

Transformace rostlin

úvod
metody

Biotechnologie

metody využívající různé organismy ve prospěch člověka a současně
pozměňující jejich vlastnosti tak, aby byly co nejlépe využitelné

výrobní postupy:

- získávání potravy
- chemický průmysl
 - výroba enzymů - praní, příprava ovocných šťáv, výroba škrobu...
- farmaceutický průmysl
- výroba oděvů
- biologické čištění vody, **bioremediace** - ropné produkty, PAH v půdě

Biotechnologie - kvašení

konzervace rychle se kazících potravin a krmiv

➔ kvašení:

- kvašení mléka - sýry, kefír, kumys, jogurty
- kvašení cukerných roztoků - víno, pivo (bible, Egypt)
- kvašené proso - boza (Balkán, Orient)
- kvašená rýže - saké (Japonsko)
- kvašené tropické ovoce - pombe (africký nápoj)
- kvašené zelí
- siláže

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

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
	Mini-Green	ethyl methan sulfonát
common bean	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 s **GMO**

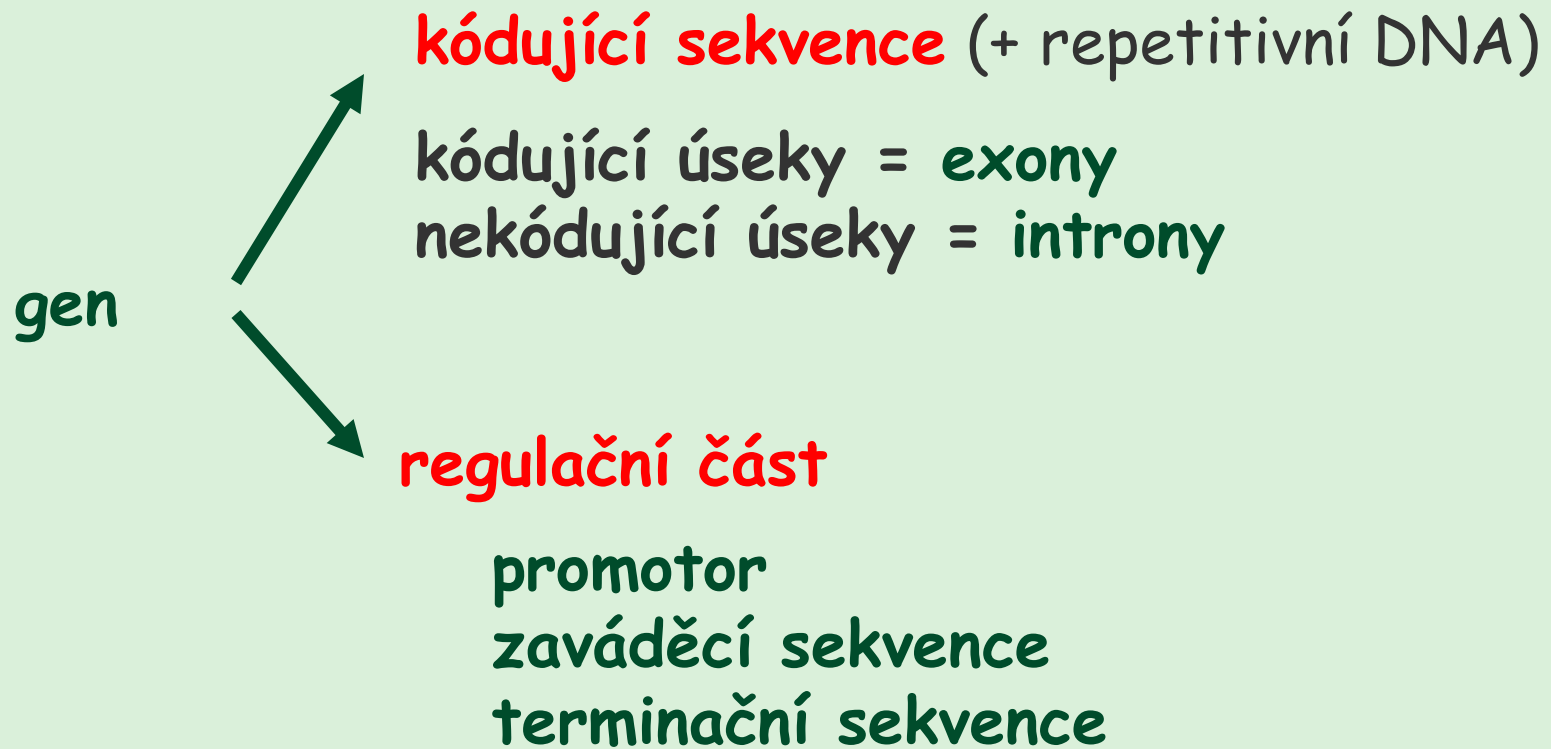
Cíle moderních biotechnologií

- 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)
- získat organismy přežívající za **stresových** podmínek
- získat **obnovitelné a ekologické** zdroje pro výrobu
- produkovat léčiva + vakcíny **ekonomicky a bezpečně**
- vyvinout nové způsoby **čištění vod a půd**
- připravit enzymy nových vlastností - **snížení energetické náročnosti výroby a ekologických rizik**

Obecné schéma transformace

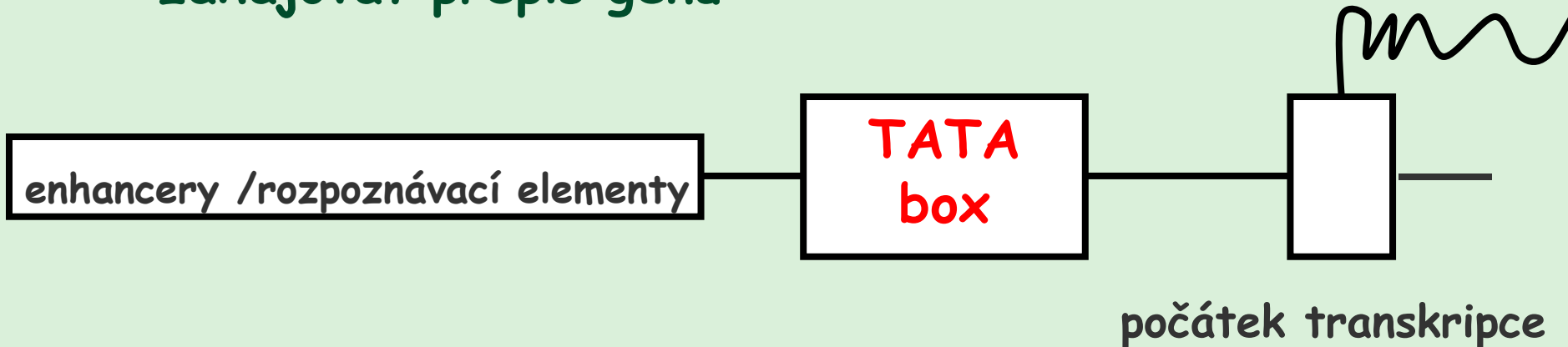
- příprava rekombinantní DNA (konstrukt)
- vnesení DNA do rostlinné buňky (přímo nebo pomocí vektorů)
- test exprese vnesených genů
- demonstrace stabilní integrace DNA do rostlinného genomu

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 ribozómy a postupují „naprázdno“ až k prvnímu iniciačnímu kodonu
rozhoduje o stupni afinity ribozómů, 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

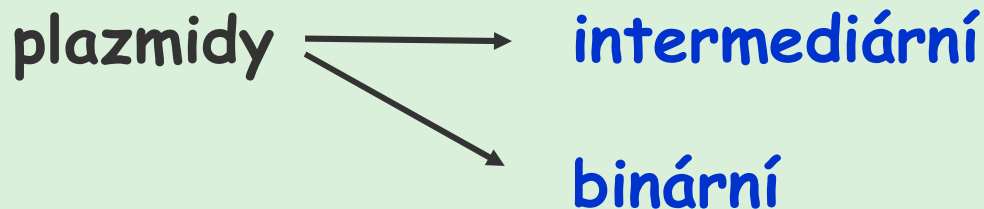
Metody transformace (vnášení DNA)

přímé

lipozómy uzavírající DNA
elektroporace
mikroinjekce DNA do jádra
bombardování mikroprojektily
vakuová infiltrace
s použitím nanovláken

