsežnih studija usmjerenih na inženjerstvo vektora koji je u osnovi bio potpuno funkcionalan virus, a koji je unatoč nošenju i izražavanju heterolognog slijeda, zadržao infektivnost, stabilnost i sistemsku virulenciju u svom domaćinu. Najnoviji trend odražava ideologiju koja priznaje inherentna ograničenja virusa te ga pokušava onеспособiti uklanjanjem gena i funkcija koji su ograničavajući (npr. uska specifičnost vrsta ili preusmjeravanje biljnih resursa domaćina od strane virusnih mehanizama za proizvodnju vlastitog proteinskog omotača) ili nepoželjni (kao što je sposobnost stvaranja funkcionalnih zaraznih čestica viriona, što predstavlja potencijalnu biološku opasnost), te ponovna izgradnja procesa zamjenom virusnih funkcija analognim funkcijama koje nisu izvedene iz virusa (vektorska strategija „razoružanog virusa“). U svojim naprednijim oblicima, ovi ekspresijski sustavi „druge generacije“ integriraju elemente virusnih mehanizama, kao što su pojačavanje RNA/DNA i kretanje stanice do stanice, zajedno s nevirusnim procesima poput stvaranja replikona putem isporuke T-posredovane agrobakterijom. Vjerojatno je najnaprednija verzija ove tehnologije razvijena u Icon Genetics (Halle, Njemačka) i zaštićena je kao magnICON tehnologija i vektori. Icon Genetics i njena magnICON vektorska tehnologija postigli su važnu prekretnicu na području biotehnologije stvaranjem standardizirane metodologije za ekspresiju gena posredstvom *Agrobacterium* u biljkama (Gleba i sur., 2013).

Dizajnirani je niz malih pomoćnih plazmida s namjerom da pojednostave i optimiziraju transformaciju usjeva posredovanih agrobakterijama. Ovi plazmidi, označeni kao pVIR koji se nazivaju pPHP70298, pPHP71539 i pPHP7976, a sadrže skupove različitih vir gena (virG, virE, virA, virJ, virB, virC i virD) iz hipervirulentne pTiBo542 plazme, kao i veliki broj kopija pVS1 ORI (ishodište replikacije) te antibiotski marker za odabir bakterijskih transformanata, gentamicin. Odgovarajući nizovi mogu se pronaći pod GenBank brojevima MF788072, MF788073 i MF788074. Pomoćni plazmidi dizajnirani su za potporu trostrukom dizajnu vektora za transformaciju usjeva te za pojednostavljivanje vektorskog sastavljanja. Dizajn pVIR plazmida zasnovan je na superbinaarnom vektoru otvorenog koda pCAMBIA5105. Veliki ORI (19,7 kb) sadrži umjerenu kopiju plazmidnog replika RK2 ORI (10–12 kopija), a partijske sekvence u pSB1 zamijenjene su sa pVS1, manjim (~ 2,6 kb), stabilnijim primjerkom (~ 20 kopija) ORI. Izbor plazmida ORI važna je odrednica veličine plazmida, stabilnosti, broja kopija, specifičnosti domaćina i kompatibilnosti s drugim ORI, kada su dodatni plazmidi prisutni u istoj bakterijskoj stanici (Anand i sur., 2018).

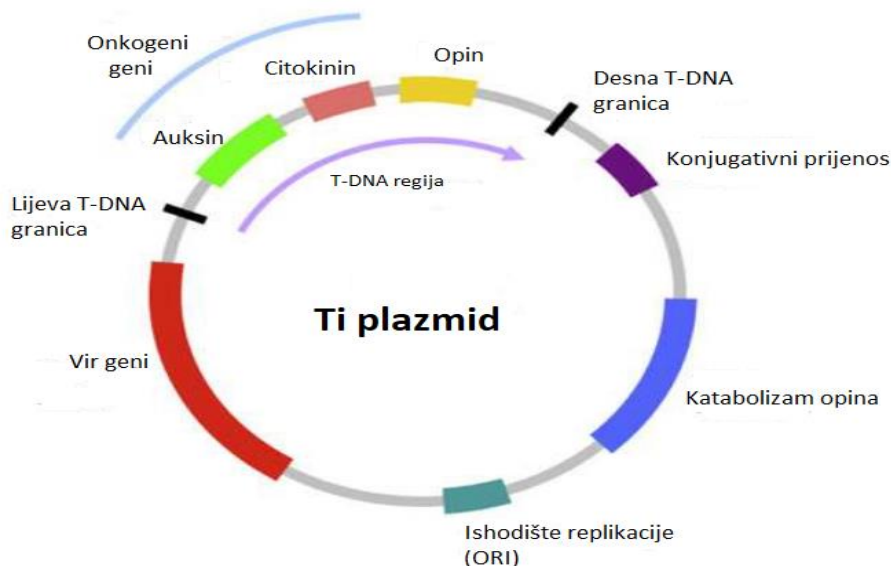
6.2. Vrste roda *Agrobacterium* u biotehnologiji

Rod *Agrobacterium* posljednjih desetljeća široko se koristi za genetsku transformaciju velikog broja biljnih vrsta. Identifikacija sve većeg broja bakterijskih i biljnih čimbenika koji sudjeluju u prijenosu i integraciji posredovanih agrobakterijama može dovesti do novih primjena u raznim poljima istraživanja i biotehnologije. Jedan od glavnih izazova u tehnologiji prijenosa gena posredovanih agrobakterijom je postizanje bolje kontrole integracije i ekspresije prenesenih gena u stanicama domaćina, te njihova primjena za ciljanu integraciju u genom domaćina ili zamjena gena. Uz genetsku transformaciju biljaka, u laboratorijskim uvjetima, raspon domaćina *Agrobacterium* može se proširiti na gotovo sve eukariotske vrste, kao što su to gljive i životinjske stanice. Ne samo da *Agrobacterium* može prenositi DNA na ove vrlo raznolike domaćine, već je i njegov mehanizam virulencije sposoban ubrizgati proteine u stanicu domaćina, neovisno o prijenosu DNA. Dakle, *Agrobacterium* predstavlja univerzalni stroj za prijenos gena i proteina (Lacroix i sur., 2008). U ovom poglavlju opisat će se primjena *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* i *A. vitis* u zelenoj biotehnologiji. Prilikom transformacije potrebno je provesti postupak namijenjen izravnom uklanjanju *Agrobacterium*-a (radi se prije infekcije) jer će razvoj bolesti napredovati neovisno o uzročniku nakon transformacije. Prilikom mehaničkog oštećenja površine biljke kalemljenjem i presađivanjem, baktericidi na bazi bakra ili izbjeljivača mogu smanjiti populacije *A. tumefaciens* na biljnim površinama, umanjujući bolesti. Međutim, korištenjem avirulentnih sojeva *Agrobacterium* koji djeluju kao antagonisti *A. tumefaciens* pokazali su se najučinkovitijim sredstvom za kontrolu patogenih tumora vrata korijena. Soj *Agrobacterium radiobacter* K84 i njegov derivat s nedostatkom plazmida K1026 najčešće su korišteni i najbolje proučavani agensi za biokontrolu tumora. Soj K84 posjeduje plazmid pAgK84 od 48 kb koji kodira za proizvodnju i imunost na antibiotik agrocin 84. Agrocin 84 ima snažno baktericidno djelovanje protiv *A. tumefaciens* sojeva koji sadrže Ti plazmid tipa nopalina. Plazmid soja K84 proizvodi agrocin 434 i ALS 84 te dodatne antibiotske spojeve koji vjerojatno proširuju opseg kontrole izvan sojeva *A. tumefaciens*. Ipak, patogeni sojevi *A. tumefaciens* koji su otporni na biokontrolu K84 nisu rijetkost pa kontrola bolesti tumora vrata korijena sa K84 nije univerzalno djelotvorna. Gore opisani baktericidni tretmani u osnovi su aktualni pa su često potrebne alternativne mjere za kontrolu agrobakterija kod vinove loze (*V. vinifera*) koja je obično sistemski zaražena sa *A. vitis*. U ovom slučaju, materijal za razmnožavanje bez bakterije *A. vitis* može se dobiti tretiranjem dormantnih reznica vrućom vodom ili *in vitro* tretiranjem vrhova izdanaka (Escobar i Dandekar, 2003).

