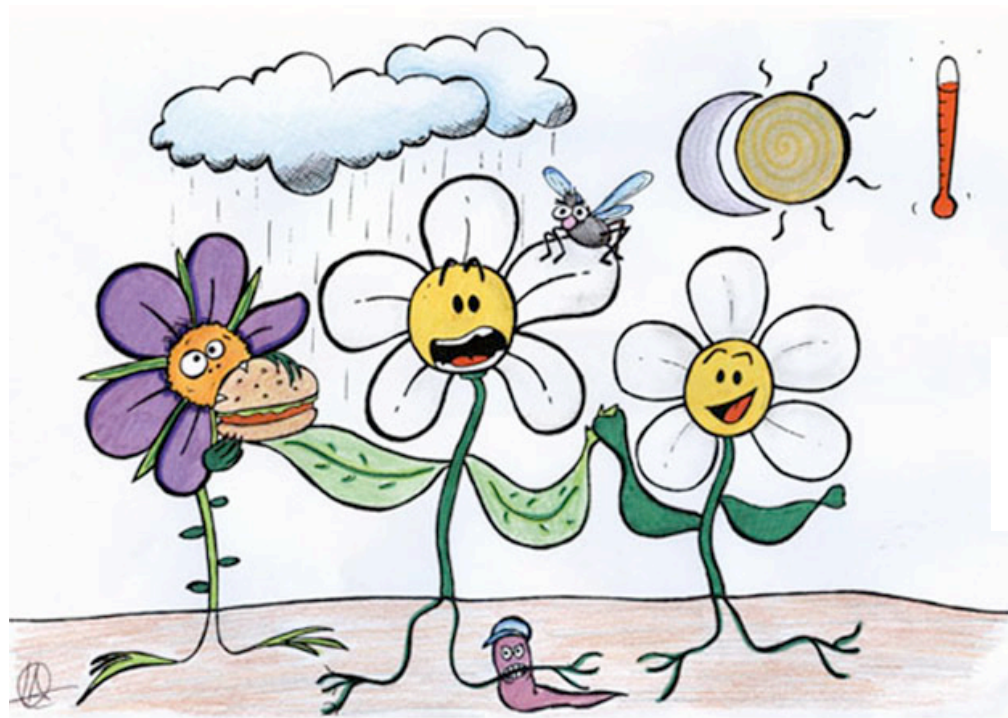


Bi8240 GENETIKA ROSTLIN

Prezentace 08 Biotechnologie ve šlechtění

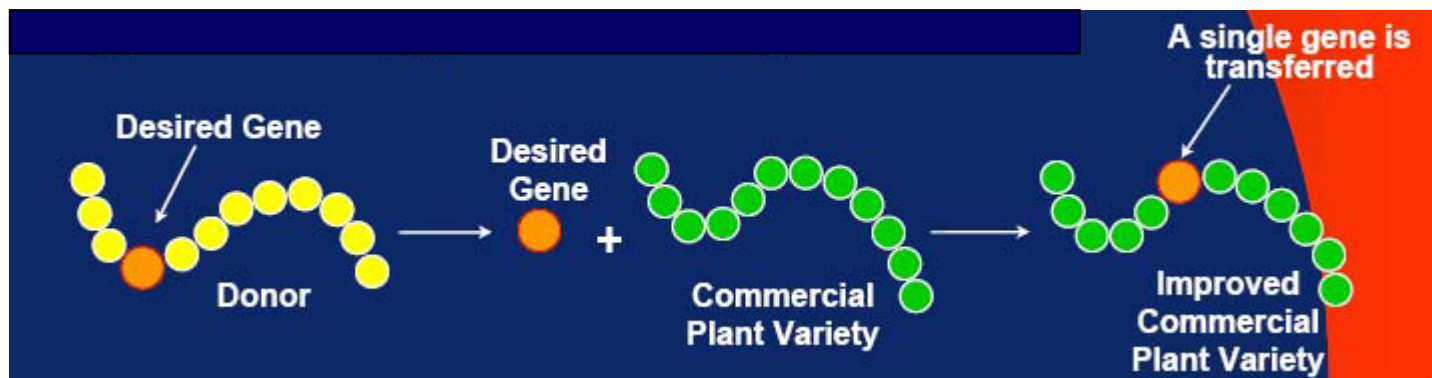


Biotechnologie jsou rozšířením šlechtění Obohacení klasických postupů ve šlechtění

Tradiční šlechtění – kombinuje mnoho genů současně



Biotechnologie – cílené vkládání genů



Explantátové kultury

Biotechnologické metody

Základní principy

- ➔ Totipotentní schopnost somatické buňky
- ➔ Regenerace celistvých rostlin i z 1 buňky
- ➔ Sterilní prostředí *in vitro*, výživa