nepřímé - pomocí vektorů

plazmidy *Agrobacterium*
rostlinné viry
modifikovaný bakteriofág λ



Agrobacterium tumefaciens, A. rhizogenes

Půdní bakterie: *Pseudomonas, Corynebacterium*
Agrobacterium, Rhizobium

Agrobacterium tumefaciens
Agrobacterium rhizogenes

nádory
kořínky

Ti plasmid
Ri plasmid

T-DNA

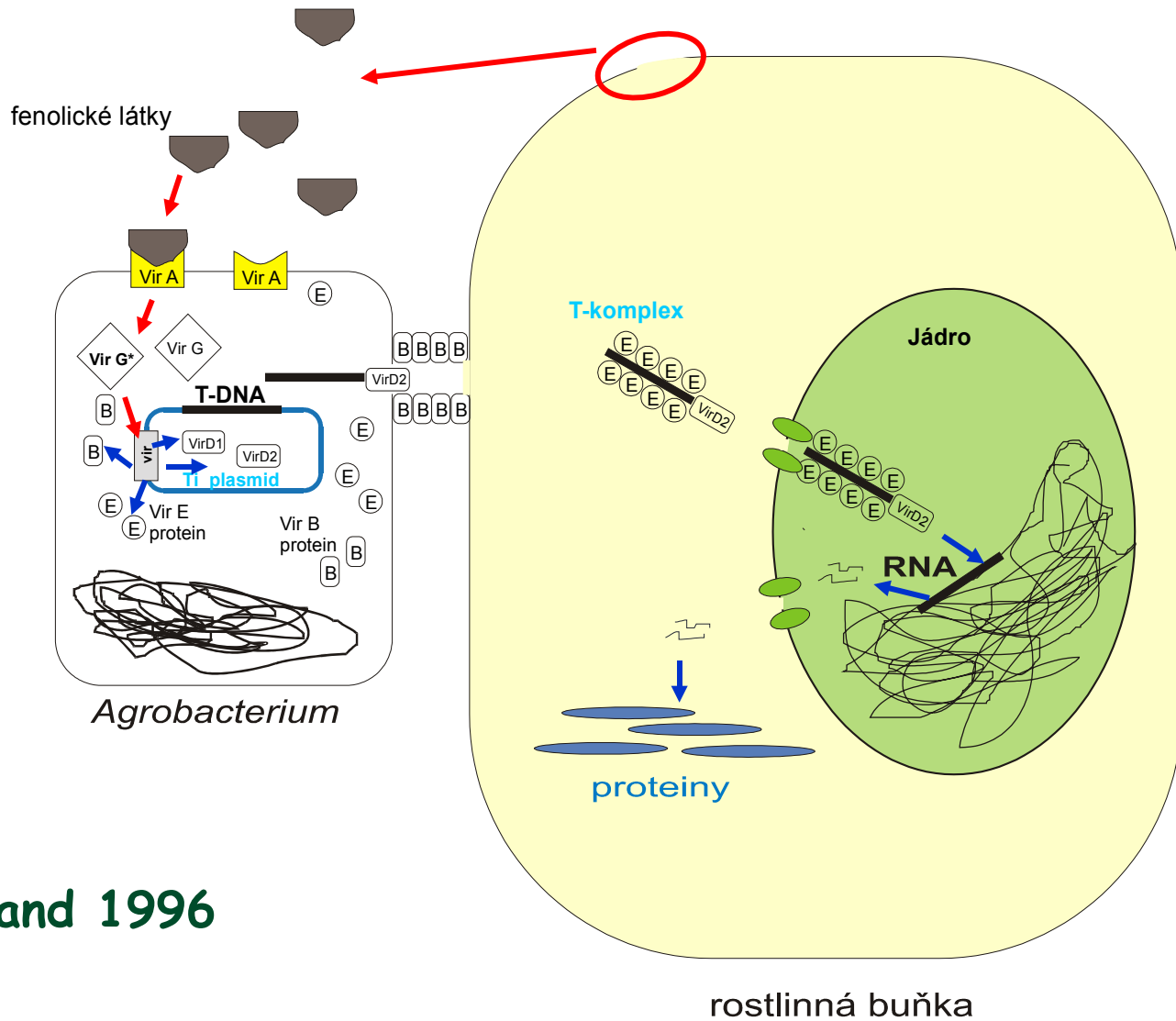
T-DNA Ti plasmidu (WT)

1. geny pro biosyntézu auxinů (*iaaM*, *iaaH*) a cytokininů (*ipt*) =
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

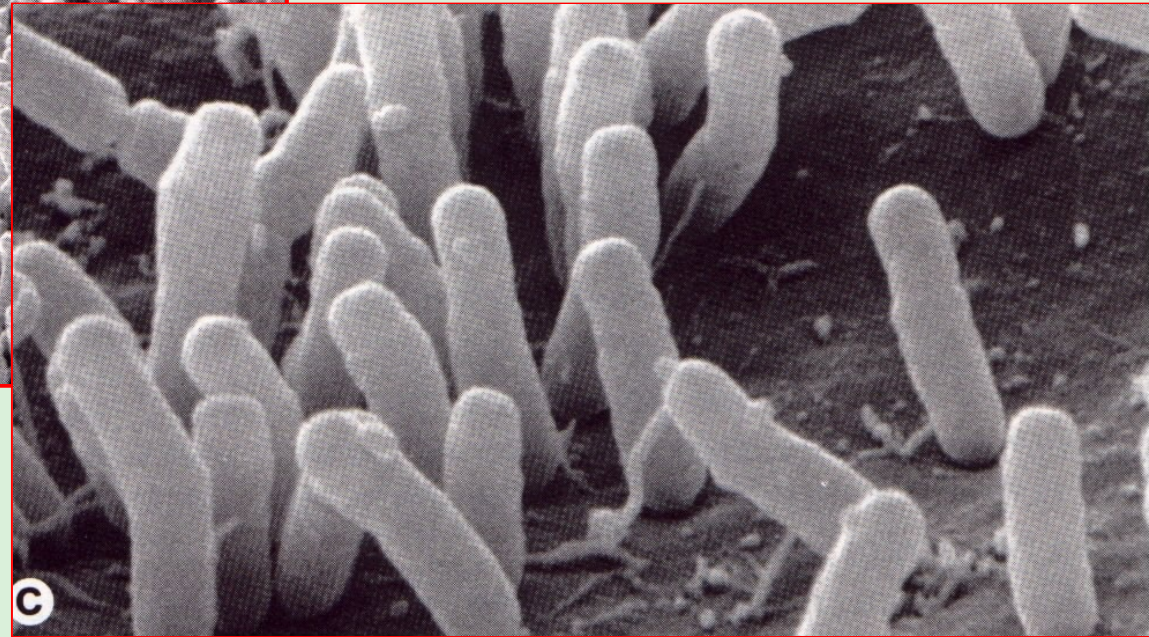
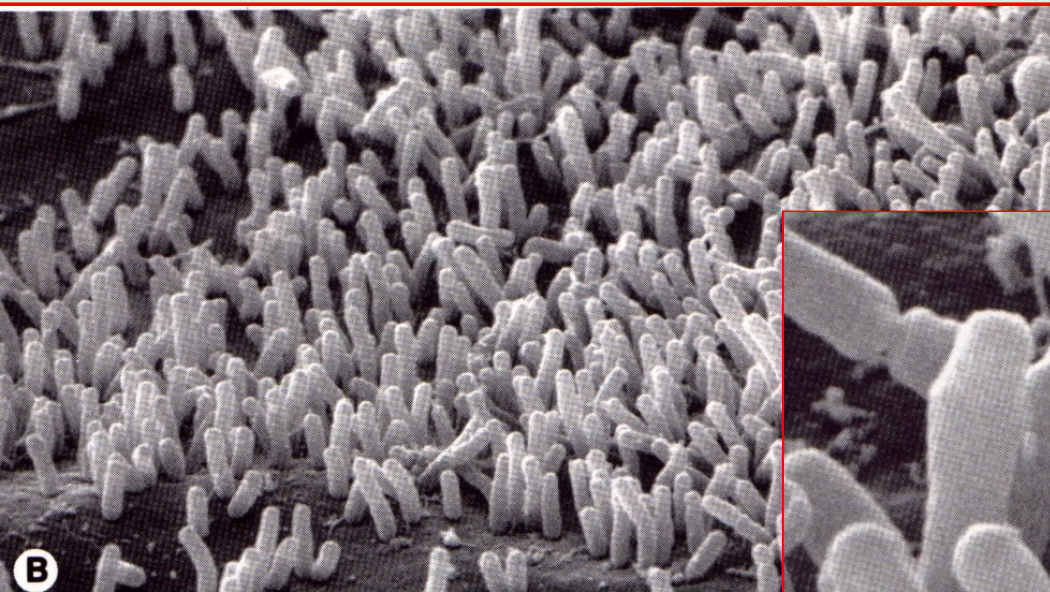
Mechanismus přenosu T-DNA intermediární vektor



