

Transformace rostlin

úvod
metody

Biotechnologie - přístup k přírodě

biotechnologie - metoda využívající organismy ve prospěch člověka 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** - sekundární metabolity rostlin
- **bioremediace** - biologické čištění vody, ropné produkty v půdě, toxické kovy...

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.

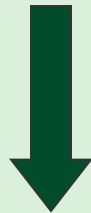
Navíc nevíme, kolik genů se změnilo a jak.

Příklady odrůd rostlin odvozených mutačním šlechtěním

plodina	jméno kultivaru	metoda použitá k mutaci
rýže	Calrose 76	paprsky gama
pšenice	Above	azid sodný
	Lewis	neutrony
oves	Alamo-X	X-paprsky
grapefruit	Rio Red	neutrony
	Star Ruby	neutrony
<i>Cynodon dactylon</i>	Tifeagle	paprsky gama
	Tifgreen II	paprsky gama
	Tift 94	paprsky gama
	Tifway II	paprsky gama
salát	Ice Cube	ethyl methansulfonát
	Mini-Green	ethyl methansulfonát
fazol	Seafarer	X-rays
	Seaway	X-rays
šeřík	Prairie Petite	neutrony
<i>Stenotaphrum secundatum</i>	TXSA 8202	paprsky gama
	TXSA 8212	paprsky gama

„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**

Charakteristika genů

gen

kódující sekvence (+ repetitivní DNA)

kódující úseky = **exony**

nekódující úseky = **introny**

regulační část

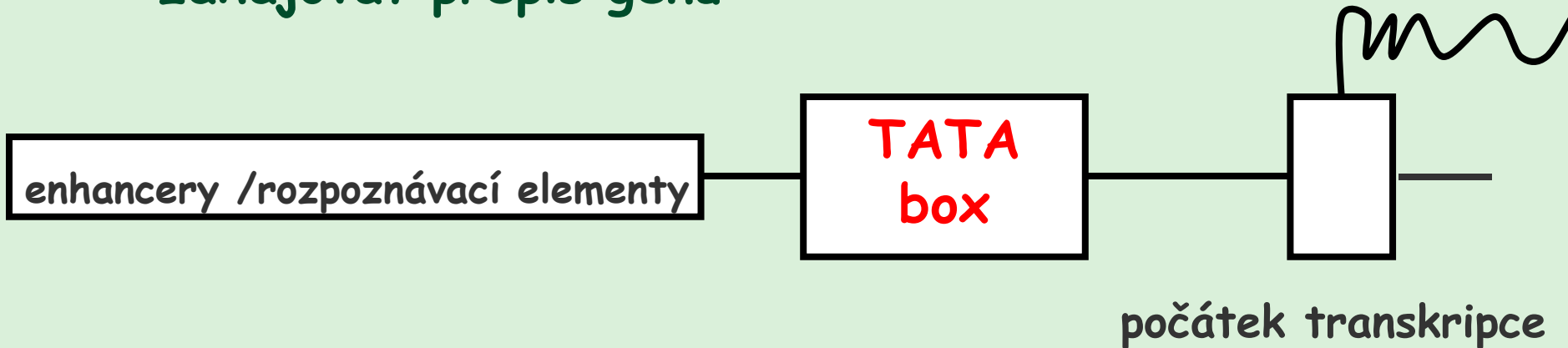
promotor

zaváděcí sekvence

terminační sekvence

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

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

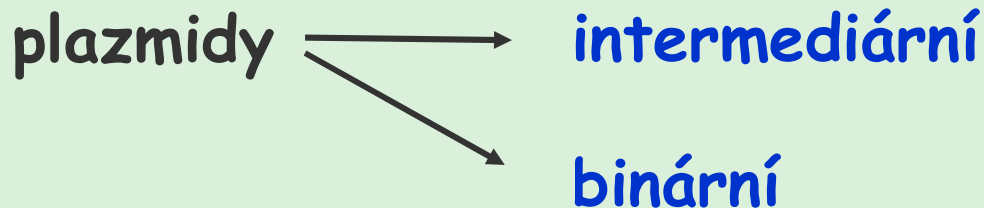
Metody transformace (vnášení DNA)

přímé

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

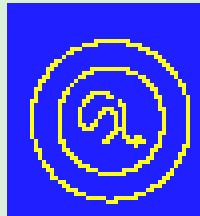
nepřímé - pomocí vektorů

Agrobacterium (plazmidy)
rostlinné viry
modifikovaný bakteriofág λ

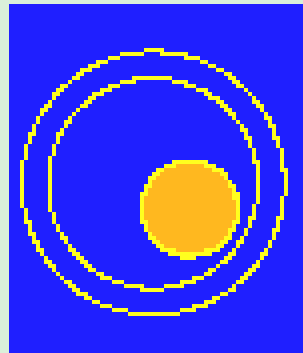


Transformace zprostředkovaná liposomy

1.

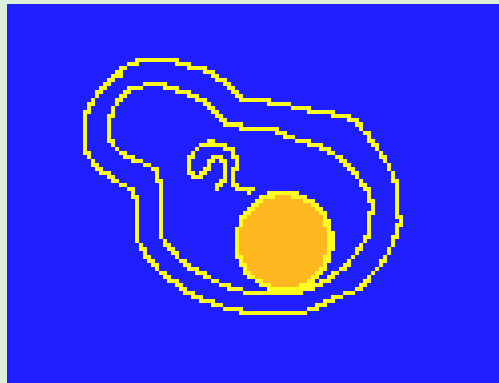


liposom + DNA



protoplast

2.