- *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens široko se koristi kao svestrani alat za razvoj stabilno transformiranih biljaka koje služe kao model. Međutim, razvoj prijelaznih metoda transformacije biljaka na osnovi agrobakterija privukao je značajnu pozornost posljednjih godina. Privremene metode transformacije nude nekoliko primjena koje unapređuju stabilne transformacije poput brze i skalabilne proizvodnje rekombinantnih proteina (Krenek i sur., 2015).

Molekularna osnova genetske transformacije biljnih stanica od strane *Agrobacterium* je u velikoj mjeri otkrivena i dobro je poznato da se određeno područje, odnosno T-DNA iz Ti plazmida, prenosi i stabilno integrira u biljni genom. Kao što je spomenuto, regija T-DNA je mobilni element koji je odgovoran za stvaranje tumora i biosintezu opina u biljki. Uz to, Ti plazmid (slika 10) sadrži još dva područja povezana s interakcijom bakterije i biljke. Ta područja djeluju *trans* prilikom rekombinacije te se ne prenose se u biljnu stanicu. Područje *vir* sadrži približno 35 gena virulencije grupirane u najmanje osam operona (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* i *virH*). Kodirani proteini virulencije imaju višestruko važnu ulogu i u bakterijama i u stanici domaćinu, gdje kontroliraju prijenos i integraciju T-DNA. Druga regija sadrži gene koji imaju ulogu u unosu i metabolizmu opina. T-DNA regija definirana je i ograničena vrlo homolognim, izravno ponovljenim 25e28pb T-DNA graničnim sekvencama. Tijekom posljednjeg desetljeća, nekoliko pregleda opširno opisuje sve aspekte prijenosa i integracije T-DNA iz *A. tumefaciens* (Păcurar i sur., 2011).



Slika 10. Shematski prikaz Ti plazmida.
Prilagođeno iz Păcurar i sur. (2011).

Provedena su brojna istraživanja kako bi se razumio postupak kojim *A. tumefaciens* transformira svog domaćina i uzrokuje tumor vrata korijena. Polako se počeo uviđati potencijal u molekularnoj biologiji. Da bi postali pogodni za laboratorijske uvjete, nekada korišteni sojevi *Agrobacterium* trebali su biti konstruirani od odabranih sojeva divljeg tipa. Neke prirodne značajke Ti plazmida morale su se u potpunosti ukloniti (npr. geni odgovorni za stvaranje tumora i biosintezu opina u biljkama), dok su karakteristike nekih komponenata mehanizama za transformaciju morale biti poboljšane i naglašene. Temelj za biotehnološku uporabu agrobakterija u genetskoj transformaciji, leži na strukturi i funkcijama T-DNA. Dvije izravne granice ponavljanja od 25e28 bp jedini su *cis*-djelujući elementi neophodni za prijenos T-DNA. Na taj se način onkogeni divljeg tipa i opin sintaze iz T-DNA mogu zamijeniti genima od interesa. Kao rezultat, bilo koja DNA smještena između lijeve i desne

granice (sastoje se od 25e28pb) prenijet će se u stanicu domaćina. Međutim, budući da T-DNA nije u stanju posredovati u vlastitom prijenosu jer je samo „vozilo“, trebalo je izmijeniti i druge bakterijske značajke. Geni vir, nastanjeni na području virulencije Ti plazmida, potrebni su za prijenos i integraciju T-DNA. Izmjena njihove regulacije i broja kopija pokazala se korisnom za povećanje učinkovitosti transformacije. Time bi se mogla povećati veličina T-DNA koja se može mobilizirati u biljke. Iako bi razina indukcije i ekspresije virusa vir mogla biti ograničavajući korak za učinkovitu transformaciju nekih biljnih vrsta, noviji podaci pokazuju da učinkovitost transformacije nije uvijek u korelaciji s ekspresijom gena vir. Sposobnost virusa gena da djeluju u *trans* obliku dovela je do razvoja binarnih i superbinarnih vektora transformacije, kao glavni korak prema povećanju raspona vrsta koje su podložne transformaciji posredovanoj agrobakterijama. Budući da je proces transformacije rezultat suradnje između agrobakterije i njenog domaćina, sada je velik napor usmjeren ka razumijevanju doprinosa domaćina. Komplementarni pristup, koji se sastojao od manipulacije samim domaćinom, ukazuje na interes za dodatnim istraživanjem. Identifikacija mutanata *Arabidopsis* (otpornih na transformaciju *Agrobacterium*) pomoću genetičke pretrage otvorila je put za identifikaciju biljnih gena uključenih u proces transformacije. Iako je poznato da više od 120 gena ima ulogu u transformaciji, predloženo je da bi više od 200 gena *Arabidopsis* moglo utjecati na ovaj proces. Odgovarajući proteini pokrivaju širok spektar funkcija u biljkama, od sinteze komponenata stanične stijenke, prijenosa i insercije, do kromatina s potencijalnom ulogom u integraciji T-DNA i ekspresije transgena. Do sada su identificirani proteini koji djeluju između biljaka kao receptori za bakterijske proteine te biljni proteini koji sudjeluju u nuklearnoj integraciji, usmjerenom prema lokalizaciji T-DNA. Nadalje, pomoću transkripcijskog profiliranja, nekoliko je skupina uspjelo identificirati biljne gene s promijenjenom ekspresijom nakon infekcije s agrobakterijom. Iskorištavajući informacije prikupljene genetskim strategijama, napravljeni su i obrnuti genetski zasloni kako bi se dalje istražila važnost gena kandidata u transformaciji (Păcurar i sur., 2011).