Tinland 1996

Agrobacterium tumefaciens

Nestlé Research News



adheze buněk agrobakteria na povrchu rostlinné buňky

„Crown gall“

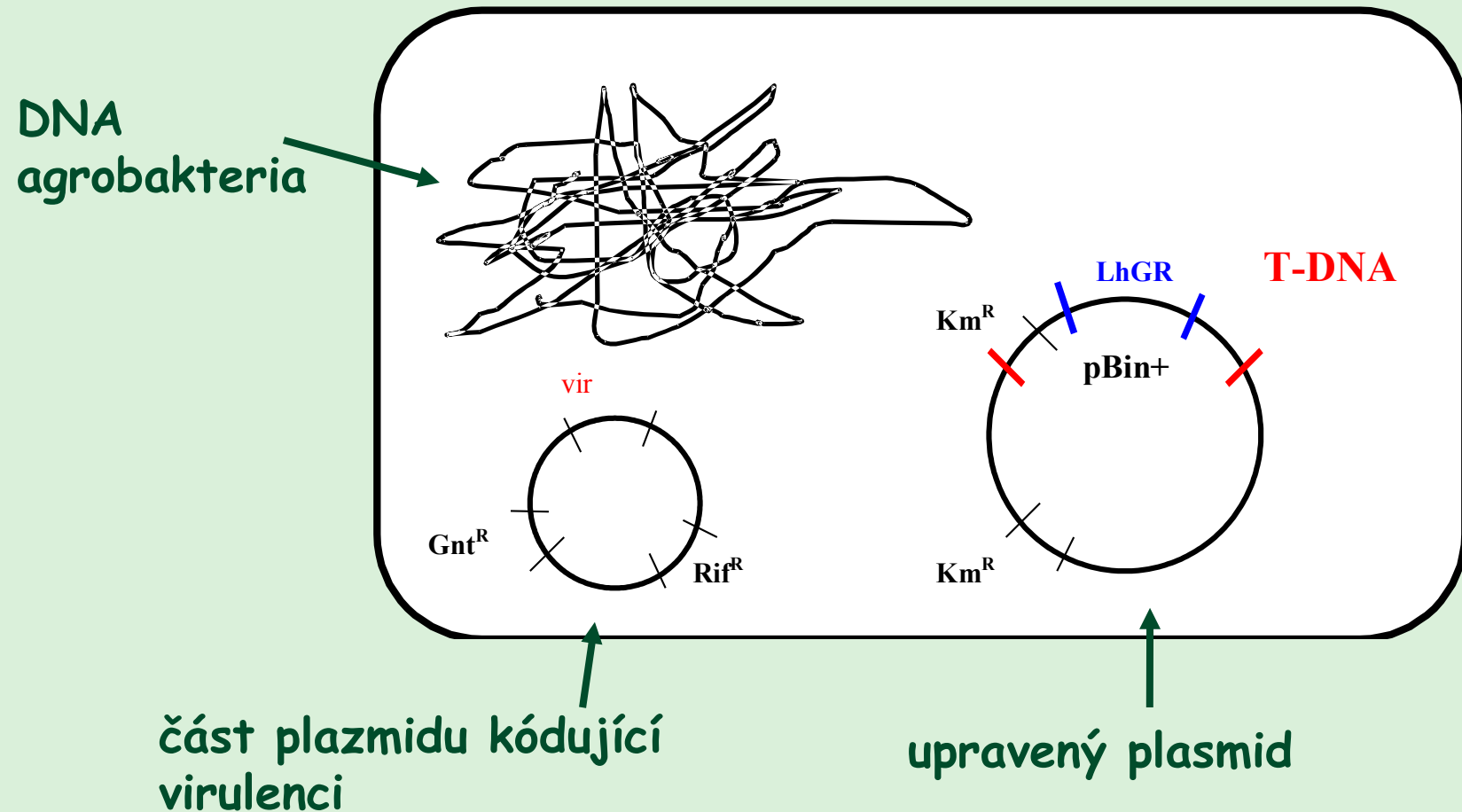


nádor vytvořený po umělé infekci *Agrobacterium tumefaciens*
na stonku tabáku

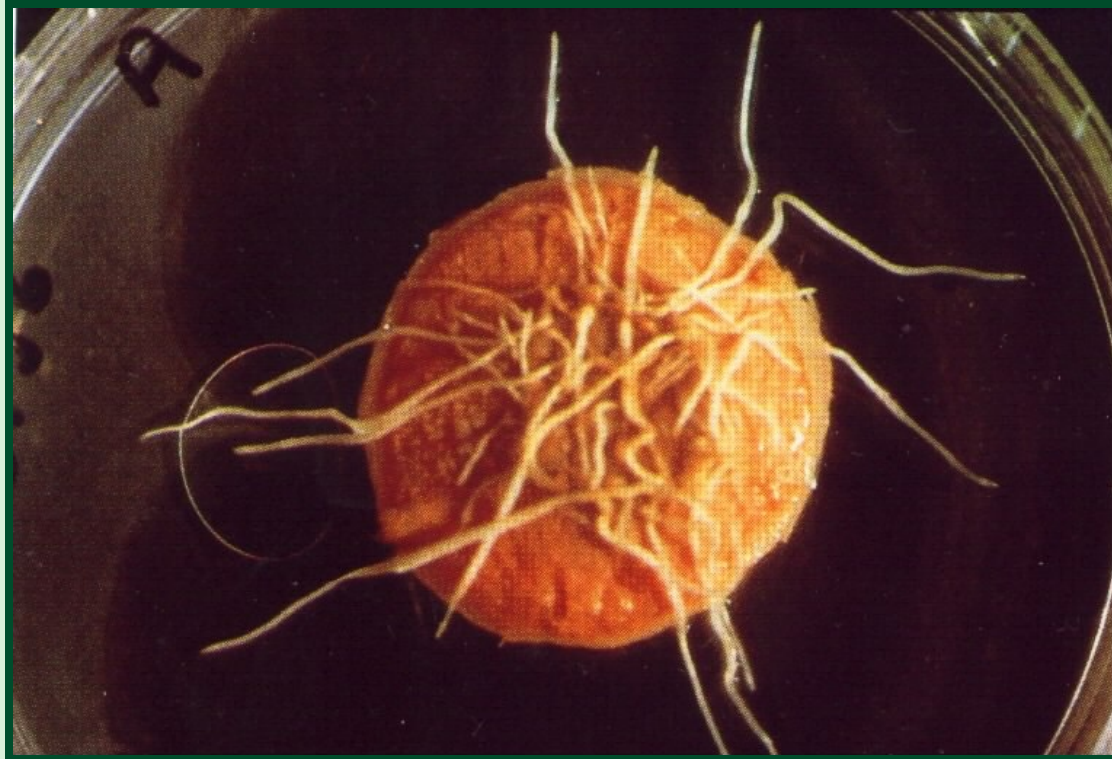
Agrobacterium tumefaciens

upravený binární vektor LhGR

Šámalová 2005



Agrobacterium rhizogenes

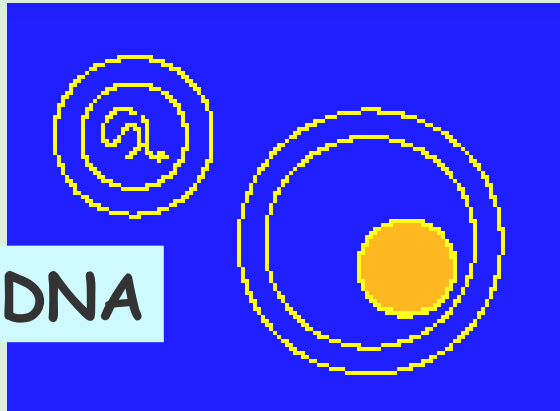


indukce tvorby kořenů na segmentu kořene mrkve

Transformace pomocí lipozómů

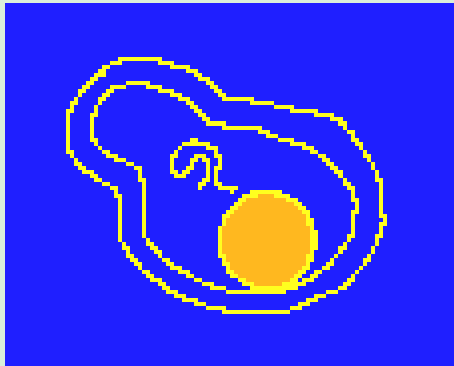
1. krok

lipozóm+DNA



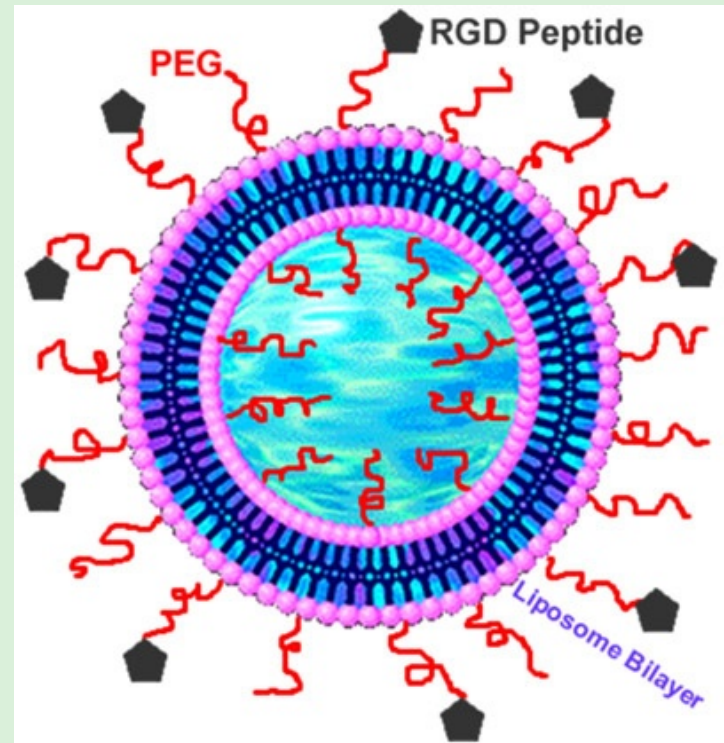
protoplast

2. krok



transformovaný protoplast

Nallamothu et al. *AAPS PharmSciTech*. 2006

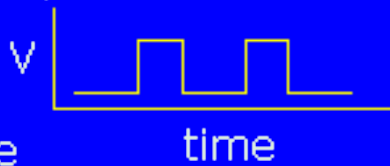


http://www.aapspharmscitech.org/articles/pt0702/pt070232/pt070232_figure1.jpg

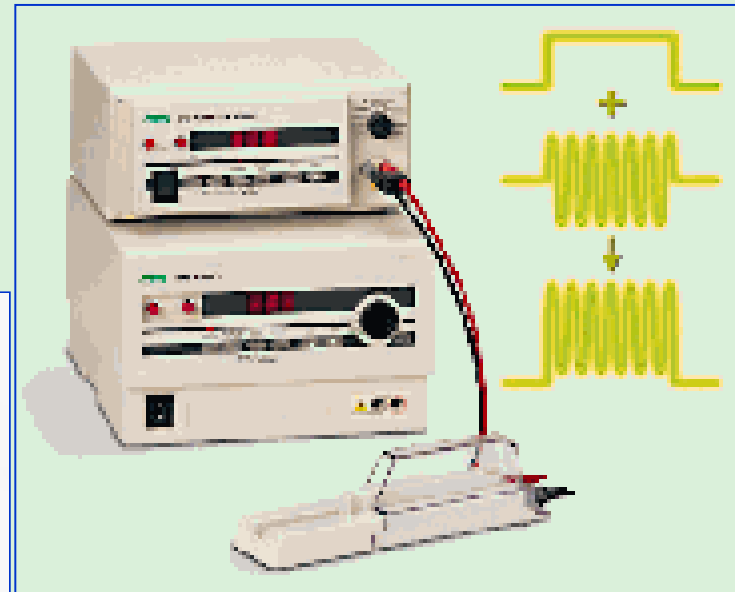
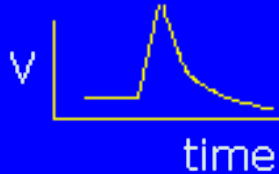
Transformace s elektroporací

1. vyžaduje použití protoplastů, kvasinek, bakterií
2. DNA proniká do buněk přes plasmalemu po vytvoření dočasných pórů vlivem působení elektrických pulzů

