

Biotechnologie, transformace rostlin, *GMO*

úvod
metody
využití



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Biotechnologie = technologický 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	gama paprsky
pšenice	Above	azid sodný
	Lewis	neutrony
oves	Alamo-X	X-paprsky
grapefruit	Rio Red	neutrony
	Star Ruby	neutrony
<i>Cynodon dactylon</i>	Tifeagle	gama paprsky
	Tifgreen II	gama paprsky
	Tift 94	gama paprsky
	Tifway II	gama paprsky
salát	Ice Cube	ethyl methansulfonát
	Mini-Green	ethyl methansulfonát
fazol	Seafarer	X-paprsky
	Seaway	X-paprsky
šeřík	Prairie Petite	neutrony
ječmen	Diamant	gama paprsky

„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

„Tradiční“ metody transformace (vnášení DNA)

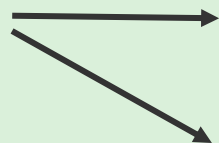
přímé

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

plazmidy

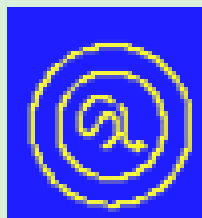


Intermediární (jeden malý plazmid)

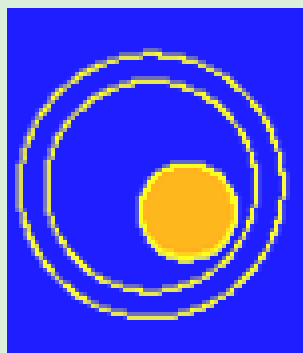
Binární (dva plazmidy: s virulentní oblastí a s T-DNA)

Transformace zprostředkovaná liposomy

1.

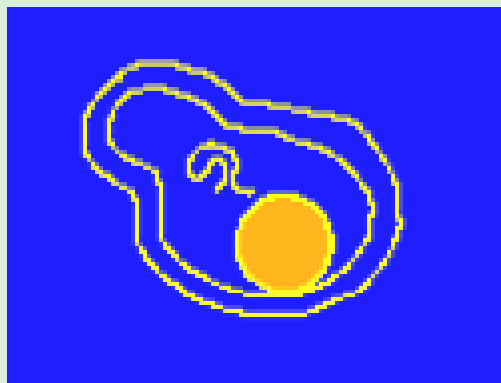


liposom + DNA



protoplast

2.



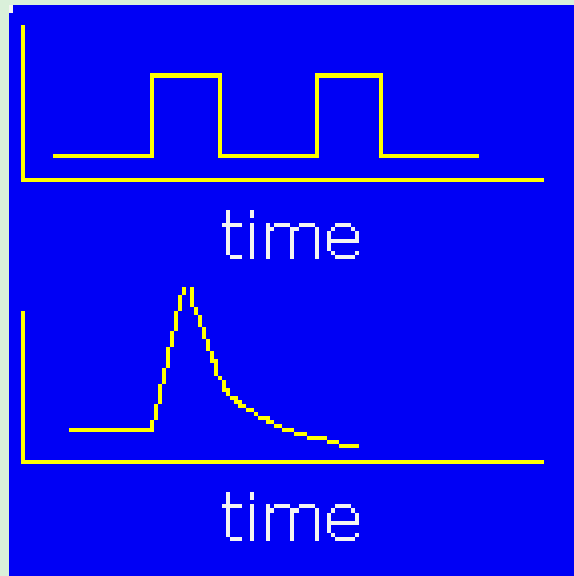
fúze membrán
protoplastu a
liposomu

Elektroporace

vyžaduje použití protoplastů

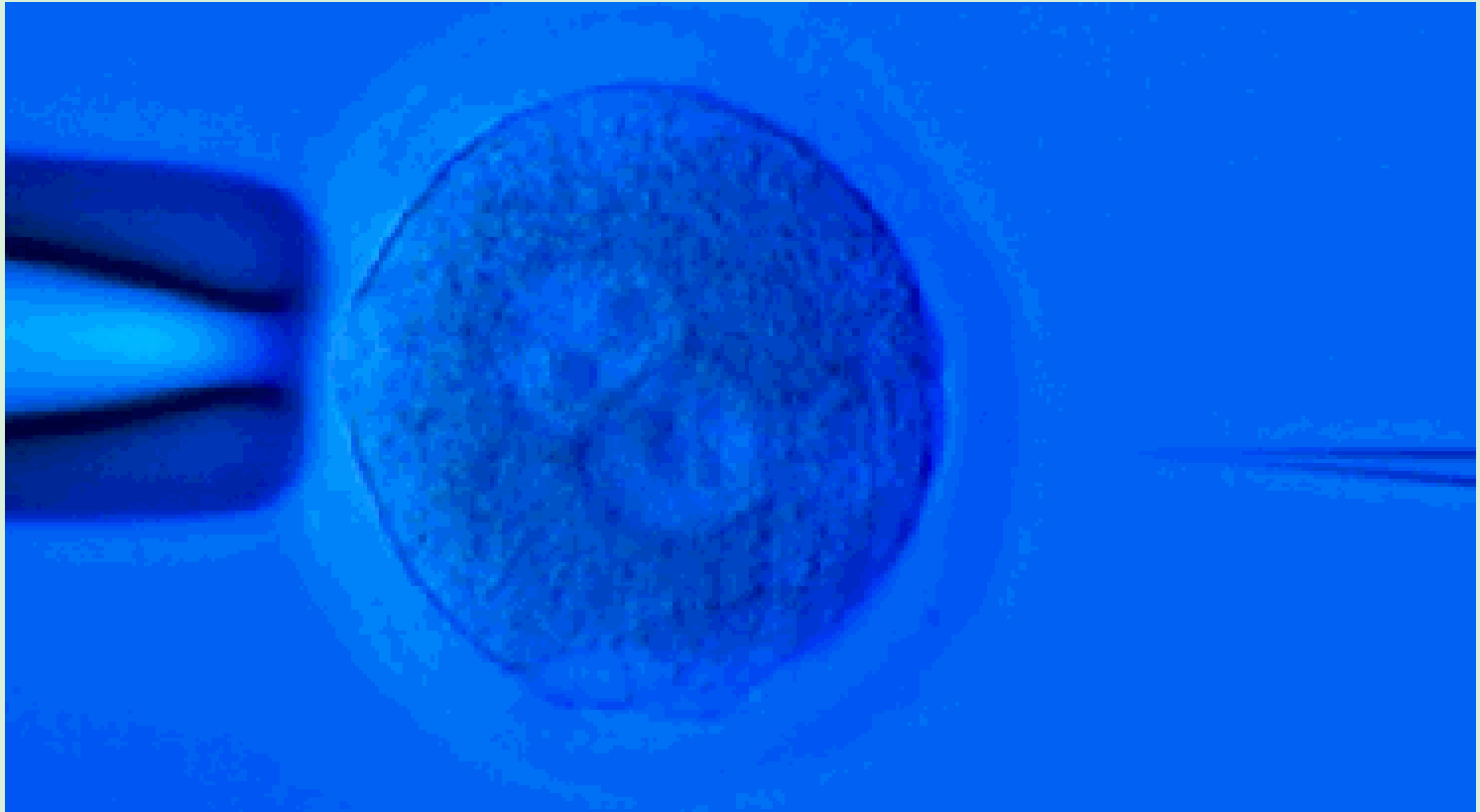
po aplikaci el.pulsu se vytvoří dočasné póry v membránách,
které umožní průniku DNA

