


Metody transformace I.

Agrobacterium tumefaciens



Geneticky modifikované plodiny

- ovlivnění vlastností rostlin:
 - velikost (výnos), textura, sladkost...
 - odolnost proti suchu
 - rychlost růstu v různých půdních podmínkách
 - závislost na hnojivech
 - odolnost vůči škůdcům a nemocem

Dříve pomocí selektivního šlechtění.



Jak vytvořit
transgenní rostlinu?

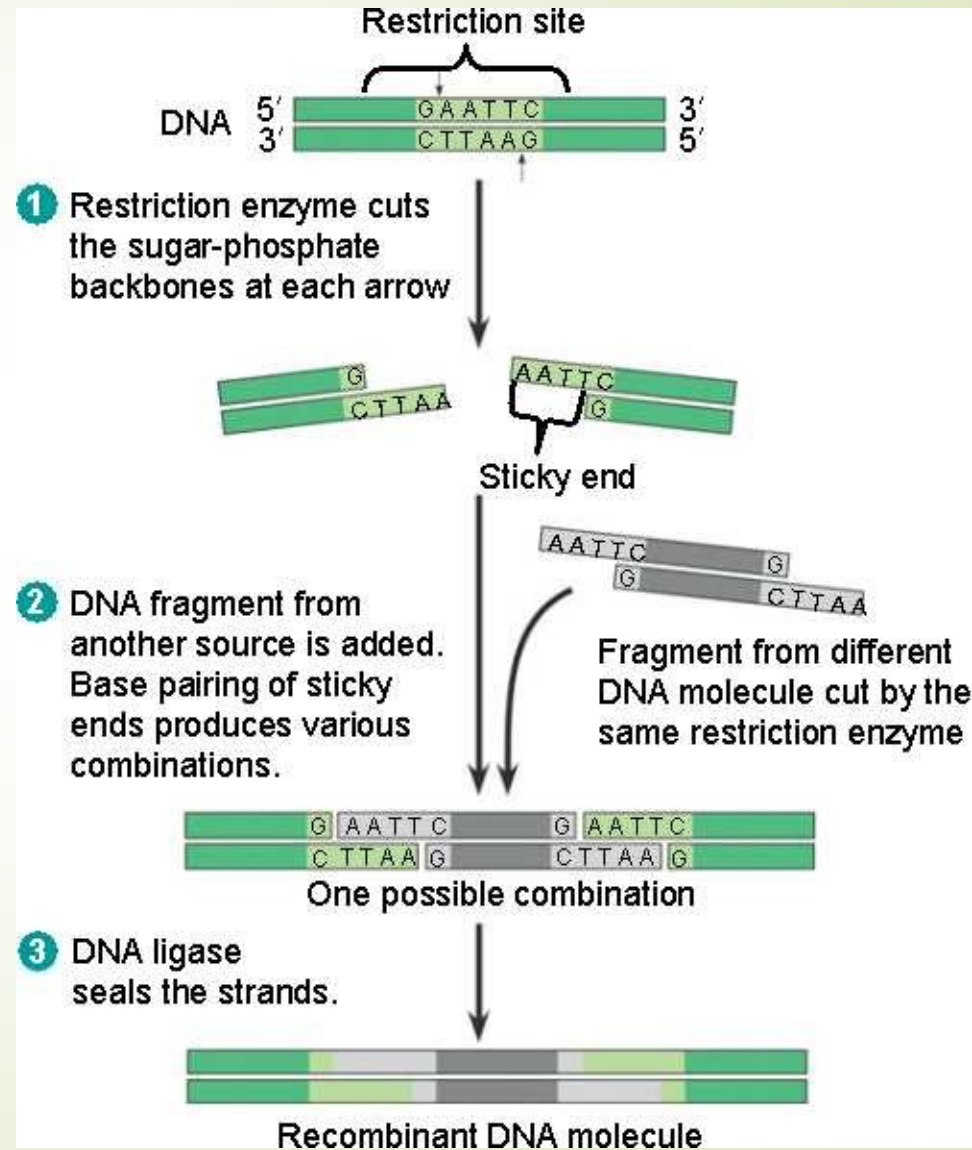
Obecné schéma transformace

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

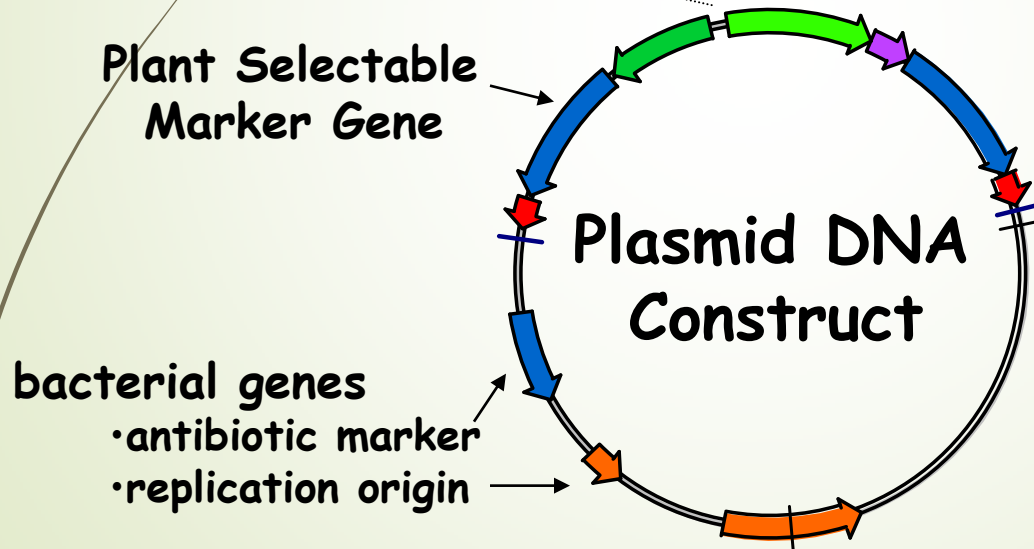
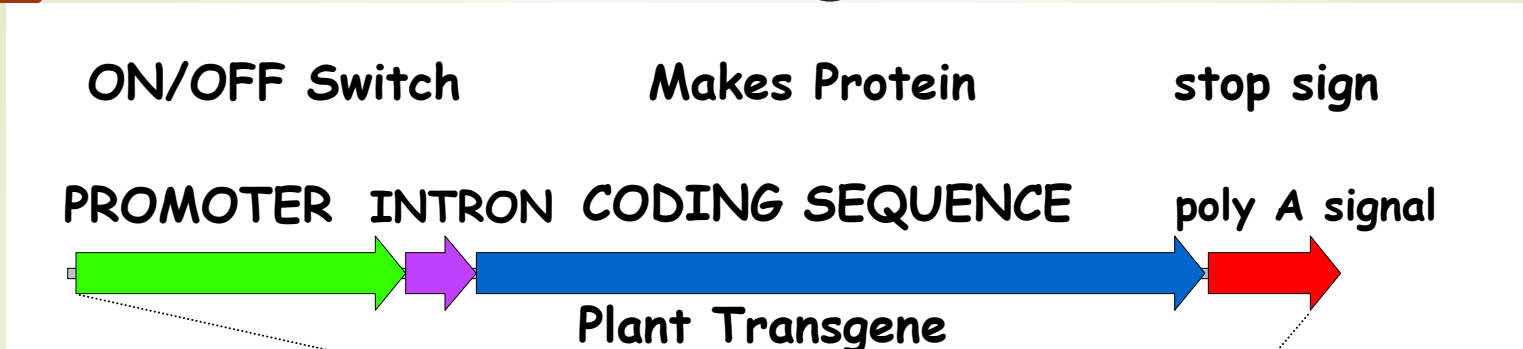
Genetická modifikace