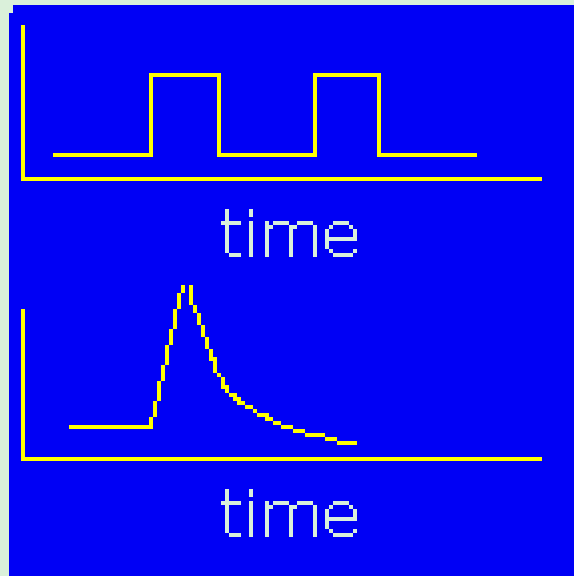
fúze membrán
protoplastu a
liposomu

Elektroporace

vyžaduje použití protoplastů

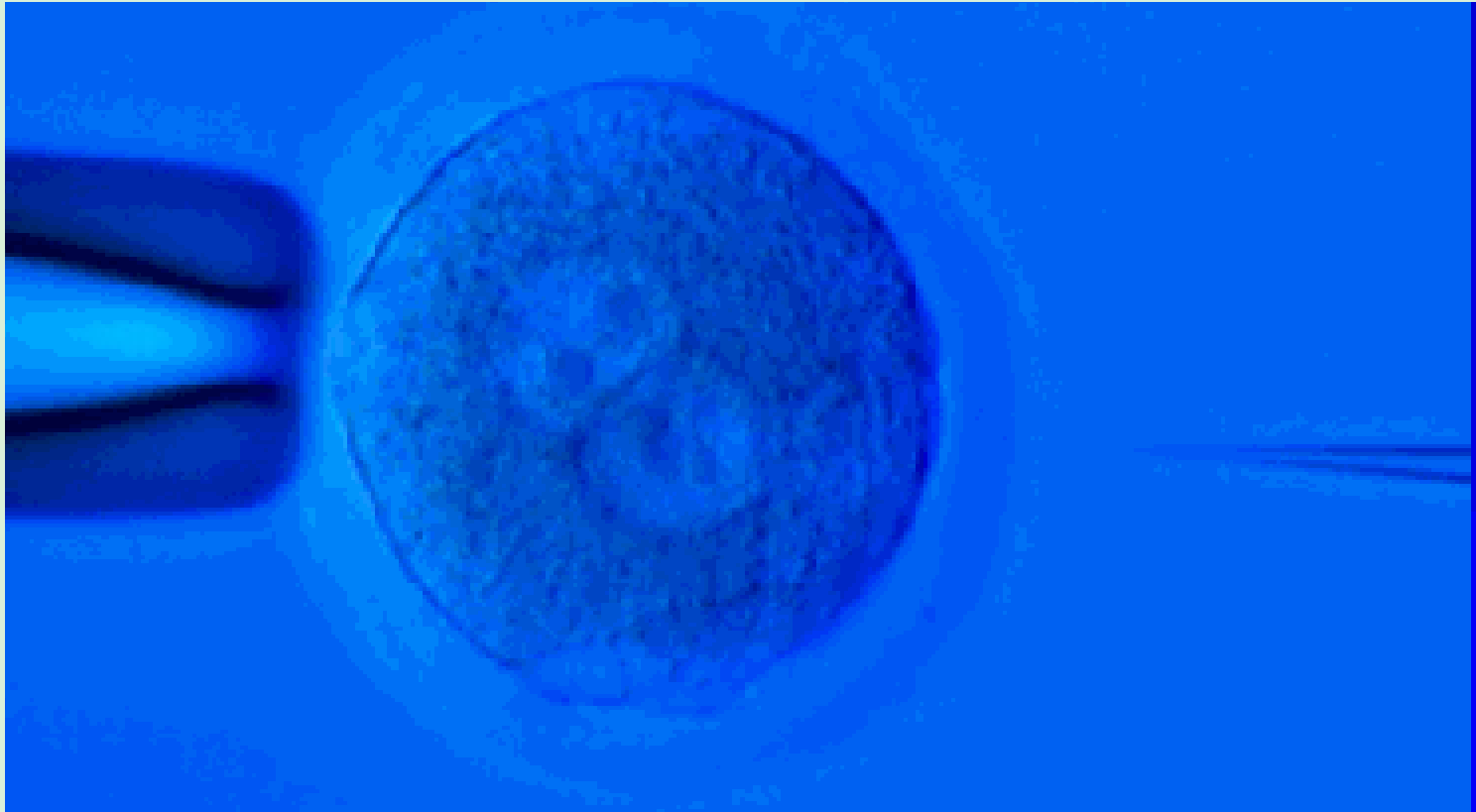
po aplikaci el.pulsu se vytvoří dočasné póry v membránách,
které umožní průniku DNA

různé typy pulsů



BioRad Laboratories

Mikroinjekce DNA do jádra



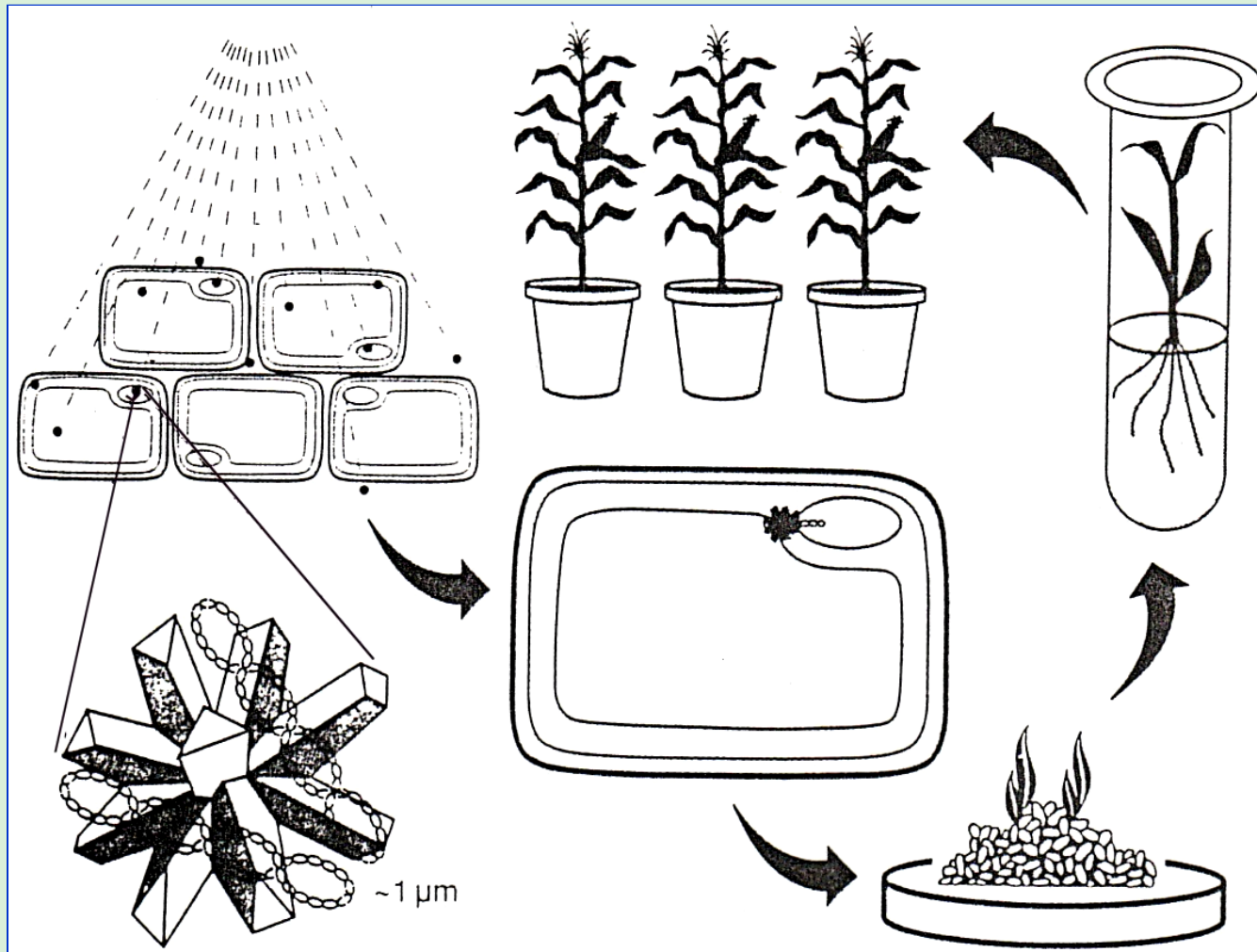
použito u protoplastů rostlin, ale častější u živočichů