různé typy pulsů



BioRad Laboratories

Mikroinjekce DNA do jádra



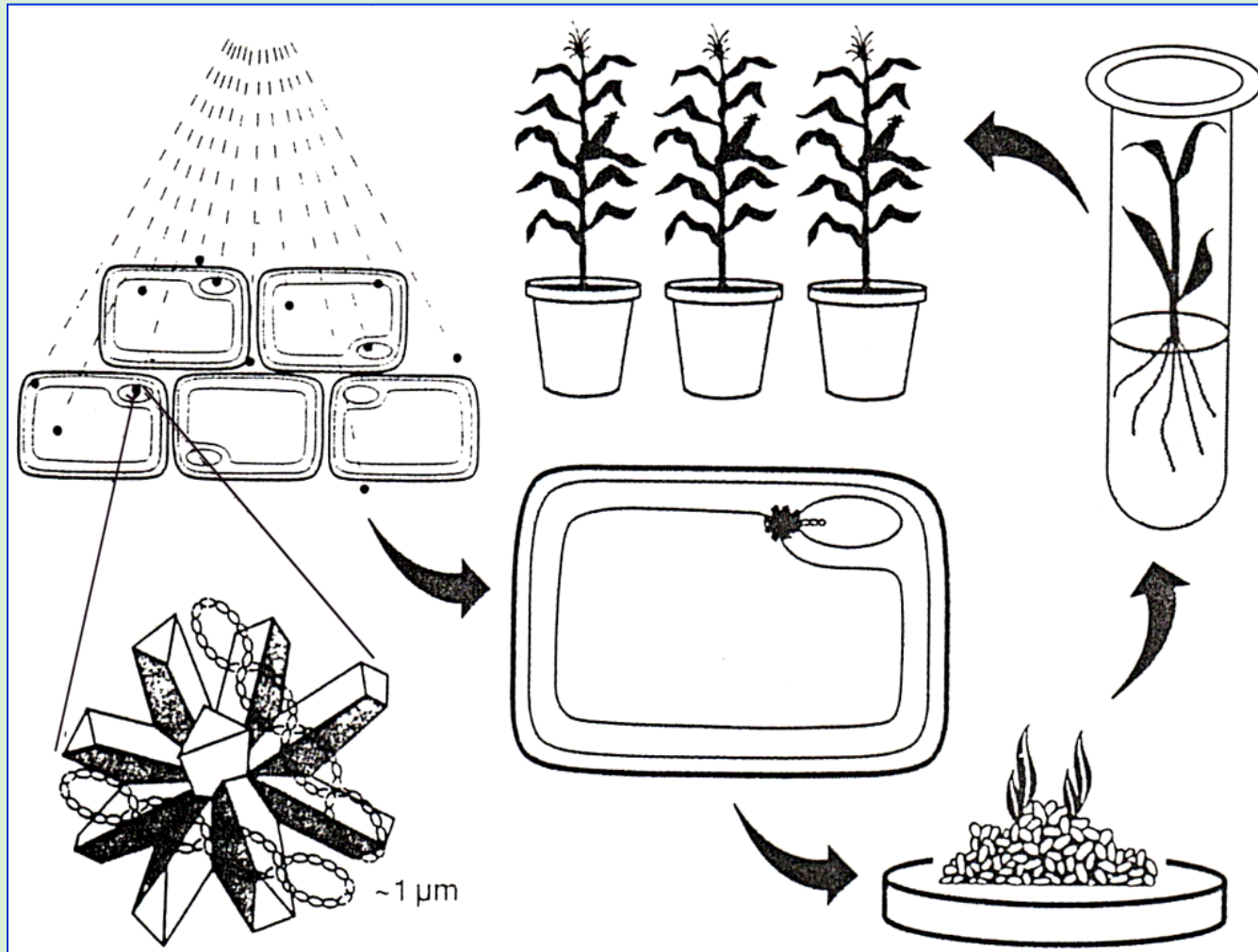
použito u protoplastů rostlin, ale častější u živočichů