► Potřebujete:

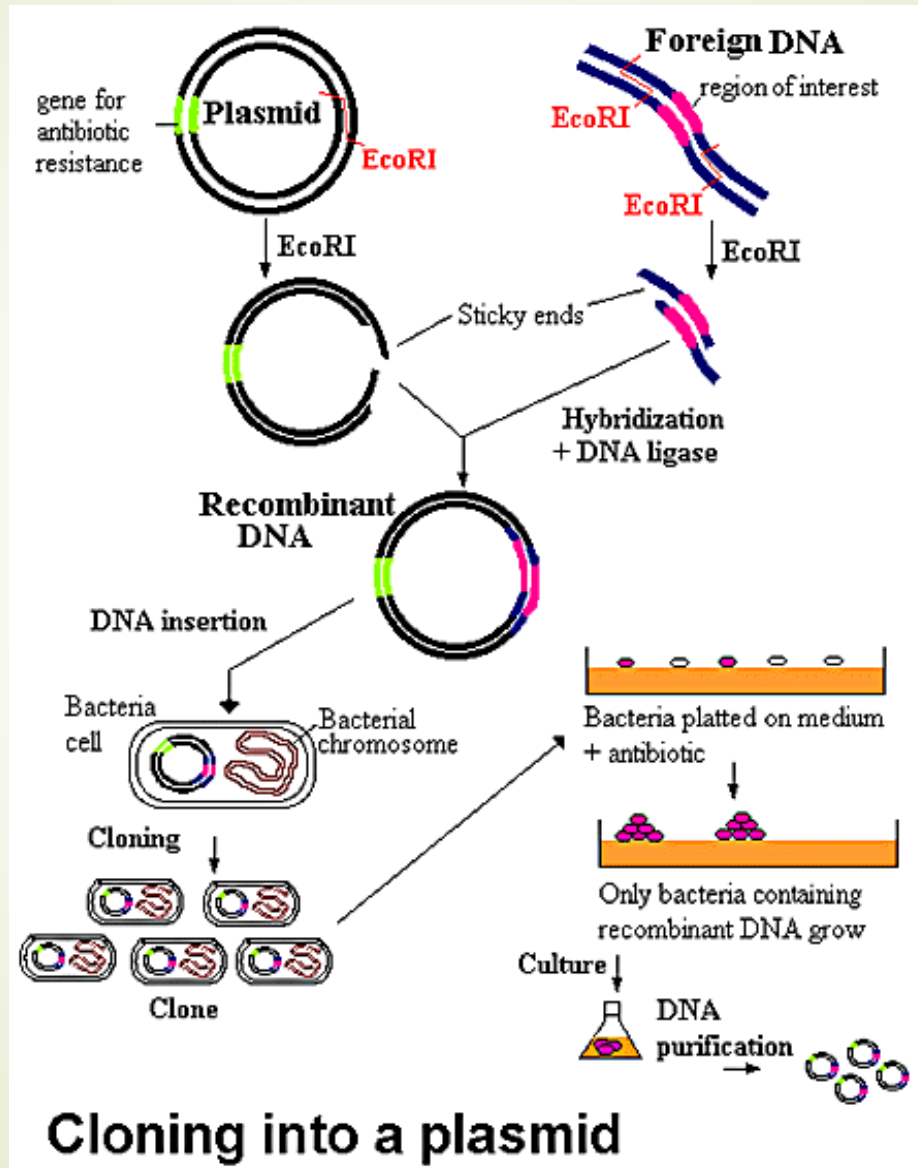
- znát DNA sekvenci genu, který vás zajímá (gene of interest, GI)
- do blízkosti GI vložit snadno identifikovatelný markerový gen
- oba dva geny vložit do jaderného genomu rostliny
- dobrý zobrazovací postup pro nalezení úspěšné inserce



Tvorba transgenu



Klonování do plasmidu





Jak dostat DNA do
buňky?

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

Chapter 18

Genetic Engineering of Plants: Methodology

Table 18.1

TABLE 18.1 Plant cell DNA-delivery methods

Method	Comment
→ Ti plasmid-mediated gene transfer	An excellent and highly effective system that is limited to a few kinds of plants
→ Microprojectile bombardment	Used with a wide range of plants and tissues; easy and inexpensive
Viral vectors	Not an effective way to deliver DNA to plant cells
Direct gene transfer into plant protoplasts	Can be used only with plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants
Microinjection	Has limited usefulness because only one cell can be injected at a time; requires the services of a highly skilled individual
Electroporation	Generally limited to plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants
Liposome fusion	Can be used only with plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants



*Agrobacterium
tumefaciens*

Půdní bakterie

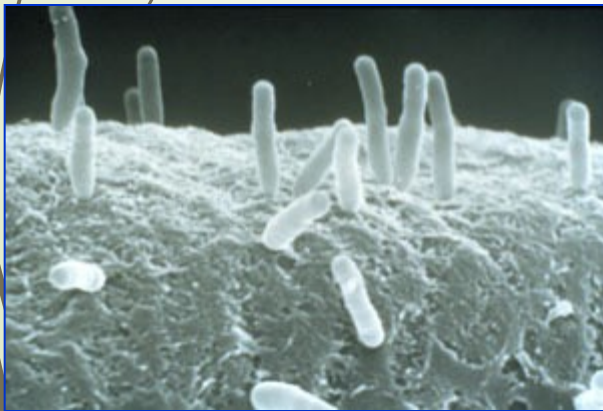
Pseudomonas, Corynebacterium
Agrobacterium, Rhizobium,
Bradyrhizobium

