

# Transgenní rostliny Biotechnologie

---

*úvod*  
*metody*

# Biotechnologie - přístup k přírodě

**biotechnologie** = metoda využívající ve prospěch člověka různé organismy a současně pozměňuje jejich vlastnosti tak, aby byly co nejlépe využitelné

- **kvašení** - snahy konzervovat rychle se kazící potraviny a krmiva
  - kvašení mléka - sýry, kefír, kumys, jogurty
  - víno, pivo - bible, Egypt
  - boza - kvašené proso (Balkán, Orient)
  - saké - japonský nápoj z kvašené rýže
  - pombe - africký nápoj z kvašeného tropického ovoce
  - kvašené zelí
  - siláže
- **výroba enzymů** - praní, příprava ovocných šťáv, výroba škrobu...
- **farmaceutický průmysl**
- **bioremediace** - biologické čištění vody, odstraňování ropných produktů z půdy...

# Cíle moderních biotechnologií

- zvýšení **výnosů** plodin, produkce dobytka i ryb
- zvýšení **nutriční hodnoty**, snížení ztrát produkce
- zlepšení chuti, kvality a trvanlivosti potravin
- **omezení** používání pesticidů a chemických látek (hnojiva, postřiky)
- získání organismů **přežívající za stresových podmínek**
- získání **obnovitelných a ekologických zdrojů** pro výrobu
- **produkování léčiv** ekonomicky a bezpečně + vakcíny
- vyvinutí nových způsobů **čištění vod a půd**
- **příprava enzymů** nových vlastností - snížení energetické náročnosti výroby a ekologických rizik

# Definice podle protokolu o biodiverzitě

- **LMO = living modified organism**  
organismus se změněnou genetickou informací,  
kterou je schopen předávat do další generace  
(polyploidizace, konjugace, transdukce)
- **GMO = genetically modified organism**  
získaný zavedením cizorodé DNA (metody  
rekombinantní DNA)



genové nebo genetické inženýrství

# „Klasické“ a „moderní“ biotechnologie

## klasické šlechtění LMO

- přirozené mutace a jejich křížení
- indukované mutace  
ozařování UV nebo ionizující záření  
chemomutageneze

vysoké výtěžky antibiotik, produkce enzymů,  
sladovnický ječmen

**Nevýhoda** - metody jsou „slepé“ = vyvolává se poškození a následně se čeká, zda náhodou nevznikne výhodná změna. Navíc nevíme, kolik genů se změnilo a jak.

# Příklady kultivarů produkovaných mutačním šlechtěním

Plodina	Kultivar	Metoda indukce mutace
rýže	Calrose 76	gama záření
pšenice	Above	azid sodný
	Lewis	neutrony
oves	Alamo-X	X-paprsky
grapefruit	Rio Red	neutrony
	Star Ruby	neutrony
<i>Cynodon dactylon</i> troskut prstnatý	Tifeagle	gama záření
	Tifgreen II	gama záření
	Tift 94	gama záření
	Tifway II	gama záření
salát	Ice Cube	ethyl methan sulfonát (EMS)
	Mini-Green	ethyl methan sulfonát
<i>Phaseolus vulgaris</i> fazol obecný	Seafarer	X-paprsky
	Seaway	X-paprsky
šeřík	Prairie Petite	neutrony

# „Klasické“ a „moderní“ biotechnologie

- **moderní biotechnologie** - umožňují cílený postup = vnášení pouze žádaného genu beze změny ostatních genů  **GMO**
- je možný přesun vlastností mezi organismy, které se jinak nemohou ani potkat
- **mohou ale existovat i nechtěné následky**



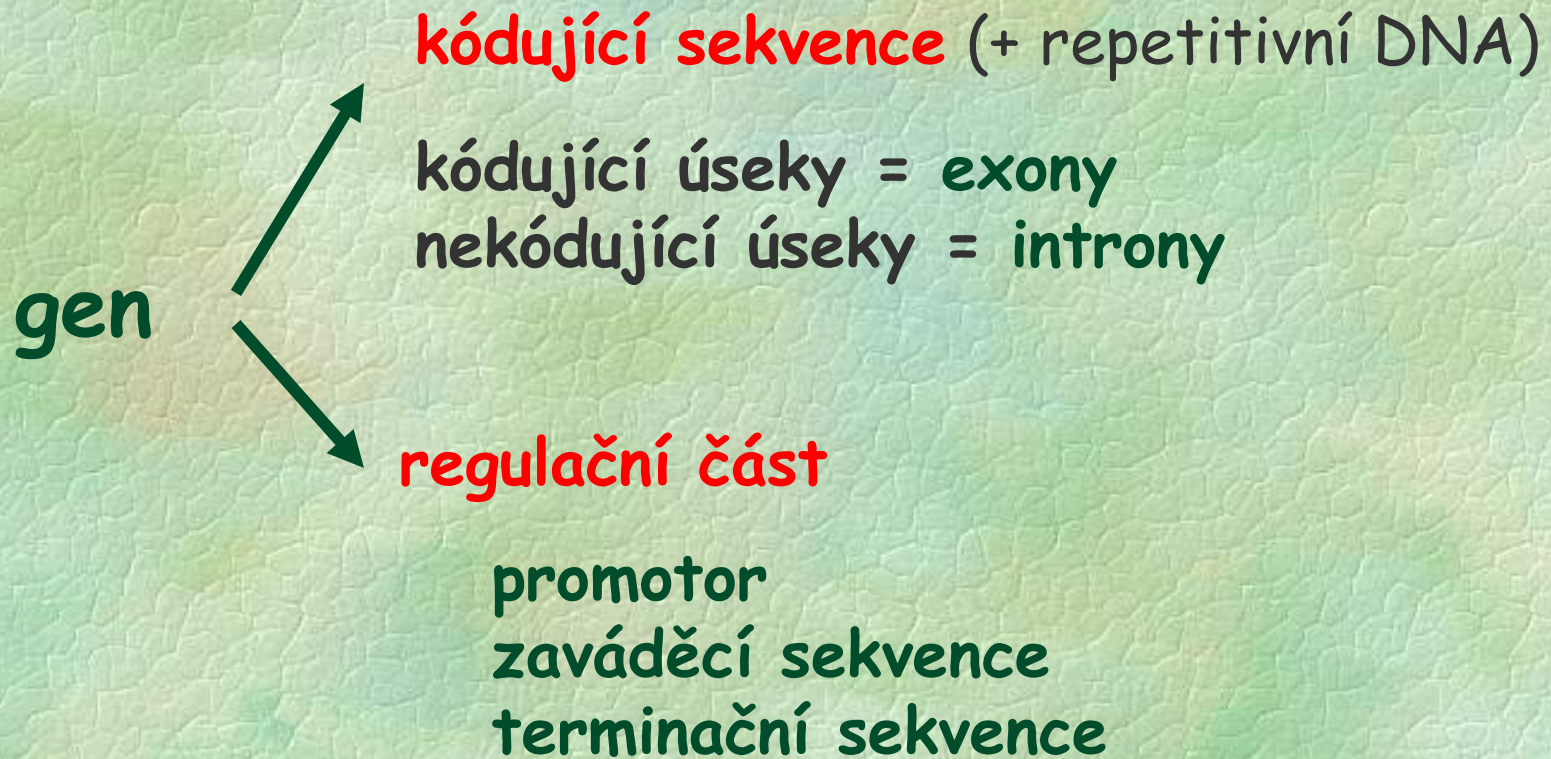
**požadavek regulace a správného zacházení**