Biolistické metody



BioRad Laboratories

Biolistické metody



T_0

krytal W
s DNA

~1 μm

regenerace
rezistentních rostlin

Agrobacterium tumefaciens, A. rhizogenes

Půdní bakterie: *Pseudomonas, Corynebacterium*
Agrobacterium, Rhizobium

Agrobacterium tumefaciens
Agrobacterium rhizogenes

nádory
kořínky

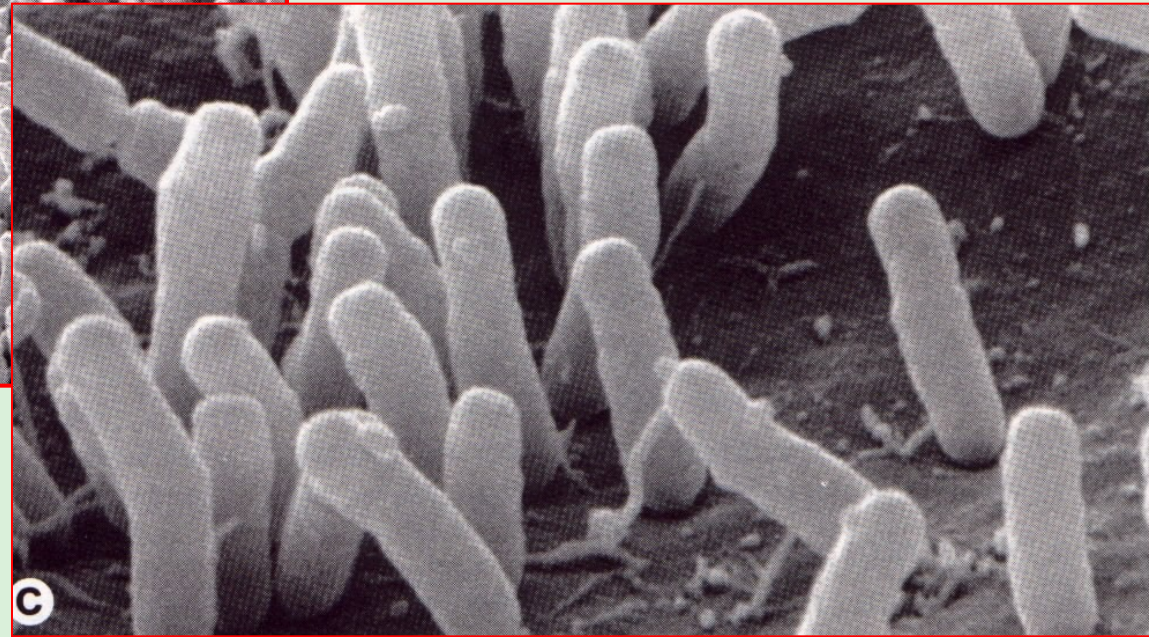
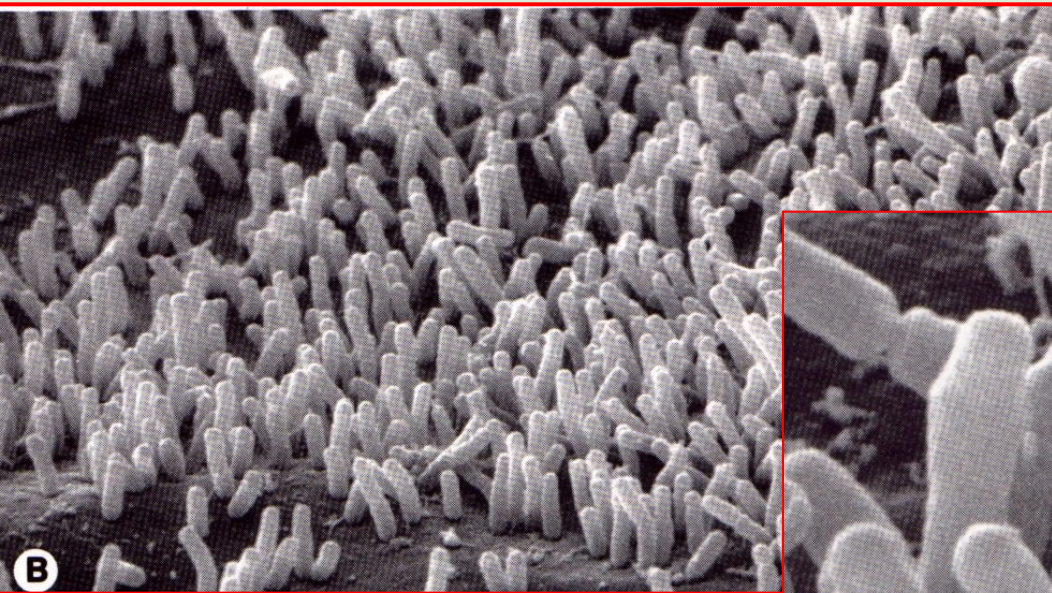
Ti plasmid
Ri plasmid T-DNA

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 (T-DNA, ze které jsou zachovány jen krajní sekvence 25 bp nezbytné pro začlenění do rostlinného genomu, jinak neobsahují žádnou DNA pocházející z *Agrobacterium*)