Biolistické metody



BioRad Laboratories

Biolistické metody



T₀

krystal W
s DNA

~1 μm

regenerace
rezistentních rostlin

Agrobacterium tumefaciens, A. rhizogenes

Půdní bakterie: *Pseudomonas, Corynebacterium*
Agrobacterium, Rhizobium

Agrobacterium tumefaciens
Agrobacterium rhizogenes

nádory
kořínky

Ti plasmid
Ri plasmid T-DNA

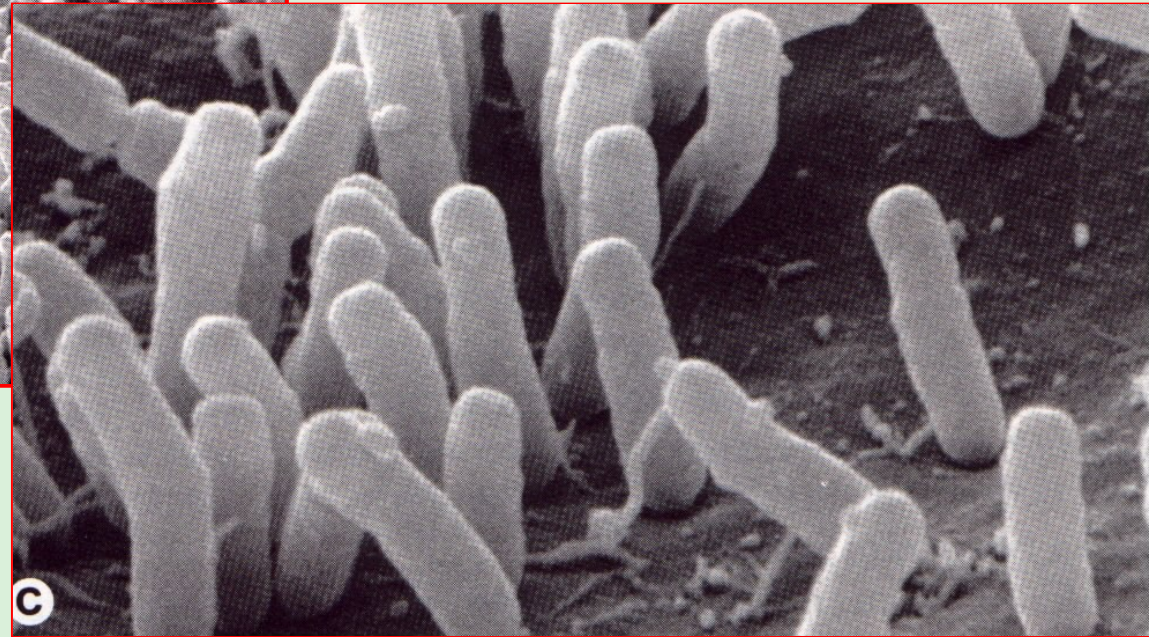
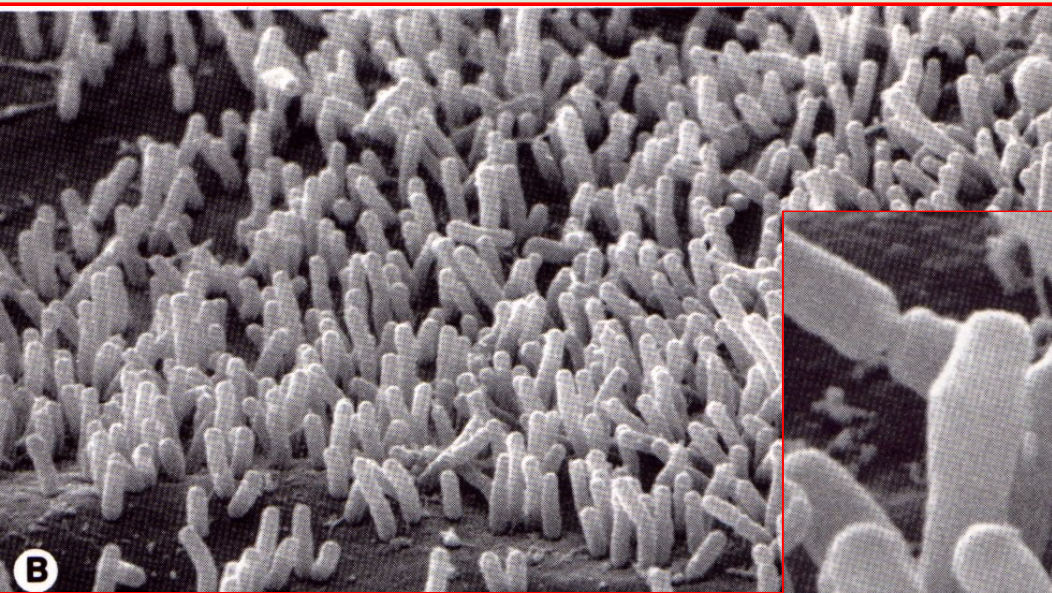
T-DNA Ti plasmidu (WT)