*Danaus plexippus*, danao stěhovavý  
„Monarch“ imago a housenka



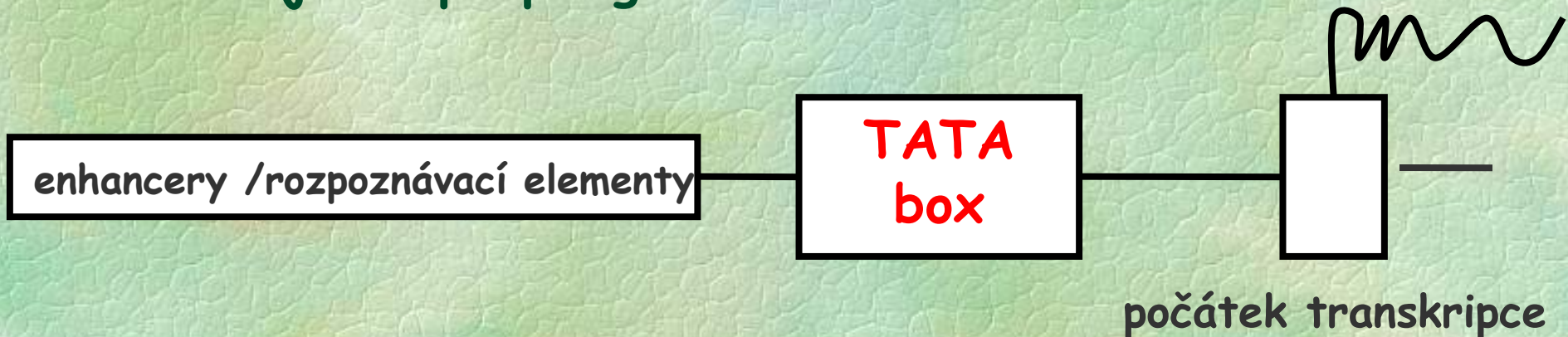


# Charakteristika rostlinných genů



# Promotor

sekvence DNA - schopnost vázat RNA-polymerázu  
= zahajovat přepis genu



sekvence promotoru se netranskribuje, ale rozhoduje o tom kdy, kde a s jakou intenzitou se bude gen transkribovat

## Zaváděcí sekvence

počáteční úsek mRNA, na níž se uchycují ribosomy a postupují „naprázdno“ až k prvnímu iniciačnímu kodonu

rozhoduje o stupni afinity ribosomů, tedy o intenzitě translace

## Počátek translace

první triplet ATG, rozhoduje o účinnosti translace

**Exony a introny** počátek a konec intronu GT-AC

**Polyadenylační a terminační signál**

AATAAA

Ondřej 1992

# Obecné schéma transformace

- příprava rekombinantní DNA (konstrukt)
- vnesení DNA do rostlinné buňky
- test exprese vnesených genů
- demonstrace stabilní integrace DNA do rostlinného genomu

# Metody transformace (vnášení DNA)

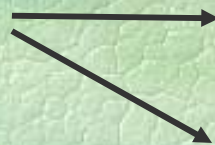
přímé

lipozómy uzavírající DNA  
elektroporace  
mikroinjekce DNA do jádra  
bombardování mikroprojektily  
vakuová infiltrace

nepřímé - pomocí vektorů

*Agrobacterium* (plazmidy)  
rostlinné viry  
modifikovaný bakteriofág  $\Lambda$

plazmidy



intermediární

binární

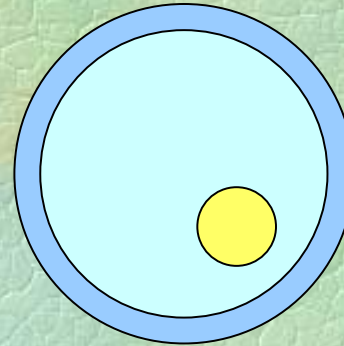
# Transformace pomocí liposomů

liposom + DNA

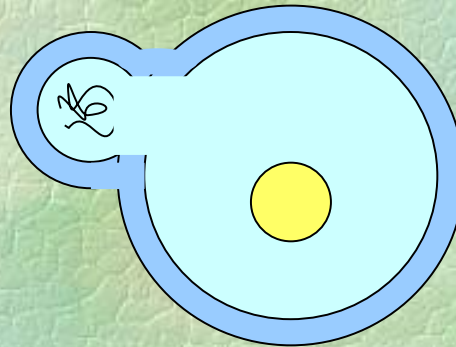
1.



protoplast



2.

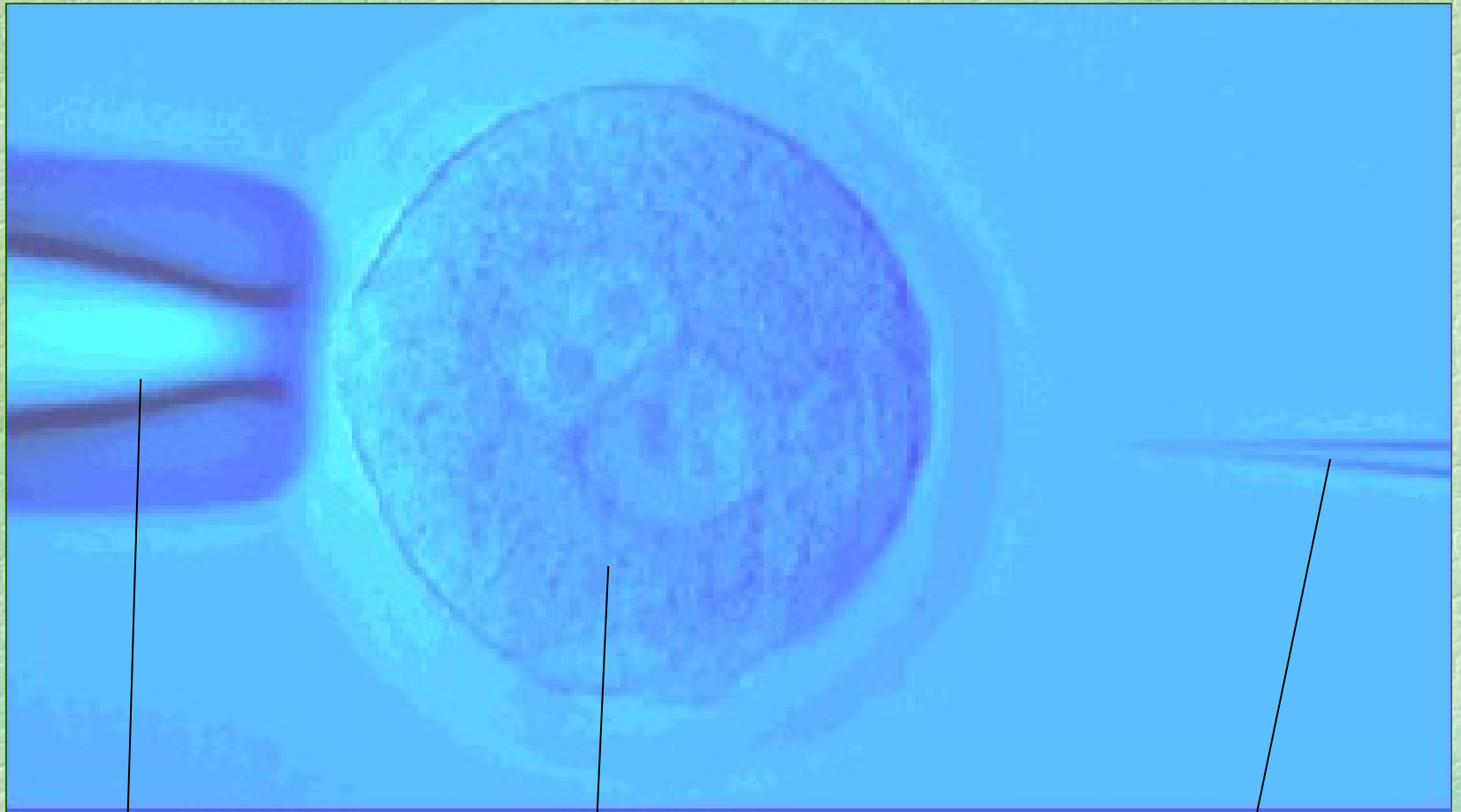


# Elektroporace

- vyžaduje použití protoplastů (bakterií, kvasinek)
- DNA proniká do buněk po vytvoření dočasných mikropórů v plasmatické membráně vlivem působení el. pulsů