Agrobacterium tumefaciens

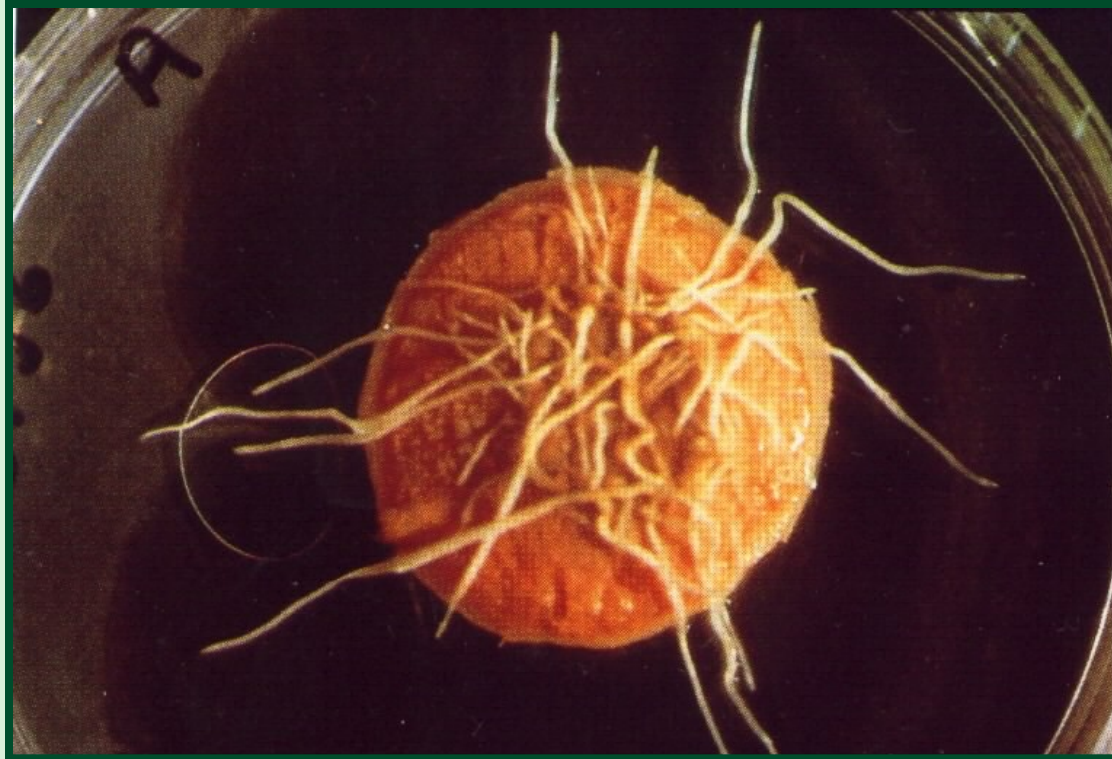


Nádor „Crown gall“



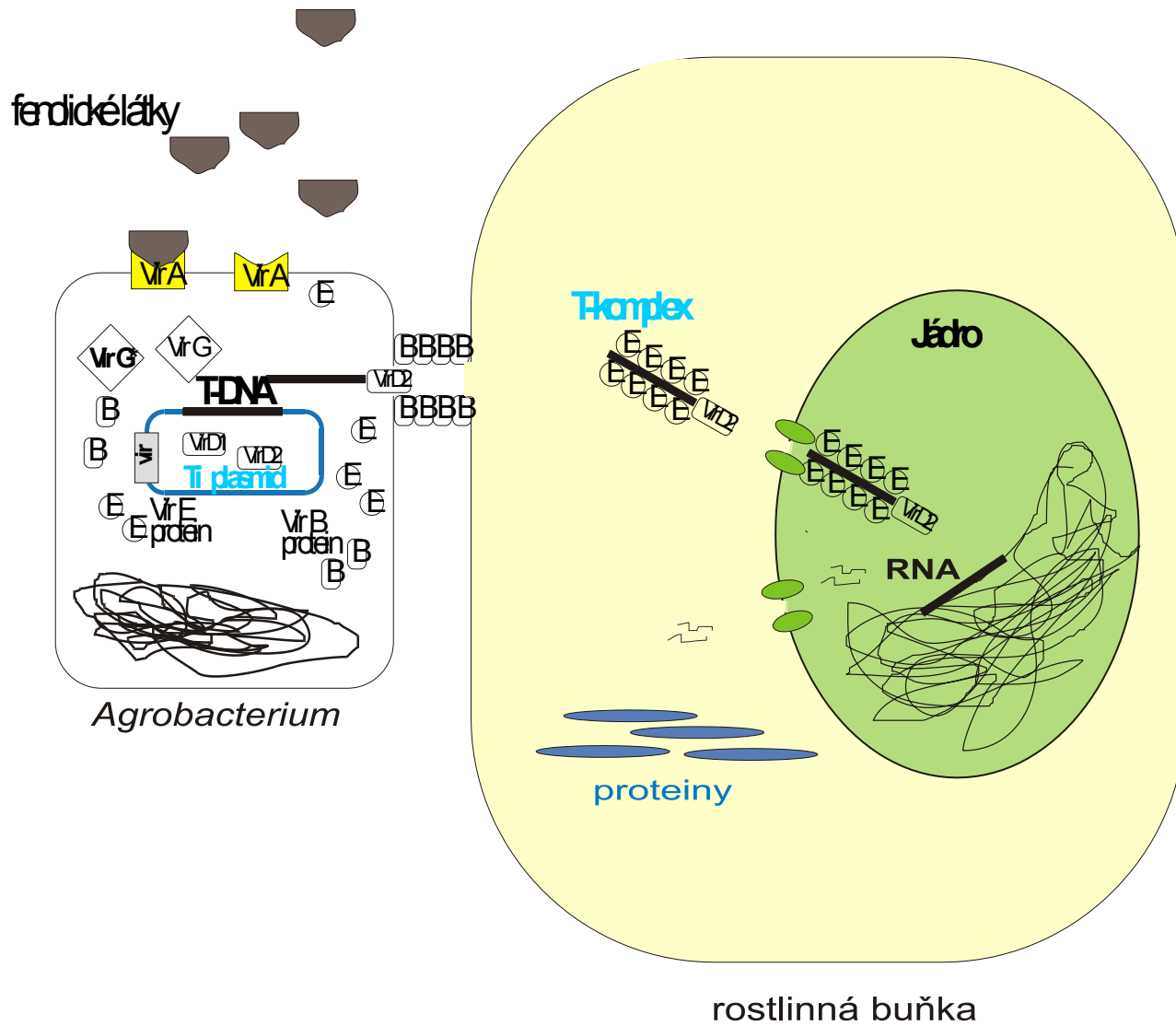
vytvořený po infekci *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium rhizogenes



indukce tvorby kořenů na segmentu kořene mrkve

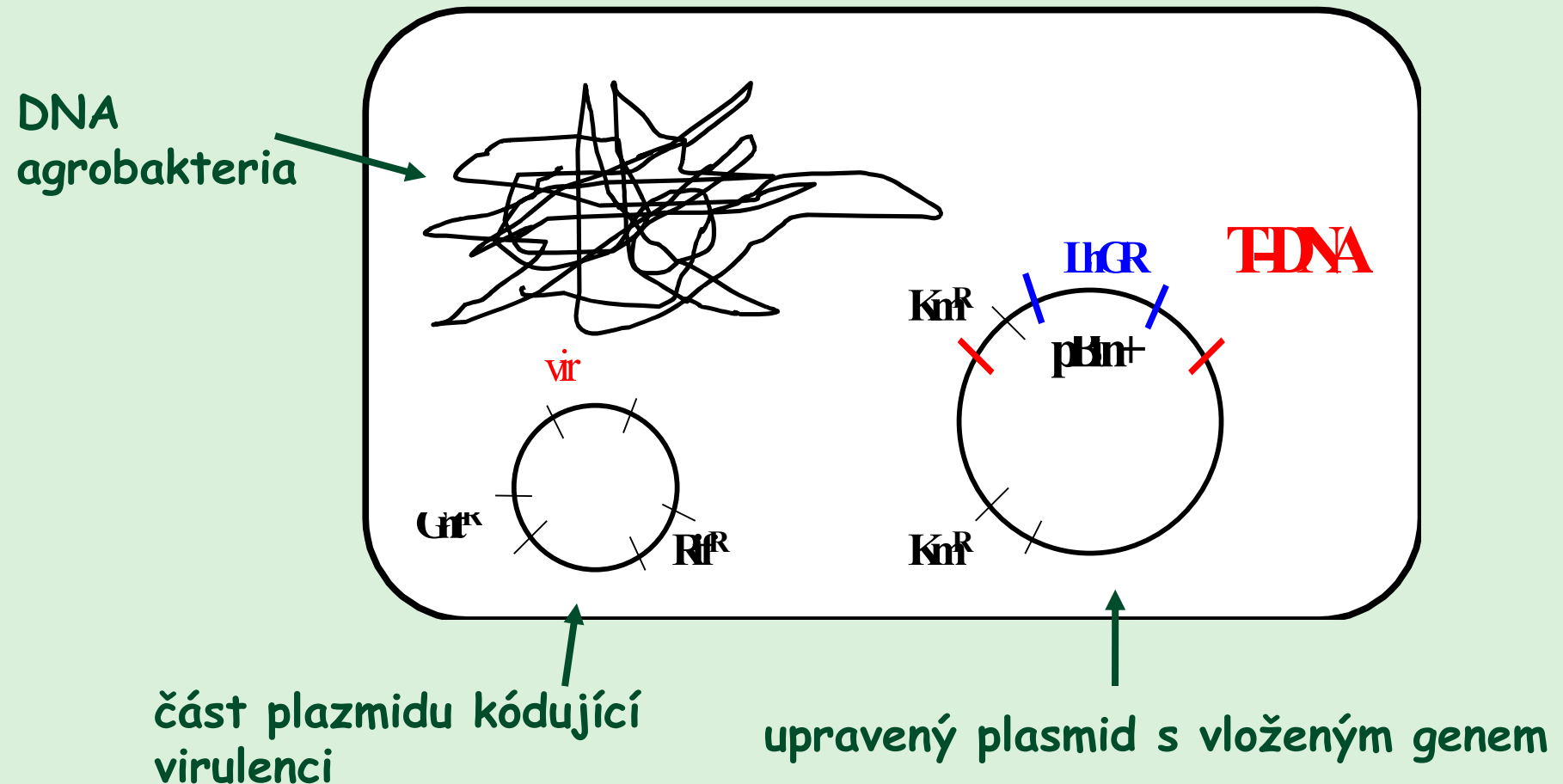
Mechanismus přenosu T-DNA intermediární vektor