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

Agrobacterium tumefaciens

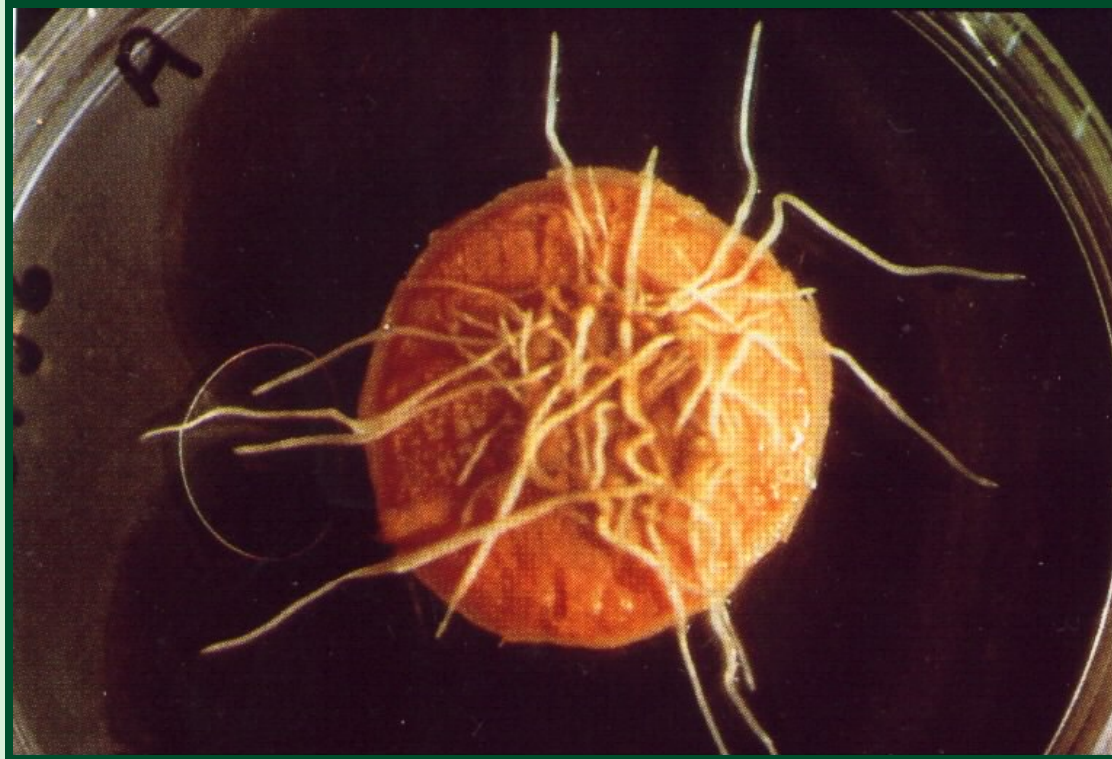


„Crown gall“



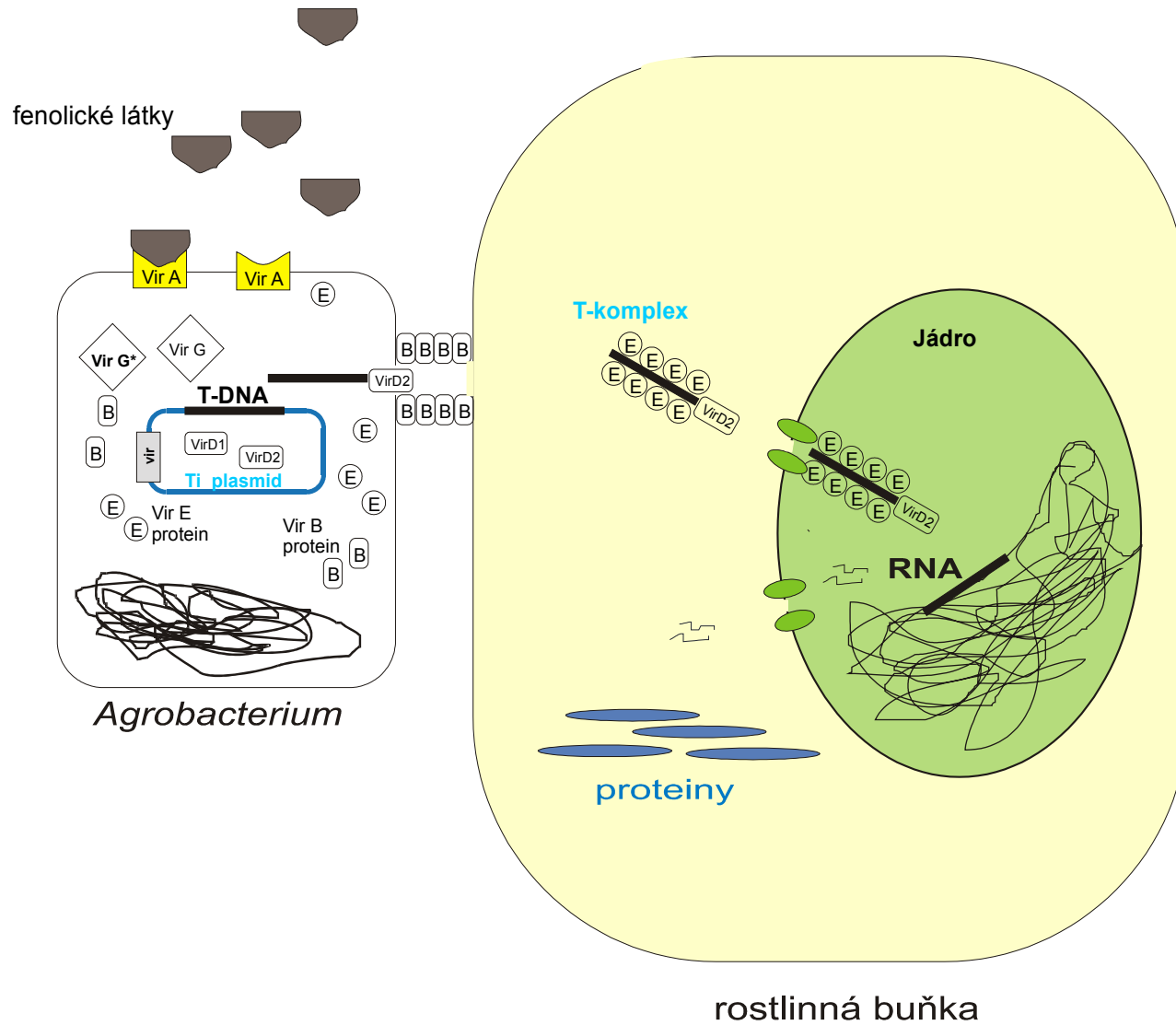
vytvořený po infekci *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium rhizogenes



indukce tvorby kořenů na segmentu kořene mrkve

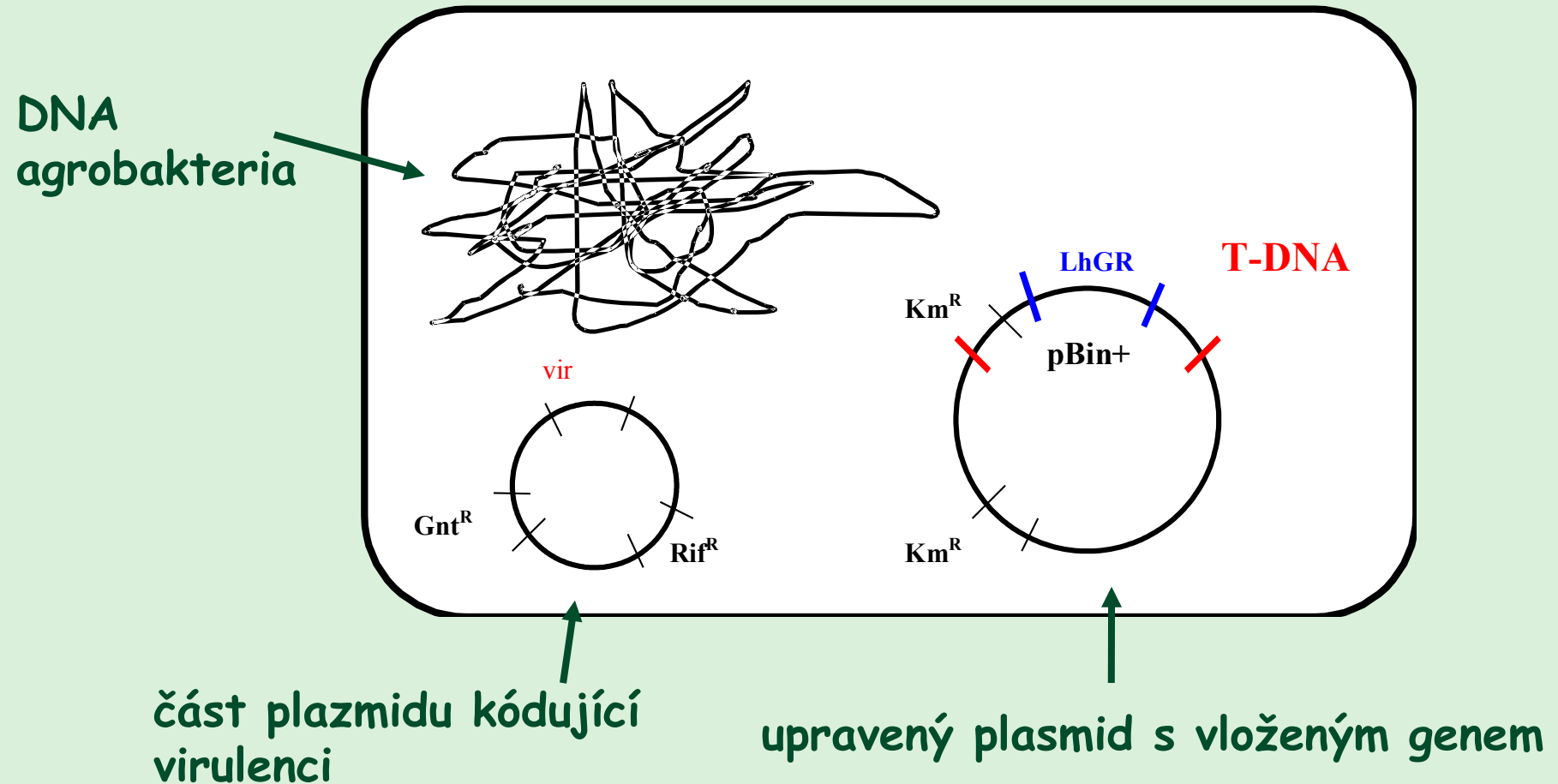
Mechanismus přenosu T-DNA intermediární vektor