# Mikroinjekce DNA do jádra protoplastu



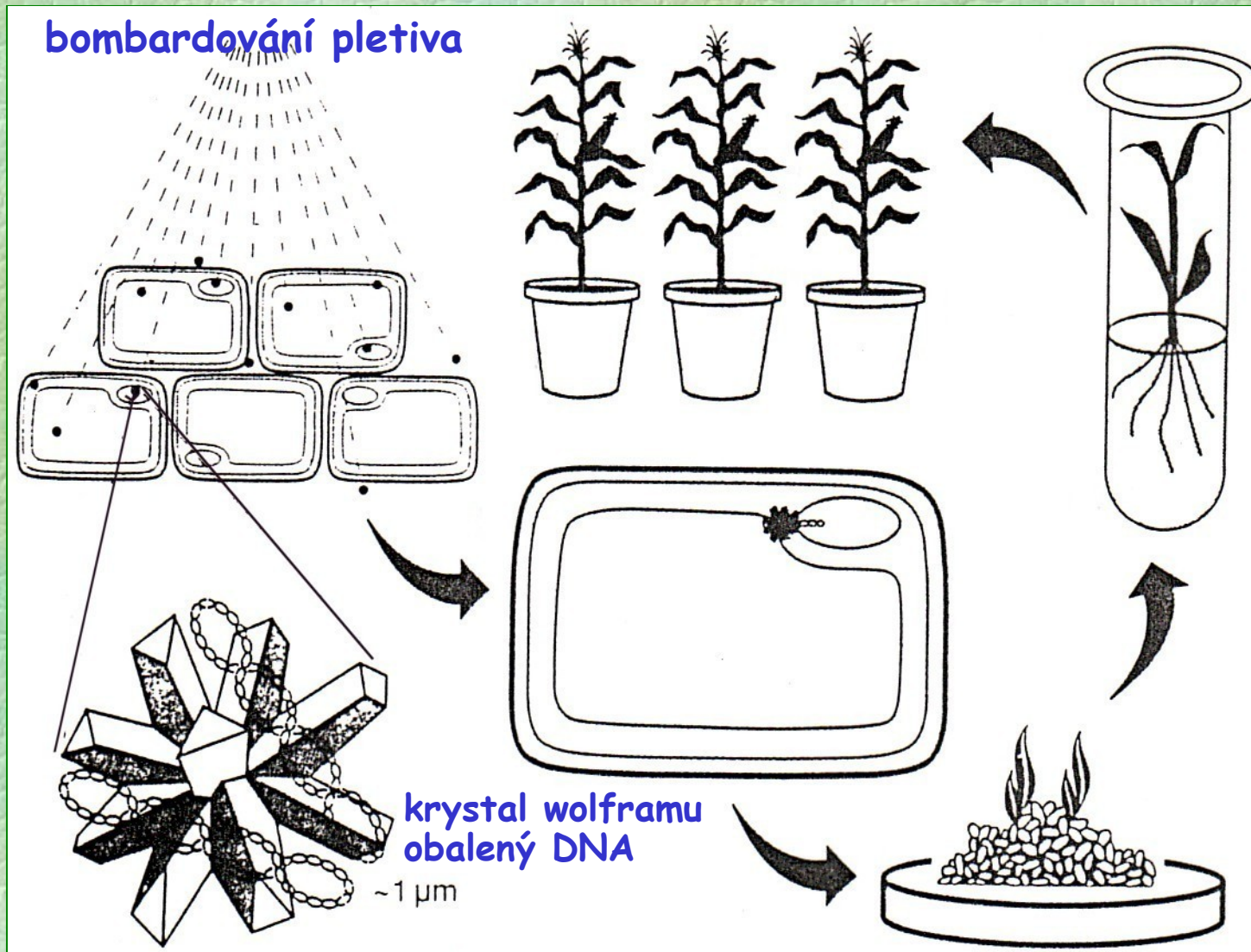
pipeta  
držící  
protoplast

protoplast

špička mikropipety  
s DNA



# Princip biolistické metody



# Zařízení pro biolistické metody



# Biolistická metoda: pro transformace pletiv trav - GUS marker



jednoděložné rostliny  
jsou resistantní vůči  
infekci *Agrobacterium*

exprese aktivity  
enzymu glukuronidázy  
po bombardování kalusu  
*Brachypodium*  
partikule Au 0,5 mm

využití kalusové kultury pro transformace

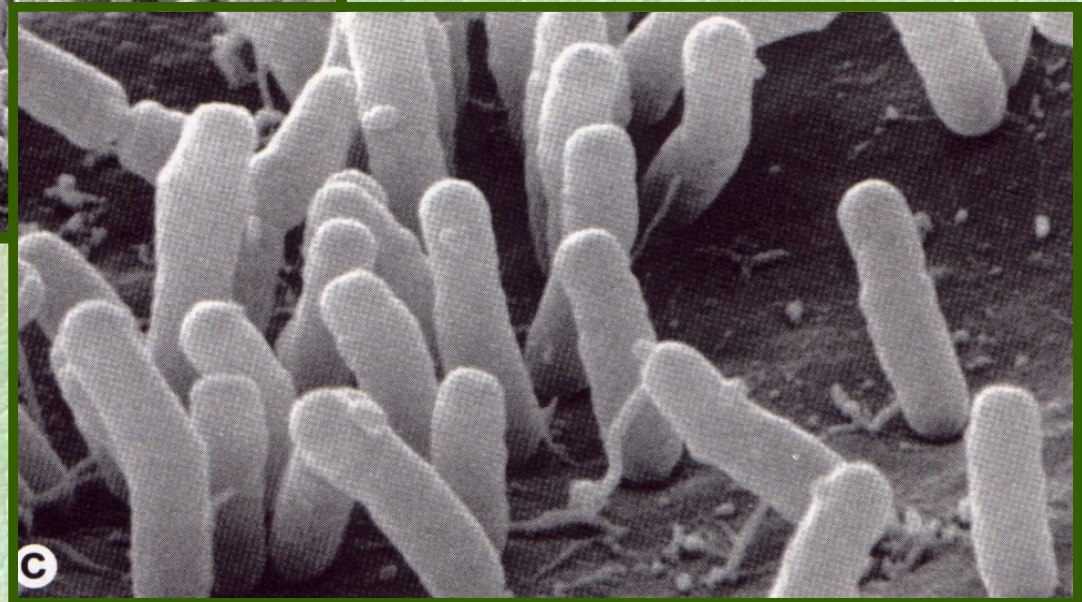
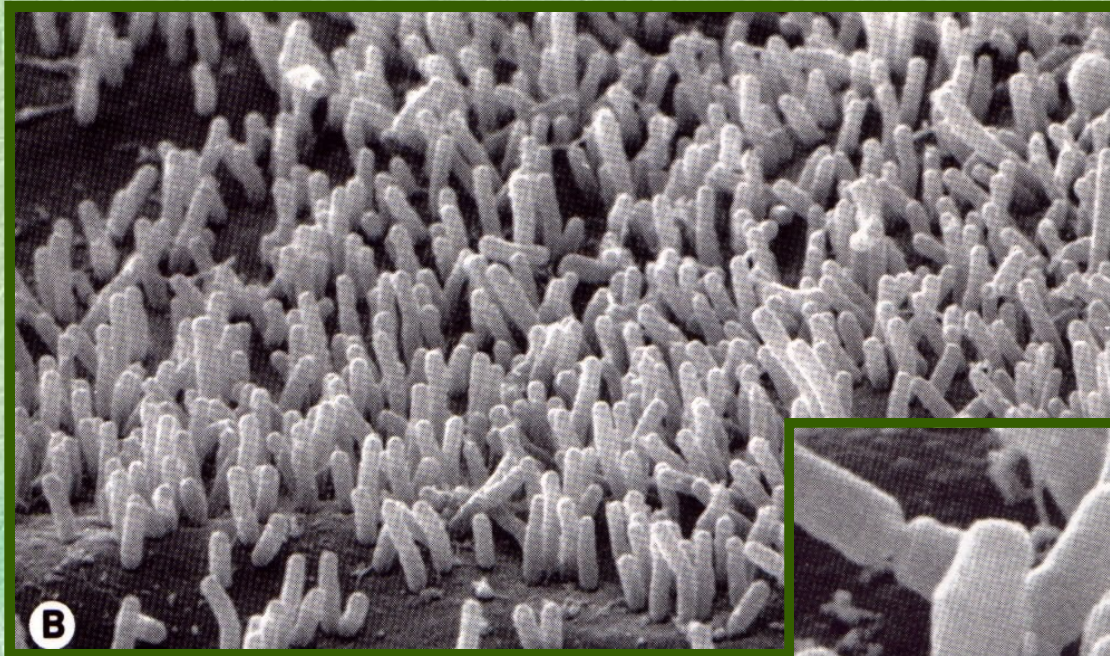
<http://www.aber.ac.uk/plantpathol/brachytransform.htm>

# Nádor „Crown gall“



vytvořený po infekci *Agrobacterium tumefaciens*

# *Agrobacterium tumefaciens*



# Vektory: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*

Půdní bakterie: *Pseudomonas*, *Corynebacterium*  
*Agrobacterium*, *Rhizobium*

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	nádory	Ti plasmid	T-DNA
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	kořínky	Ri plasmid	