- *Agrobacterium radiobacter*

A. radiobacter komercijalno se koristi za suzbijanje tumora vrata korijena, bolesti biljaka uzrokovane sveprisutnim patogenom koji se prenosi zemljom, *A. tumefaciens*. Gubici uzrokovani tumorom vrata korijena mogu biti veliki, posebno u rasadničarskoj industriji, gdje se svaka zaražena biljka mora ukloniti. Do zaraze može doći preko rana dobivenih rutinskom praksom obrezivanja pa korijen može biti koloniziran i zaražen s *A. tumefaciens* ili se zdrave sadnice sade u rasadničarska tla zaražena patogenom. Tijekom procesa infekcije, *A. tumefaciens* prenosi T-DNA regiju Ti plazmida u biljnu stanicu. Soj K84 uspješno se komercijalno koristi već više od deset godina u mnogim regijama svijeta, uključujući Australiju, Grčku, Izrael, Italiju, Japan, Novi Zeland, Južnu Afriku, Španjolsku i Sjedinjene Države (Stockwell i sur., 1993).

Tri desetljeća soj bakterijskog antagonista *A. radiobacter* K84 bio je vrlo učinkovit u sprječavanju tumora na krošnjama koštunjavih voćaka. Soj se koristi na sjemenu i korijenju, kao i na reznicama materijala za razmnožavanje. Ipak, uporaba K84 ima određenih nedostataka. Neuspjeh ovog soja uglavnom je posljedica prijenosa gena koji kontrolira

proizvodnju agrocina 84 (pAg84). Otpornost se može prenijeti sa soja K84 na patogenog primatelja *Agrobacterium*, što rezultira gubitkom biokontrole jer primatelj tada postaje otporan na agrocin 84 i ostaje patogen. Kako bi se izbjegao taj prijenos i osigurala biokontrola tumora vrata korijena, prijenosno rekombinantno područje *tra* izbrisano je genetskim inženjeringom da bi se dobio tramutant soja K84, nazvan K1026. Stoga, osim dijela DNA uklonjenog iz K84, dva soja su u osnovi identična i imaju iste karakteristike. Uklanjanje ovog genetskog materijala sprječava soj K1026 da prenese dio DNA na bakterije koje uzrokuju bolest tumora vrata korijena, čime se smanjuje vjerojatnost da te bakterije postanu otporne. Ova bolest brzo se proširila širenjem uzgoja voćaka i uspostavljanjem novih rasadnika bez odgovarajućih fitosanitarnih preuvjeta (Rhouma i sur., 2004).

Enantiomerno čisti epoksidi važni su građevni blokovi za proizvodnju širokog spektra farmaceutskih proizvoda. Posebice tijekom posljednjeg desetljeća, mnogo je istraživanja usmjereno na razvoj biokatalitičkih metoda za proizvodnju tih spojeva. Epoksid hidrolaze su enzimi koji ne ovise o kofaktoru i koji hidroliziraju epoksidge u diole. Ako ovi enzimi pokazuju enantioselektivnost, mogu se koristiti kao kiralni katalizatori za proizvodnju enantiomerno čistih epoksidge ili diola. Enzimi iz izvora sisavaca opsežno su proučavani zbog njihovog sudjelovanja u metabolizmu toksičnih ksenobiotika. Npr. stiren oksid hidrolizira se u manje toksični proizvod feniletandiol. Potencijal hidrolaze sisavaca epoksidge kao kiralnih katalizatora ograničen je zbog male dostupnosti ovih enzima. Nedavno je otkriveno nekoliko epoksid hidrolaza iz mikrobnih izvora. Visoka enantioselektivnost dobivena je hidrolizom (supstituiranih) stiren oksidge upotrebom gljivičnih stanica, te širokom lepezom arilnih i alifatskih epoksidge s kvascem *Rhodotorula glutinis*. Enantioselektivne bakterijske epoksidne hidrolaze otkrivene su u *Rhodococcus* sp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp. te nekim drugim rodovima. Dostupnost bakterijskih enzima znatno je veća u usporedbi s mikrosomnom epoksid-hidrolazom. Međutim, za razliku od enzima sisavaca, za gore spomenute epoksid hidrolaze iz mikrobnih izvora dostupno je vrlo malo biokemijskih podataka. Geni nisu klonirani, a njihova struktura i mehanizam nepoznati su. Nedavno se okarakterizirala bakterijska epoksid hidrolaza dobivena iz *Agrobacterium radiobacter* AD1. Bakterija je u početku izolirana iz razloga zaštite okoliša zbog svoje sposobnosti da razgrađuje epiklorohidrin (Spelberg i sur., 1998).

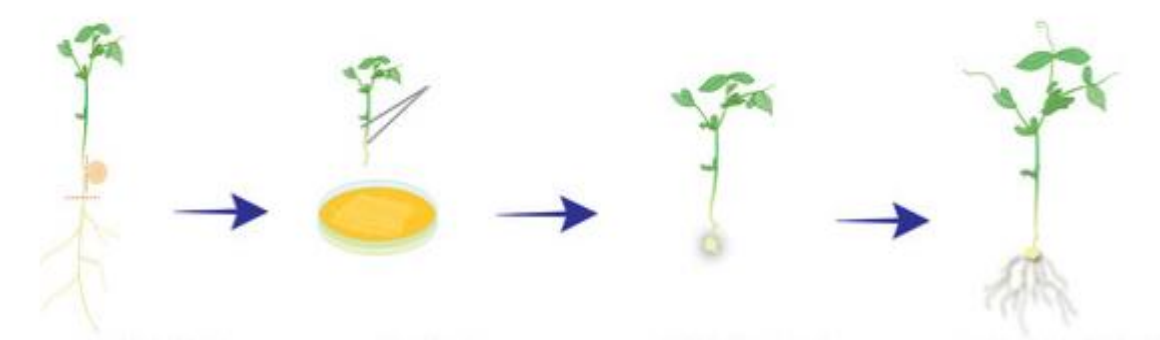
- *Agrobacterium rhizogenes*

Agrocinopin A jedan je od spojeva proizvedenih od Ti plazmida tipa agrocinopin-nopalin A te ima važnu ulogu u ekologiji stanica *Agrobacterium*. Prije svega, poznat je kao konjugativni opin jer izaziva prijenos plazmida između agrobakterija koje su sposobne iskoristiti ovu molekulu. Štoviše, dijeli strukturnu homologiju s agrocinom 84, antibiotskim spojem koji proizvodi soj *A. rhizogenes* K84. Imunost i biosinteza ovog antibiotika kodirani su lokusom od 19,8 kb smještenim na transmisivnom plazmidu pAgK84 koji je smješten u antagonistu soja *A. rhizogenes* K84. Agrocin 84 apsorbiraju patogene agrobakterije putem transportera opina kodiranog prema operonu koji je pripisan stjecanju i katabolizmu agrocinopina A i B. Upotreba K84 predstavlja najučinkovitiju metodu za prevenciju tumora na različitim biljnim vrstama širom svijeta jer su kemijske ili agronomske metode djelotvorne