Agrobacterium tumefaciens

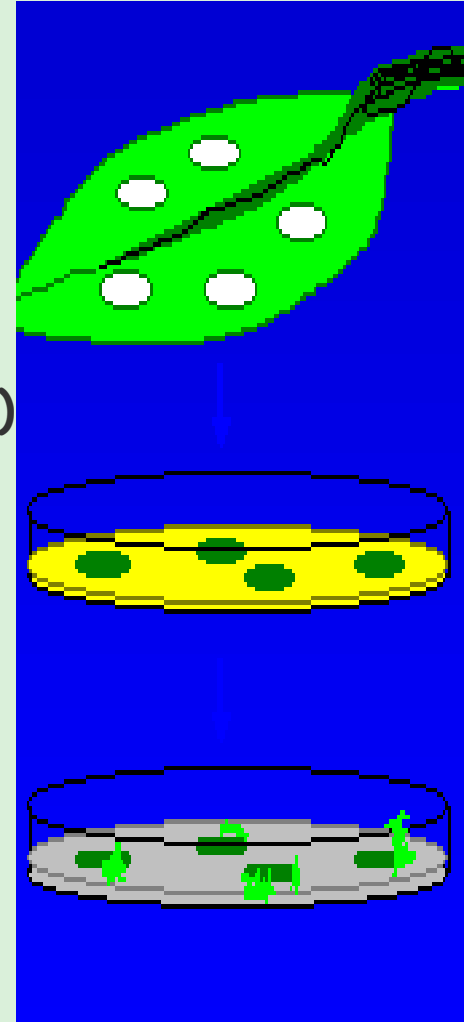
upravený binární vektor LhGR

Šámalová 2005



Postup transformace - disková metoda

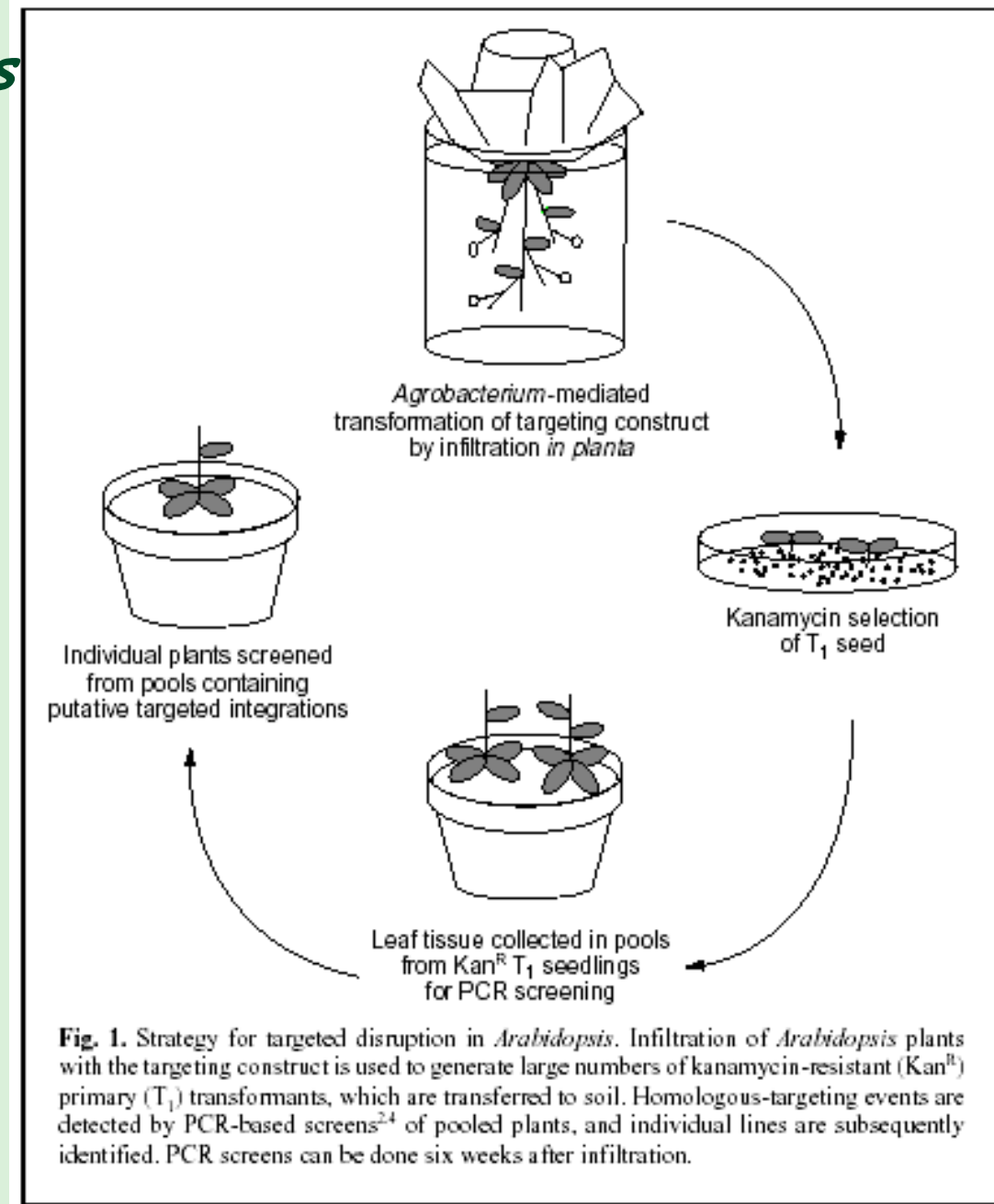
1. příprava kultury agrobakteria - křížový roztěr na LB médium s antibiotiky + agar
2. příprava listových segmentů - předkultivace na MSH - s auxinem a cytokininem + agar (2 - 3 dny v kultiv. místnosti)
3. příprava suspenze agrobaktéria pro kokultivaci (LB médium)
4. kokultivace listových segmentů v 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



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

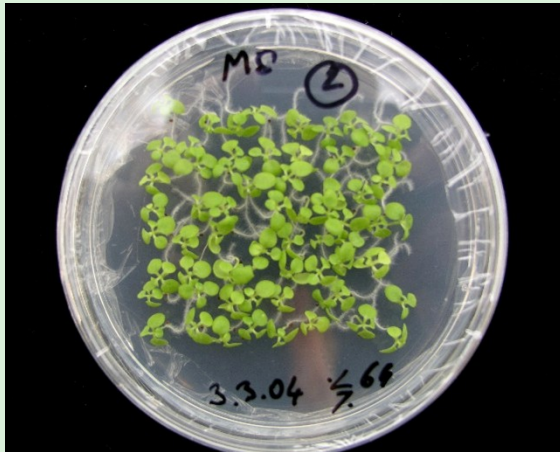


Selekční a signální markery

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*)