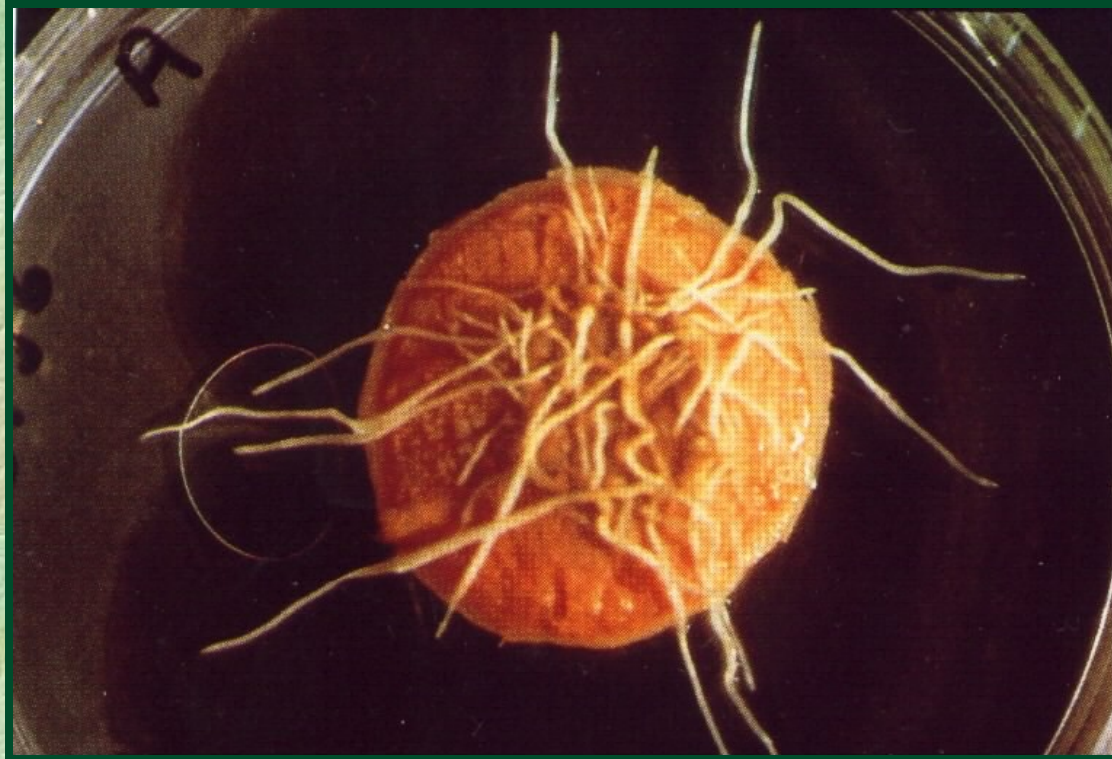
T-DNA (transferred) Ti plasmidu

1. geny pro biosyntézu **auxinů a cytokininů** = dediferenciace buněk a vznik nádorů („crown gall“)

2. geny pro syntézu nádorově specifických látek, tzv. **opinů** (bazické aminokyseliny - oktopin, nopalin, manopin) = zdroj dusíku, uhlíku a energie pro bakterie

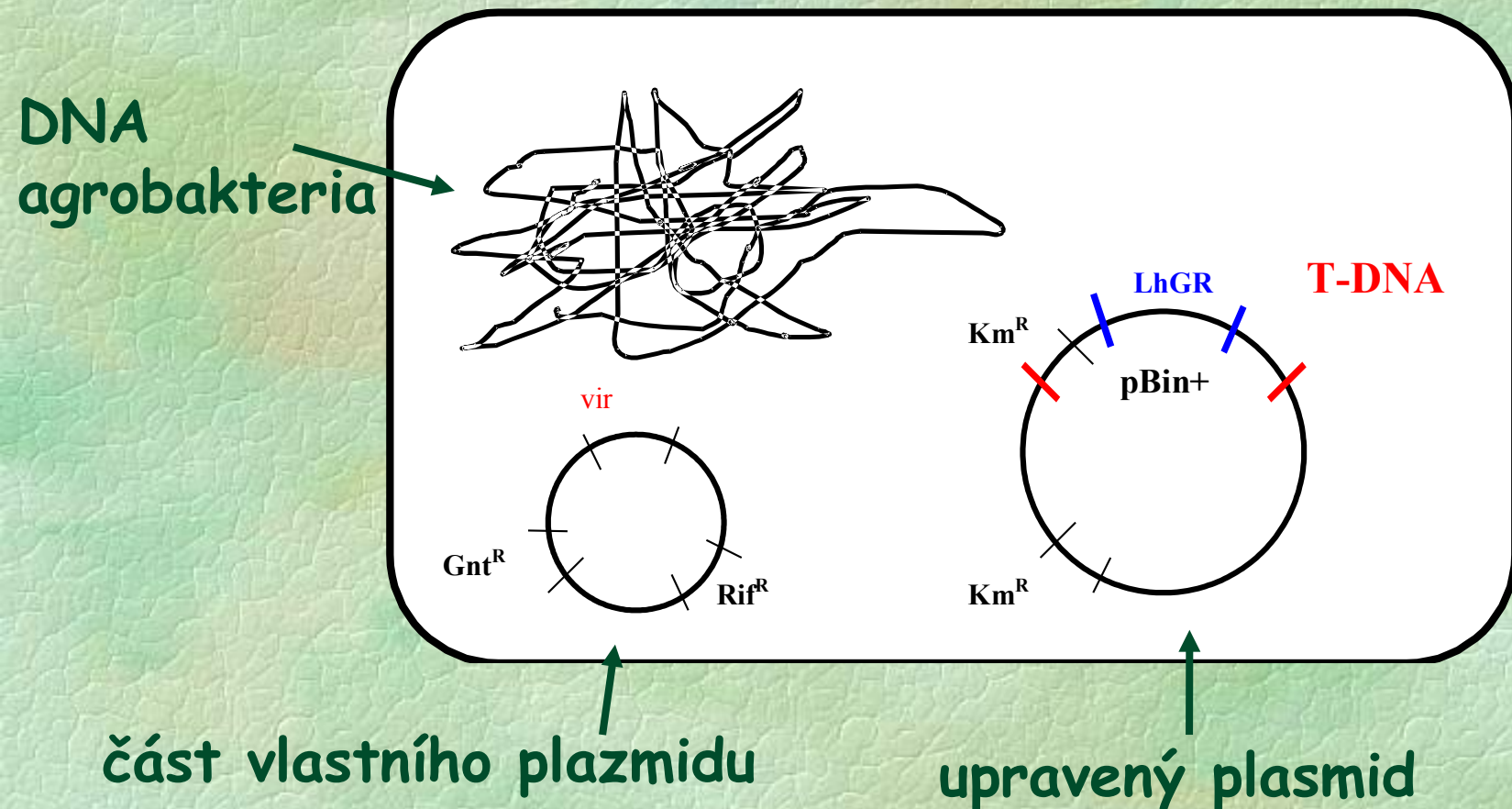
odzbrojené vektory - původní geny odstraněny

# *Agrobacterium rhizogenes*



indukce tvorby kořenů na segmentu kořene mrkve  
po infekci bakteriemi

# *Agrobacterium tumefaciens* upravený binární vektor LhGR





# Selekční a signální markery

1. rezistence vůči  
**antibiotikům**

kanamycin  
hygromycin  
gentamycin

**cytostatikům (antimetabolika)**

methotrexat

**herbicidům**

Round-up, Basta

2. *iudA* → glukuronidáza - **GUS** - histochemická detekce

3. *luc* → **luciferáza** (z mořského planktonu *Photinus pyralis*, katalyzuje ATP dependentní oxidativní dekarboxylaci substrátu = luciferin - za produkce světelné emise 562 nm)

4. **GFP** („green fluorescent protein“ gen z medúzy *Aequorea victoria*) - detekce fluorescenčním mikroskopem

# Antibiotika

## využití pro selekci transgenních organismů

látky produkované různými druhy mikroorganismů, které potlačují růst jiných mikroorganismů (-statika), eventuálně je ničí (-cidy)

dnes termín rozšířen i na syntetické sloučeniny s podobným účinkem nebo chemicky modifikované látky produkované mikroorganismy