samo djelomično. Budući da su samo sojevi *A. tumefaciens* osjetljivi na agrocin 84, postoje neke populacije *Agrobacterium* koje su neosjetljive na agrocin 84. Ove prirodno rezistentne agrobakterije mogu predstavljati važno ograničenje u uporabi soja K84 kao agensa za biokontrolu. Transkonjugantne agrobakterije koje sadrže i pAgK84 i pTi, mogu se dobiti konjugativnim prijenosom pAgK84 u onkogene agrobakterije koje žive u rizosferi kultiviranih biljaka. Transkonjuganti mogu nastati prijenosom i rekombinacijom Ti plazmida iz tumorogenih agrobakterija u pozadinu K84. Da bi se prevladali rizici povezani s konjugativnim prijenosom pAgK84, konstruirana je *tra* regiju pAgK84 dobivajući tako derivat soja *A. rhizogenes* K1026 koji nije u stanju mobilizirati vlastiti plazmid u drugim sojevima primatelja. Danas se *A. rhizogenes* K1026 koristi u nekoliko zemalja gdje je dopuštena uporaba genetski manipuliranih mikroorganizama na otvorenom polju (Raio i sur., 2009).

A. rhizogenes koristi se za identifikaciju biljnih gena koji mogu suzbiti programiranu staničnu smrt u biljkama koju uzrokuje fumonizin B1. Također, *A. rhizogenes* može se koristiti kao alat za određivanje prostornih i vremenskih aspekata ekspresije gena u biljkama kako bi se identificirali signalni putovi povezani s odgovorom patogena (Ron i sur., 2014).

Leppyanen i sur. (2019.) proveli su istraživanje u kojem su pokazali uspješnu transformaciju dviju sorti graška (*Pisum sativum* L.) uz pomoć *A. rhizogenes*. Sadnice s jednim do dva internodija su presječene u hipokotilnom području kako bi se uklonio ostatak korijena. Ranjeni vrh korijena svake sadnice stavljen je na ploču u kojoj je kultivirana bakterija *A. rhizogenes*. Nakon transformacije sadnice graška inkubirane su u staklenkama, a vrhovi korijena održavani su u uvjetima visoke vlažnosti. Nakon 10 – 14 dana dolazi do stvaranja kalusa (masa parenhimskog tkiva koja se nalazi uz ranu nastalu pri mehaničkim povredama bilo kojeg dijela biljke) na mjestima ranjavanja. Nakon 4 tjedna uočen je pojačani rast korijenovih dlačica (slika 11). Nakon infekcije *A. rhizogenes*, oko 70 – 80% sadnica graška pokazalo je pojačani rast korijenovih dlačica. Također, utvrdili su da *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* može učinkovito nodulirati transgeni korijen.



Slika 11. Pojačani rast korijenovih dlačica na grašku (*Pisum sativum* L.).

Preuzeto iz Leppyanen i sur. (2019).

- *Agrobacterium vitis*

Tumor vinove loze (*V. vinifera*) uzrokuje bakterija *A. vitis*. Ovo je najvažnija je bakterijska bolest koja može zahvatiti vinovu lozu (*V. vinifera*) u cijelom svijetu. Nepatogeni *A. rhizogenes* soj K84 uspješno se koristi za suzbijanje tumora kod mnogih biljnih vrsta. Smatra se da je agrocin koji proizvodi K84 (agrocin 84) primarni faktor u biokontroli. Međutim, K84 ne može spriječiti početnu zarazu vinove loze (*V. vinifera*) kao što to može *A. vitis* (Kawaguchi i sur., 2007).

Uzorci prikupljeni iz rasadnika vinove loze (*V. vinifera*) u Japanu utvrdili su nepatogene sojeve roda *Agrobacterium*. Na temelju klasičnih dijagnostičkih testova, analize sekvenci i multiplex PCR metode, nepatogeni sojevi ARK-1, ARK-2 i ARK-3 identificirani su kao *A. vitis*. Stabljike sadnica vinove loze (*V. vinifera*) inokulirane su staničnom suspenzijom sedam miješanih patogenih sojeva *A. vitis* (koje posjeduju Ti plazmid) te sojem *A. vitis* VAR03-1, jednim od bioloških sredstava za kontrolu tumora. U testu s omjerom stanica 1: 1 (patogen/nepatogen), sojevi ARK-1, ARK-2 i ARK-3 smanjili su učestalost tumora. Konkretno, soj ARK-1 bio je najsnažniji u inhibiranju stvaranja tumora u ovom istraživanju. Soj ARK-1 utvrdio je populacije na korijenima vinove loze (*V. vinifera*) i zadržao se na korijenju godinu dana. ARK-1, ARK-2 i ARK-3 nisu proizveli halo inhibicije protiv soja *A. vitis* (Ti) na YMA mediju. Štoviše, soj ARK-1 nije smanjio učestalost tumora na stabljikama vinove loze (*V. vinifera*) kada je ARK-1 bio mrtav ili je korišten samo filtrat iz kulture. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da ovi novi sojevi inhibiraju tumor vinove loze (*V. vinifera*) u rasadnicima drugačijim mehanizmom od VAR03-1. Konkretno, jedan od novih sojeva, nazvan ARK-1, bio je najučinkovitiji u inhibiranju stvaranja tumora na vinovoj lozi (*V. vinifera*) i čini se da je novo obećavajuće sredstvo za kontrolu tumora vinove loze (*V. vinifera*) (Kawaguchi i Inoue, 2012).

Nekoliko je laboratorija pokušalo identificirati druge biološke mjere kontrole tumora koji zahvaća vinovu lozu (*V. vinifera*). U tu svrhu procijenjeno je 16 sojeva, uključujući nepatogeni soj *A. vitis* F2/5, koji inhibira rast većine onkogenih vrsta *A. vitis in vitro* i uvelike inhibira tumor na vinovoj lozi (*V. vinifera*) u eksperimentima s ranjavanjem stabljike u stakleniku. Dokazano je kako soj F2/5 proizvodi agrocin, koji inhibitorno djeluje kod većine onkogenih sojeva *A. vitis in vitro*, te učinkovito inhibira stvaranje tumora na mjestima rane na trsima vinove loze (*V. vinifera*) umjetno cijepljenim s jednim od nekoliko onkogenih gena *A. vitis* sojeva (Kawaguchi i sur., 2007).