Agrobacterium tumefaciens

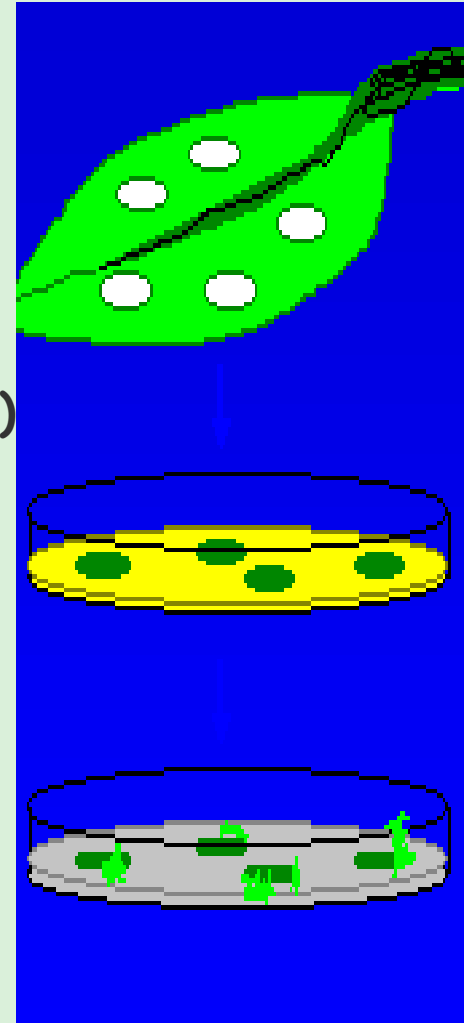
upravený binární vektor LhGR

Šámalová 2005



Postup 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 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 - svrchní stranou dolů
6. pravidelná pasáž na médium MSSa (s antibiotiky) 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_2PO_4	2 g
MgSO_4	0,3 g
destil. H_2O do 1000 ml	
agar	13 g

LB BROTH High Salt

(DUCHEFA)

25 g do 1000 ml destil. H_2O

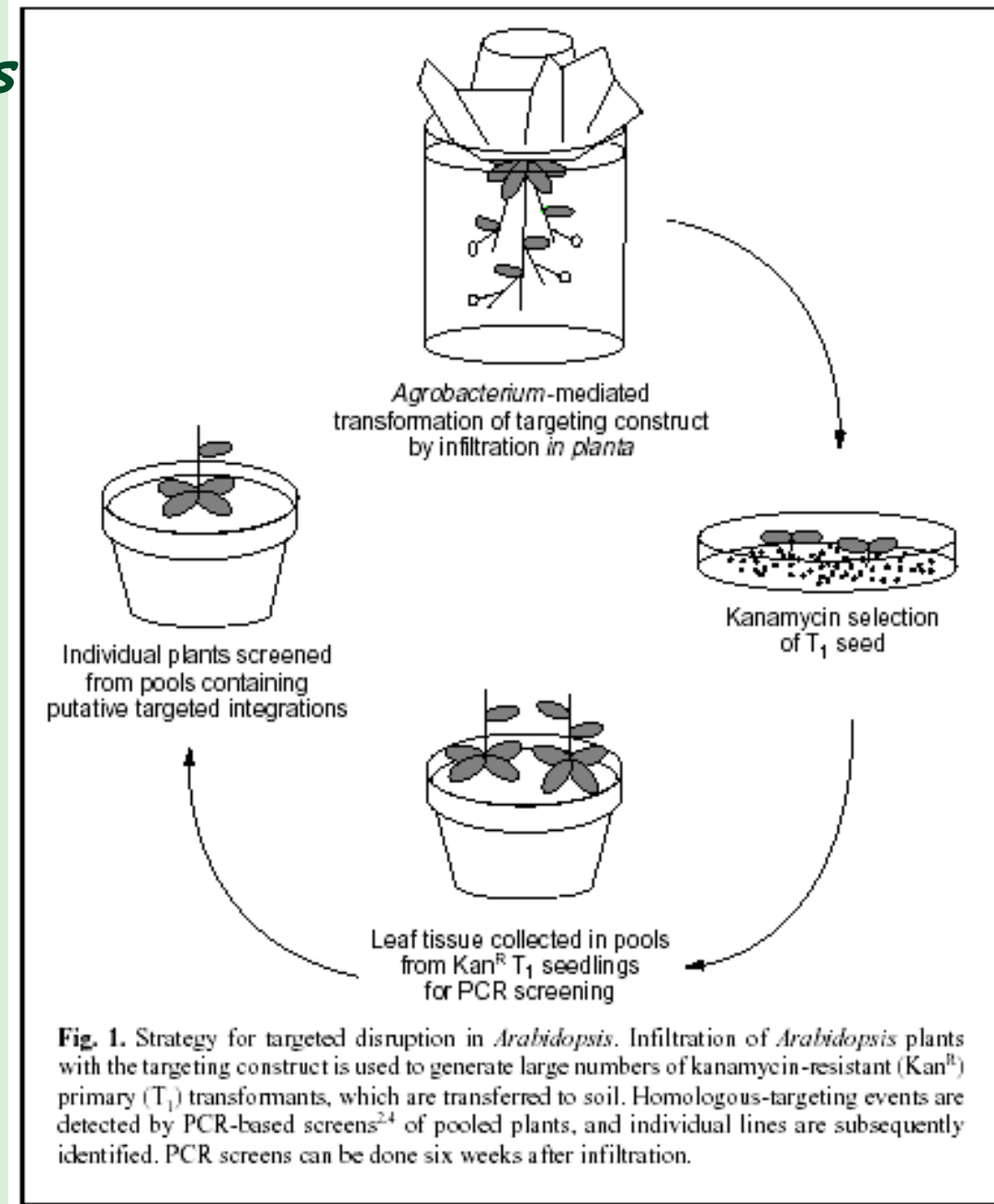
složení:

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

Transformace *Arabidopsis* vakuovou infiltrací



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



Selekční a signální markery

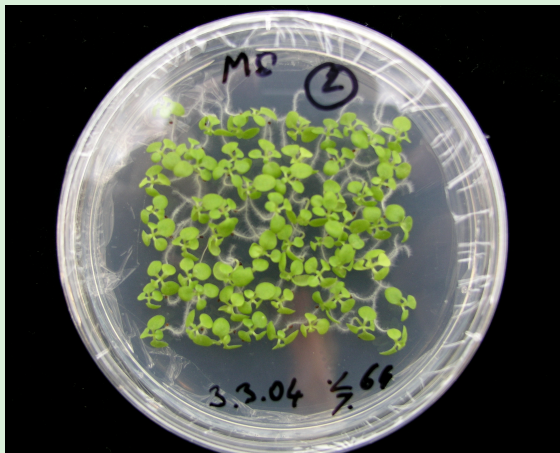
1. rezistence vůči **antibiotikům** → kanamycin
hygromycin
gentamycin
cytostatikům (antimetabolika)
herbicidům → glyfosát → methotrexát
2. **iudA** → glukuronidáza - **GUS** (z *E. coli*)
3. **luc** → **luciferáza** (z mořského planktonu *Photinus pyralis*, katalyzuje ATP dependentní oxidativní dekarboxylaci substrátu = luciferin za produkce světelné emise 562 nm)
4. **GFP** („green fluorescent protein“ gen z medúzy *Aequorea victoria*)

Transgeny pro toleranci k herbicidům

- **výhody** - možnost použít až postemergentně
- jsou biodegradovatelné
- mechanismus účinku
 - do rostliny je vnesen gen kódující enzym necitlivý k herbicidu
 - transgen přímo herbicid rozkládá
- **nevýhody**
 - vznik herbicid rezistentních plevelů