Rectangular pulse

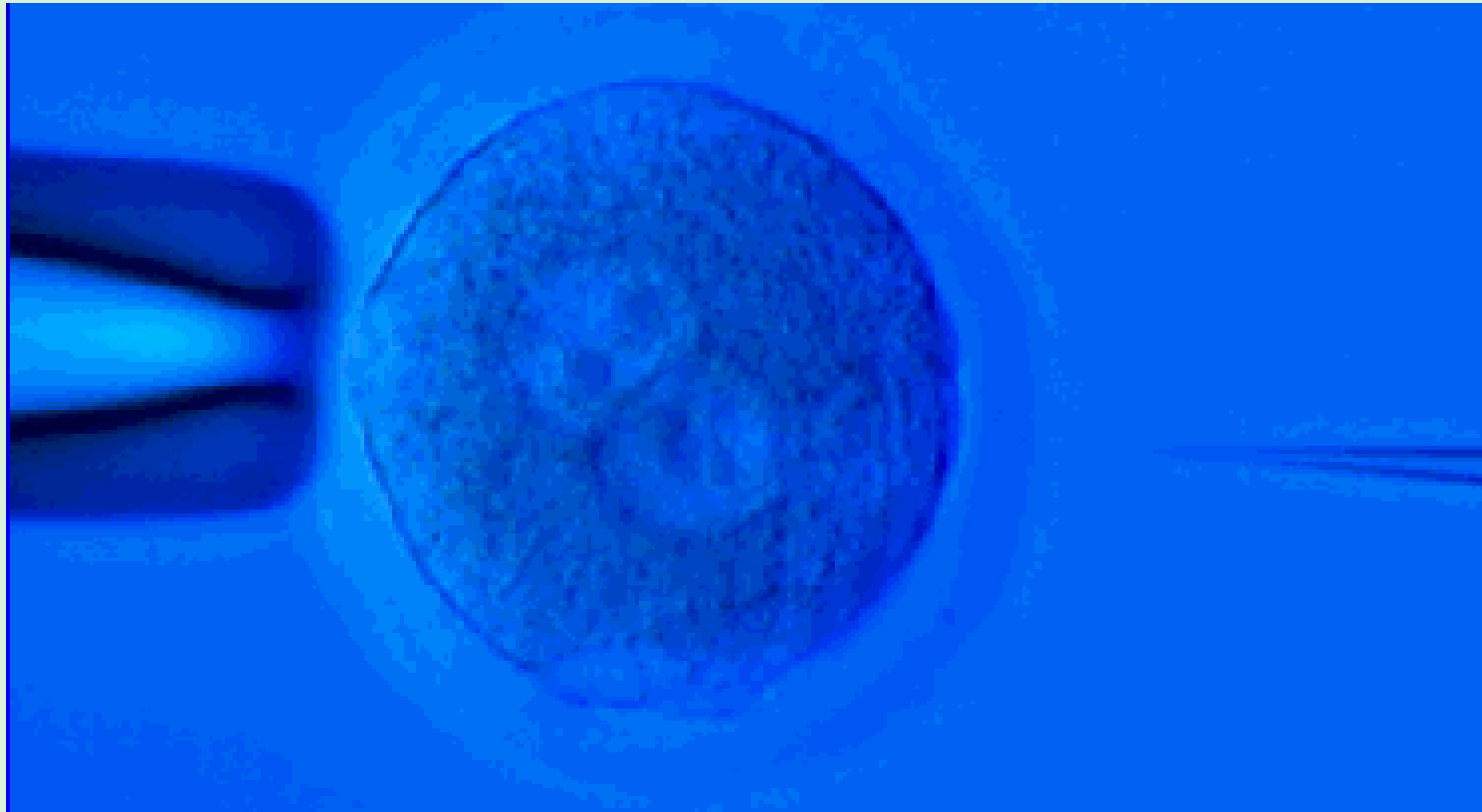


Spike pulse



©BioRad Laboratories

Mikroinjekce



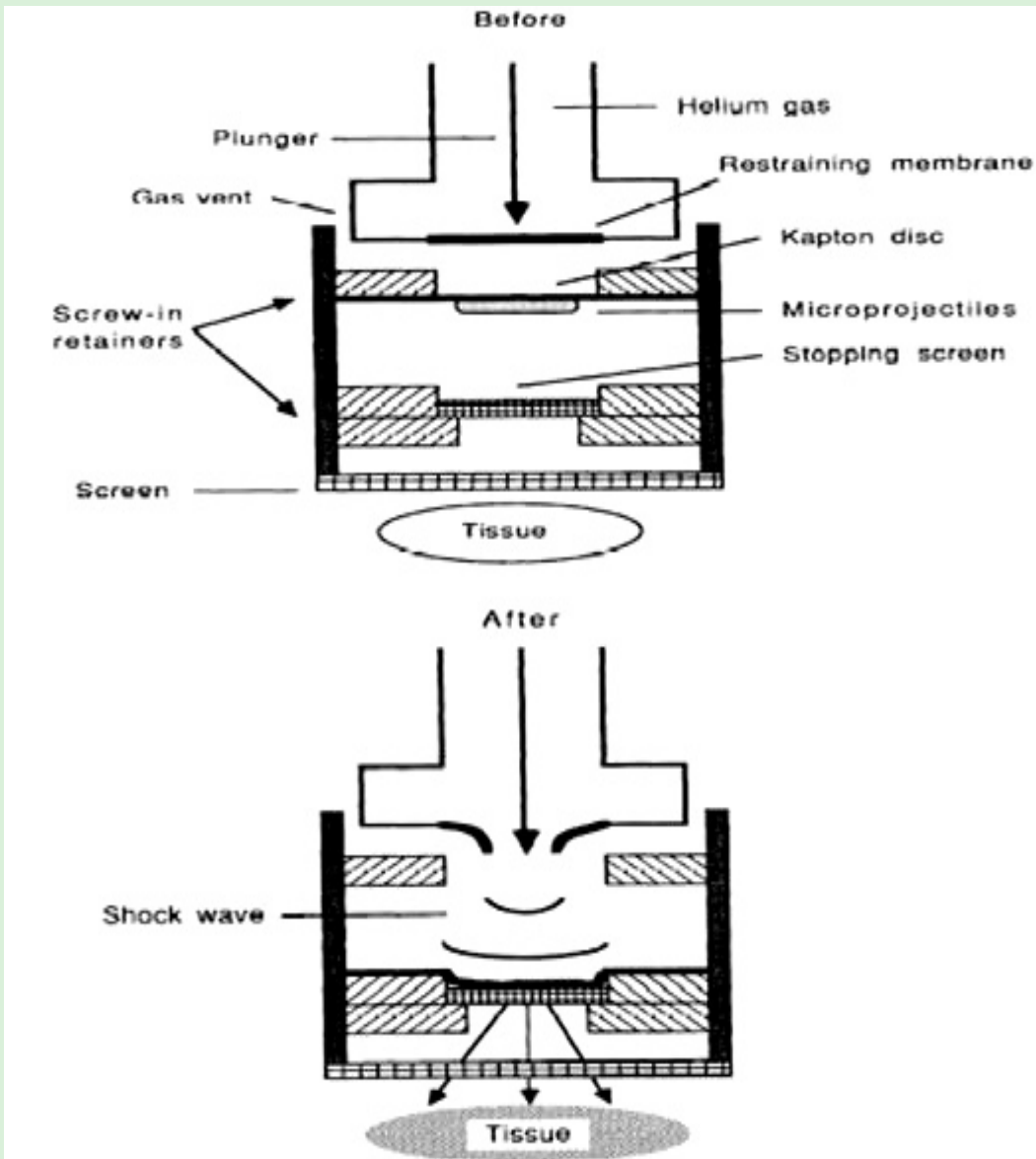
Biolistické metody - výhody



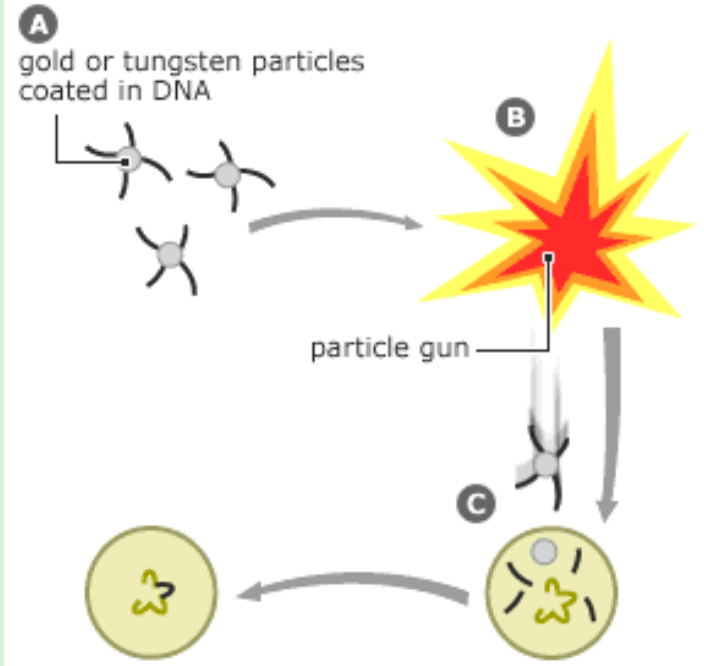
©BioRad Laboratories

1. mohou být aplikovány na různé cíle, včetně buněčných a tkáňových kultur rostlin i živočichů
 2. využívají pulsy hélia, které urychlují částice zlata nebo wolframu obalené DNA
- vysoce efektivní i pro nedělicí se buňky
 - použitelné i pro rostlinné buňky
 - stačí malé množství DNA
 - lze použít *in vitro*, *in vivo*

Biolistické metody - schéma