# Klasifikace antibiotik

1. inhibitory syntézy bakteriální buněčné stěny
2. antibiotika ovlivňující permeabilitu membrán
3. bakteriostatické inhibitory syntézy proteinů
4. baktericidní inhibitory syntézy proteinů

# 1. inhibitory syntézy bakteriální buněčné stěny

## Peniciliny

Amoxycillin  
Amoxycillin-klavunolát K  
Ampicilillin  
Carbenicillin  
Penicillin G  
Penicillin V  
Ticarcillin-klavunolát K

## Cephalosporiny

Cefalexin  
Cefotaxim

Kyselina klavunolová = specifický inhibitor  $\beta$ -laktamázy

## 2. Antibiotika ovlivňující permeabilitu membrány

### antibakteriální

Gramicidine  
Polymixin B

### antifungální

Amphotericin  
Nystatin

## 3. Bakteriostatické inhibitory proteosyntézy

### reversibilní inhibice

Chloramphenicol  
Doxycycline  
Erythromycin  
Tetracycline  
Oxyteracycline

## 4. Baktericidní inhibitory proteosyntézy

### aminoglykosidy

Gentamycin  
Hygromycin B  
Kanamycin  
Neomycin  
Streptomycin

### inhibitory metabolismu NK

Rifampicine  
Kyselina nalidixová

### antimetaboly

Methotrexat  
Nitrofurantoin

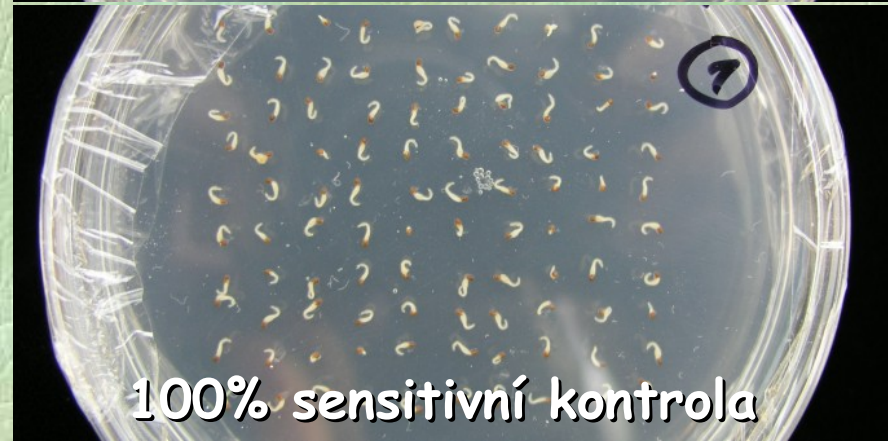
### analogy NK

5-florouracil

# *In vitro* selekce rezistentních rostlin

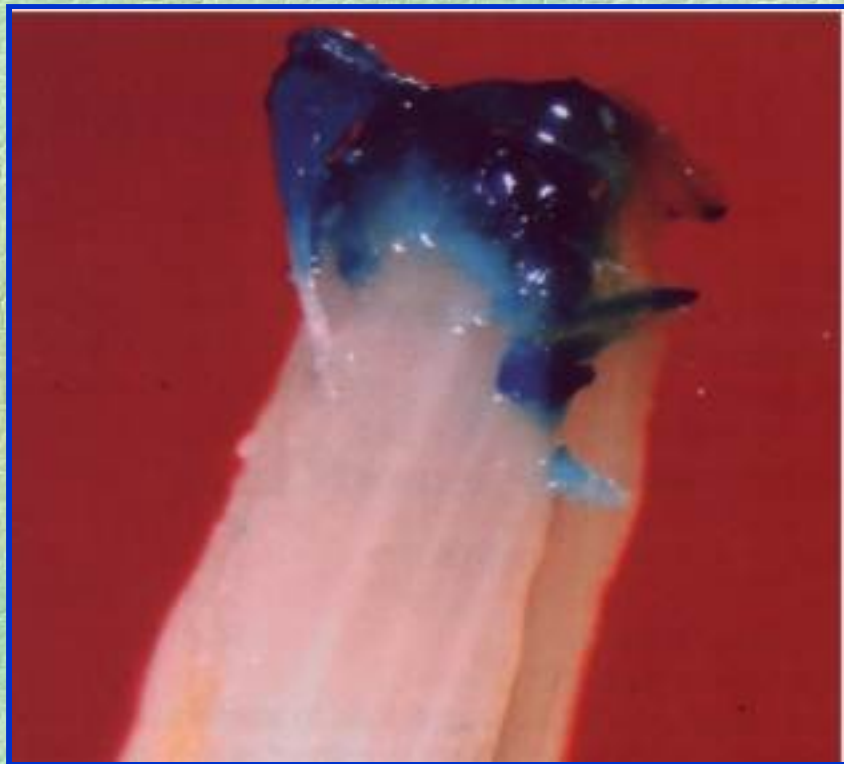
Selekce transgenních rostlin tabáku, které mají jako selekční marker myší gen *dhfr* pro dihydrofolátreduktázu rezistentní vůči methotrexátu (**MTX**)

M-S médium s přidavkem MTX

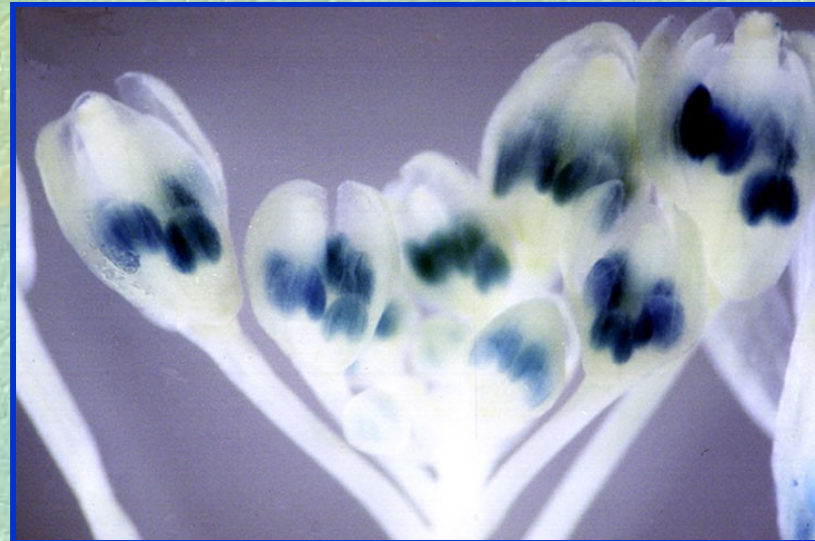


# Indigogenní metoda detekce glukuronidázy

apex karafiátu



*Arabidopsis*

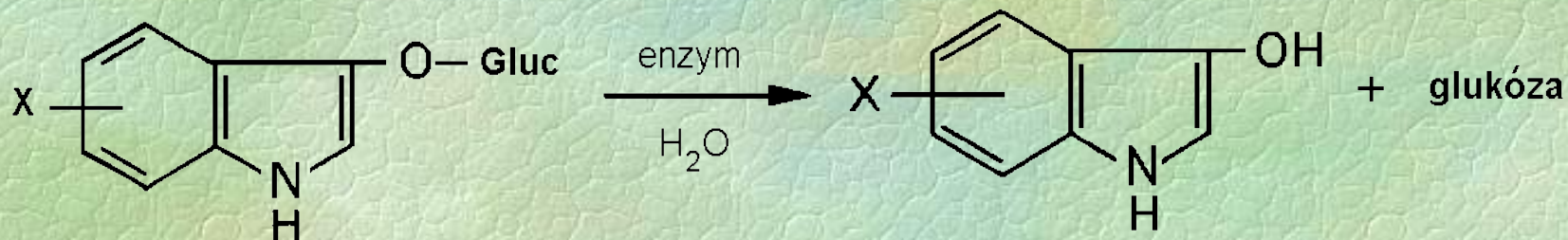


substrát =  
5-Br-4-Cl-3-indolyl- $\beta$ -D-  
glukuronid (X-gluc)