Využití methotrexátu pro selekci transgenních organismů

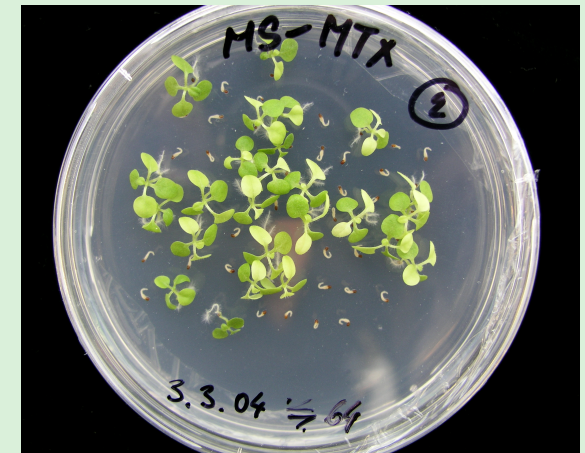
- do média pro selekci transgenních organismů se přidává methotrexát sterilně (0,5 g/l) až po vysterilizování média
- transgenní rostliny mají vložený gen pro dihydrofolát reduktázu (DHFR) z myši, která není citlivá na methotrexát



heterozygotní
transgenní tabák
na MS médiu



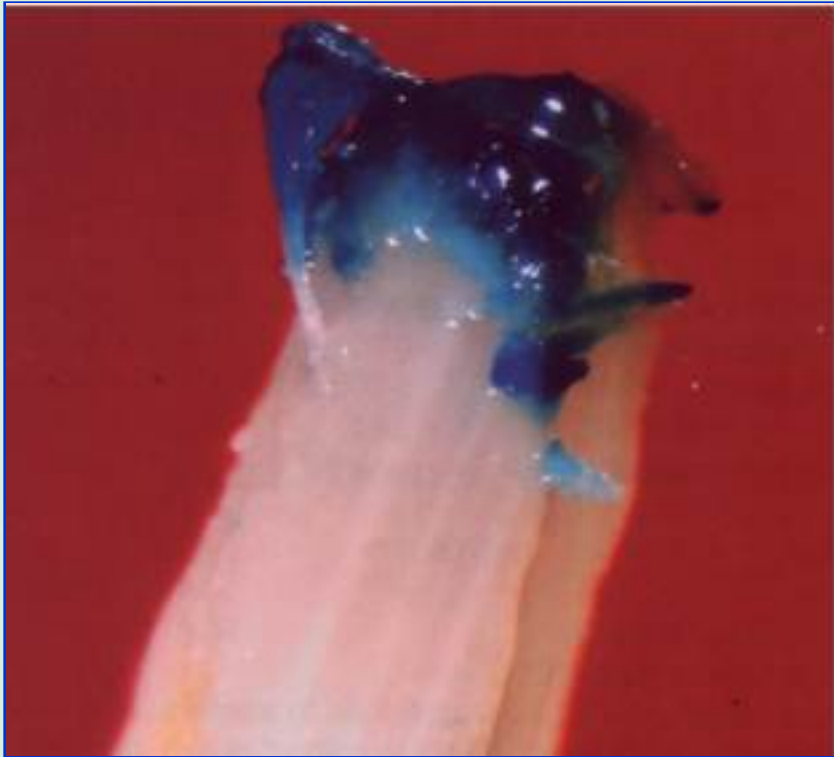
kontrola bez myši DHFR
na MS médiu s MTX



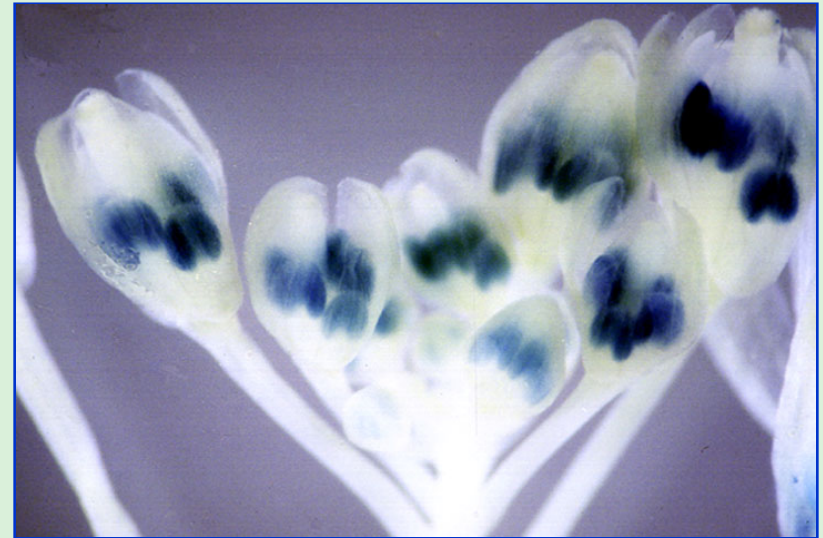
heterozygotní
transgenní tabák
na MS médiu s MTX

Indigogenní metoda detekce glukuronidázy

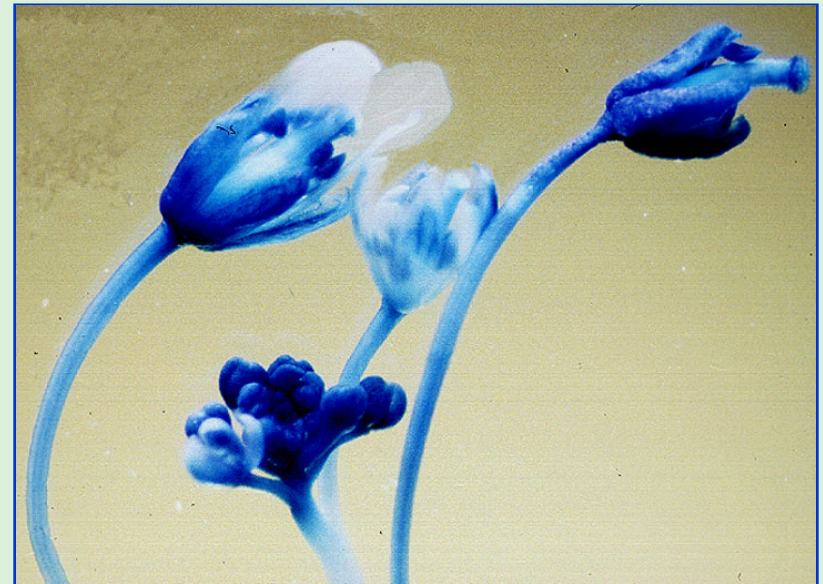
apex karafiátu



Arabidopsis

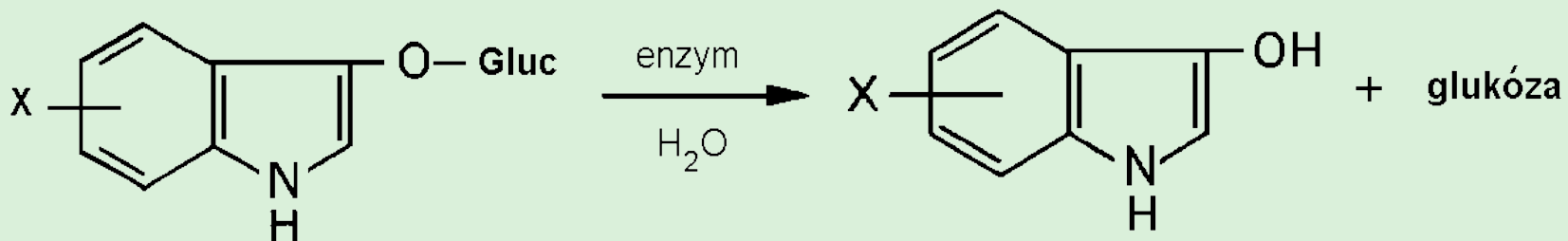


substrát =
5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-
glukuronid (X-gluc)



