

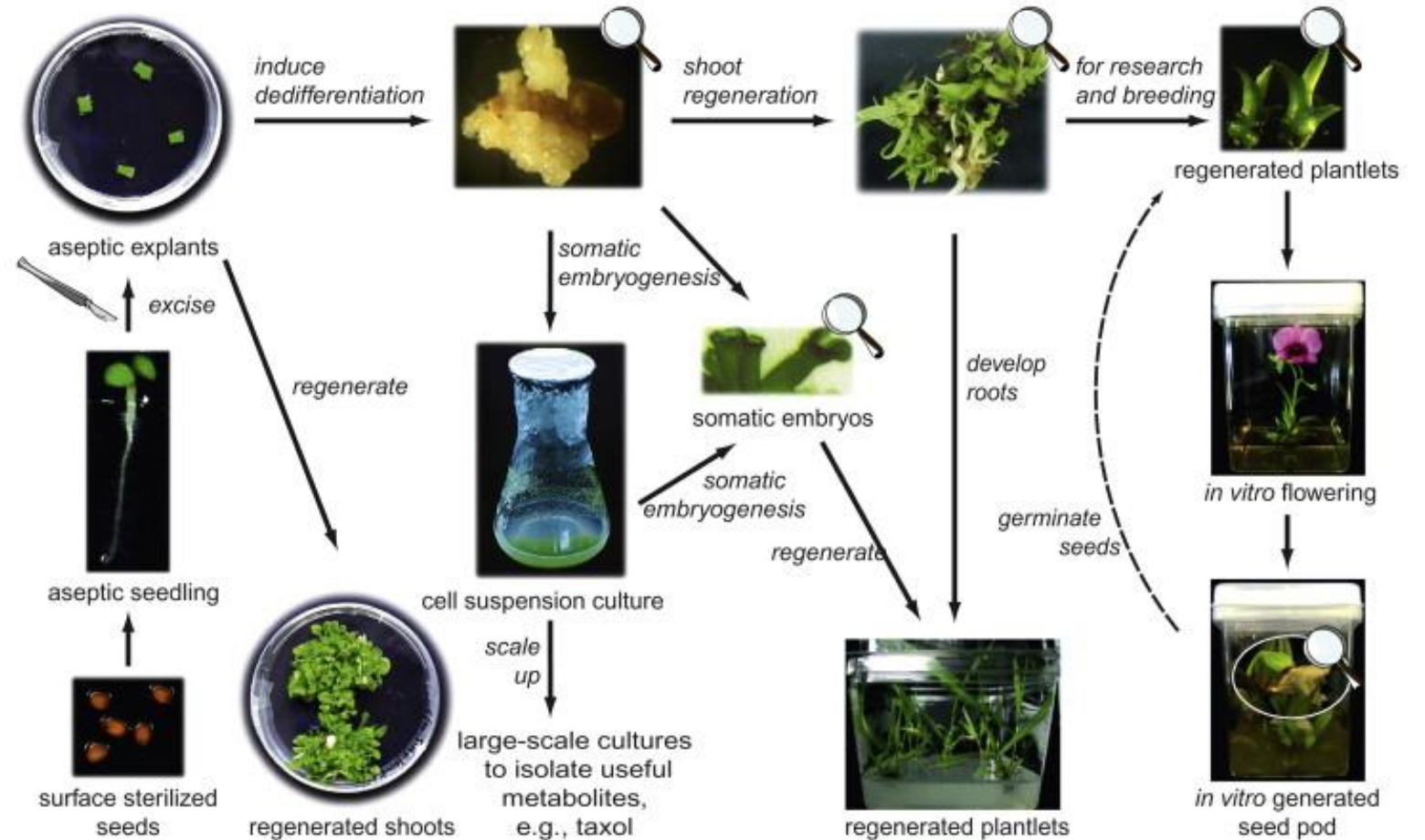
# Rostlinné biotechnologie



# Biotechnologie

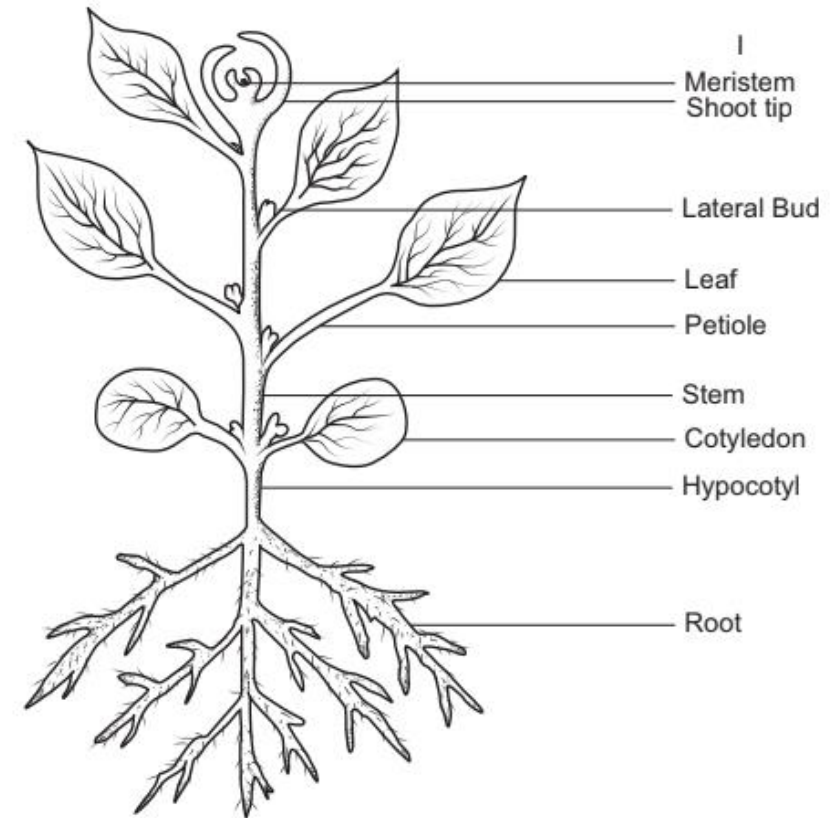
Moderní rostlinné biotechnologie zahrnují především rostlinné tkáňové kultury a genové inženýrství.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>



# Rostlinné explantáty

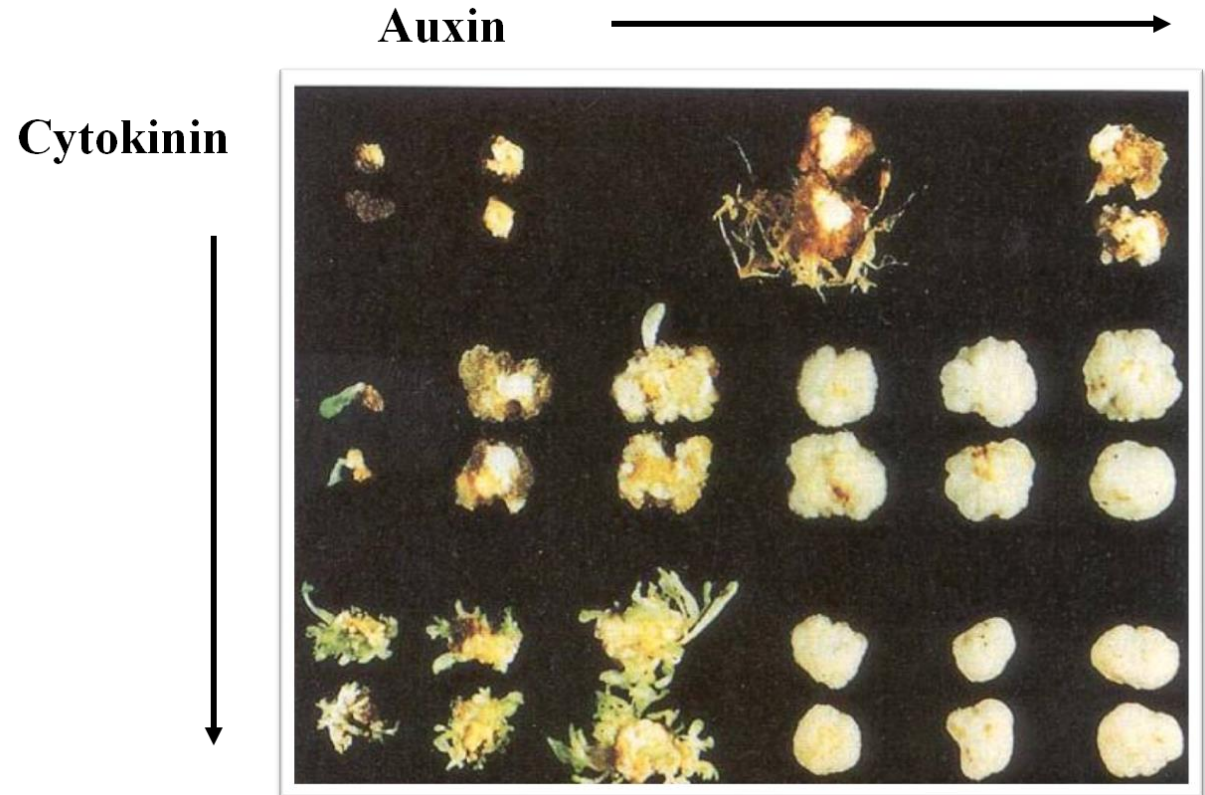
- Ne příliš malý kus mladé zdravé tkáně odebrané ideálně na jaře
- Výběr vhodného explantátu
- Pro množení postranní pupen
- Pro přípravu kalusové kultury nejčastěji děložní lístek nebo hypokotyl
- Pro izolaci protoplastů list