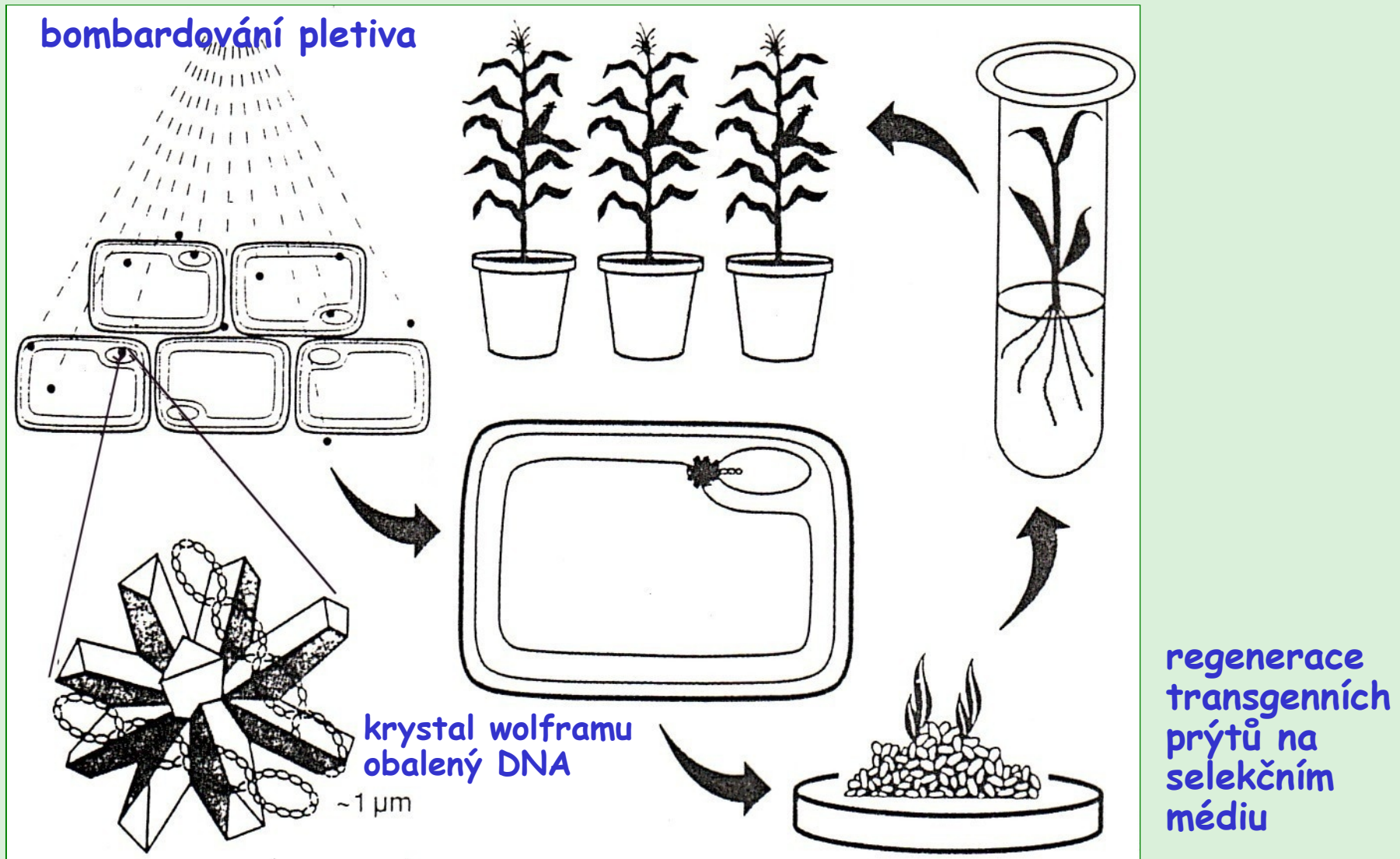


Transferring a gene using a particle gun



BBC news

Princip biolistické metody



Selekční a signální markery

1. rezistence vůči **antibiotikům**
a **cytostatikům** (antimetabolika)



kanamycin
hygromycin
gentamycin
chloramfenikol



methotrexát

2. **iudA** → glukuronidáza - **GUS**

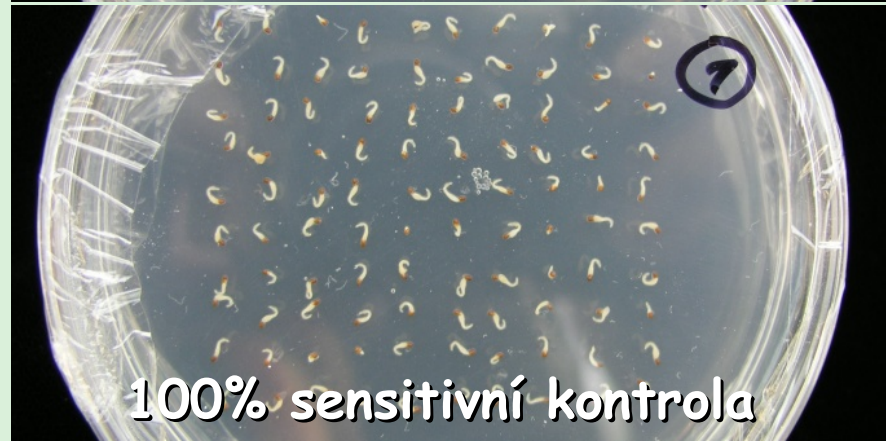
3. **luc** → **luciferáza** (z mořského planktonu *Photinus pyralis*, katalyzuje ATP dependentní oxidativní dekarboxylaci substrátu = luciferin za produkce světelné emise 562 nm)

4. **GFP** („green fluorescent protein“ upravený gen z medúzy *Aequorea victoria*)