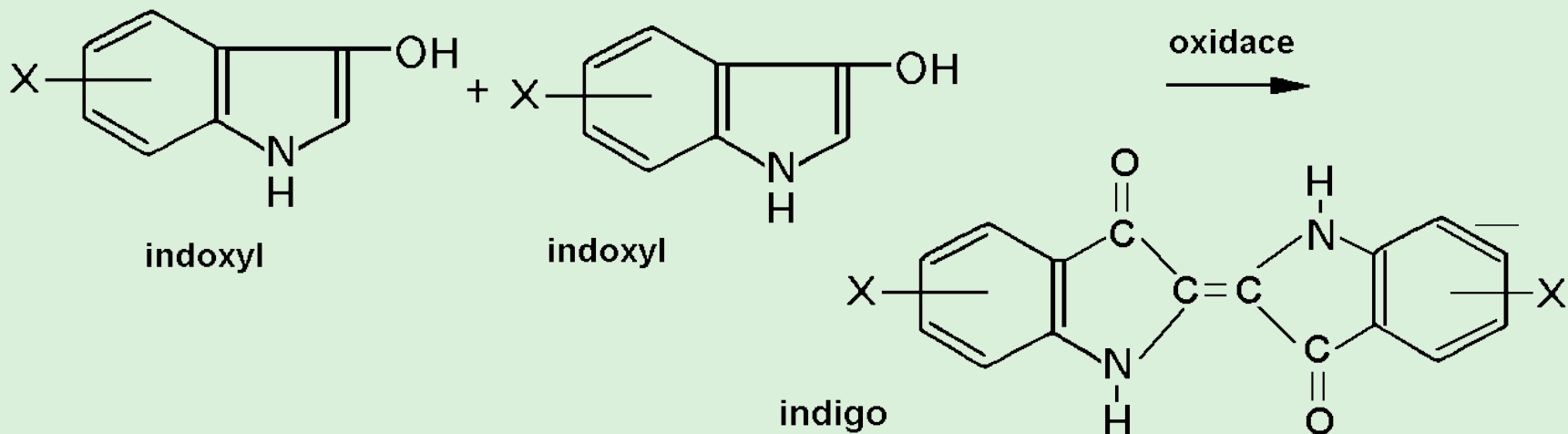
Princip indigogenní metody: detekce aktivity glukosidázy

1. Primární reakce - štěpení substrátu enzymem



X = Br, Cl

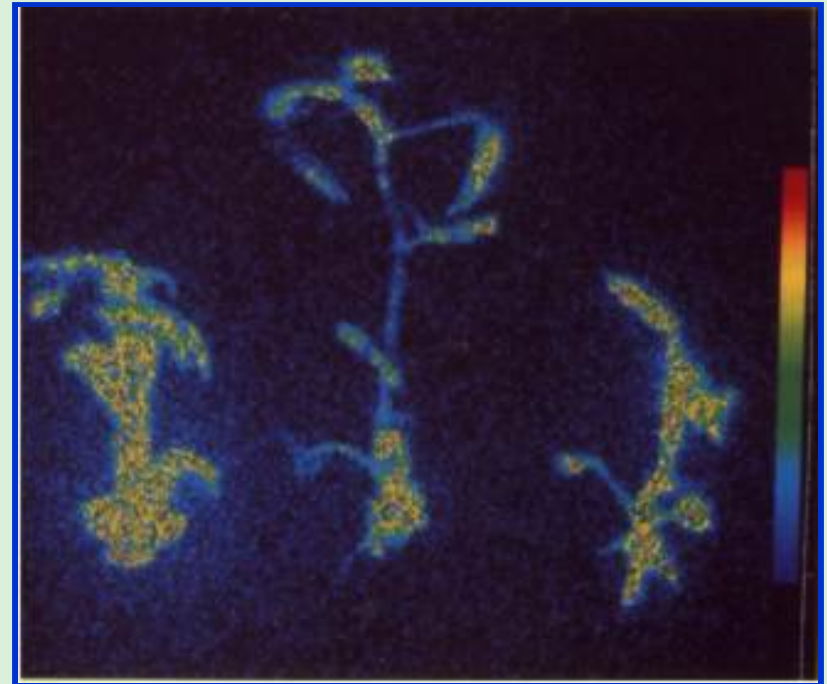
2. Sekundární reakce - tvorba indiga



Transformované rostlinky kasavy z embryogenní kultury, signální gen = luciferáza

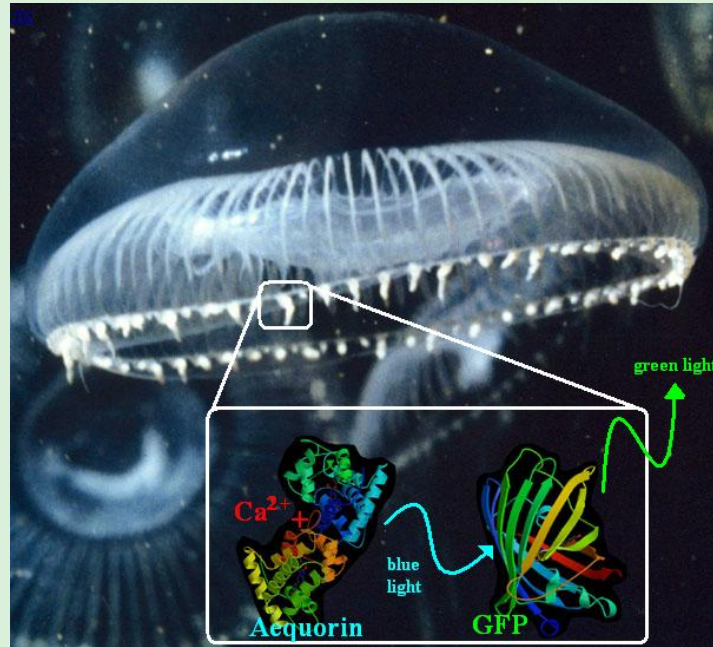
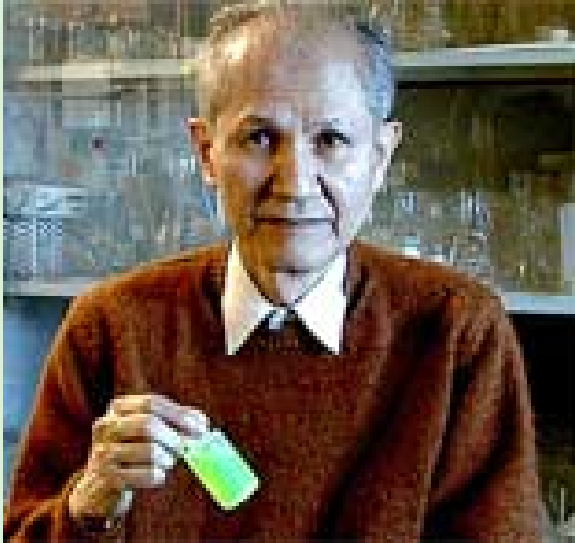


rostlinky



vizualizace luciferázy- postříkáno luciferinem a měřeno luminometrem

Osamu Shimomura - objevitel GFP

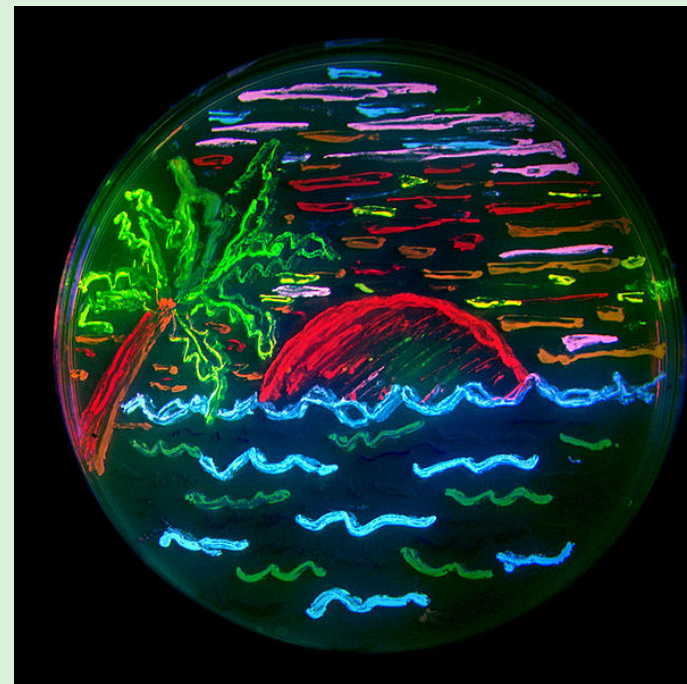
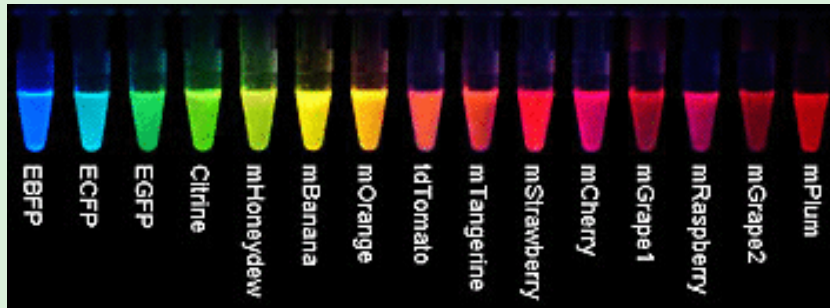