ISBN-13: 978-0124159204

# Tkáňové kultury

- První úspěšně kultivovaná byla nediferencovaná meristematická tkáň
- Kultury odvozené z rostlinných nádorů
- Po objevu hormonů i (částečně) diferencované kalusové kultury

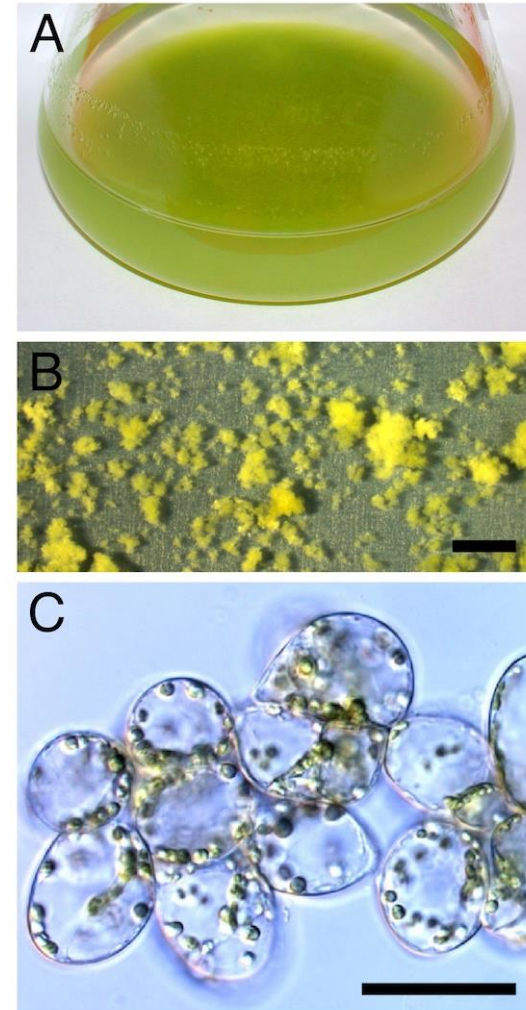


<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.900160>



# Buněčné suspenzní kultury

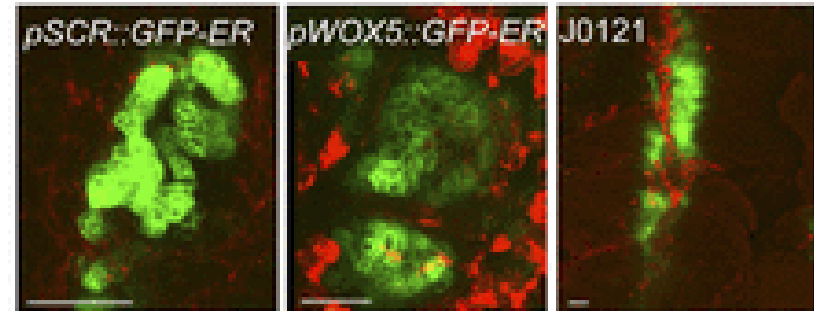
- Vznikají rozsuspendováním kousků kalusu v živném médiu
- Média obsahují zdroj uhlíku, dusičnany a amonné ionty, další soli obsahující všechny potřebné prvky, vitaminy a hormony
- Nejčastější média: Murashige and Skoog, Gamborg, Nitsch and Nitsch



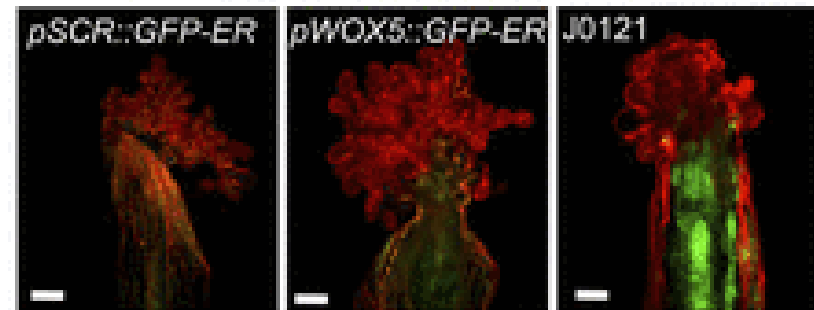
# Využití rostlinných kultur v primárním výzkumu

- Studium primárního i sekundárního metabolismu
- Izolace organel
- Studium morfogeneze, organogeneze a embryogeneze
- Studium interakcí rostlin a mikrobů

CIM-induced callus



wound-induced callus



<https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>

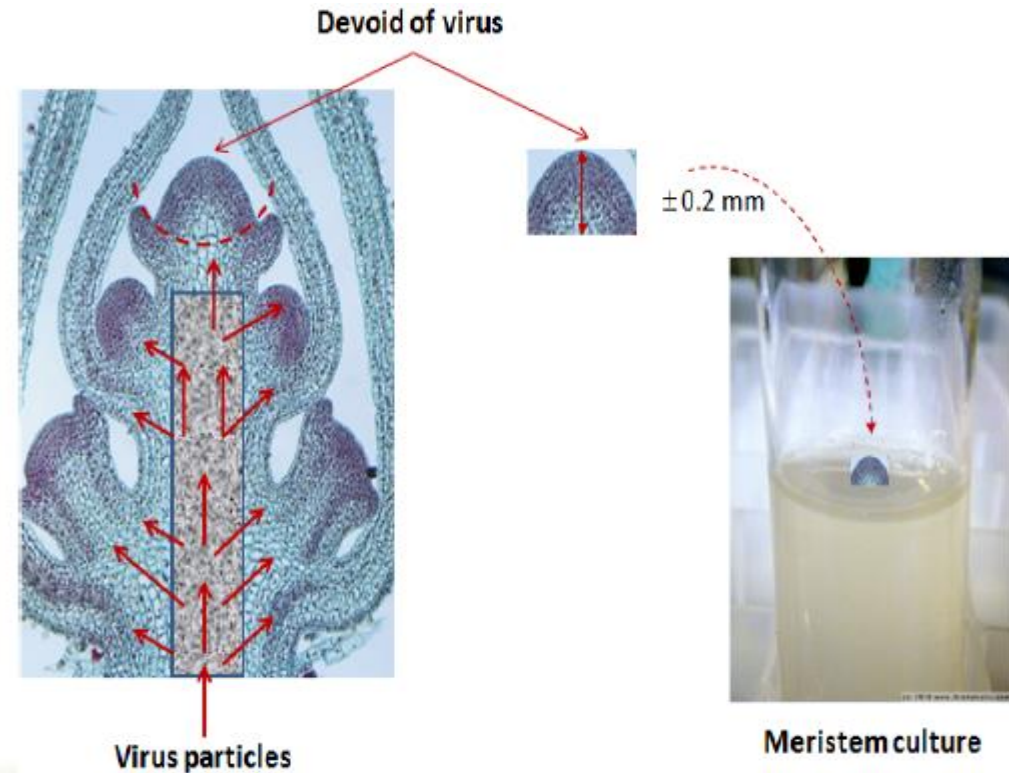
# Využití rostlinných kultur pro mikropropagaci (množení in vitro)

- Zkrácení cyklu, vysoký množitelský koeficient, možnost načasování, dobrý zdravotní stav
- Náročné na energie, nutnost aklimatizace