Využití methotrexátu pro selekci transgenních organismů

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



heterozygotní
transgenní tabák
na MS médiu



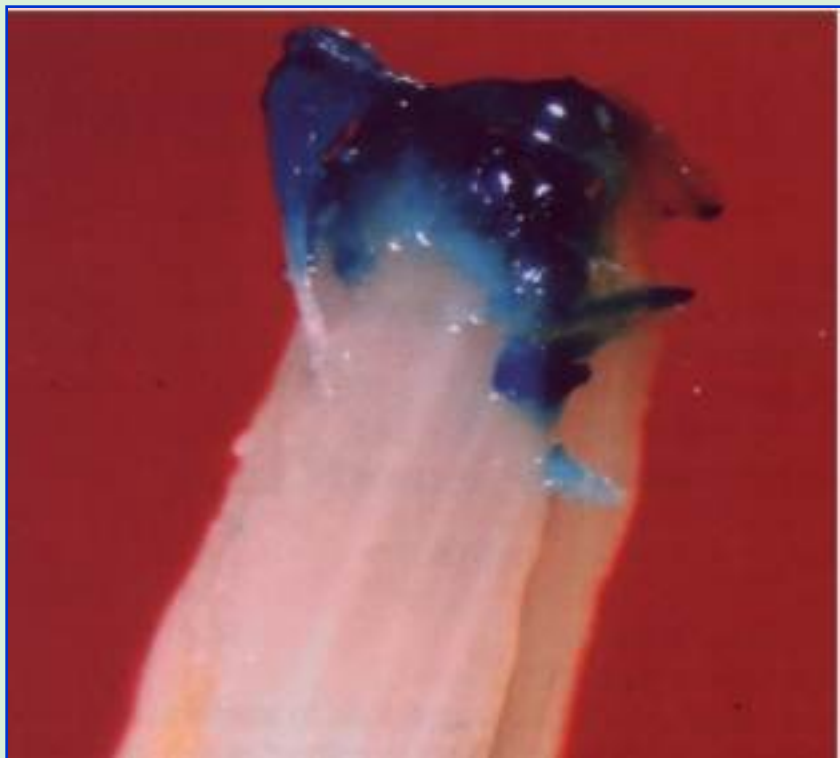
kontrola bez myši DHFR
na MS médiu s MTX



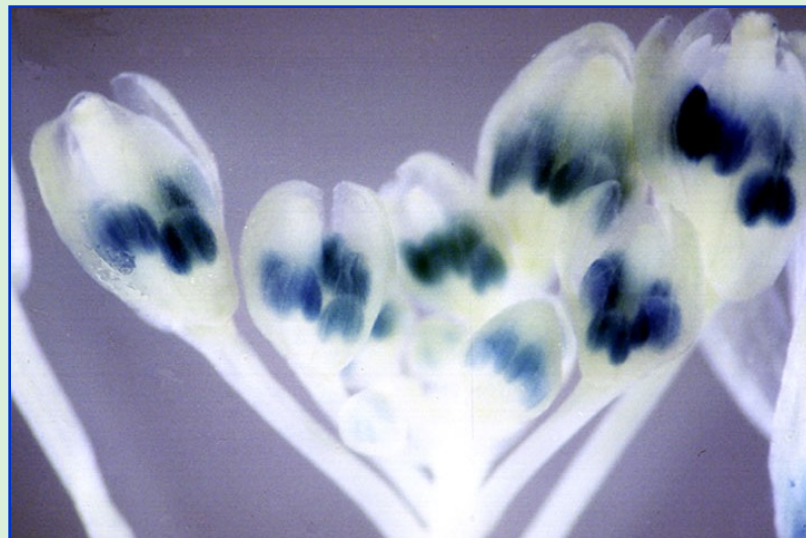
heterozygotní
transgenní tabák
na MS médiu s MTX

Indigogenní metoda detekce glukuronidázy

apex karafiátu



Arabidopsis

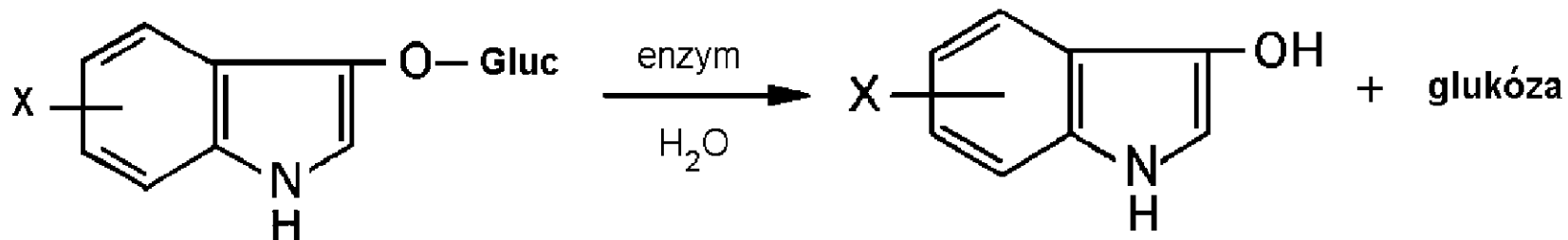


substrát =
5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-
glukuronid (X-gluc)



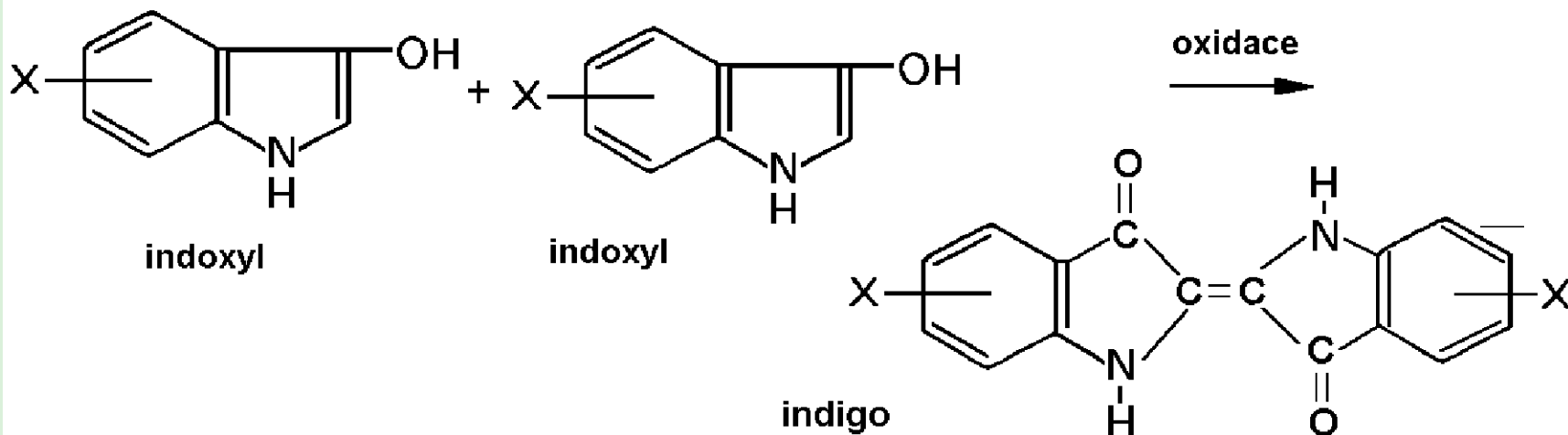
Princip indigogenní metody: detekce aktivity glukosidázy