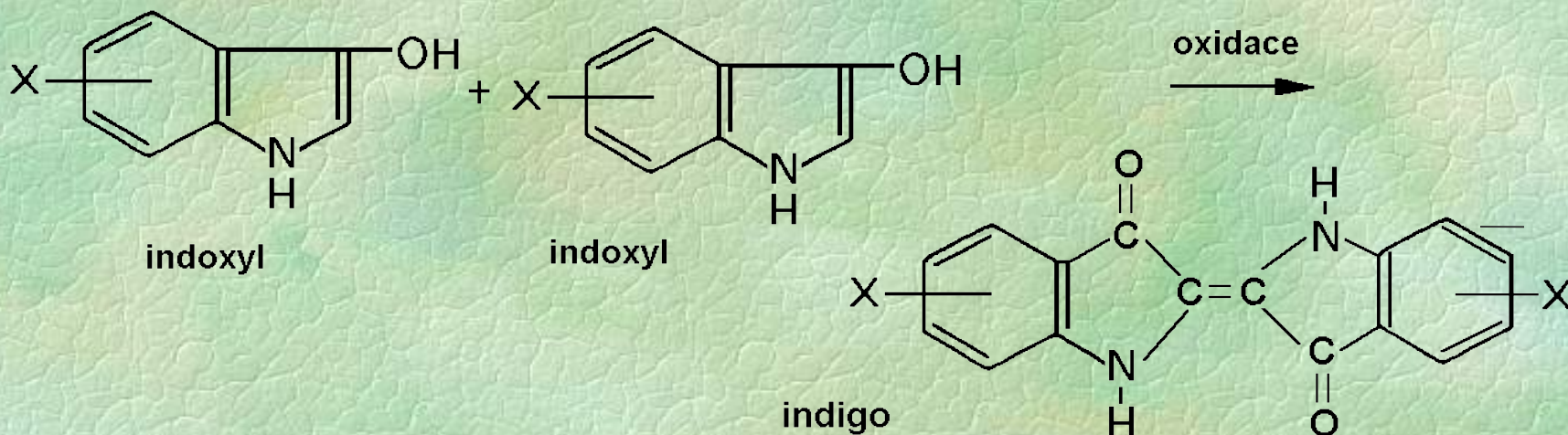
# Indigogenní metoda detekce aktivity glukosidasy

## 1. Primární reakce - štěpení substrátu enzymem



X = Br, Cl

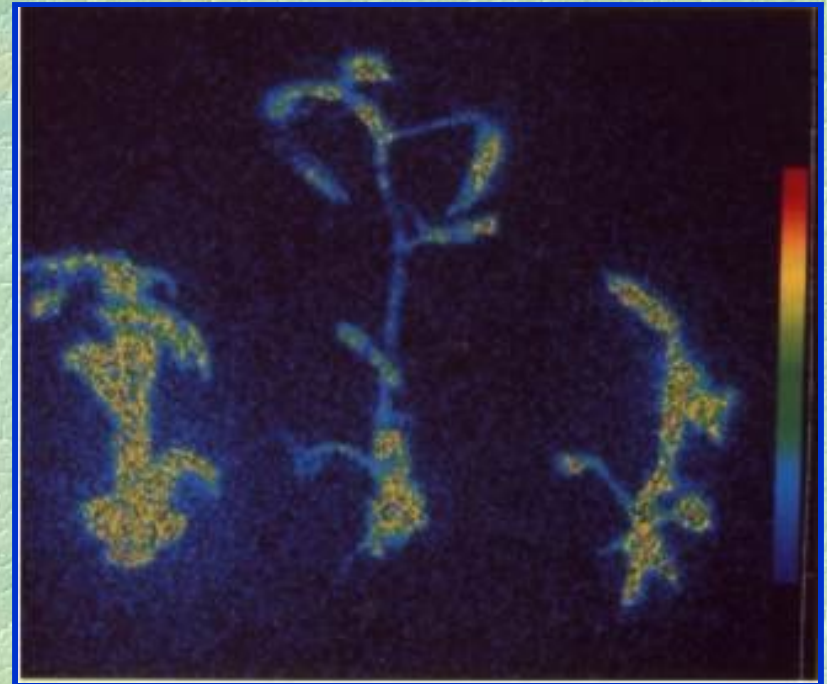
## 2. Sekundární reakce - tvorba indiga



# Transformované rostlinky kasavy regenerované z embryogenní kultury, signální gen = luciferáza



rostlinky



vizualizace luciferázy - postříkáno luciferinem a měřeno luminometrem

# *Aequorea victoria*

In *Aequorea victoria* a protein called aequorin releases blue light upon binding with calcium. This blue light is then totally absorbed by the GFP, which in turn gives off the green light

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>

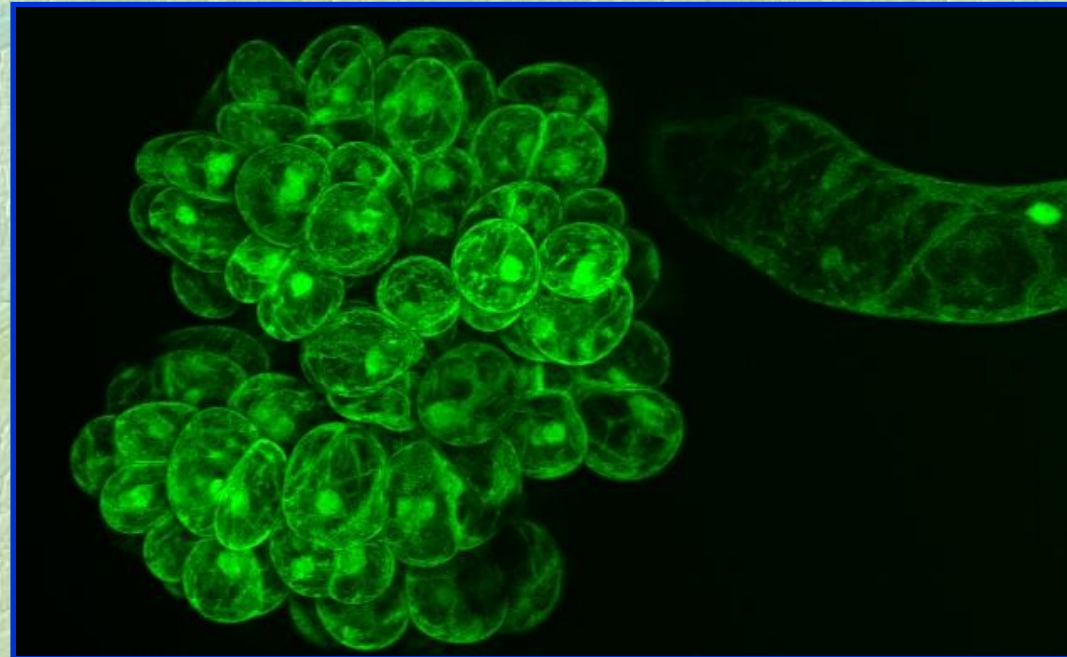


Green Fluorescent Protein (GFP) has existed for more than one hundred and sixty million years in one species of jellyfish, *Aequorea victoria*. The protein is found in **the photoorgans of *Aequorea***, see picture below right. GFP is not responsible for the glow often seen in pictures of jellyfish - that "fluorescence" is actually due reflection of the flash used to photograph the jellies.

# GFP jako marker

**Osamu Shimomura** byl první, kdo izoloval GFP z medúzy („jellyfish“) *Victoria aequorea*

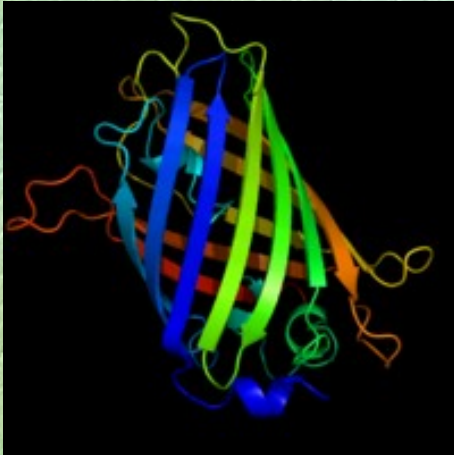
a zjistil, která část GFP je zodpovědná za jeho fluorescenci.