Agrobacterium tumefaciens
Agrobacterium rhizogenes

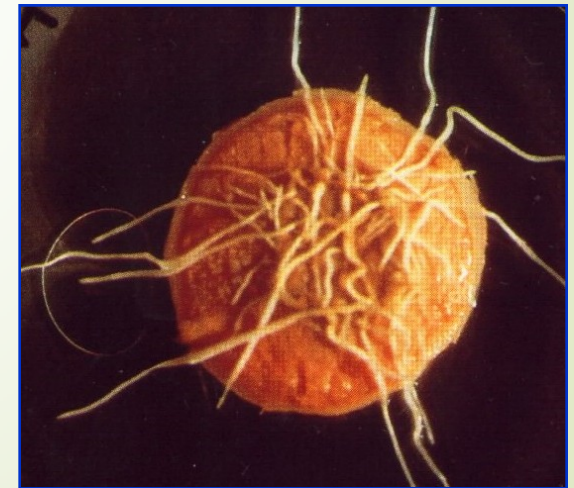
nádory
kořínky

Ti plasmid
Ri plasmid

T-DNA



„crown gall“



„hairy roots“ na segmentu
kořene mrkve



Transformace rostlin Ti plasmidem *Agrobacterium tumefaciens*

- *A. tumefaciens* je gramnegativní půdní bakterie, která přirozeně transformuje rost. buňky, výsledkem jsou nádory „crown gall“
- Tvorba nádorů je výsledkem přenosu, integrace a exprese genů na specifickém segmentu plasmidu *A.t.* (**T-DNA** – transferová DNA)
- T-DNA je součástí velkého **Ti plasmidu** (tumor indukujícího)

T-DNA Ti plasmidu (WT)

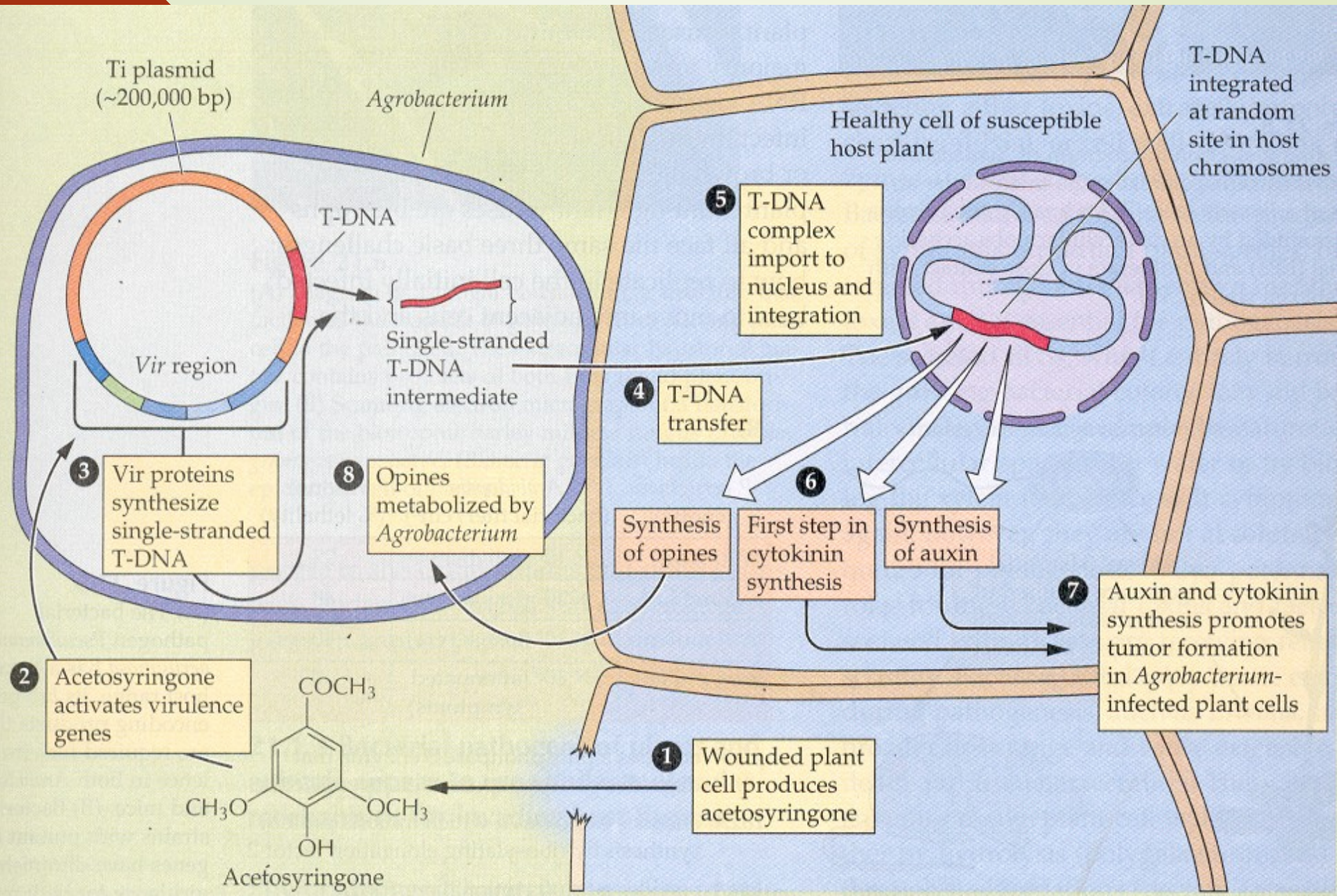
1. geny pro biosyntézu **auxinů** (*iaaM* tryptofan monooxygenáza a *iaaH* indolyl-3-acetamid hydroláza) a **cytokininů** (*ipt* izopentenyltransferáza) = dediferenciace buněk a vznik nádorů („**crown gall**“)
2. geny pro syntézu nádorově specifických látek, tzv. **opinů** (**bazické aminokyseliny**: oktopin, nopalin, manopin, agropin, histopin, kukumopin) = zdroj dusíku, uhlíku a energie pro bakterie