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



Biolistická metoda: pro transformace pletiv trav - GUS marker



jednoděložné rostliny
jsou resistantní vůči
infekci *Agrobacterium*

exprese aktivity
enzymu glukuronidázy
po bombardování kalusu
Brachypodium

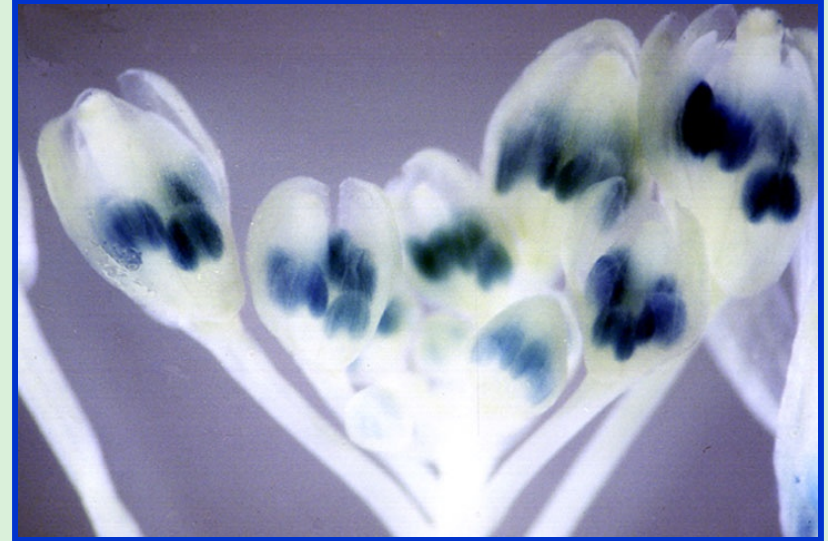
využití kalusové kultury pro transformace

Indigogenní metoda detekce glukuronidázy

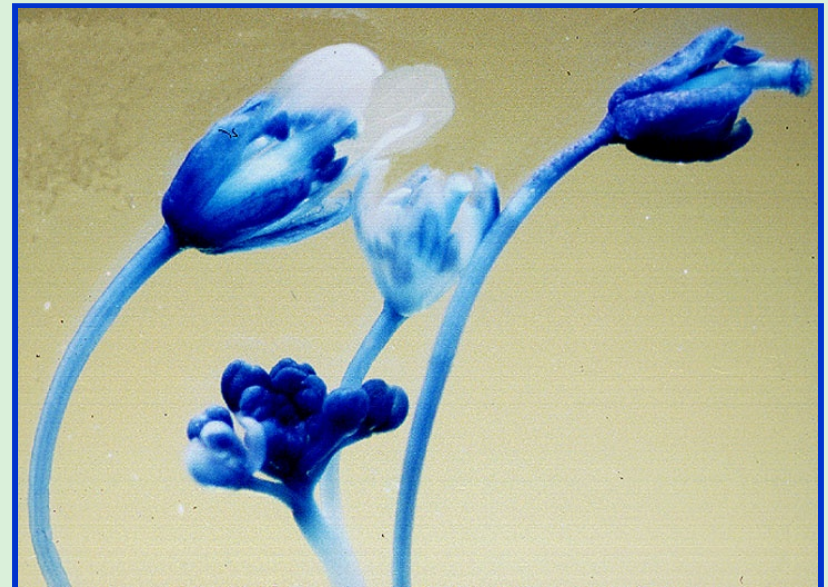
apex karafiátu



Arabidopsis

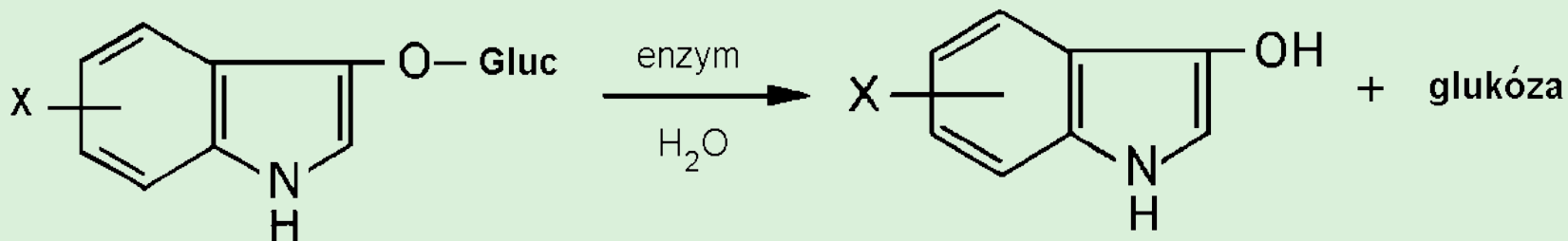


substrát =
5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-
glukuronid (X-gluc)



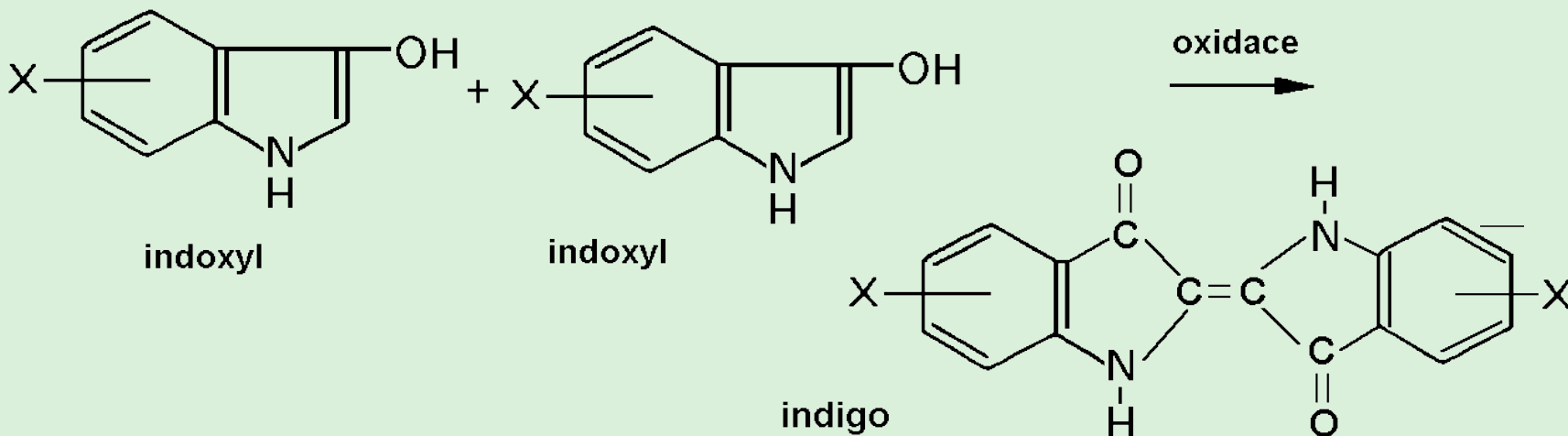
Indigogenní metoda detekce aktivity glukosidázy

1. Primární reakce - štěpení substrátu enzymem



X = Br, Cl

2. Sekundární reakce - tvorba indiga

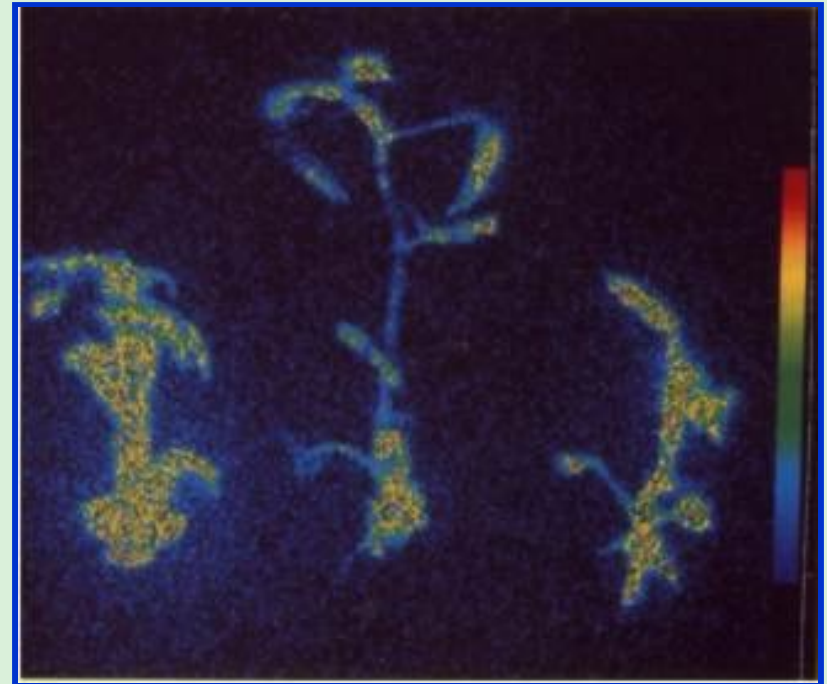


Transformované rostlinky kasavy z embryogenní kultury

signální gen = luciferáza



rostlinky



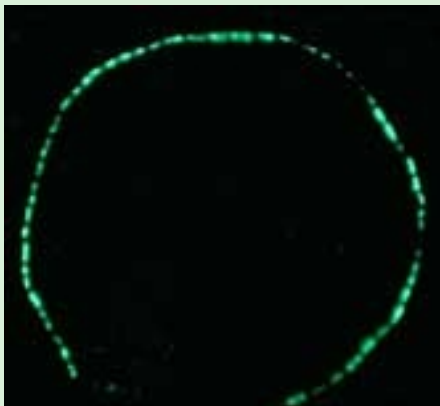
vizualizace aktivity luciferázy:
postříkáno luciferinem
a měřeno luminometrem