1. Primární reakce - štěpení substrátu enzymem



X = Br, Cl

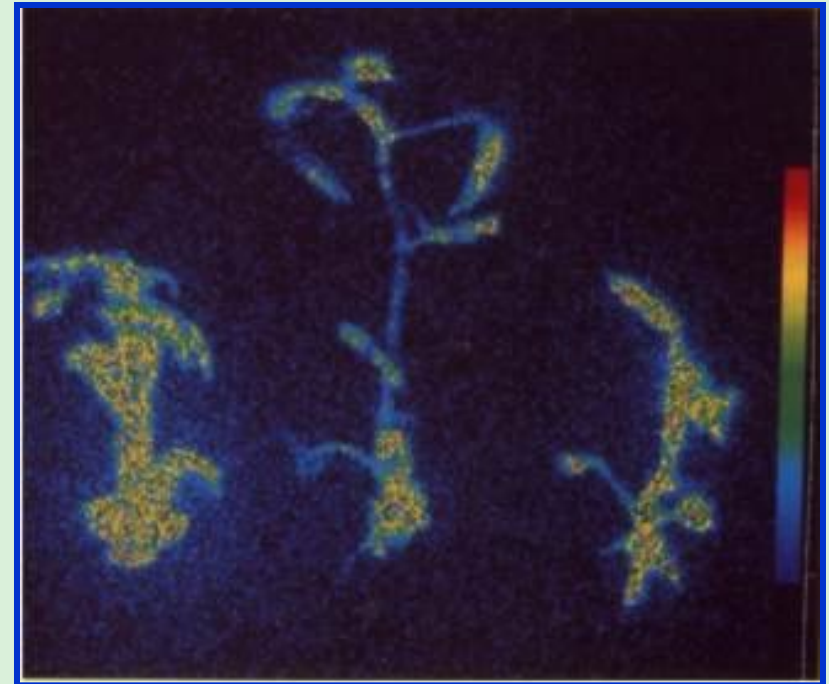
2. Sekundární reakce - tvorba indiga



Transformované rostlinky kasavy z embryogenní kultury, signální gen = luciferáza

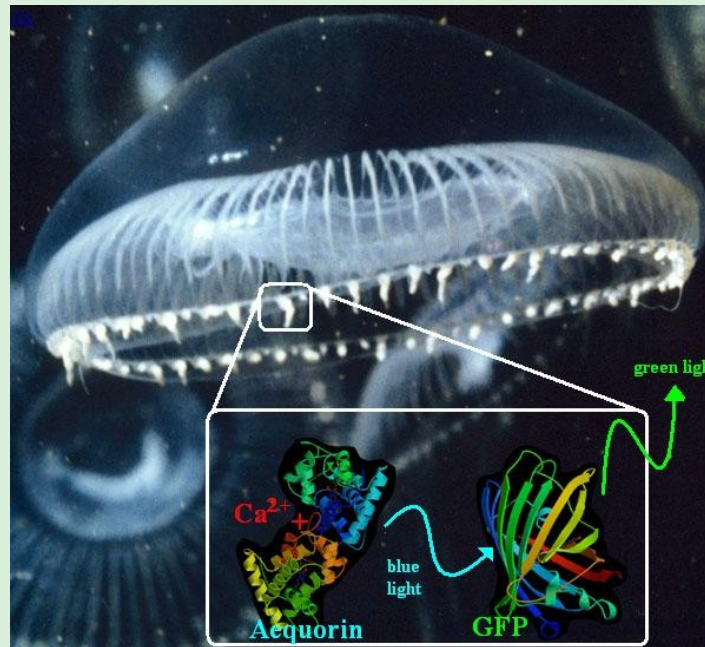
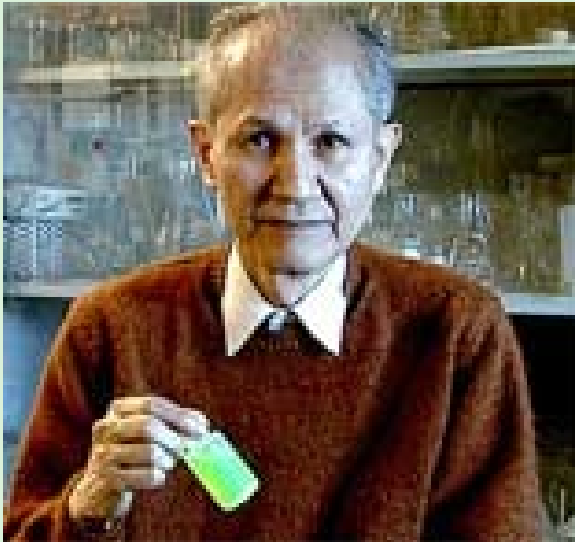


rostlinky



vizualizace luciferázy- postříkáno luciferinem a měřeno luminometrem

Osamu Shimomura - objevitel GFP

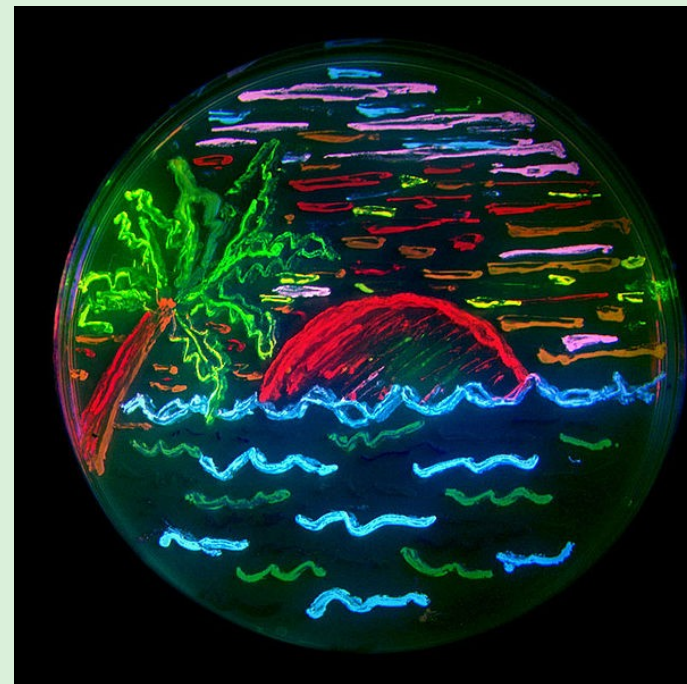


2008 Nobelova cena za chemii (Osamu Shimomura, Marty Chalfie a Roger Tsien)

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

Modifikace GFP

Roger Tsien



Potraviný a *GMO*



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.