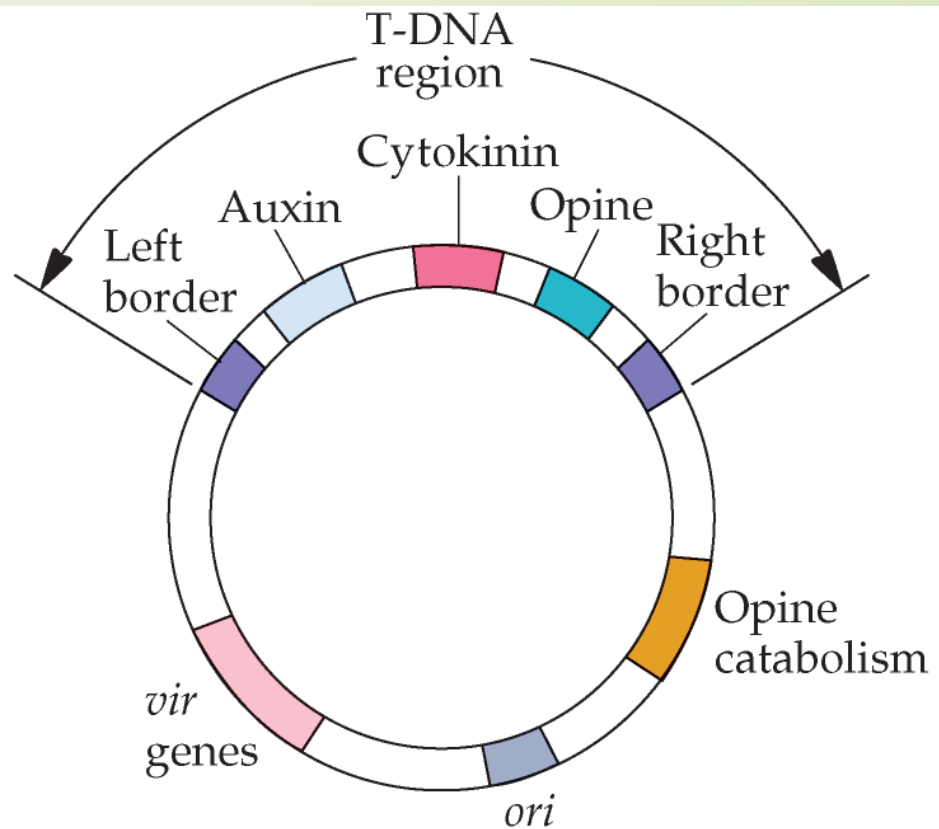
Clarence I. Kado
University of California, Davis

odzbrojené vektory – odstraněné původní bakteriální geny a vloženy tzv. geny zájmu

Infekce rostliny



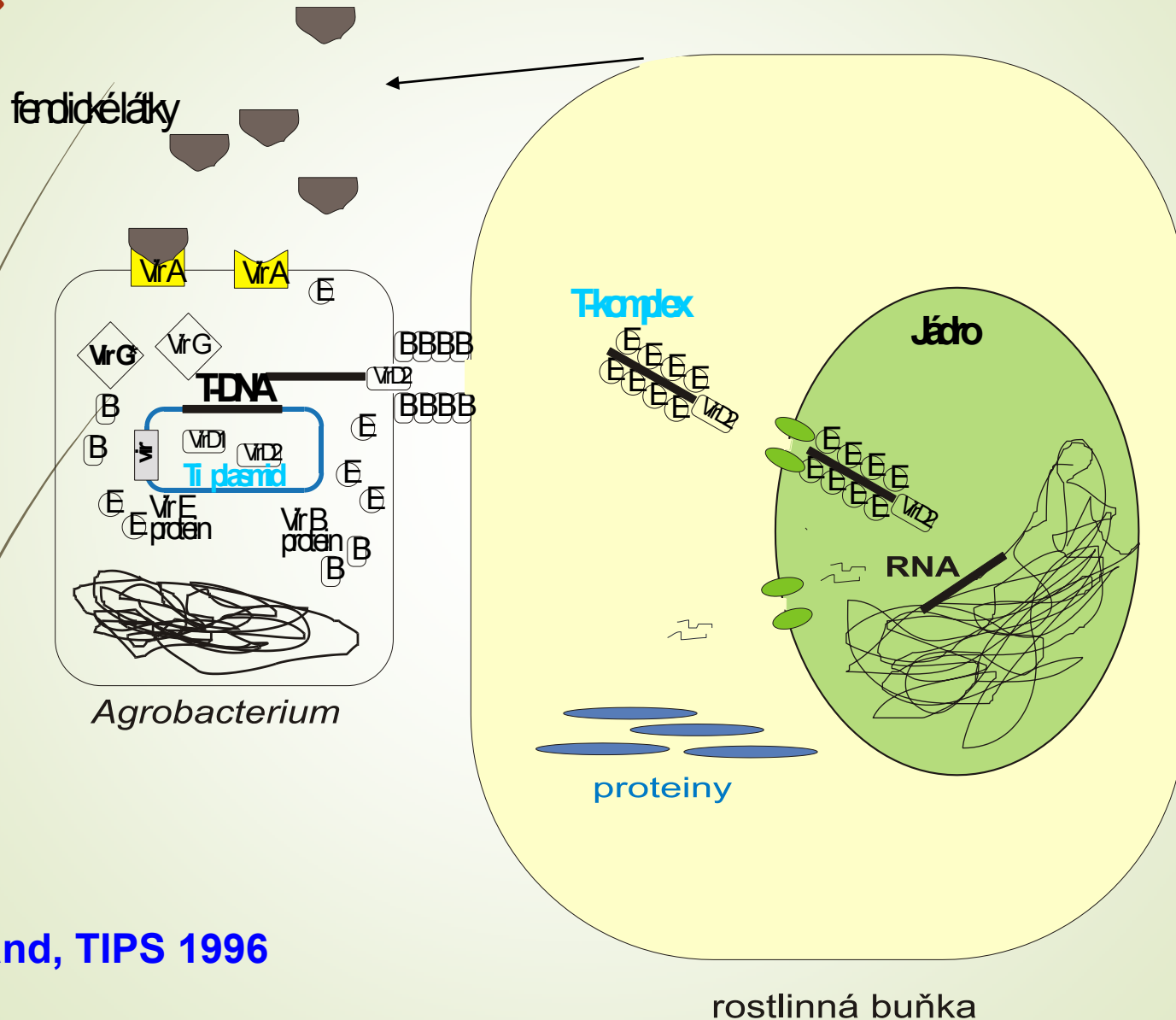
Struktura Ti plasmidu



The infection process:

1. Wounded plant cell releases phenolics and nutrients.
2. Phenolics and nutrients cause chemotactic response of *A. tumefaciens*
3. Attachment of the bacteria to the plant cell.
4. Certain phenolics (e.g., acetosyringone, hydroxyacetosyringone) induce vir gene transcription and allow for T-DNA transfer and integration into plant chromosomal DNA.
5. Transcription and translation of the T-DNA in the plant cell to produce opines (food) and tumors (housing) for the bacteria.
6. The opine permease/catabolism genes on the Ti plasmid allow *A. tumefaciens* to use opines as a C, H, O, and N source.