2008 Nobelova cena za chemii (Osamu Shimomura, Marty Chalfie a Roger Tsien)

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

Modifikace GFP

Roger Tsien



První povolená transgenní plodina



Rajče Flavr-Savr

schváleno v USA v roce 1994
obrácená orientace genu pro enzym
polygalakturonasu, která normálně
degraduje pektin v buněčných
stěnách a vede k měknutí plodů

od jeho pěstování se již upustilo

2010 - v Indii se vrací k tématu - využili RNA interference, aby potlačili u zrajícího ovoce tvorbu alfa-mannosidázy a beta-D-N acetylhexosaminidázy, které mají „na svědomí“ dozrávání: možné použití také u banánů, papáji, manga a dalšího ovoce ke snížení posklizňových ztrát.

Herbicid tolerantní plodiny

- ☞ transgenní plodiny tolerující **nespecifické herbicidy** (HTP)
- ☞ jejich použití je z hlediska ochrany rostlin složitější - umožňují získat prakticky čistou monokulturu = kritika z hlediska biologické rozmanitosti
- ☞ rizikem je **vznik plevelů tolerujících herbicid** podobně jako transgenní plodina - mohou vznikat jak přirozenými mutacemi, tak přímým přenosem transgenu podmiňujícího necitlivost (v případě křížitelnosti a vzniku plodného potomstva) - u nás je rizikem řepka.
- ☞ zprávy z USA a Argentiny o plevelech necitlivých na glyfosát, což se klade za vinu pěstování **RR sóji** (Roundup Ready) vyvolávající potřebu opakované aplikace glyfosátu

Bt-plodiny

produkují δ -toxin z *Bacillus thuringiensis*

- ☞ kukuřice MON 810 - se pěstuje od roku 2005 je odolná vůči zavíječi kukuřičnému



zavíječ kukuřičný - *Ostrinia nubilalis*

je jedním z nejvýznamnějších škůdců kukuřice, který **snižuje výnosy** a kvalitu zrna

u poškozených obilí se navíc **zvyšuje obsah afaltoxinů**

zároveň také **zvyšuje lámavost stébel**, což znamená sklizňové ztráty

Danaus plexippus, danao stěhovavý
„Monarch“ imago a housenka



Amflora - GM brambor



- Ludwigshafen, Německo - 2. březen 2010 - Evropská komise povolila Amfloru, geneticky modifikovanou bramboru BASF s optimalizovaným obsahem škrobu, pro komerční použití v Evropě
- Žádost o schválení Amflory byla ve Švédsku podána v roce 1996.
- Odrůda této brambory tak může být nyní používána pro výrobu průmyslového škrobu.
- Evropská agentura pro bezpečnost potravin (EFSA) při několika příležitostech v průběhu schvalovacího procesu opakovaně zdůraznila bezpečnost Amflory pro lidi, zvířata a životní prostředí.

Zlatá rýže

Ingo Potrykus



nese geny pro tvorbu β -karotenu lykopenu (provitamin A)
pod kontrolou endosperm-specifického promotoru

psy (phytoene synthase) z narcisu *Narcissus pseudonarcissus*
crtI z půdní bakterie *Erwinia uredovora*

bakteriální gen funguje jako katalyzátor dokončení biosyntézy
lykopenu

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

http://en.wikipedia.org/wiki/Golden_rice

Doporučené adresy

BIOTRIN je nezisková organizace vytvořená vědeckými pracovníky pro šíření informací o moderních biotechnologiích.

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

vydávají internetový bulletin **SVĚT BIOTECHNOLOGIÍ**, Bílá kniha **Gate2Biotech** - vše o českých biotechnologiích na jednom místě:

<http://www.gate2biotech.cz/>

prezentace o transformaci

<http://www.life.umd.edu/classroom/BSCI411/Liu/lecture11.pdf>

postřehy z pěstování transgenních plodin:

<http://www.gate2biotech.cz/postrehy-z-prvnich-sedmnacti-let-pestovani-transgennich-plodin/>

hebicid glyfosát a rezistence:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Glyphosate>

Postřehy z prvních sedmnácti let pěstování transgenních plodin

Dr. Jaroslav Salava, VÚRV, v.v.i. Praha - Ruzyně

v roce 2012 byl zaznamenán 100 násobný nárůst ploch pěstování GM plodin:

- 1996 (v roce, kdy byly uvedeny na trh) 1,7 miliónu ha
- 2012 170 miliónů ha

přijímání transgenních plodin je známkou toho, že jsou pro farmáře užitečné


nevýhodou je vznik rezistentních plevelů i škůdců

<http://www.gate2biotech.cz/postrehy-z-prvnich-sedmnacti-let-pestovani-transgennich-plodin/>

Klasifikace antibiotik podle účinnosti

- inhibitory syntézy bakteriální **buněčné stěny**
- antibiotika ovlivňující **permeabilitu membrán**
- **bakteriostatické** inhibitory syntézy proteinů
- **baktericidní** inhibitory syntézy proteinů

využívají se jako selekční markery



1. Inhibitory syntézy bakteriální buněčné stěny

β -laktamová antibiotika

peptidoglykan = vysoce zesíťovaná molekula, která zabraňuje plazmoptýze plazmatické membrány bakterie v hypotonickém prostředí

inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny způsobí její rozštěpení



odkrytí plazmatické membrány vede k plazmoptýze bakteriálních buněk

β -laktamáza štěpí strukturu antibiotika = vede k inaktivaci

Stadia tvorby bakteriální buněčné stěny

I. biosyntéza základních stavebních jednotek - uvnitř buňky

Cykloserin inhibuje jejich dokončení

II. přenos stavebních jednotek vně membrány a jejich kovalentní vazba na již existující buněčnou stěnu

inhibuje Vancomycin a Bacitracin

III. zesíťování peptidoglykanových polymerů do pevného skeletu

inhibují peniciliny a cephalosporiny

Peniciliny

Amoxycilin
Amoxycilin-klavunalát K
Ampicilin
Carbenicilin
Penicilin G
Penicilin V
Ticarcilin-klavunalát K

Cephalosporiny

Cefalexin
Cefotaxim

Kyselina klavunolová = specifický inhibitor β -laktamázy

2. Antibiotika ovlivňující permeabilitu membrány

antibakteriální

Gramicidin
Polymixin B

antifungální

Amphotericin
Nystatin

3. Bakteriostatické inhibitory proteosyntézy

reversibilní inhibice: Chloramfenikol
Doxycyklin
Erythromycin
Tetracyklin
Oxyteracyklin

4. Baktericidní inhibitory proteosyntézy

aminoglykosidy:

Gentamycin
Hygromycin B
Kanamycin
Neomycin
Streptomycin

inhibitory metabolismu NK:

Rifampicin
kyselina nalidixová

antimetabolity:

Methotrexat
Nitrofurantoin

analogy NK:

5-florouracil