Green Fluorescent Protein  
v buňkách tabáku

konfokální obraz

# GFP



**excitace**

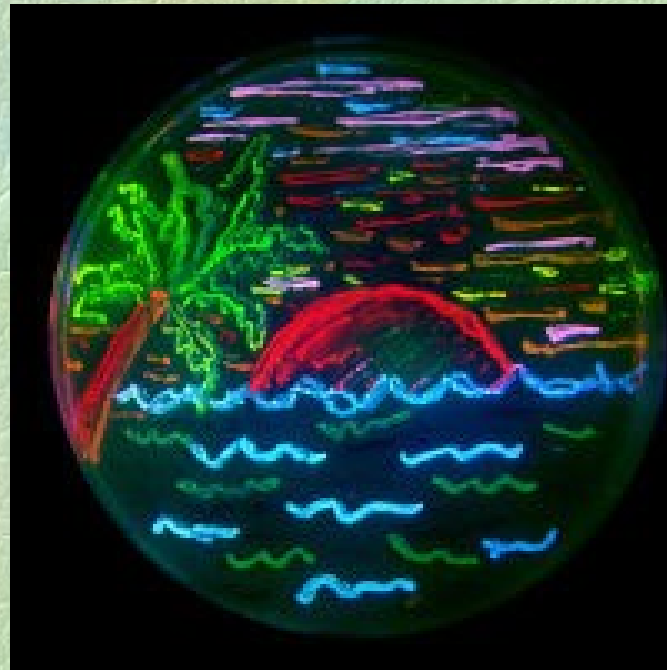
při vlnové délce 395 nm

a **emise**

při 509 nm

v zelené části  
viditelného spektra

Many other mutations have been made, including color mutants; in particular **blue fluorescent protein** (EBFP, EBFP2, Azurite, mKalama1), **cyan fluorescent protein** (ECFP, Cerulean, CyPet) and **yellow fluorescent protein** derivatives (YFP, Citrine, Venus, YPet).



The diversity of **GFP genetic mutations** is illustrated by this San Diego beach scene drawn with living bacteria expressing 8 different colors of fluorescent proteins.

# Agrobacterium - média pro kultivaci

## LK médium (Langley et Kado)

sacharóza	10 g
kaseinhydrolyzát	8 g
kvasničný extrakt	4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4$	0,3 g
destil. $\text{H}_2\text{O}$	do 1000 ml
agar	13 g

## LB BROTH High Salt (DUCHEFA)

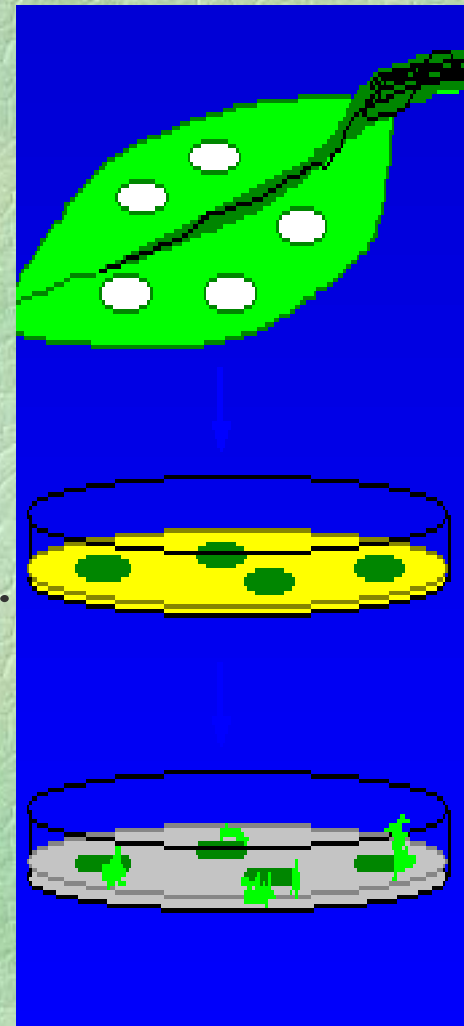
25 g do 1000 ml destil.  $\text{H}_2\text{O}$

### složení:

trypton	10 g
(kaseinhydrolyzát)	
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
agar	15 g

# Postup transformace - disková metoda

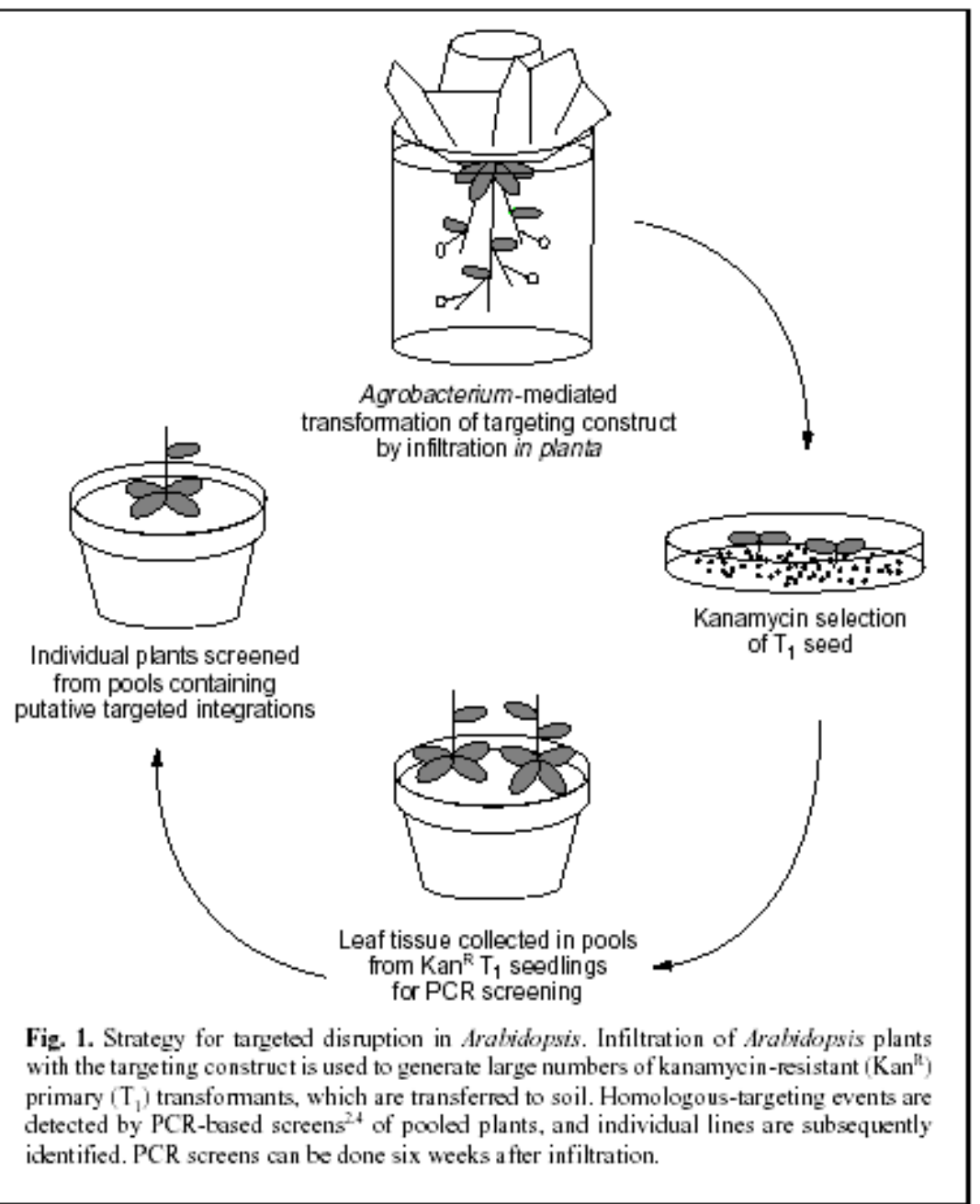
1. příprava kultury agrobakteria - křížový roztěr na LB médium s antibiotiky, ztužené agarem
2. příprava listových segmentů - předkultivace na MSH - s auxinem a cytokininem + agar (2 - 3 dny v kultiv. místnosti)
3. příprava suspenze agrobaktéria pro kokultivaci (LB médium)
4. kokultivace listových segmentů v suspenzi - 1 min.
5. osušení segmentů a přenos na povrch MSS média - inokulace svrchní stranou dolů
6. pravidelná pasáž na médium MSSa ( s antibiotiky) regenerace transgenních kalusů a rostlinek
7. indukce zakořeňování regenerovaných prýtů MSRa