6.3. Transgene biljke

Tehnologija rekombinantne DNA omogućila je proizvodnju biljaka koje izražavaju nova svojstva koja nisu nužno dodijeljena određenim vrstama čime je prekinuta reproduktivna izolacija, tj. sterilnost između dviju populacija jedinki. Genetski modificirane (GM) biljke mogu se klasificirati u tri "generacije". Prva generacija dizajnirana je da koristi proizvodnom procesu i obično je imala agronomске osobine, kao što su otpornost na bolesti i

štetnike, te tolerancija na herbicide. Druga generacija dizajnirana je za dobrobit potrošača i uključuje GM biljke čija su hranjiva svojstva poboljšana kvalitativno i/ili kvantitativno, kao i biljke s boljom kvalitetom nakon berbe. Treća generacija uključuje GM biljke dizajnirane da djeluju kao biotvornice sintetiziranjem spojeva s primjenom u farmaceutskoj industriji (cjepiva, hormoni i antitijela) i proizvodnoj industriji (Zerbini i sur., 2014).

Prve GM biljke razvijene su 1983. godine, a prva dozvola za eksperimentalnu sadnju dogodila se tek 1990. godine u Kini. Međutim, uporaba GM usjeva u komercijalne svrhe u velikim je razmjerima započela tek rajčicom (*Solanum lycopersicum* L.) Flavr savr u SAD-u 1992. godine, a kasnije, 1996. godine, sojom (*Glycine max* L.), Roundup Ready. Glavne karakteristike GM usjeva su otpornost na štetnike i tolerantnost herbicida, povećanje produktivnosti i podnošljivost biljaka na nepovoljne uvjete tla i klime. Roundup Ready soja (*G. max*), GM usjev tolerantan na herbicide razvijen je uvođenjem gena otpornosti na glifosat bakterije *A. tumefaciens* u svoju DNA, čime soja (*G. max*) postaje tolerantna na herbicid Roundup Ready. Ovaj herbicid, putem svoje glifosadne komponente, ubija korov blokirajući enzim enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintazu (odgovoran za proizvodnju esencijalnih aminokiselina za rast i opstanak većine biljaka). *Bt* pamuk i *Bt* kukuruz, usjevi otporni na štetnike, imaju gene koji kodiraju insekticidno djelovanje bakterije *B. thuringiensis*. Proteini izvedeni iz ovih gena specifični su po pružanju rezistencije određenim vrstama *Lepidoptera*. Prije nego što mogu naštetiti usjevima, gusjenice koje se hrane GM usjevima unose *Bt* protein, koji zatim djeluje na epitelne stanice crijeva potičući osmotsku rupturu i smrt. Glavna osobina ovih proizvoda je olakšano upravljanje usjevima, smanjenje troškova proizvodnje te povećanje vrijednost u programima integriranog upravljanja štetocinima, dajući poljoprivrednicima veću sigurnost u suzbijanju štetnika. Između 1996. i 2015. godine zabilježeno je povećanje površina zasađenih GM usjeva s 1,7 milijuna hektara na 179,7 milijuna hektara. Smatra se da je ova tehnologija najbrže usvojena poljoprivredna tehnologija u suvremenoj povijesti poljoprivrede. Prema podacima iz 2018. godine, SAD (73,1 milijuna hektara), Brazil (42,2 milijuna hektara), Argentina (24,3 milijuna hektara), Indija (11,6 milijuna hektara) i Kanada (11,6 milijuna hektara) bili su među najvećim svjetskim proizvođačima GM usjeva po zasađenim površinama. Pored ovih zemalja, još 23 zemlje dopunjuju popis proizvođača GM usjeva s ukupno 28 zemalja proizvođača i 18 milijuna poljoprivrednika. Najčešće uzgajane kulture su kukuruz (*Zea mays* L.), soja (*G. max*), pamuk (*Gossypium* sp.) i repica (*Brassica napus* L.). U prosjeku je usvajanje GM usjeva smanjilo upotrebu pesticida za 37%, a povećani su prinosi usjeva za 22%, što je dovelo do povećanja dobiti poljoprivrednika za 68%. Ta su povećanja osigurala konkurentnost zemalja izvoznica hrane na poljoprivrednim tržištima. Niz značajki usmjereno je na poboljšanje tolerancije na sušu i slanost, poboljšanje prinosa te učinkovitosti upotrebe dušika (Barcelos i sur., 2018).

Korištenje selekcijskog gena markera zajedno s genom od interesa važan je aspekt u generiranju transgenih biljaka jer omogućuje odabir transformiranih biljnih stanica među velikim brojem ne transformiranih stanica. Proizvod većine selektivnih marker gena pruža rezistentnost na antibiotike ili herbicide, omogućujući transformiranim biljnim stanicama da rastu i ostanu na životu pod uvjetima koji ubijaju ili koče rast netransformiranih stanica. Najkorišteniji biljezi u žitaricama su geni koji kodiraju higromicin fosfotransferazu (*hpt*),

neomicin fosfotransferazu (nptII), fosfinothricin acetiltransferazu (pat ili bar), acetolaktat sintazu (als), fosfomanoza izomerazu (pmi) i ksiloza izmetazu. Gen za hpt bio je najbolji selektivni marker za rižu (*Oryza sativa* L.) i ječam (*Hordeum vulgare* L.), pat/bar je bio uobičajeni marker za transformaciju kukuruza (*Z. mays*) i pšenice (*Triticum aestivum* L.), a pmi gen pokazao je najveću učinkovitost u sirku (*Sorghum bicolor* L.). Uz selektivne markere, u biljkama su korištene mnoge vrste gena za vizualno prikazivanje, također poznate kao reporter geni, kao što su: GFP (zeleni fluorescentni protein), gus A (β -glukuronidaza) i luc (luciferaza). Otkrivanje ekspresije ovih reporterskih gena vrlo je jednostavno i uglavnom se koristi za potvrđivanje transformacije, lokalizaciju proteina unutar stanica ili na razini tkiva i promatranje aktivnosti gena. Prisutnost introna u kodirajućoj sekvenci reporterskih gena posebno je važno kod žitarica jer je time povećana razina ekspresije gena. Sljedeći važan aspekt u transformaciji je upotreba odgovarajućeg i određenog promotora za konstitutivnu ili tkivno specifičnu ili induciranu ekspresiju gena od interesa u transgenskoj biljci. Konstitutivni promotor CaMV 35S, promotor ubikvitina kukuruza (*Z. mays*) i gena za aktin riže (*O. sativa*), intenzivno se koristi u žitaricama (Singh i Prasad, 2016).