Historie GFP

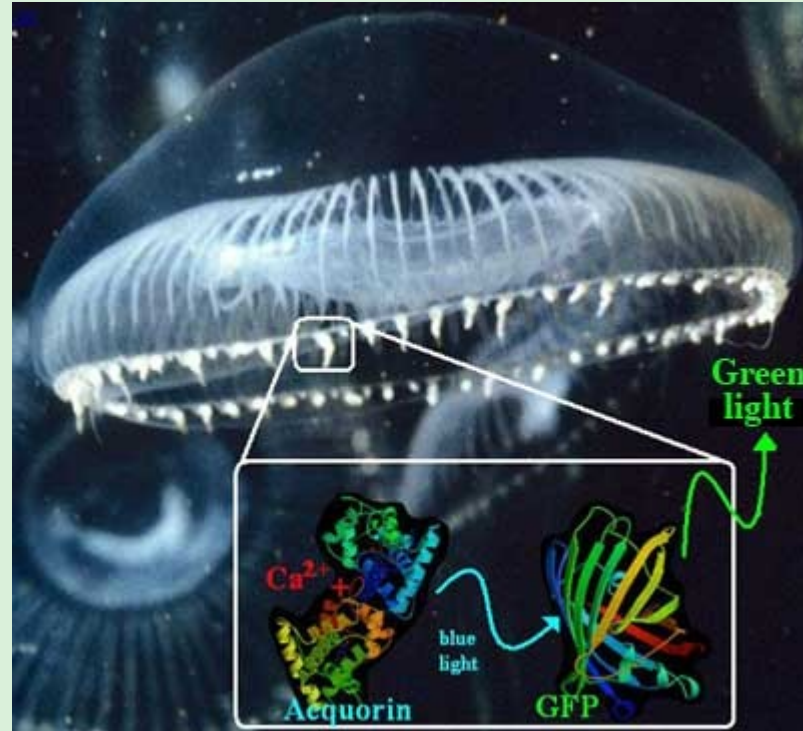
1955 první popis luminiscence medúzy



Osamu Shimomura (1962)



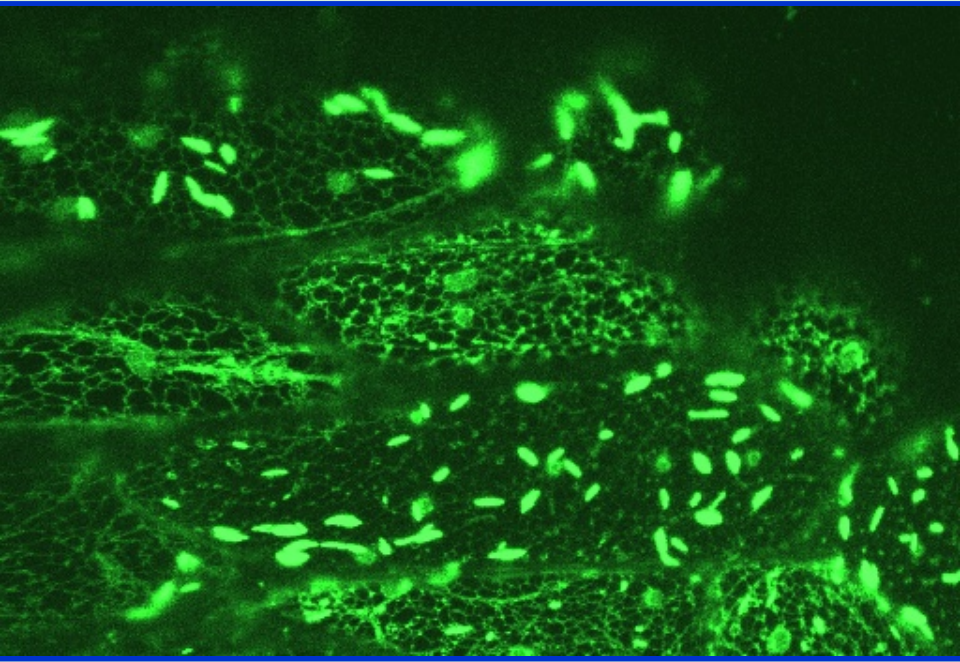
fotoreceptory na okraji
klobouku medúzy



2008 Nobelova cena za chemii

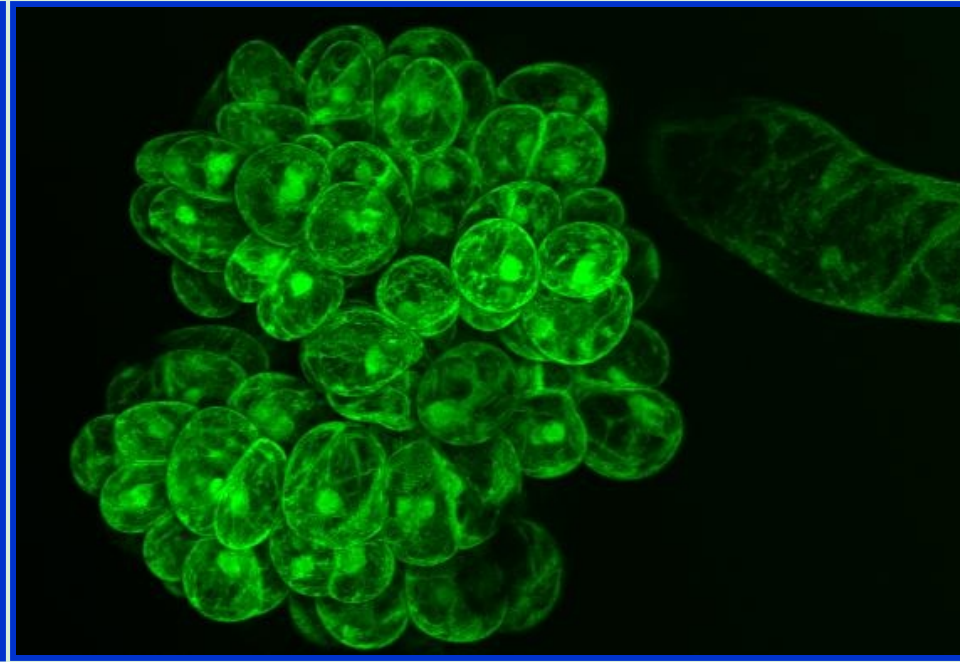
<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html>

Využití GFP



Fusifonní tělíska v síti ER
stonkové buňky *Arabidopsis*.

Signální peptid GFP-HDEL



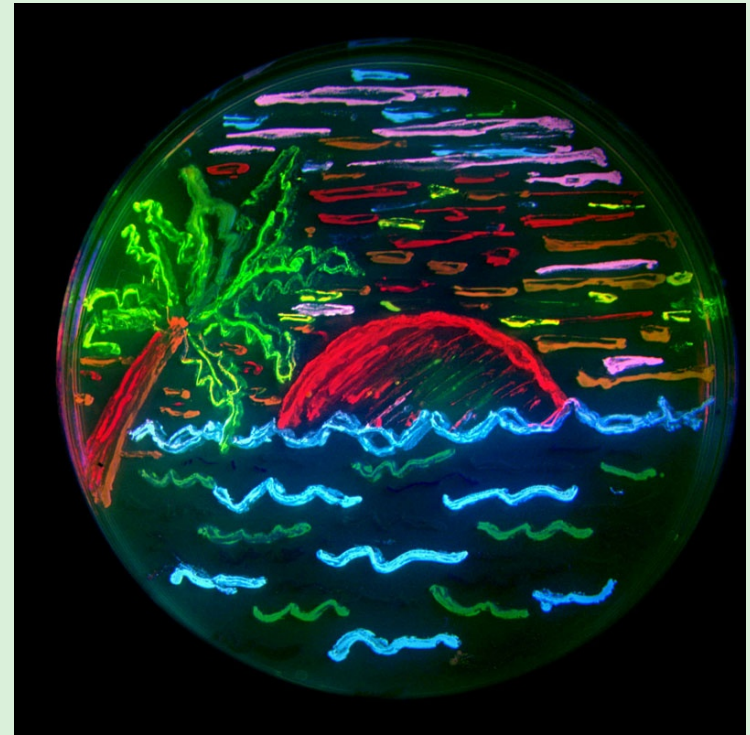
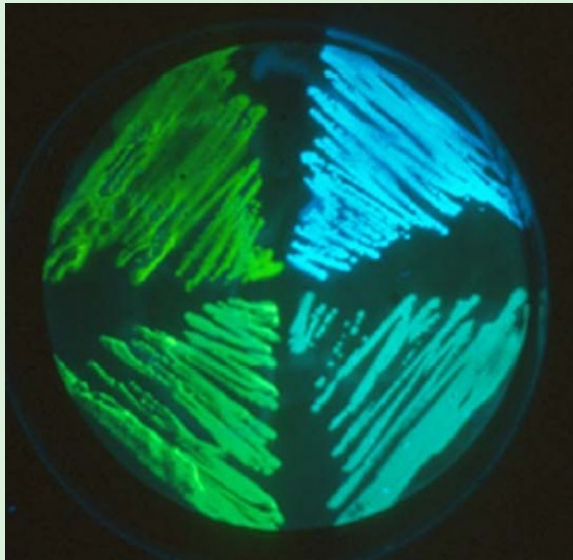
GFP v pěstovaných
buňkách tabáku