## Transformace *Arabidopsis* vakuovou infiltrací



Sarah J. Liljegren and  
Martin F. Yanofsky\*  
Dept of Biology, Center  
for Molecular Genetics,  
University of California at  
San Diego, La Jolla,  
CA 92093-0116, USA



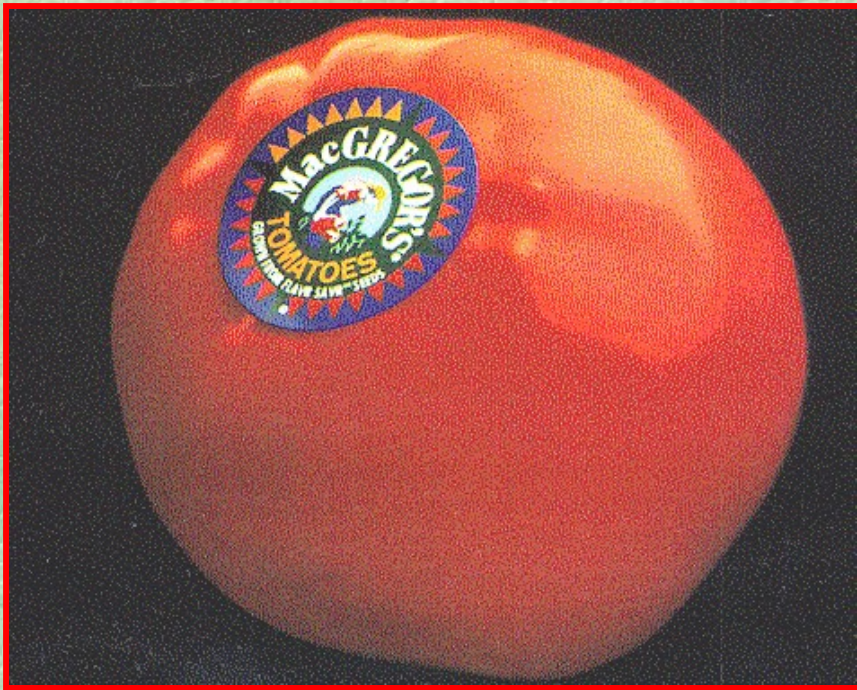


# Komerční využití GM rostlin

je doposud omezeno:

- nedostatečnou znalostí kontroly exprese genů
- nedostatečnou vzájemných interakcí genů a regulací jednotlivých metabolických cest v rámci celé rostliny
- málo účinnými protokoly regenerace rostlin *in vitro*
- vysokými náklady na technologii genetické transformace rostlin
- obavami veřejnosti

# První povolená transgenní plodina



The **Flavr Savr** tomato was the first commercially grown genetically engineered food to be granted a license for human consumption. It was produced by the Californian company Calgene, and submitted to the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 1992.

It was first sold in **1994**, and was only available for a few years before production ceased.

# Komerční využití GMO

1994 první povolená GM zelenina - **rajčata Flavr-Savr** s přidaným antisense genem, který interferuje s produkcí enzymu polygalakturonasy (RNA interference). Tento enzym je zodpovědný za měknutí buněčné stěny při dozrávání plodů (= zpomalené dozrávání a dlouhodobá trvanlivost v obchodě)

1996 první komerční osivo GM kukuřice v USA s rezistencí vůči zavíječi kukuřičnému

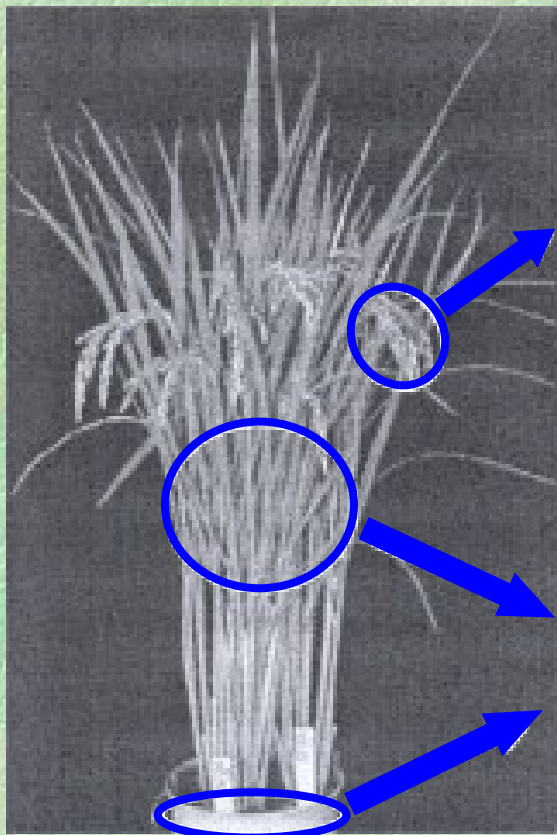
2000 **Walmsley a Arntzen** - vakcína proti průjmovému onemocnění (diarrhoea) v GM plodech banánů

2001 **Potrykus** - GM „zlatá rýže“ s vyšší schopností akumulovat  $\beta$ -karoten a železo

# Transgenní plodiny

- geneticky manipulované hospodářské a průmyslové plodiny kukuřice, pšenice, řepka, cukrovka, slunečnice, brambory, soja a bavlna mají **zvýšený výnos** a **jsou rezistentní** proti některým herbicidům a škůdcům
- transgenní „ zlatá rýže “ nese gen kukuřice pro tvorbu  **$\beta$ -karotenu** (provitamin A) a má **zvýšený obsah železa** v přijatelné formě

# Zlatá rýže



nese gen kukuřice pro tvorbu  $\beta$ -karotenu (provitamin A) a gen pro feritin

zrno má vyšší obsah  $\beta$ -karotenu a zvýšený obsah železa v přijatelné formě

konstitutivní ukládání železa do stébel

zvýšený příjem železa kořeny

**pěstování zlaté rýže má ohromný význam pro zlepšení výživy, především u obyvatel Asie**

# Komerčně úspěšné GM plodiny

- **Zlatá rýže** se komerčně pěstuje v jihovýchodní Asii a významně přispívá k zlepšení zdravotního stavu populace v rozvojových zemích
- V roce **2001** pěstovaly USA 68% světové výroby GM plodin, Argentina 22%, Kanada 6% a Čína 3%
- Transgenní plodiny jsou důvodem dlouholetého sporu mezi EU a USA. Modifikované kukuřici, řepce a soji s rezistencí proti herbicidu Round-up (glyphosate) spotřebitelé v EU stále nedůvěřují.

# Komerčně úspěšné GM dřeviny a okrasné rostliny

- *Populus nigra* transformovaný genem CryAC (bakteriální toxin *Bacillus thuringiensis*) účinný proti housenkám motýlů (*Lepidoptera*).
- Čína komerčně vysazuje a pěstuje porosty *Populus nigra* a *Pinus nigra* pro průmysl papírenský a textilní.
- růže a karafiáty serie Moon, s modifikovanou vůní, firmy Suntory Ltd. (Japonsko) a Florigene Ltd. (Austrálie) jsou pěstovány v jižní Americe a prodávány v Evropě, USA, Kanadě, Japonsku, Austrálii.
- transgenní modrá růže firmy Suntory byla získána přenosem genů pro tvorbu modrého barviva *delfinidinu*.

# Trendy výzkumu GM okrasných rostlin a lesních dřevin

## okrasné rostliny

- **oddálení stárnutí květů:** změna biosyntézy etylénu
- **změny barvy květu:** manipulace s geny pro biosyntézu antokyanů
- **změny vůně:** manipulace s geny kodující S-linalolsyntázu
- **modifikace rezistence** vůči patogenům a herbicidům

## lesní dřeviny

- **modifikace obsahu** celulózy, snížení obsahu ligninu a změna jeho struktury - využití v papírenském průmyslu
- **rezistence** proti fytopatogenním houbám (manipulace s geny kódujícími peptidy) a škůdcům
- **rezistence** proti herbicidu Buster - méně pracné pěstování



# Doporučené adresy

postup transformace v krocích a obrazech

<http://ceprap.ucdavis.edu/Transformation/transform11.htm>

transformace sóje

<http://www.cropsoil.uga.edu/soy-engineering/Transformation.html>

transformace sóje

<http://www.oardc.ohio-state.edu/plantranslab/>

<http://www.biotrin.cz/>

GM potraviny

<http://www.csa.com/discoveryguides/gmfood/overview.php>