# Využití rostlinných kultur pro skladování a převoz

- Uchování genofondu rostlin
- Příprava rostlinného materiálu neobsahujícího mikroorganismy (především viry)

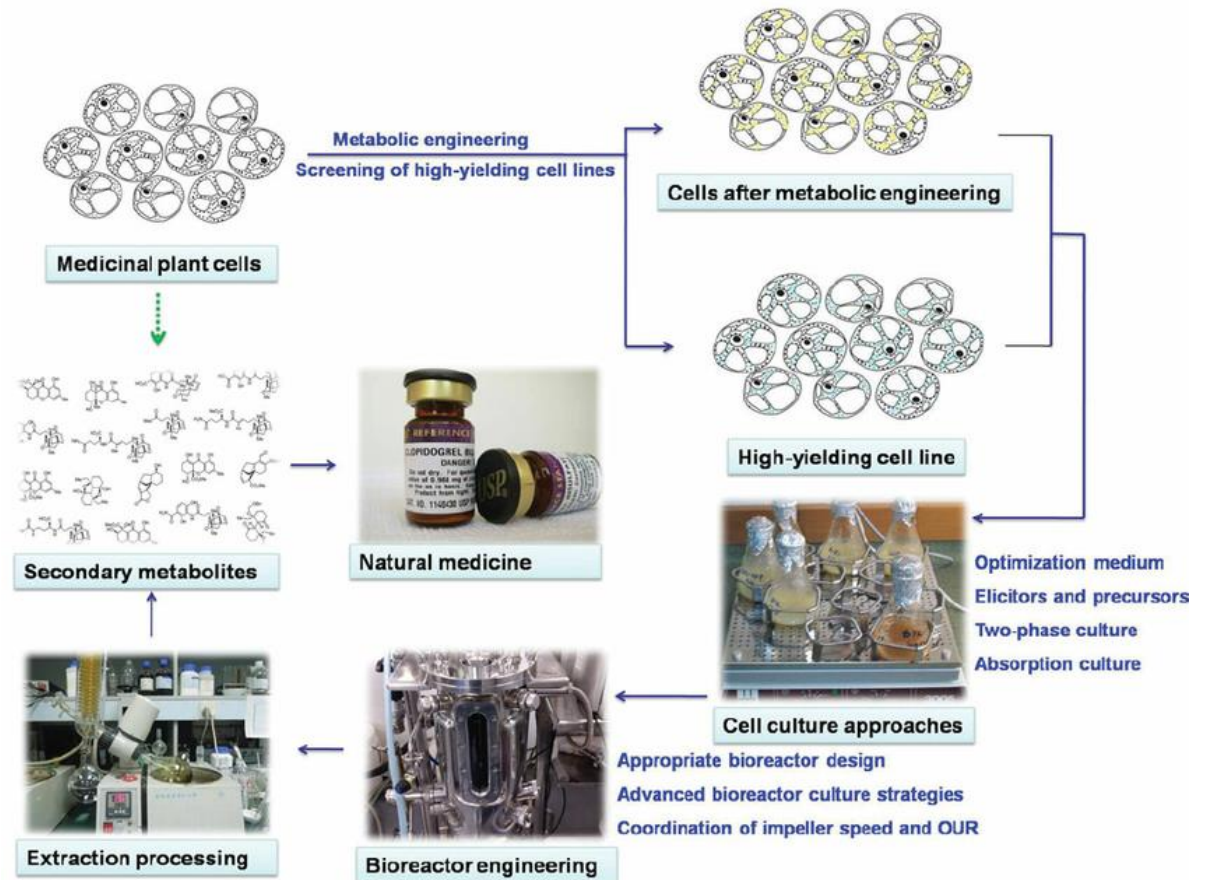


Retno Mastuti: Plant Physiology



# Využití rostlinných kultur pro tvorbu produktů

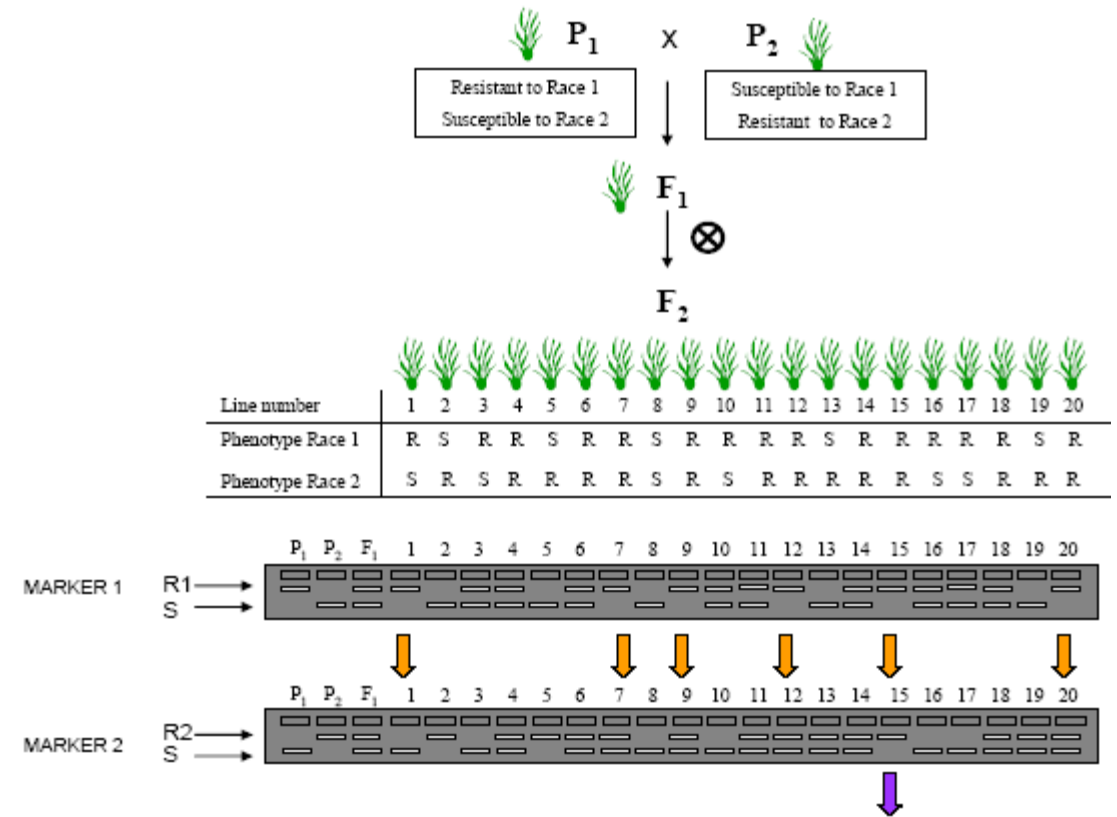
- Rostlinné sekundární metabolity s využitím ve farmacii nebo průmyslu
- Komerčně ve velkoobjemových reaktorech
- Využití vysoce výnosných kmenů/mutantů nebo stimulace



DOI: [10.3109/07388551.2014.923986](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923986)