Mechanismus přenosu T-DNA Ti plasmidu intermediární vektor



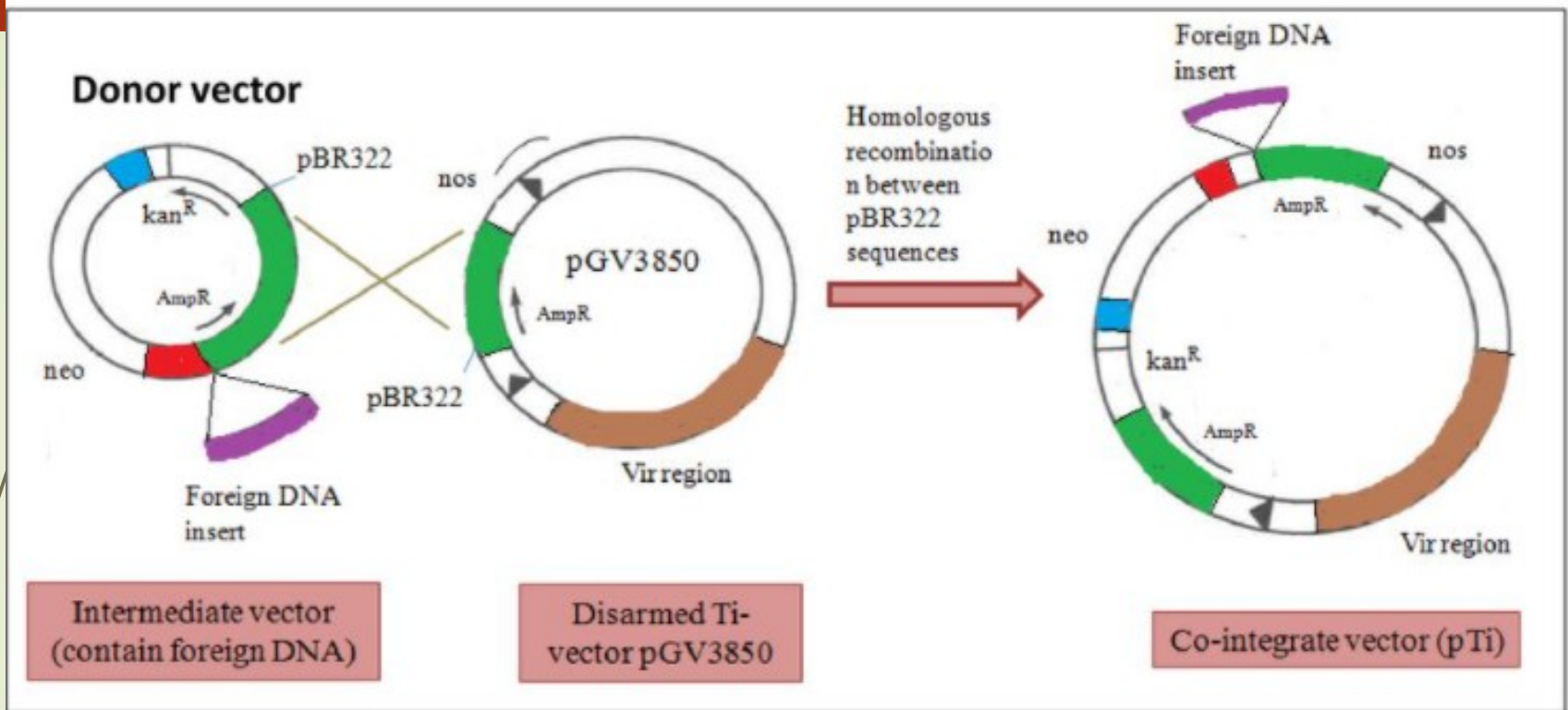
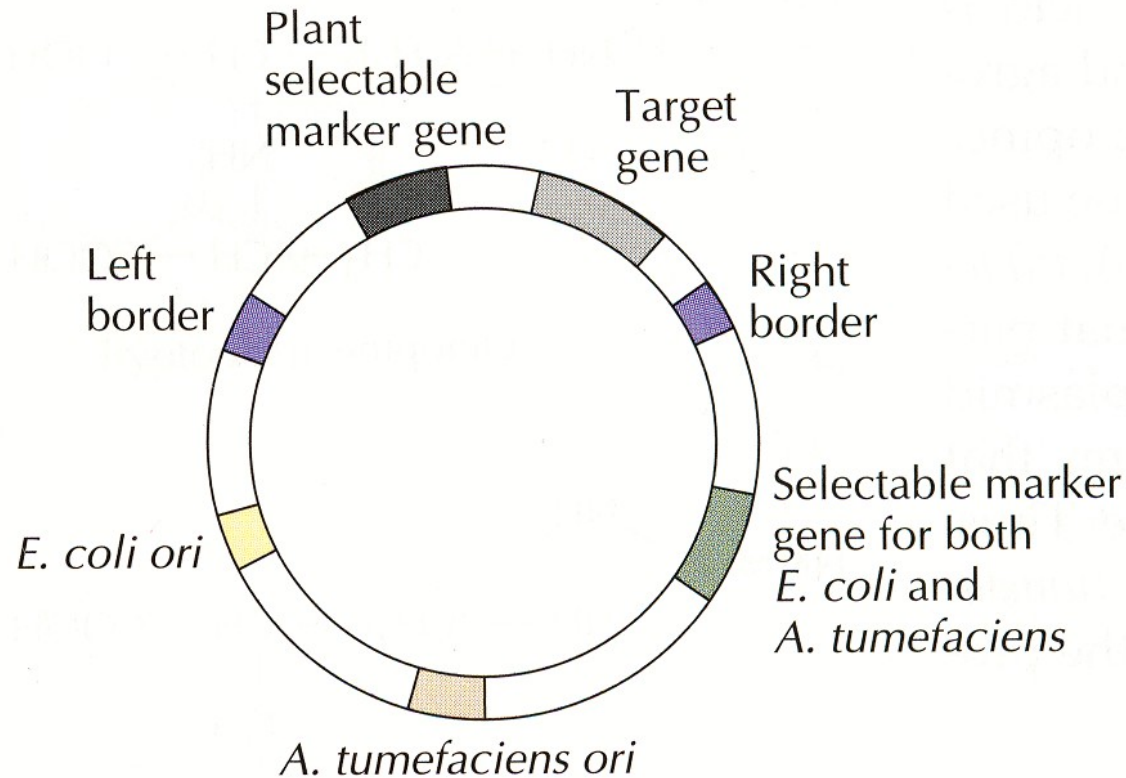


Fig Construction of a Co-integrate vector (foreign gene cloned into an appropriate plasmid is integrated with a disarmed Ti-plasmid through homologous recombination).