Sirak (*S. bicolor*) je peta zasađena žitna kultura na svijetu i često se uzgaja u sušnim i polusušnim regijama poput Afrike. Unatoč svojoj važnosti kao izvora hrane, genetsko poboljšanje sirka (*S. bicolor*) kroz transgene pristupe ograničeno je zbog neučinkovitog sustava transformacije. Procjenjuje se da se oko 500 milijuna ljudi širom svijeta oslanja na sirak (*S. bicolor*) kao osnovni izvor hranjiva. Međutim, zrnu sirka (*S. bicolor*) ozbiljno nedostaje mikronutrijenata, a ujedno je siromašno i bjelančevinama. Zbog ograničenja tradicionalnog uzgoja, zelena biotehnologija pokazala se kao važna komponenta za biofortifikaciju usjeva i poboljšanje agronomskih svojstava usjeva. U principu, uspješan sustav transformacije oslanja se na kombinaciju čimbenika, uključujući odabrani marker, učinkovitu integraciju gena i reaktivnu kulturu tkiva. Iako je posljednjih godina postignut značajan napredak, mikroinjektiranjem može se postići učinkovitost transformacije od ~ 21%. Iako je transformacija posredovana agrobakterijama pogodnija za umetanje precizne sekvence DNA s niskom i jednom kopijom, učinkovitost transformacije samo je 10%. Virulentni sojevi *Agrobacterium* pokazali su veće frekvencije transformacije. U usporedbi s metodama transformacije za druge žitne kulture, poput kukuruza (*Z. mays*) i riže (*O. sativa*), transformacija sirka (*S. bicolor*) znatno zaostaje. Binarni vektori idealni su za uvođenje gena u biljke usjeva zbog njihove sposobnosti da integriraju transgene u niskoj i pojedinačnoj kopiji. Šira primjena agrobakterija postignuta je primjenom tzv. superbinarnih, kointegracijskih vektora (CIV) što rezultira znatno poboljšanom transformacijom usjeva, posebno za žitarice. Međutim, superbinarni plazmid pSB1 ima ograničeni broj vir gena (B, G i dio C) i zahtijeva korak kointegracije. Uz to, velika veličina plazmida također predstavlja izazov za visoko propusnu konstrukciju vektora. Stoga, dizajniran je niz pVIR vektora (pPHP70298, pPHP71539 i pPHP79761) koji sadrže optimalan skup vir gena. Ti su geni sastavljeni u ternarni vektor u kojem se nalazi pVIR plazmid bez T-DNA i binarni plazmid nadležan za prijenos T-DNA. Tako konstruiran ternarni vektor kotransformira se u stanicu *Agrobacterium* te se koristi za transformaciju biljaka. Ovi pVIR vektori imaju mnoštvo poželjnih karakteristika, uključujući manju veličinu vektora, poboljšanu stabilnost vektora i izmijenjene vir gene za pojačanu dostavu T-DNA gena (Che i sur., 2018).

Iako su tijekom proteklog desetljeća postignuti veliki pomaci u povećanju broja biljnih vrsta koje se mogu transformirati pomoću agrobakterija, mnoge važne vrste i dalje pokazuju nisku stopu transformacije posredovanu agrobakterijama. Često se postavlja pitanje: "*Tko ima problem s transformacijom, Agrobacterium ili istraživač?*" Vrlo širok raspon domaćina *Agrobacterium*, uključujući golosjemenjače i možda niže biljne vrste, razne gljive, pa čak i životinjske stanice, sugerira da prijenos T-DNA na primatelja možda nije problem. *Agrobacterium* može privremeno transformirati brojne vrste, uključujući agronomski važne vrste poput kukuruza (*Z. mays*) i soje (*G. max*), što sugerira da u mnogim slučajevima integracija T-DNA može ostati ograničavajući korak. Promjena uvjeta kulture tkiva, npr. upotrebom antioksidansa tijekom transformacije vinove loze (*V. vinifera*), riže (*O. sativa*), kukuruza (*Z. mays*) i soje (*G. max*), povećala je vjerojatnost stabilne transformacije tipova stanica koji se mogu obnoviti. Međutim, takve manipulacije u uvjetima pretvorbe mogu imati ograničenja. Infekcija biljnih tkiva agrobakterijom može rezultirati nekrozom biljnog tkiva (Gelvin, 2003).

Učinci na agroekosustave korištenjem transgenih sorti mogu biti izravni (prisutnost funkcionalnih egzogenih gena u biljki) ili neizravni (promjena u sustavu upravljanja proizvodnjom). Ovi učinci mogu se pojaviti u tlu i u zraku. Točnije, promjene se mogu dogoditi u poljoprivrednoj produktivnosti, ekologiji invazivnih biljaka pa čak i u trofičkom lancu (utječući na ne-ciljane organizme, poput grabežljivaca, prirodnih neprijatelja i fitofagnih vrsta). Uz to, geni mogu preći na divlje vrste i rekombinirati se s njima, a štetnici i korovi mogu postati rezistentni. U tlu može doći do promjene organske tvari, sastava eksudata korijena i dinamike mineralizacije kemijskih elemenata. Rizik protoka gena u prirodi nesumnjivo je jedan od zabrinjavajućih i najspornijih izravnih učinaka uzgoja transgenih biljaka. Razmatrajući mogućnost pojave vertikalnog transfera gena ili prijenosa gena s transgene sorte na druge ne-ciljane sorte istih vrsta, mora se uzeti u obzir da se uzgajane vrste klasificiraju u tri skupine prema njihovoj prirodnoj stopi samo-oprašivanja (alogamni, autogamni i srednji). Kada se raspravlja o horizontalnom transferu gena ili prijenosu gena s transgenih vrsta na druge botanički srodne vrste, mora se uzeti u obzir da je većina uzgajanih vrsta u svakoj zemlji uvedena i da stoga u blizini nema srodnih divljih vrsta s kojima mogu zamijeniti gene. Biološka sigurnost odnosi se na sprečavanje, minimiziranje i uklanjanje rizika svojstvenih istraživanju, proizvodnji, obrazovanju, tehnološkom razvoju i pružanju usluga povezanih s biotehnologijom, s ciljem očuvanja zdravlja živih bića i integriteta okoliša. Zatim se donose mjere za uklanjanje ili minimiziranje tog rizika. Za procjenu biološke sigurnosti, GM biljke uspoređuju se s konvencionalnim analogom koji ima povijest sigurne uporabe. Aspekti ove procjene uključuju molekularnu karakterizaciju transgena i stabilnost genetske modifikacije, dokaz da se nisu dogodile nenamjerne promjene na metaboličkoj razini (nutritivna ekvivalencija), te toksikološki i alergeni profili koji ukazuju da nema štetnih učinaka. Pored toga, moraju se proučiti potencijalni vertikalni i horizontalni transferi gena, kako bi se utvrdio mogući učinak na ne-ciljane organizme (životinje, mikroorganizmi, štetnici i ljudi), te analizirao rizik za okoliš (Zerbini i sur., 2014).