# Selekce s využitím markerů

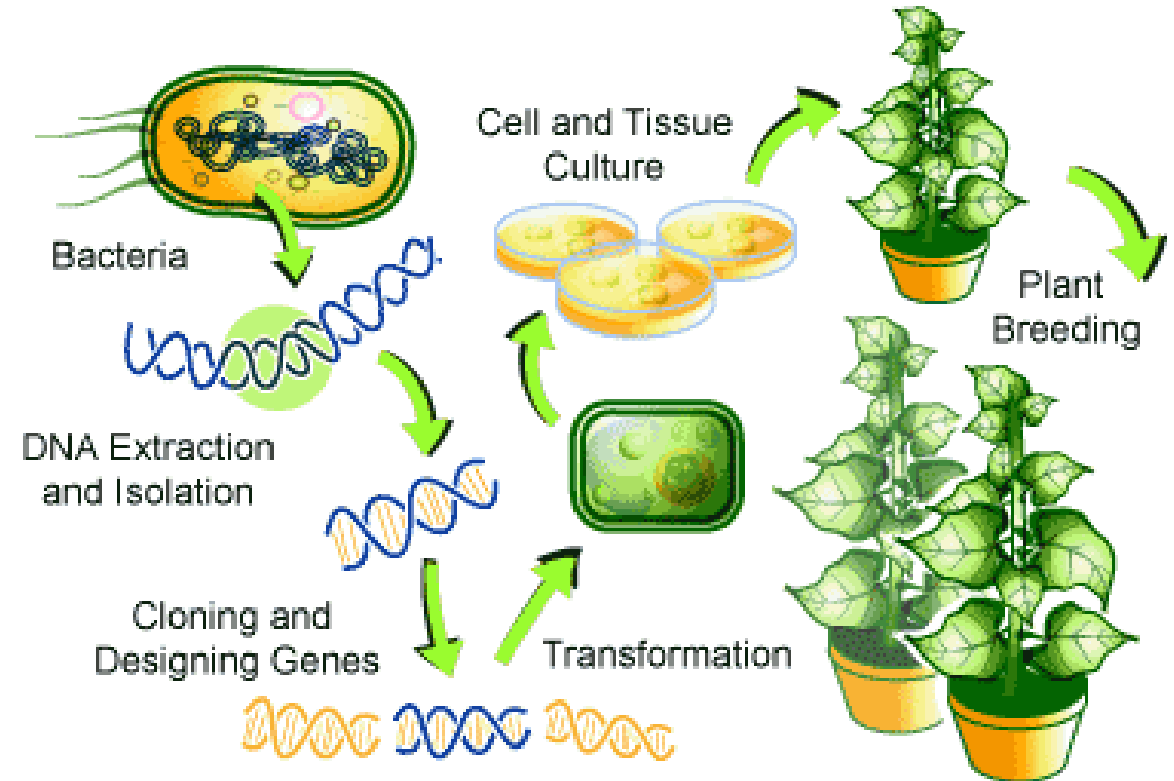
- Místo sledování fenotypu sledujeme při šlechtění přímo požadované geny nebo obecně sekvence spojené s daným znakem (markery)
- Vhodné pro fenotypové znaky kódované malým počtem genů (rezistence k patogenům)



<http://www.knowledgebank.irri.org/>

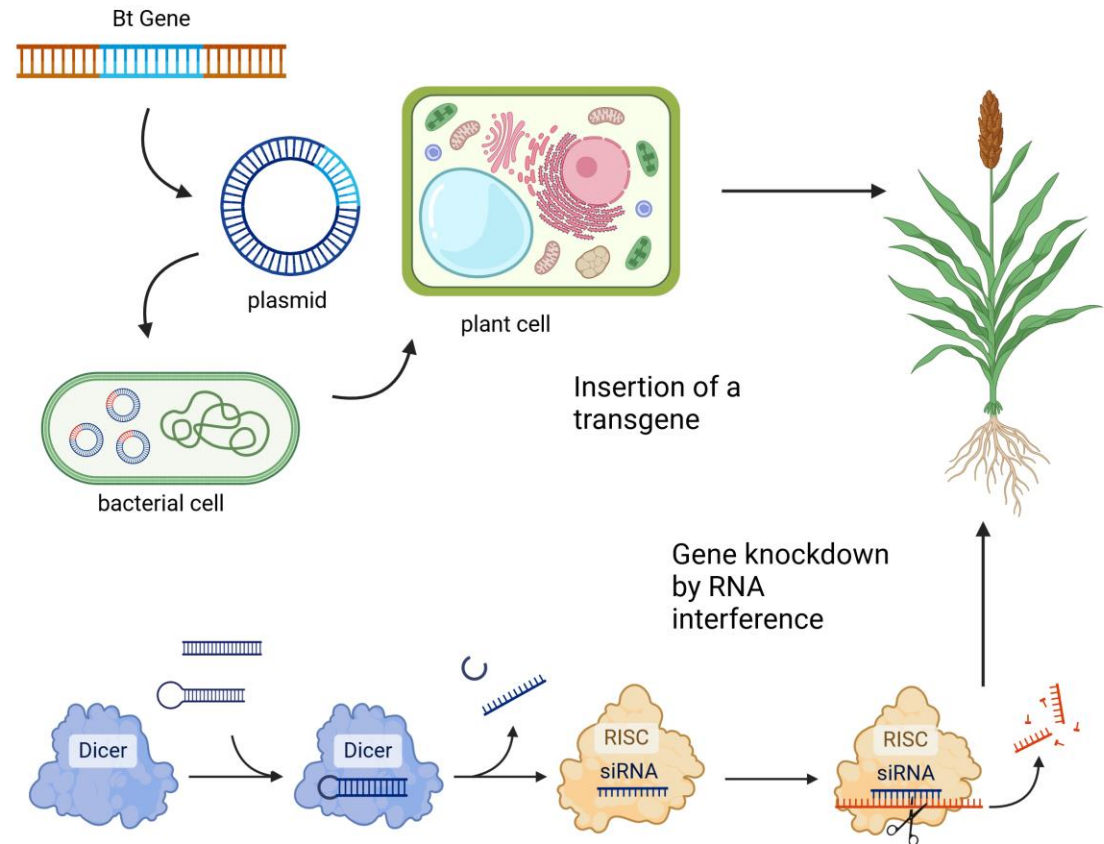
# Využití rostlinných kultur pro genetickou modifikaci rostlin

- Genetické transformace buněk, tkání a orgánů
- Produkce cisgenních a transgenních rostlin s rekombinantní DNA



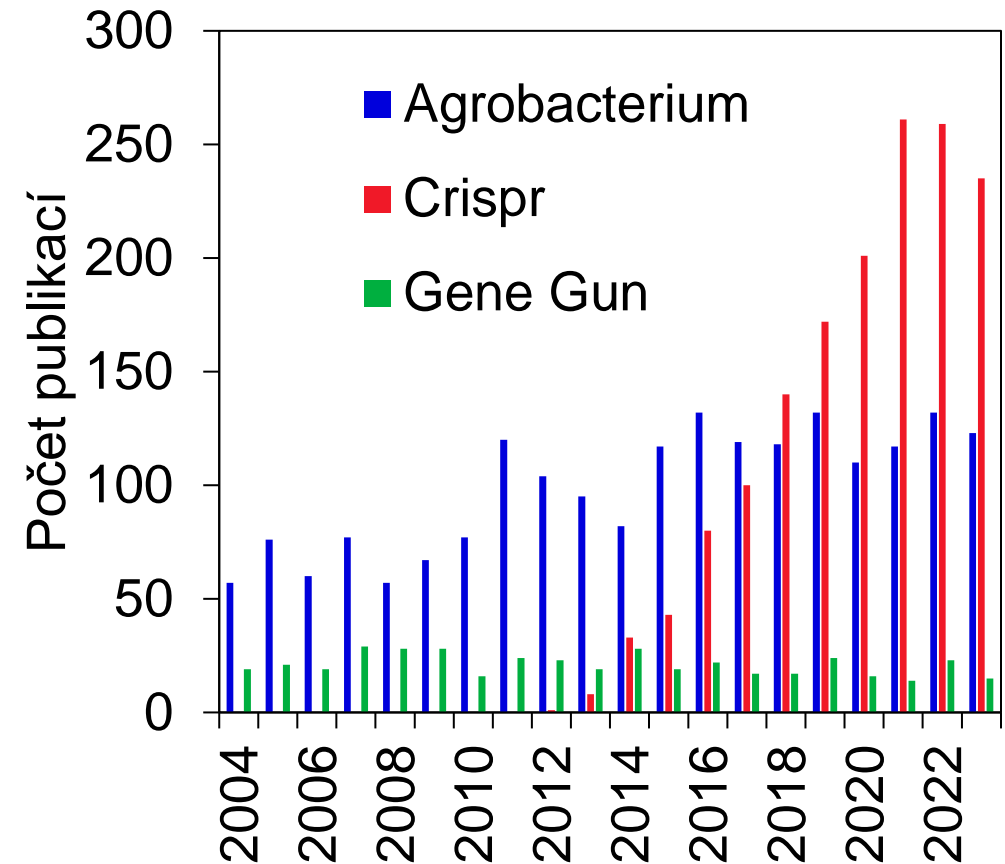
# Genetické modifikace rostlin

- Bakteriální geny kódující proteiny rezistence (insekticidní proteiny, enzymy degradující herbicidy) vložené do DNA plodin
- Využití RNA interference expresí fragmentů viru hostitelskou rostlinou



# Technologické přístupy

- Tzv. gene gun (DNA navázaná na částice kovu)
- Transformace pomocí agrobakterií (přirozeně schopné přenášet genetický materiál)
- CRISPR/Cas (využití bakteriálního antivirového systému)