The binary Ti plasmid system involves using a small T-DNA plasmid and a disarmed (i.e., no T-DNA) Ti plasmid in *A. tumefaciens*

A

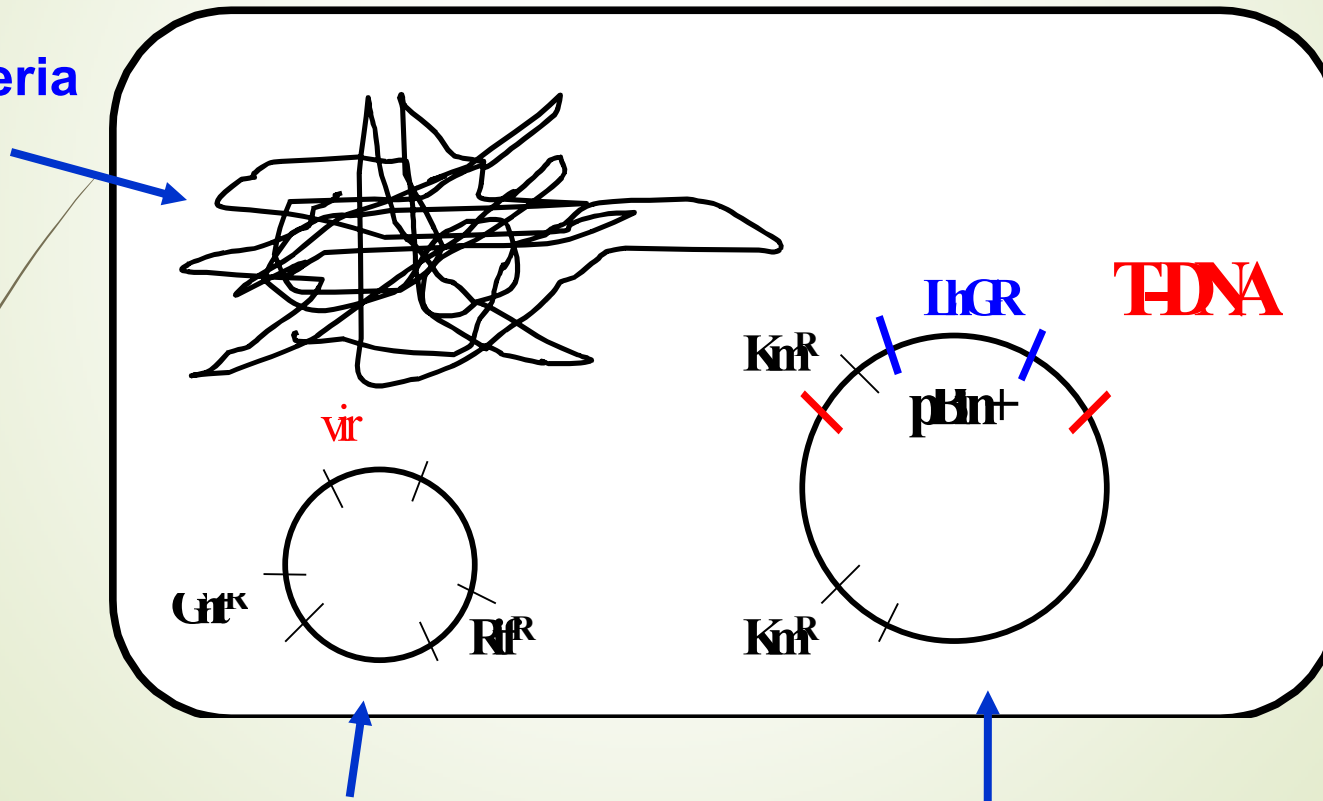


Agrobacterium tumefaciens

upravený binární vektor LhGR

Šámalová 2005

DNA
agrobakteria



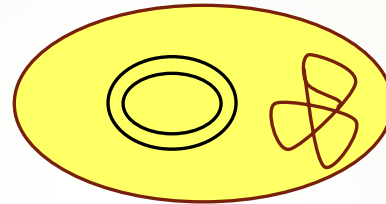
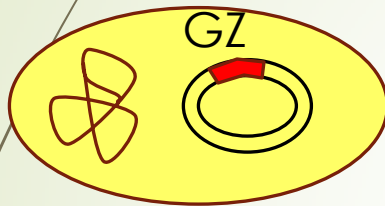
část plazmidu kódující
virulenci

upravený plasmid

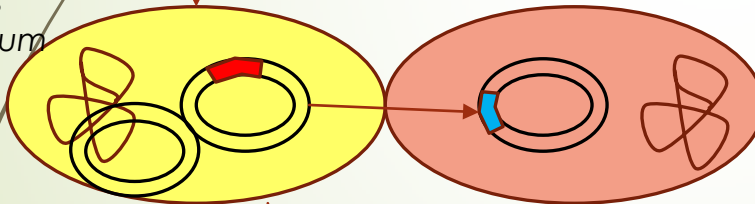
Jak dostat GZ do *Agrobacterium*?

- elektroporace, „freeze/thaw“ metoda, triparentální konjugace

E. coli

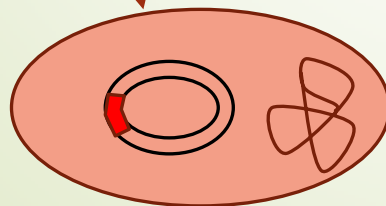


Konjugace s *Agrobacterium*



Agrobacterium

Plasmid s GZ se integruje do Ti plasmidu homologní rekombinací



Infekce rostlinných buněk

Rekombinantní *Agrobacterium* (intermediární vektor)

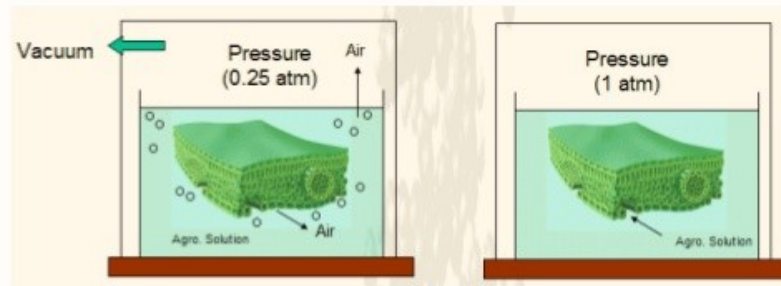
Příklady způsobu transformace pomocí *Agrobacterium*