Transgeny pro toleranci k herbicidům

- **výhody** - možnost použít herbicidy 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
 - Nadměrné používání herbicidů (hlavní kritika odpůrců *GMO*)

Některé poslední studie ukazují, že došlo k velkému nárůstu používání herbicidů především u rostlin, které nemají *GM* odrůdy

Herbicid tolerantní plodiny (HTP)

- ☐ transgenní plodiny tolerující herbicidy
- ☐ 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

u nás je není povoleno pěstovat, ale bez dovozu RR sóje z Jižní Ameriky by se zhroutila naše živočišná výroba

Bt-plodiny

resistence vůči škůdcům

produkují δ -toxin z *Bacillus thuringiensis*



zavíječ kukuřičný - *Ostrinia nubilalis*

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

zvyšuje **lámavost stébel**, což znamená sklizňové ztráty u poškozených obilí se navíc **zvyšuje obsah afaltoxinů**

Bt-kukuřice MON810

- odolná vůči zavíječi kukuřičnému
- první GM plodinou autorizovanou v EU (1998)
- v Evropě v roce 2008 byla pěstována přibližně na 110 tisících ha, v 6 zemích EU včetně Česka
- Nyní nic

Danaus plexippus, danao stěhovavý „Monarch“ imago a housenka



- Pyl z Bt kukuřice je toxický pro housenky
- nicméně nebyl prokázán žádný dlouhodobý vliv Bt kuřice na úbytek motýlů, např. Sears et al. (2001)

Zlatá rýže

- podle WHO každý rok na světě oslepne zhruba čtvrt až půl milionu lidí, protože nemají v potravě dostatek vitamínu A, téměř polovina z nich pak zhruba do dalšího půlroku zemře
- Možným řešením by mohla být **GMO zlatá rýže** - obsahuje 4 geny, které zvyšují obsah vitamínu A v zrnu
- mezinárodní nezisková organizace vyvázala tento produkt ze všech patentových závazků
- hlavní výzkumný program převzala nekomerční instituce, tedy **International Rice Research Institute (IRRI)** na Filipínách
- finance poskytla **Rockefellerova nadace**, později (až dodneška) **Nadace Billa Gatese** a firma **Syngenta**

Zlatá rýže

Ingo Potrykus - Zurych
Peter Beyer - Freiburg



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 by mělo ohromný význam
pro zlepšení výživy, především u obyvatel Asie
2022 - povoleno ke konzumaci a pěstování na Filipínách**

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

Amflora - GM brambor



- 1996 podána žádost o schválení Amflory
- Evropská agentura pro bezpečnost potravin (EFSA) při několika příležitostech v průběhu schvalovacího procesu opakovaně zdůraznila bezpečnost Amflory pro lidi, zvířata a životní prostředí
- Ludwigshafen, Německo - 2. březen 2010 - Evropská komise povolila Amfloru, geneticky modifikovanou bramboru (BASF) s optimalizovaným obsahem škrobu, pro komerční použití v Evropě
- odrůda této brambory se s úspěchem testovala pro výrobu průmyslového škrobu i v ČR
- 2013 - ústup od pěstování (BASF odchází z Evropy do USA)

Brambor rezistentní vůči plísni bramborové

- 2007 - BASF vysadil geneticky vylepšené brambory "Fortuna" odolné vůči plísni bramborové
- 2012 - po letech bojů o povolení pěstování této odrůdy v Evropě se BASF vzdal a přesunul veškerý svůj výzkum rostlin do Severní Karolíny
- 2014 - John Innes Centre (Norwich) - "Desiree,, - s genem pro odolnost vůči plísni bramborové z blízce příbuzného jihoamerického druhu lilku
- na zkušebních polích se ukázalo, že brambory jsou vůči plísni doopravdy odolné a že oproti běžným bramborám dosahují dvojnásobné úrody
- díky evropským restrikcím Jones a spol. licencovali své brambory společnosti Simplot, se sídlem v Boise, Idaho

<http://www.gate2biotech.cz/geneticky-vylepsene-brambory-opet-vystvany-z-evropy/>



Nové metody šlechtění „NEW PLANT-BREEDING TECHNIQUES“

odstraňují nevýhodu všech způsobů vzniku transgeneze, tj. cílí na přesné místo na molekule DNA, kde buď vyvolá mutaci, nebo umožní vložení genu

- cisgeneze** = vkládání genu jako při transgenezi, ale jde o gen vlastního druhu, nebo druhu, se kterým se odrůda kříží
- Introgeneze** = gen vlastního druhu, jen nové kombinace díky in vitro manipulaci funkčních genetických jednotek
- ODM** - oligonukleotidem řízená mutageneze
- Agro-infiltrace**
- Reverse-breeding**
- gene editing**, tj. editace, **úprava genů** (Zinc-finger, TALEN, CRISPR)

Conventional Breeding Techniques

- Selection in natural populations
- Intra-specific crossing and selection
- Mutagenesis
- Wide hybridization (Inter-specific hybridization)
- Tissue culture techniques (incl.d somatic hybridization between sexually compatible species)

Established Techniques of Genetic Modification

- Somatic hybridization between sexually incompatible species
- Transgenesis

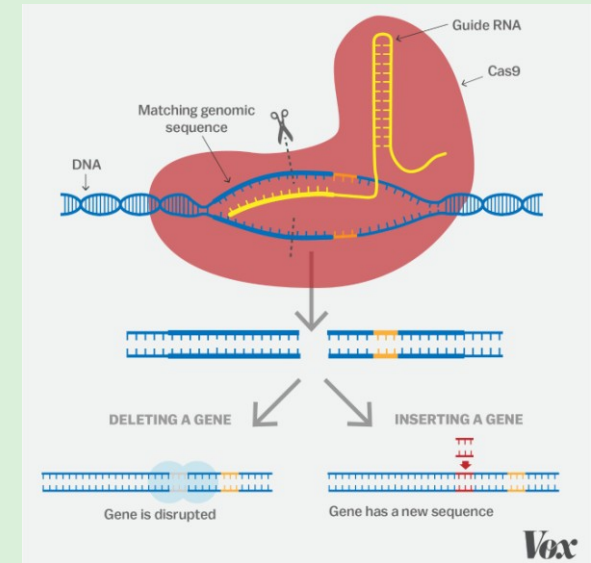
New Breeding Techniques

- Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM)
- Nuclease-based Genome Editing
- Cisgenesis and Intragenesis
- Grafting (on GM rootstocks)
- RNA-dependent DNA methylation (RdDM)
- Reverse breeding
- Agro-infiltration
- Synthetic genomics

Time

Plant breeding efficiency

CRISPR/Cas9



- segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
- jsou to úseky prokaryotické DNA obsahující krátké repetice nukleotidů. Každá z repetice je následována krátkými segmenty tzv. spacer DNA, získanými při předchozích setkáních s příslušnými bakteriálními viry nebo plazmidy.
- prokaryotický imunitní systém, zajišťující rezistenci vůči cizím genetickým elementům, jako jsou plazmidy nebo fágy
- Cas9 je nukleáza, enzym, specializovaný pro stříhání DNA
- gRNA je naváděcí RNA se sekvencí nukleotidů odpovídající sekvenci na DNA, kterou chceme upravit

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/>