konfokální mikroskopie

Modifikace GFP



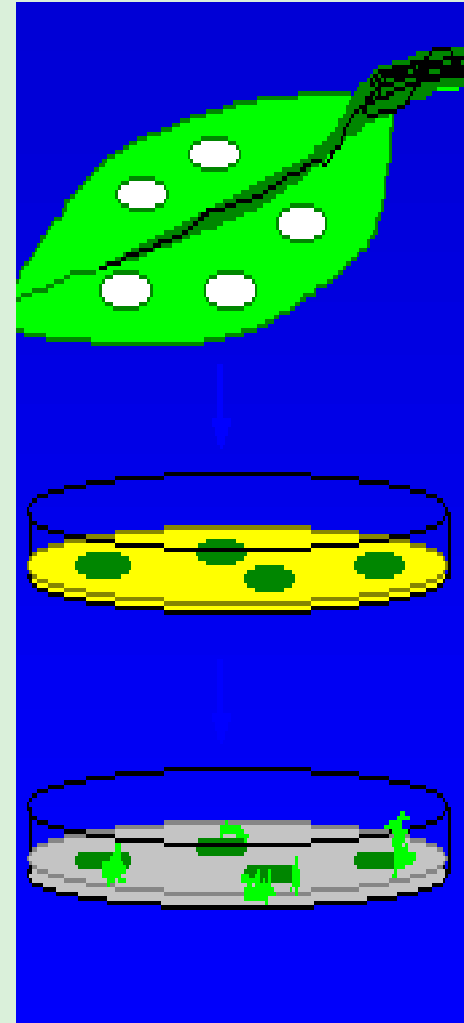
Roger Tsien
La Jola, Kalifornie



<http://www.tsienlab.ucsd.edu/People.htm>

Postup experimentu transformace - disková metoda

1. příprava kultury agrobakteria - křížový roztěr na LB médium s antibiotiky + agar
2. příprava listových segmentů - předkultivace na MSH s auxinem a cytokininem + agar (2-3 dny v kultivace)
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 - svrchní stranou dolů
6. pravidelná pasáž na médium MSSa (s antibiotiky - potlačení agrobaktéria a selekce), regenerace kalusů a rostlinek
7. indukce zakořeňování regenerovaných prýtů MSRa



Agrobacterium - média pro kultivaci

LK médium

(Langley *et* Kado)

sacharóza	10 g
kaseinhydrolyzát	8 g
kvasničný extrakt	4 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,3 g
destil. H ₂ O	do 1000 ml
agar	13 g

LB BROTH High Salt

(DUCHEFA)

25 g do 1000 ml destil. H₂O

složení:

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

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

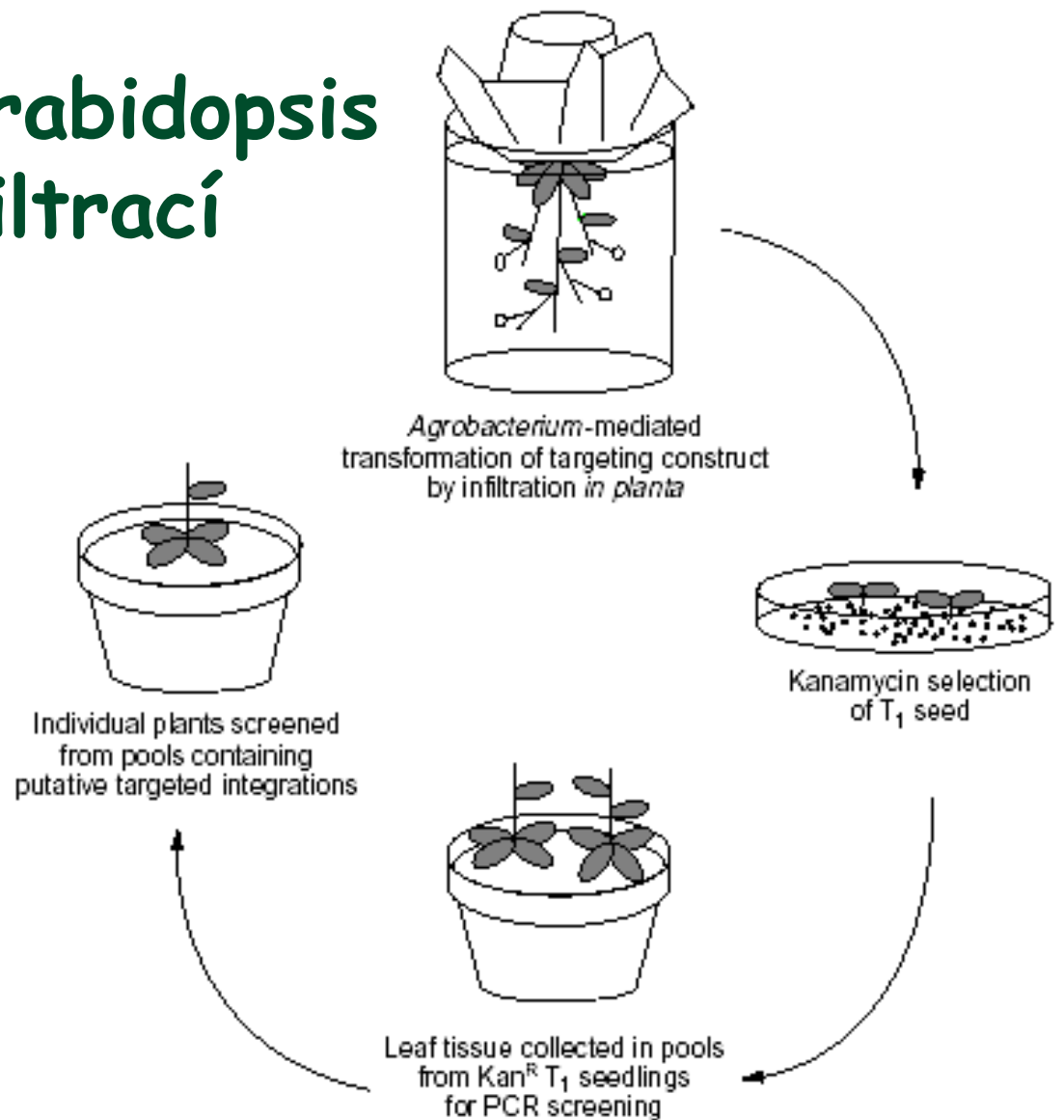


Fig. 1. Strategy for targeted disruption in *Arabidopsis*. Infiltration of *Arabidopsis* plants with the targeting construct is used to generate large numbers of kanamycin-resistant (Kan^R) primary (T_1) transformants, which are transferred to soil. Homologous-targeting events are detected by PCR-based screens^{2,4} of pooled plants, and individual lines are subsequently identified. PCR screens can be done six weeks after infiltration.

První povolená transgenní plodina



rajče Flavr-Savr

první komerčně povolená GMO
odrůda pro lidskou spotřebu

Calgene a Zeneca
Kalifornie, 1992

Poprvé prodávána 1994, ale
produkce byla brzy ukončena.

komplementární (antisense) konstrukce genu pro
galakturonidázu (pektinázu) - zpomalené dozrávání plodů

námitky vyvolal selektabilní gen NPTII - rezistence ke kanamycinu

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 β -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 (Round-up) a škůdcům (*Bacillus thuringiensis* toxin)
- transgenní „ zlatá rýže “ nese gen kukuřice pro tvorbu **β -karotenu** (provitamin A) a má **zvýšený obsah železa** v přijatelné formě

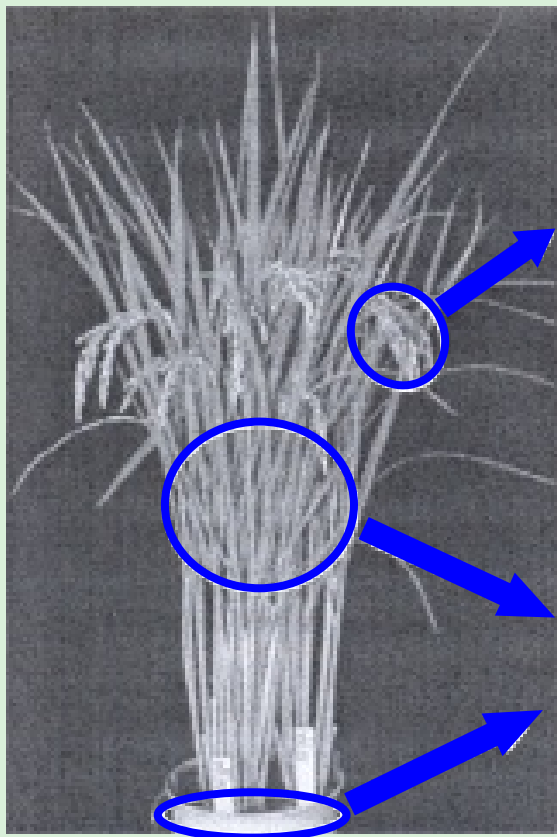
Danaus plexippus, danao stěhovavý „Monarch“ imago a housenka

Bacillus thuringiensis - Δ toxin - selektivně působící insekticid
(zavíječ kukuřičný) povolený v USA od r. 1961



http://www.kidzone.ws/animals/monarch_butterfly.htm

Zlatá rýže



nese gen kukuřice pro tvorbu β -karotenu (provitamin A) a gen pro feritin

zrno má vyšší obsah β -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* 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