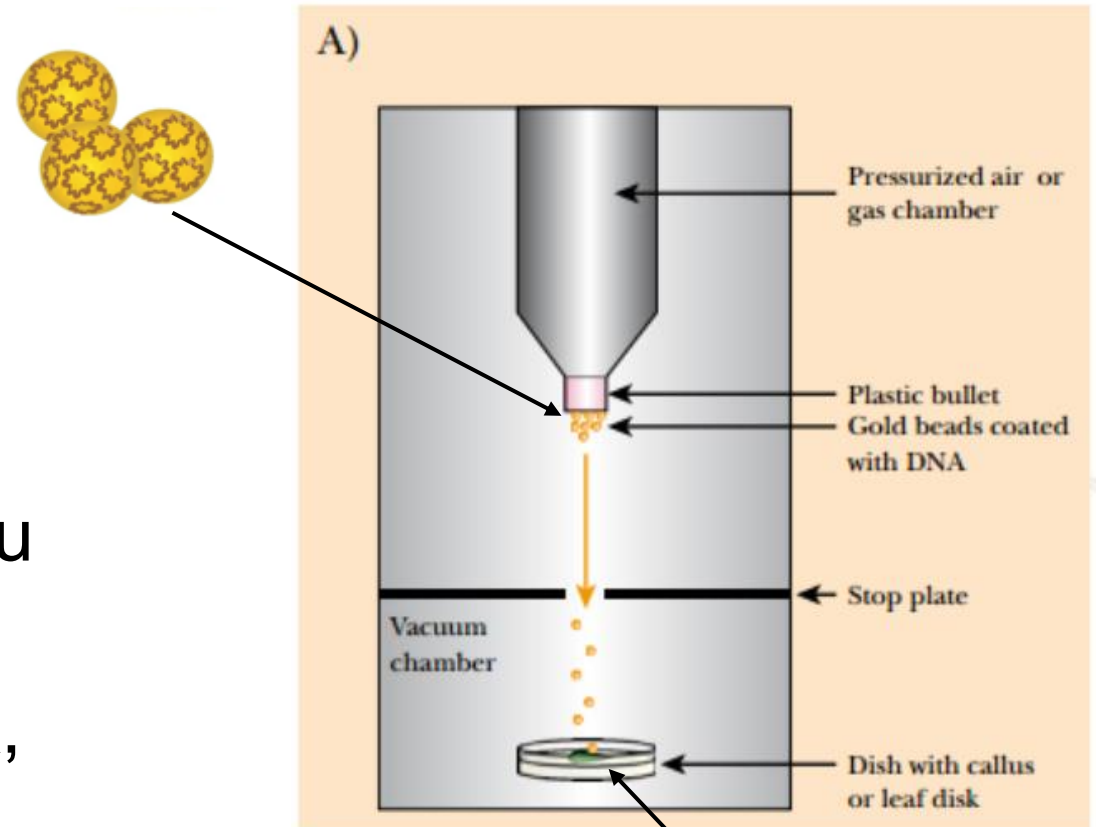
# Gene gun

- Izolace požadovaného genu ze zdrojového organismu, sestavení funkčního konstruktu (promotor, gen, markerové geny atp.)
- Inkorporace konstruktu do vhodného plazmidu
- Pokrytí kovových (zlato, wolfram) částic plazmidem

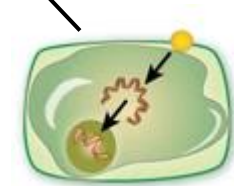


# Gene gun

- Částice urychlené stlačeným vzduchem pronikají buněčnou stěnou i plasmatickou membránou buněk (obvykle kalus)
- Selektce transformovaných buněk, regenerace rostlin



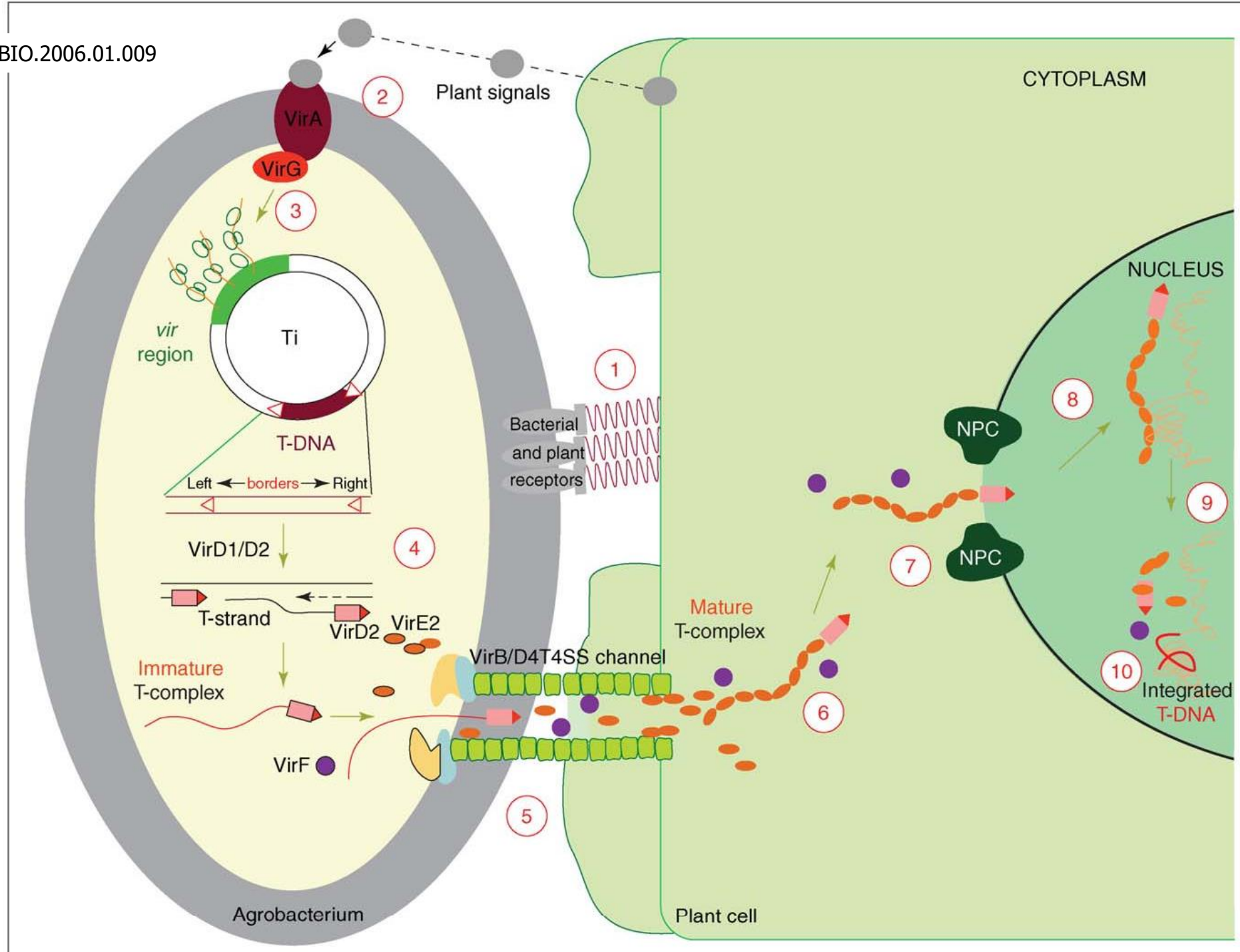
<https://istudy.pk>



# Transformace pomocí agrobakterií

- *Agrobacterium tumefaciens* je fytopatogenní bakterie (nádorová onemocnění)
- Ti plazmid obsahuje T-DNA, schopnou začlenit se do genomu rostlin