➤ *Arabidopsis* floral dip



➤ Vacuum Infiltration

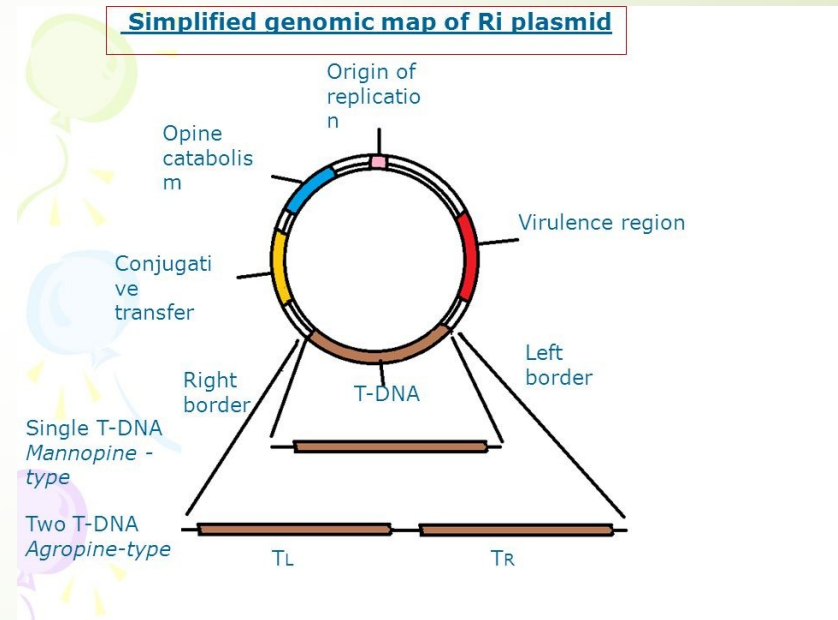
- Plant leaf disks are placed in a suspension of bacteria and vacuum pulled
- Air is released like a sponge being squeezed
- Vacuum is released and solution floods tissue
- Plant disk is cultured



Agrobacterium rhizogenes

T-DNA Ri (hairy-root inducing) plasmidu (WT)

2 fragmenty: T_L a T_R –
mohou být vloženy do
rostlinného genomu
nezávisle na sobě



<http://slideplayer.com/slide/11366596/>

geny pro syntézu **opinů** (manopin, agropin a kukumopin)
= zdroj dusíku, uhlíku a energie pro bakterie


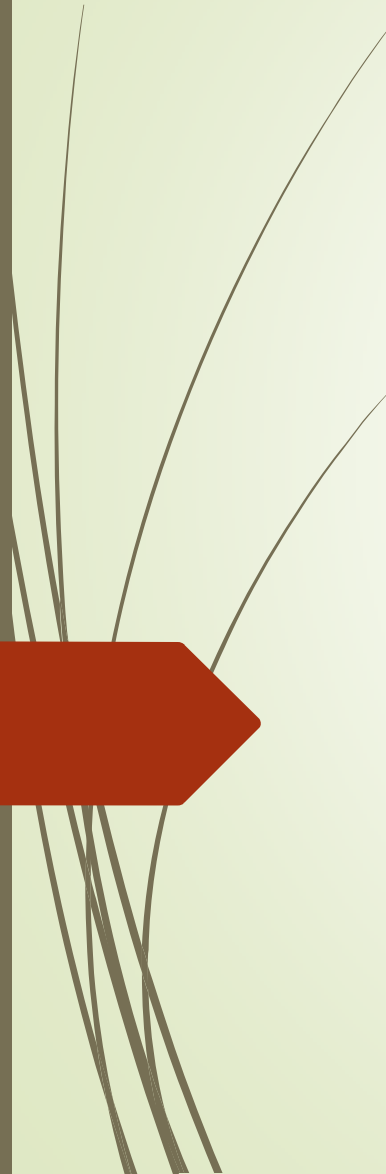


Agrobacterium

Funguje dobře pro většinu dvouděložných, ale ne tak dobře pro jednoděložné rostliny



jiné metody pro transformaci



Jak poznám, že
došlo k úspěšné
inzerci genu?

Selekční a signální markery

1. **rezistence vůči antibiotikům** → kanamycin
hygromycin
gentamycin
a **cytostatikům (antimetabolika)** → methotrexát

2. **Transgen pro beta-glukuronidázu – GUS** (Zatím nejúspěšnější reportérový transgen. Vhodné substráty mění na modré produkty nebo fluoreskující látky)

3. **Transgen pro luciferázu.** Využívají se cDNA ze světlušky *Photinus pyralis* nebo kódující sekvence *Vibrio harvei*. Po dodání substrátu (luciferin, ATP) k rostlinnému extraktu nebo do kultivačního media dochází k emisi záření měřitelného luminimetrem, scintilačním počítačem, CCD kamerou. Luciferin špatně proniká do pletiv, substrát je drahý.

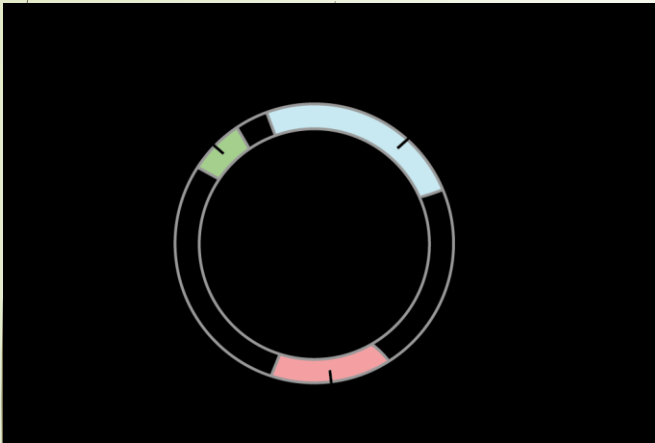
Selekční a signální markery

4. GFP („green fluorescent protein“ gen z medúzy *Aequorea victoria*). Protein GFP přeměňuje modré světlo na zelené. Má schopnost emitovat zelené světlo po ozáření modrým světlem (440-480 nm). Je to jediný protein, který má schopnost fluoreskovat bez dodání substrátu nebo kofaktorů. Zachovává si schopnost fluoreskovat, i když je fúzován s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i A-konci. Mutacemi byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou vlnovou délku. Původní gen se dobře exprimuje i v živočišných buňkách (lépe jak v rostlinách). V rostlinných buňkách je přítomen v jádře více než v cytoplazmě. Existuje i fúzní protein GFP-GUS, který má obě signální aktivity. U *A. thaliana* bylo prokázáno, že po ozáření rostlin UV světlem lze fluorescenci pozorovat pouhým okem. Vysoká exprese transgenů však může ovlivňovat životaschopnost rostlin nebo schopnost regenerace.