7. Zaključak

Brzi rast ljudske populacije nosi sa sobom trend za većom potražnjom hrane, energijom i gorivom, a biotehnologija pruža potencijalna uspješna rješenja. Biotehnologija se koristi kako bi se poboljšala poljoprivredna proizvodnja, uštedjelo vrijeme i novac, te zaštitio okoliš od zagađivača, kao što su pesticidi. Klasifikacija roda *Agrobacterium* ranije se zasnivala na patogenim karakteristikama. Međutim, novija istraživanja ukazuju na to da se ovaj rod sastoji od najmanje pet genetičkih i fenotipski različitih grupa. Taksonomija ovog roda još je uvijek u procesu revidiranja. Većina vrsta roda *Agrobacterium* sposobna je stvarati tumore na različitim biljkama domaćinima, a od biljaka koje se uzgajaju posebno su podložne zarazi višegodišnje voćne vrste, vinova loza (*V. vinifera*), te ukrasne vrste. Velik broj istraživanja koji obuhvaća temu patogenosti roda *Agrobacterium*, koristi kao primjer *A. tumefaciens*. Prilikom mehaničke ozljede biljke i ulaska patogena, biljka će koristiti razne obrambene mehanizme kako bi onemogućila daljnje širenje patogena. Jednom kada patogen integrira svoju T-DNA, dolazi do stvaranja profiliranog tkiva i pojave tumora. Većinom, bolest zahvaća podzemni dio biljke – korijen i korijenov vrat. Uslijed oboljenja dolazi do značajnih ekonomskih šteta, posebice u poljoprivrednoj proizvodnji. U slučaju infekcije sa *A. rhizogenes* koja posjeduje Ri plazmid umjesto Ti plazmida, dolazi do pojave bolesti „dlakavog korijena“. Pozitivan ishod određenih sojeva patogenih vrsta je biotehnološki važan jer se mogu koristiti za izradu biopesticida ili za konstrukciju vektora. Vektori dobiveni od bakterije *A. tumefaciens* sve su više zastupljeni na tržištu. Pomoću njih mogu se dobiti transgene (GM) biljke koje su rezistentne na štetočine, tolerantne na herbicide, te imaju poboljšani nutritivni sastav.

8. Literatura

1. Anand A., Bas S. H., Wu E., Wang N., McBride K. E., Annaluru N., Miller M., Hua M., Jones T. J. (2018). An improved ternary vector system for *Agrobacterium*-mediated rapid maize transformation. *Plant molecular biology*. 97(1): 187-200.
2. Arya A., Kumar A. (2018). *Agrobacterium Pathology and Ti Plasmid-based Vector Design*. Drawing Pin Publishing. https://www.researchgate.net/publication/324154694_Agrobacterium_Pathology_and_Ti_Plasmid_based_Vector_Design. Pristupljeno 15. travnja 2021.
3. Barcelos M. C., Lupki F. B., Campolina G. A., Nelson D. L., Molina G. (2018). The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. *FEMS microbiology letters*. 365 (21).
4. Basavand E., Charkhabi N. F., Khodaygan P., Rahimian H. (2021). *Agrobacterium pusense*, a new plant tumour-inducing pathogen isolated from Lawson cypress. *Forest Pathology*. 51(1).
5. Beljo J., Herceg N., Mandić A. (2015). *Biotehnologija i ekologija*. Mostariensia: journal of social sciences and humanities. 19 (1): 83 – 92.
6. Che P., Anand A., Wu E., Sander J. D., Simon M. K., Zhu W., Sigmund A. L., Zastrow-Hayes G., Miller M., Liu D., Lawit S. J., Zhao Z. Y., Albertsen M.C., Jones T. J. (2018). Developing a flexible, high-efficiency *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation system with broad application. *Plant biotechnology journal*. 16(7): 1388-1395.
7. Delamuta J. R. M., Scherer A. J., Ribeiro R. A., Hungria M. (2020). Genetic diversity of *Agrobacterium* species isolated from nodules of common bean and soybean in Brazil, Mexico, Ecuador and Mozambique, and description of the new species *Agrobacterium fabacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(7): 4233-4244.
8. Demchak K. (2017). *Raspberry Diseases - Crown Gall and Cane Gall*. PennState Extension. <https://extension.psu.edu/raspberry-diseases-crown-gall-and-cane-gall>. Pristupljeno 14. travnja 2021.
9. Escobar M. A., Dandekar A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in plant science*. 8(8): 380-386.
10. Farrand S. K., van Berkum P. B., Oger P. (2003). *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Journal of Medical Microbiology*. 53(5): 1681-1687.
11. Flores-Félix J. D., Menéndez E., Peix A., García-Fraile P., Velázquez E. (2020). History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Systematic and applied microbiology*. 43(1).
12. Gargiulo V., Garozzo D., Lanzetta R., Molinaro A., Sturiale L., De Castro C., Parrilli M. (2008). *Rhizobium rubiT*: A Gram-Negative Phytopathogenic Bacterium Expressing

- the Lewis B Epitope on the Outer Core of its Lipooligosaccharide Fraction. *ChemBioChem*. 9(11): 1830-1835.
13. Gelvin S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*. 67(1): 16-37.
 14. Ghasemi H. D., Navab F. K., Ghavidel R. A. (2015). Biotechnology in agriculture and its relationship to the principles of sustainable agriculture. In first national conference on modern achievements of biosciences and agriculture at Zabol University. <https://www.researchgate.net/publication/339433529> *Imperativeness of Agricultural Technology for Sustainable Crop Production Food Security and Public Health in Sub-Saharan Africa*. Pristupljeno 26. travnja 2021.
 15. Gleba Y. Y., Tusé D., Giritch A. (2013). Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Plant viral vectors*. 155-192.
 16. Gohlke J., Deeken R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*. 5: 155.
 17. Hao G., Burr T. J. (2006). Regulation of long-chain N-acyl-homoserine lactones in *Agrobacterium vitis*. *Journal of bacteriology*. 188(6): 2173-2183.
 18. Huang S. H., Vishwakarma R. K., Lee T. T., Chan H. S., Tsay H. S. (2014). Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. *Botanical Studies*. 55:17.
 19. Ibrahim M. A., Griko N., Junker M., Bulla L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis* – A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*. 1(1): 31-50.
 20. Kado C. I. (2014). Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Microbiology*. 5:340.
 21. Kawaguchi A., Inoue K. (2012). New Antagonistic Strains of Non-Pathogenic *Agrobacterium vitis* to Control Grapevine Crown Gall. *Journal of Phytopathology*. 160(10): 509-518.
 22. Kawaguchi A., Inoue K., Ichinose Y. (2008). Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, and Tomato by Nonpathogenic *Agrobacterium vitis* Strain VAR03-1. *Phytopathology*. 98(11): 1218-1225.
 23. Kawaguchi A., Inoue K., Nasu H. (2007). Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Journal of General Plant Pathology*. 73(2): 133-138.
 24. Krenek P., Samajova O., Luptovciak I., Daskocilova A., Komis G., Samaj J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*. 33(6): 1024-1042.