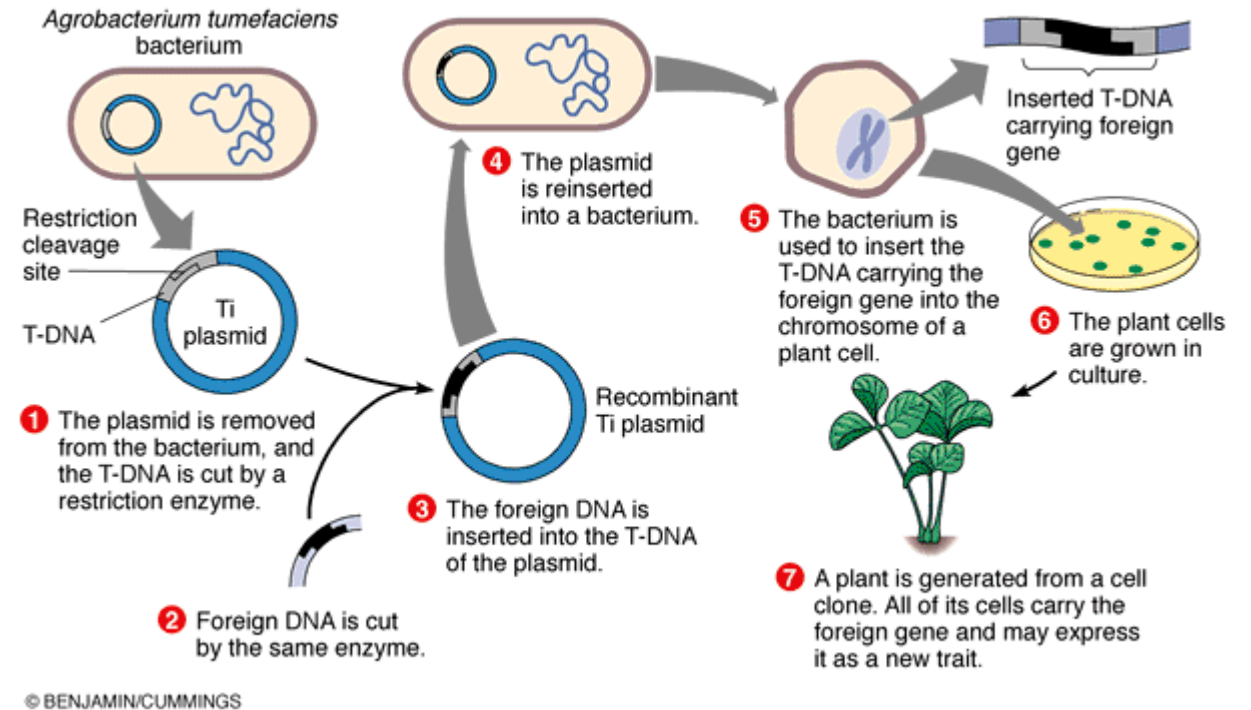






# Transformace pomocí agrobakterií

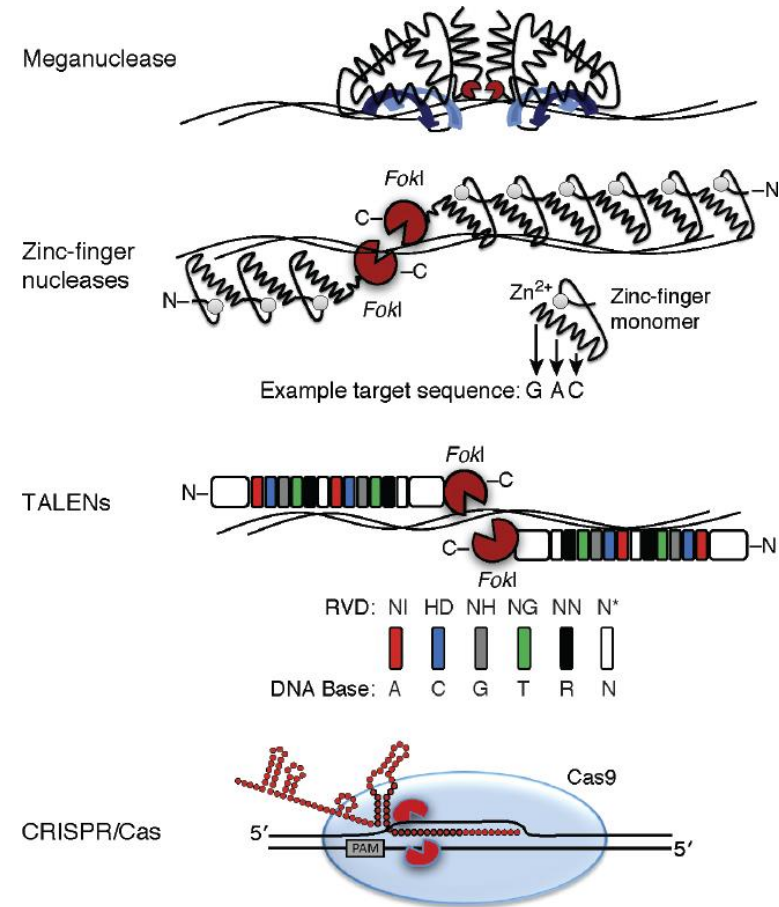
- Umělé Ti plazmidy s požadovaným genem a markerovými geny jsou namnoženy v *E. coli* a vloženy do *A. tumefaciens*
- Infekce rostlinných buněk, selekce, regenerace





# Editace genomu

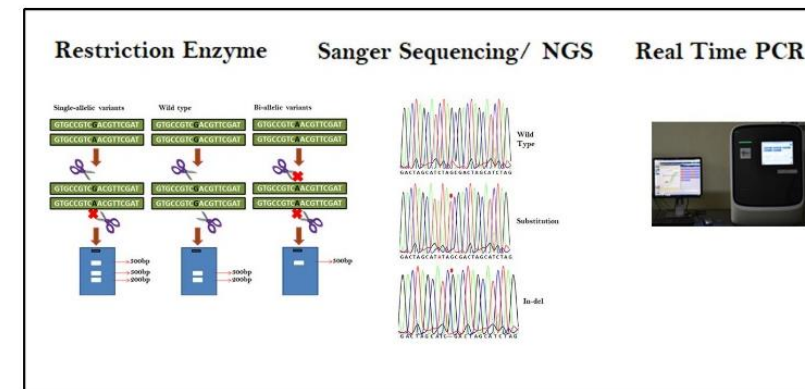
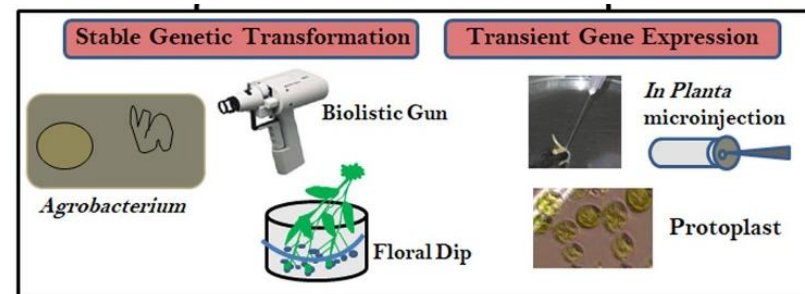
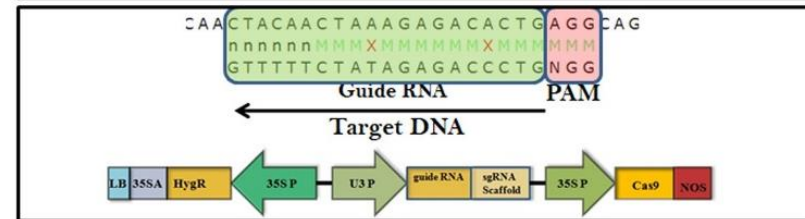
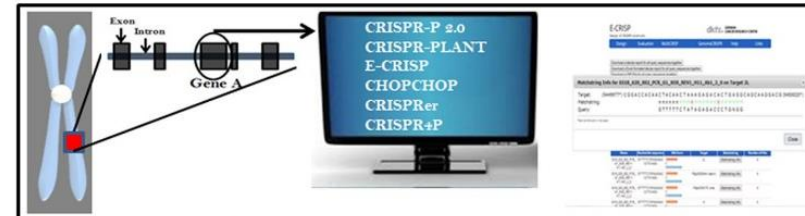
- Využívá nukleasy specifické pro určité sekvence (např. CRISPR/Cas9)
- Změna konkrétního lokusu DNA – knockout konkrétního genu nebo začlenění transgenu
- První plodiny s editovaným genomem se objevují na trhu v USA a v Kanadě (řepka, sója)