Some plant cell reporter and selectable marker gene systems

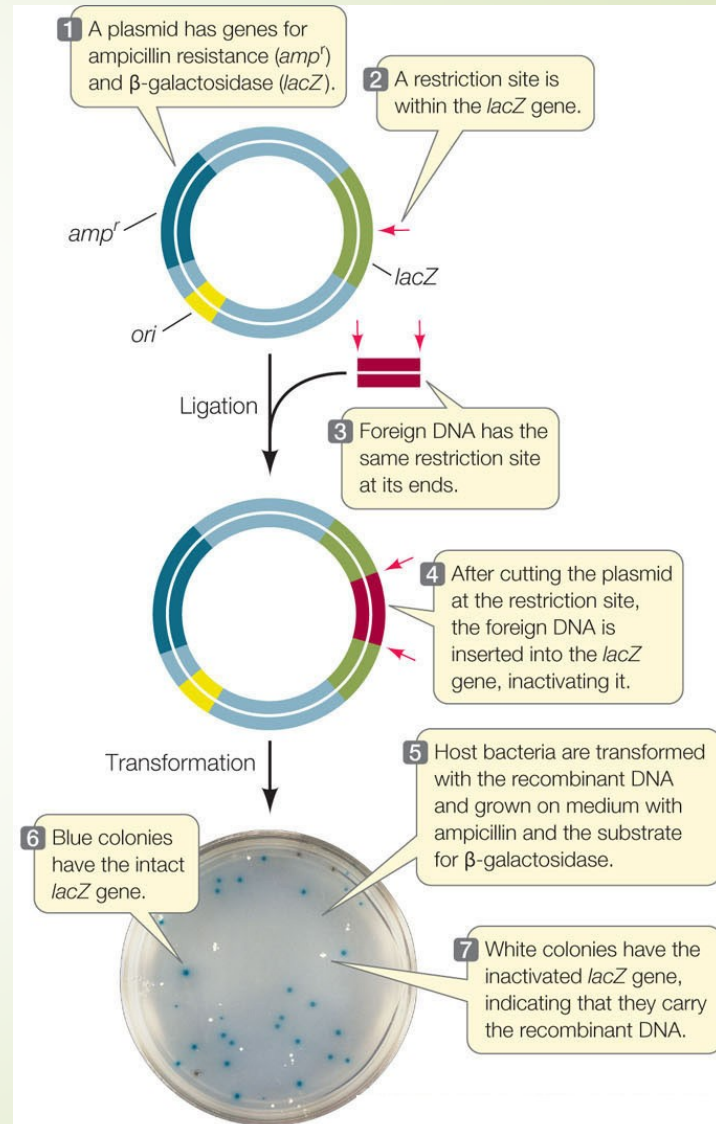
Enzyme activity	Selectable marker	Reporter gene
Neomycin phosphotransferase (kan ^r)	Yes	Yes
Hygromycin phosphotransferase (hyg ^r)	Yes	Yes
Nopaline synthase	No	Yes
Octopine synthase	No	Yes
β -glucuronidase (GUS)	No	Yes
Firefly luciferase	No	Yes
β -galactosidase	No	Yes
Bromoxynil nitrilase	Yes	No
Green fluorescent protein (GFP)	No	Yes

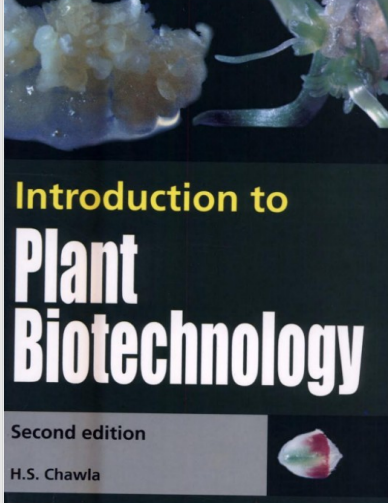
Princip rezistence vůči antibiotikům



- Na médiu s antibiotiky zůstanou živé pouze bakterie s vneseným plasmidem s genem pro rezistenci

bakteriální gen **nptII** –
neomycinofotransferáza
- Kóduje protein, který inaktivuje fosforylací širší spektrum aminoglykosidových antibiotik (např. kanamicin, neomycin)





Introduction to Plant Biotechnology

Second edition

H.S. Chawla

SCIENCE PUBLISHERS, Inc.
Post Office Box 699
Enfield, New Hampshire 03748
United States of America

Internet site: <http://www.scipub.net>

sales@scipub.net (marketing department)
editor@scipub.net (editorial department)
info@scipub.net (for all other enquiries)

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Chawla, H.S.
Introduction to plant biotechnology/H.S. Chawla.--2nd ed.
p. cm.
Includes bibliographical references and index.
ISBN 1-57808-228-5
1. Plant biotechnology. I. Title.
TP248.Z7.P55 C53 2002
631.5'233-dc21 2002070782

ISBN 1-57808-228-5

© 2002, Copyright Reserved

Reprint 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying or otherwise, without the prior permission from the publisher. The request to reproduce certain material should include a statement of the purpose and extent of the reproduction.

Published by Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA
Printed in India

Table 23.2 Selectable marker genes used for gene transfer

Selectable marker gene	Substrates used for selection
Neomycin phosphotransferase (<i>nptII</i>)	G418, kanamycin, neomycin, paromycin
Hygromycin phosphotransferase (<i>hpt</i>)	Hygromycin B
Gentamycin acetyl transferase	Gentamycin
Streptomycin phosphotransferase	Streptomycin
Dihydrofolate reductase (<i>dhfr</i>)	Methotrexate
Phosphinothricin acetyltransferase (<i>bar</i>)	L-phosphinothricin (PPT), bialaphos
5-enolpyruvyl shikimate -3-phosphate (EPSP) synthase (<i>aroA</i>)	Glyphosate (roundup)
Acetolactate synthase mutant form (<i>als</i>)	Sulphonylurea, imidazolinones
Bromoxynil nitrilase (<i>bxn</i>)	Bromoxynil

Alternativy ke genů pro resistenci k antibiotikům

- **Rostlinný původ** genů rezistence k antibiotikům
- Geny **rezistence k herbicidům**
- „**pozitivní**“ selekční markery - podpora růstu transformovaných rostlin (pěstování na médiu, které má pro netransformované rostliny toxický nebo smrtící efekt nebo schopnost autonomní produkce hormonů nutných pro regeneraci rostlin)
- „**negativní**“ selekční markery – smrtící efekt, změna netoxického substrátu na toxický nebo přímá produkce toxické látky; obvykle zároveň s pozitivní selekcí, např. pro odstranění nežádoucích genů (např. selekční)
- **Reportérové** geny – vizualizace (např. luciferáza, GFP...)
- **Odstranění markerových genů**
- Analýza genů po transformaci pomocí **PCR** pro kontrolu, zda rostliny obsahují transgeny (bez použití selekčních nebo signálních genů)

(Breyer et al. 2014)

Nevýhoda transgeneze

- ▶ sice umožňuje vložit určitou známou vlastnost
- ▶ ale stále neumí přesně lokalizovat vložení transgenu do genomu = je dílem náhody, kam se do genetické mapy vnášený gen zařadí („off-site“)
- ▶ vznikají tak **náhodné inzerční mutace** = mohou způsobovat poškození nebo změnu aktivity genu, do kterého se transgen zařadil

tento problém řeší nové biotechnologie →