25. Lacroix B., Citovsky V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *International Journal of Developmental Biology*. 57: 467-481.
26. Lacroix B., Kozlovsky S. V., Citovsky V. (2008). Recent patents on *Agrobacterium*-mediated gene and protein transfer, for research and biotechnology. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)*. 2(2): 69-81.
27. Leppyanen I. V., Kirienko A. N., Dolgikh E. A. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*—mediated transformation of *Pisum sativum* L. roots as a tool for studying the mycorrhizal and root nodule symbioses. *PeerJ*. 7.
28. Musavi S. A., Österman J., Wahlberg N., Neseme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., Lindström K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and applied microbiology*. 37(3): 208-215.
29. Nora L. C., Westmann C. A., Martins-Santana L., Alves L. D. F., Monteiro L. M. O., Guazzaroni M. E., Silva-Rocha R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial biotechnology*. 12(1): 125-147.
30. Păcurar D. I., Thordal-Christensen H., Păcurar M. L., Pamfil D., Botez C., Bellini C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76(2): 76-81.
31. Pitzschke A. (2013). *Agrobacterium* infection and plant defense-transformation success hangs by a thread. *Frontiers in plant science*. 4: 519.
32. Potvliege C., Vanhuynegem L., Hansen W. (1989). Catheter infection caused by an unusual pathogen, *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of clinical microbiology*. 27(9): 2120-2122.
33. Raio A., Peluso R., Puopolo G., Zoina A. (2009). Evidence of pAgK84 transfer from *Agrobacterium rhizogenes* K84 to natural pathogenic *Agrobacterium* spp. in an Italian peach nursery. *Plant pathology*. 58(4): 745-753.
34. Rhouma A., Boubaker A., Hafsa M., Ferchichi A. (2004). Efficacy of the Non-Pathogenic" *Agrobacterium*" Strains K84 and K1026 against Crown Gall in Tunisia. Efficacy of the Non-Pathogenic" *Agrobacterium*" Strains K84 and K1026 against Crown Gall in Tunisia. 1000-1010.
35. Ron M., Kajala K., Pauluzzi G., Wang D., Reynoso M. A., Zumstein K., Garcha J., Winte S., Masson H., Inagaki S., Federici F., Sinha N., Deal R. B., Bailey-Serres J., Brady S. M. (2014). Hairy Root Transformation Using *Agrobacterium rhizogenes* as a Tool for Exploring Cell Type-Specific Gene Expression and Function Using Tomato as a Model. *Plant Physiology*. 166: 455-469.
36. Singh R. K., Prasad M. (2016). Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of graminaceous crops. *Protoplasma*. 253(3): 691-707.

37. Singh R. S., Jha V. K., Chattopadhyay T., Kumar U., Fulzele D. P., Singh P. K. (2020). First Report of *Agrobacterium rhizogenes*-induced Hairy Root Formation in *Selaginella bryopteris*: a Pteridophyte Recalcitrant to Genetic Transformation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 63.
38. Spelberg J. H. L., Rink R., Kellogg R. M., Janssen D. B. (1998). Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. *Tetrahedron: Asymmetry*. 9(3): 459-466.
39. Stockwell V. O., Moore L. W., Loper J. E. (1993). Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(7): 2112-2120.
40. Tolba I. H., Zaki M. F. (2011). Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Annals of Agricultural Science*. 56(2): 113-119.
41. Tzfira T., Citovsky V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 17(2): 147-154.
42. Villadsen J. (2007). Innovative technology to meet the demands of the white biotechnology revolution of chemical production. *Chem Eng Sci*. 62: 6957–6968.
43. WGU: Western Governors University. (2018). Medical biotechnology: advancements and ethics. <https://www.wgu.edu/blog/medical-biotechnology-advancements-ethics1811.html#close>. Pristupljeno 16. travnja 2021.
44. White F. F., Nester E. W. (1980). Hairy Root: Plasmid Encodes Virulence TrqKts in *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*. 141 (3): 1134-1141.
45. Whitford R., Gilbert M., Langridge P. (2010). Biotechnology in agriculture. *Climate change & crop production*. (1): 219-244.
46. Wiecezorek A. (2003). Use of Biotechnology in Agriculture – Benefits and Risks.
47. Wu D., Li A., Ma F., Yang J., Xie Y. (2016). Genetic control and regulatory mechanisms of succinoglycan and curdlan biosynthesis in genus *Agrobacterium*. *Applied microbiology and biotechnology*. 100(14): 6183-6192.
48. Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*—a reply to Farrand et al. (2003). *Journal of Medical Microbiology*. 53(5): 1689-1695.
49. Young J. M., Pennycook S. R., Watson D. R. W. (2006). Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 491–493.
50. Zahradník J., Nunvar J., Pařízková H., Kolářová L., Palyzová A., Marešová H., Grulich M., Kyslíková E., Kyslík P. (2018). *Agrobacterium bohemicum* sp. nov. isolated from poppy seed wastes in central Bohemia. *Systematic and applied microbiology*. 41(3): 184-190.

51. Zerbini F. M., da Silva F. N., Patricia G., Urquiza C., Basso M. F. (2014). Transgenic Plants. *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. 1: 179-199.
52. Zhang L., Li X., Zhang F., Wang G. (2014). Genomic analysis of *Agrobacterium radiobacter* DSM 30147^T and emended description of *A. radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Conn 1942 (Approved Lists 1980) emend. Sawada et al. 1993. *Standards in Genomic Sciences*. 9: 574-584.

Životopis

Viktorija Kočmar rođena je 02. kolovoza 1997. godine u Koprivnici. Pohađala je gimnaziju Fran Galović u Koprivnici od 2012. do 2016. godine. Po završetku srednje škole upisuje preddiplomski studij Agroekologija na Agronomskom fakultetu u Zagrebu kojeg završava 2019. godine. Iste godine upisuje diplomski studij Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi, također na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Od stranih jezika razumije, govori i piše engleski i talijanski (B2 razina). U slobodno vrijeme voli čitati, učiti strane jezike, te volontirati u sklopu Unesco programa.