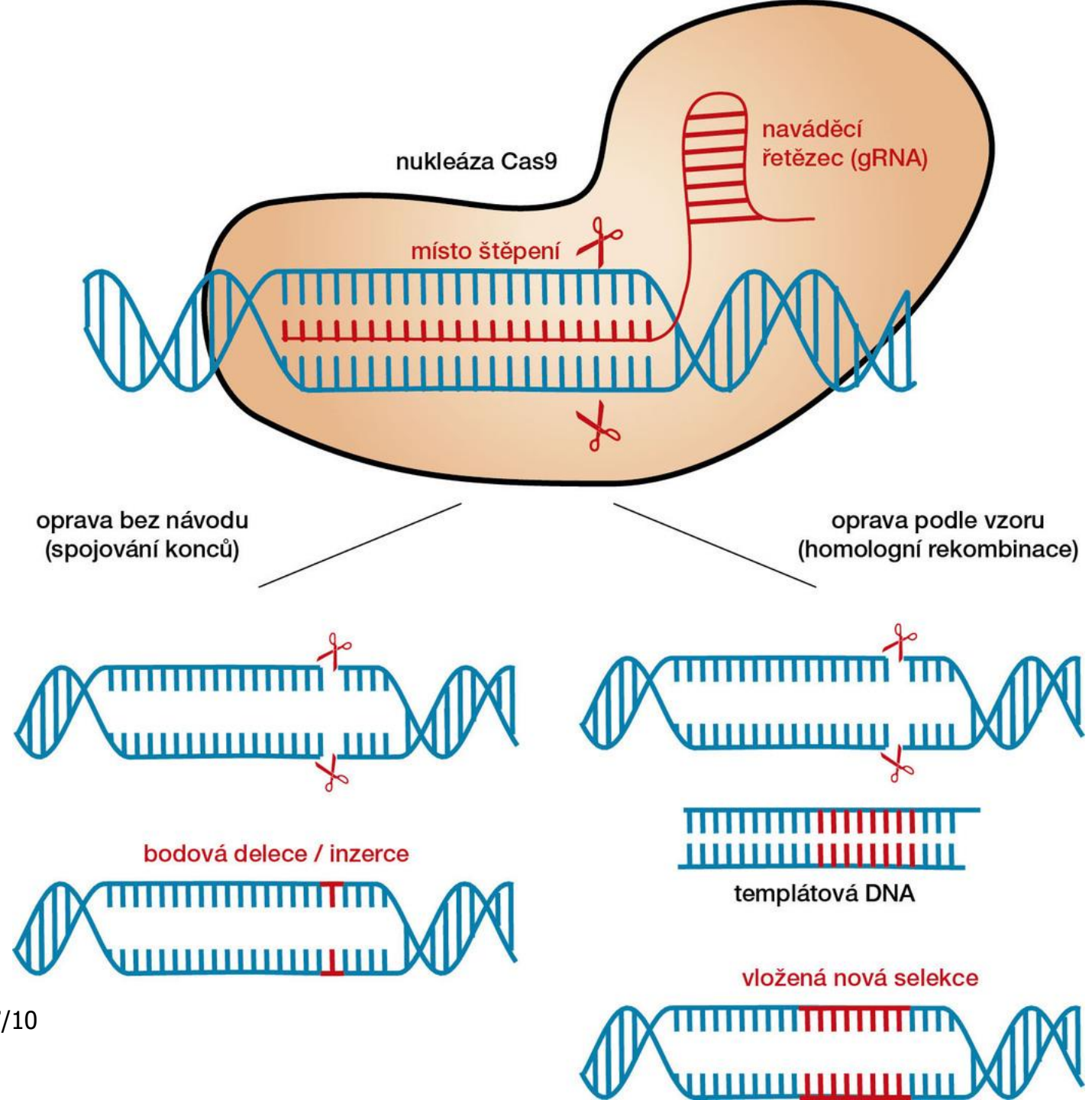
<https://www.nap.edu>

# CRISPR/Cas

- CRISPR/Cas nejméně komplikovaná (stejná nukleasa pro editaci různých sekvencí)
- Výběr genu a návrh gRNA
- Klonování gRNA do vhodného vektoru (obsahuje i sekvenci pro Cas9)
- Vložení do cílové rostliny a selekce

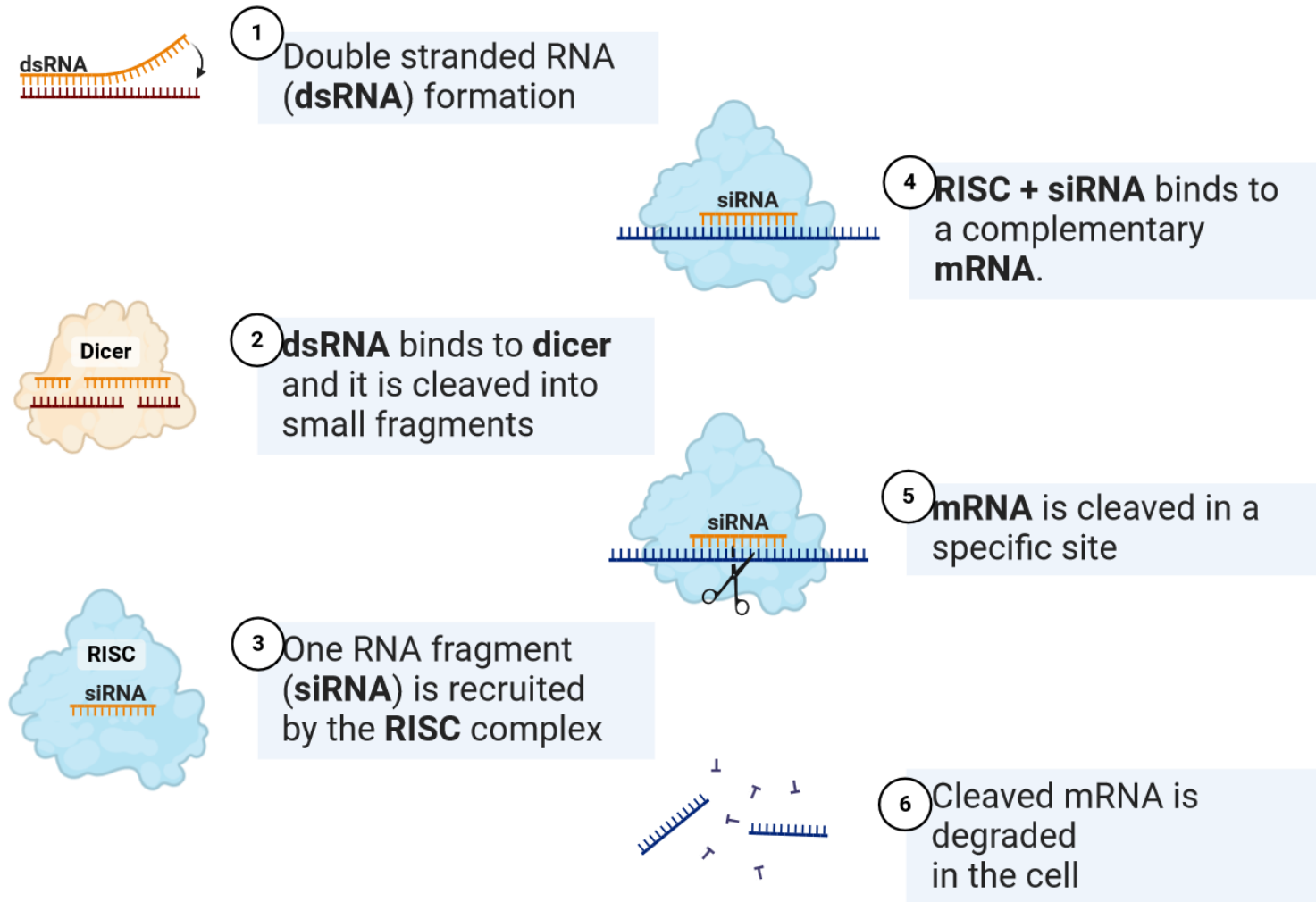


# CRISPR/Cas



# RNA interference

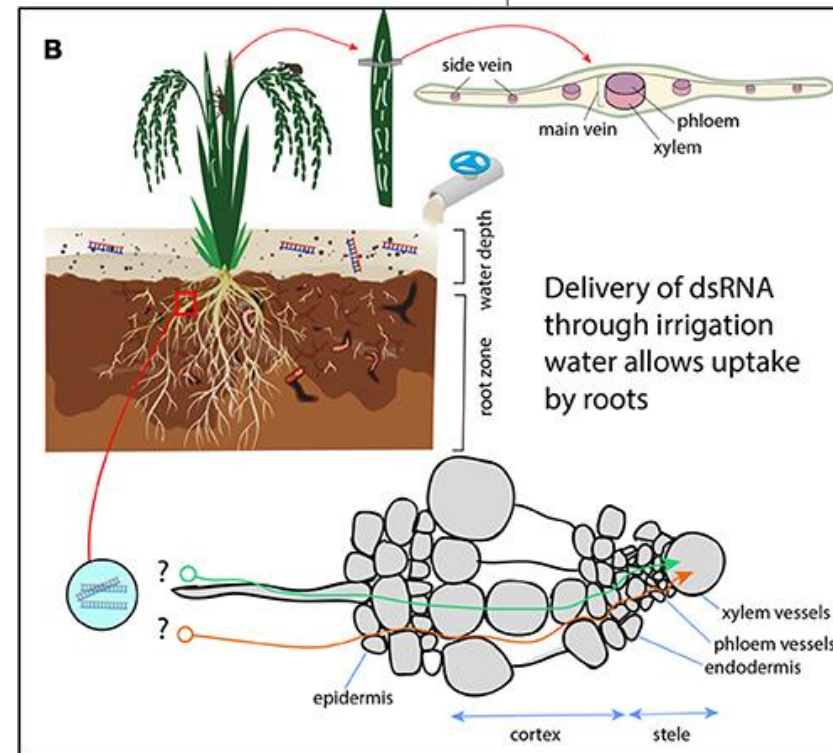
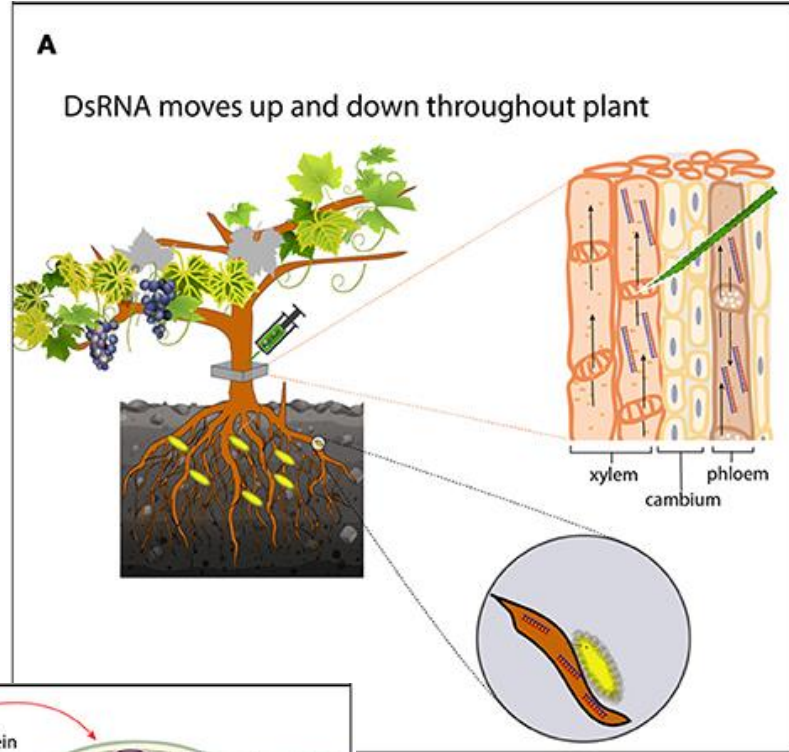
- Přírozený regulační mechanismus eukaryotických buněk
- 2 dráhy RNAi: miRNA (regulace exprese vlastních rostlinných genů) a siRNA (antivirová obrana)
- dsRNA je meziproduktem v replikaci většiny rostlinných virů





# RNA interference

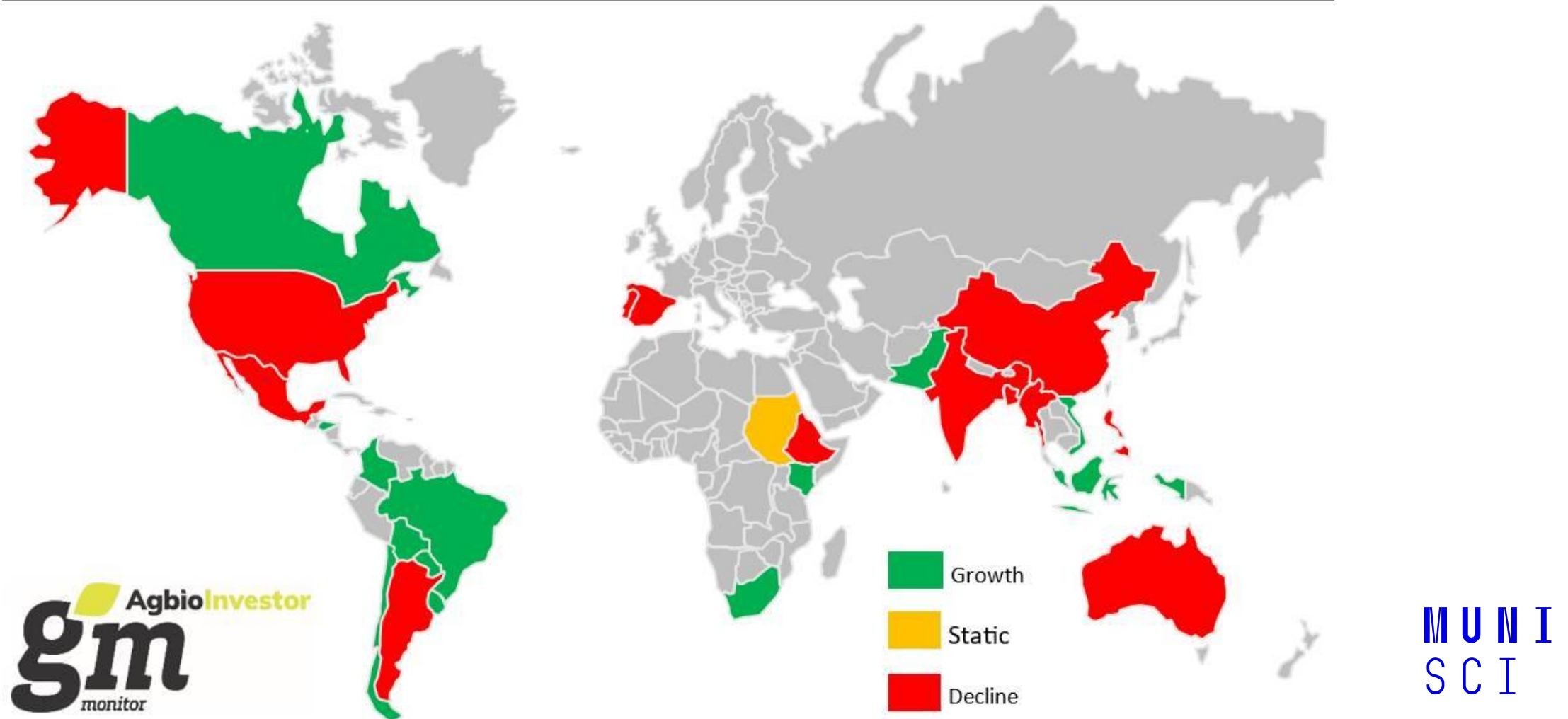
- Rostlinné buňky mohou být modifikovány k produkci části dsRNA už před napadením
- dsRNA může být také vnesena rekombinantním virem/bakterií, vstříknuta do stonku/kmene nebo absorbována kořenovým systémem
- RNAi může být částečně funkční i proti eukaryotickým patogenům





# Genetické modifikace rostlin

Area Change of GM Crops by Country in 2023P



# Přínosy rostlinných biotechnologií

- Zvýšení produkce plodin
- Omezení použití pesticidů a umělých hnojiv
- Zvýšení výživové hodnoty potravin (vitaminy, minerály)
- Podpora ekonomiky chudých zemí





# Rizika rostlinných biotechnologií

- Ztráta biodiverzity (preference monokulturního pěstování vysoce výnosných odrůd, migrace genů opylením příbuzných druhů)
- Rozšíření geneticky zvýhodněných invazivních druhů
- Zdravotní riziko (alergeny)



# Další možnosti rostlinných biotechnologií...

- [https://www.ted.com/talks/joanne\\_chory\\_how\\_supercharged\\_plants\\_could\\_slow\\_climate\\_change?utm\\_campaign=tedspread&utm\\_medium=referral&utm\\_source=tedcomshare](https://www.ted.com/talks/joanne_chory_how_supercharged_plants_could_slow_climate_change?utm_campaign=tedspread&utm_medium=referral&utm_source=tedcomshare)