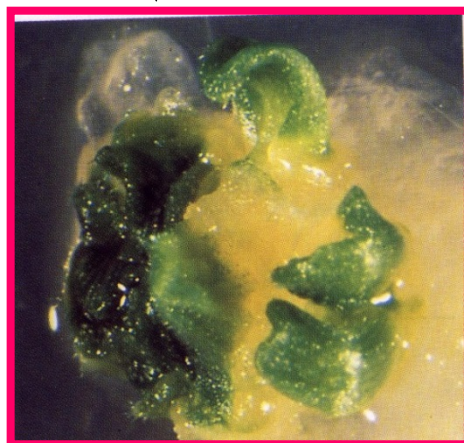
Cíle

- ➔ Regenerace při genetických modifikacích
- ➔ Vegetativní množení materiálu
- ➔ Indukce haploidie

Primární explant



Kalus

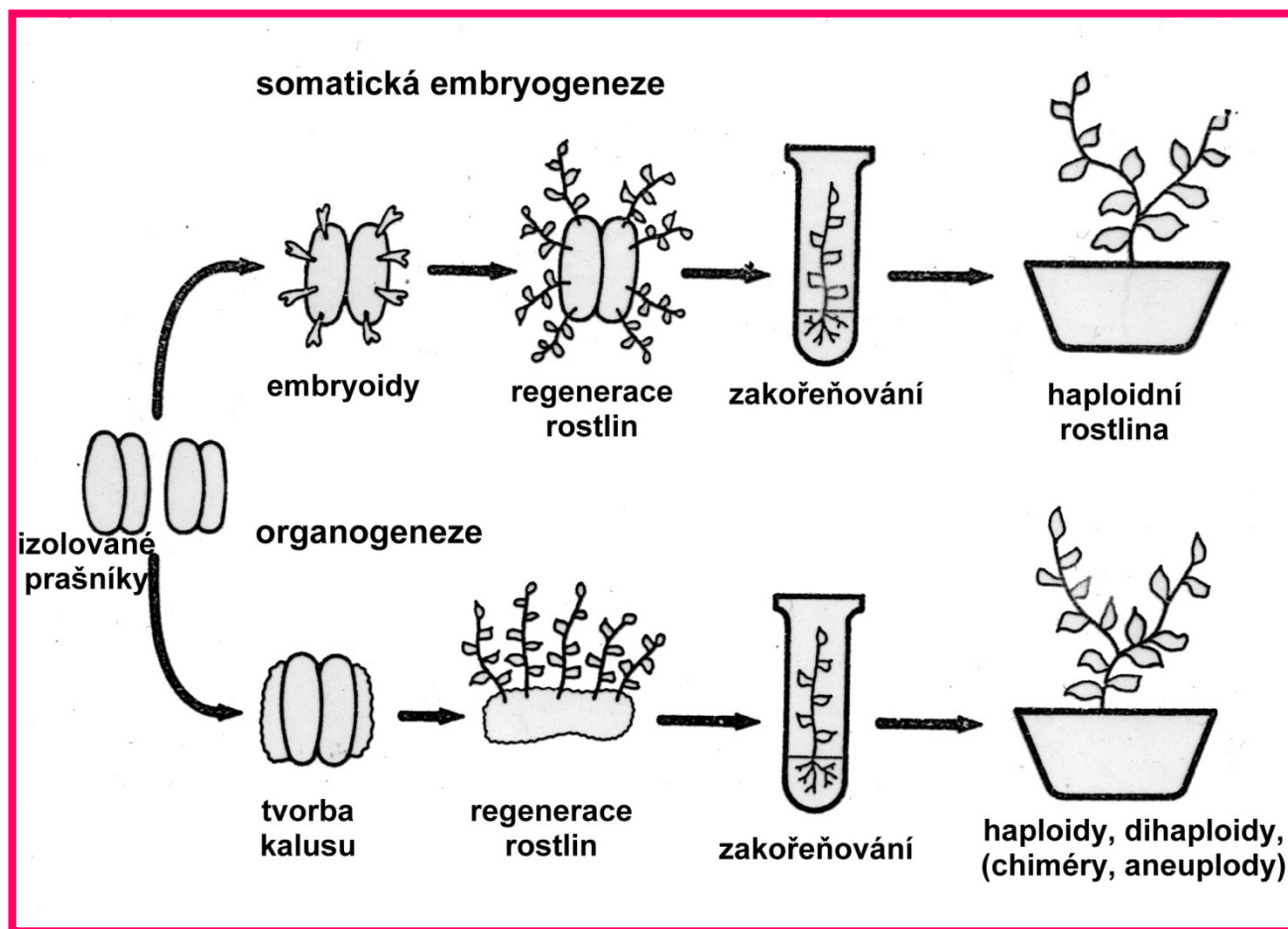


Regenerace
rostlin

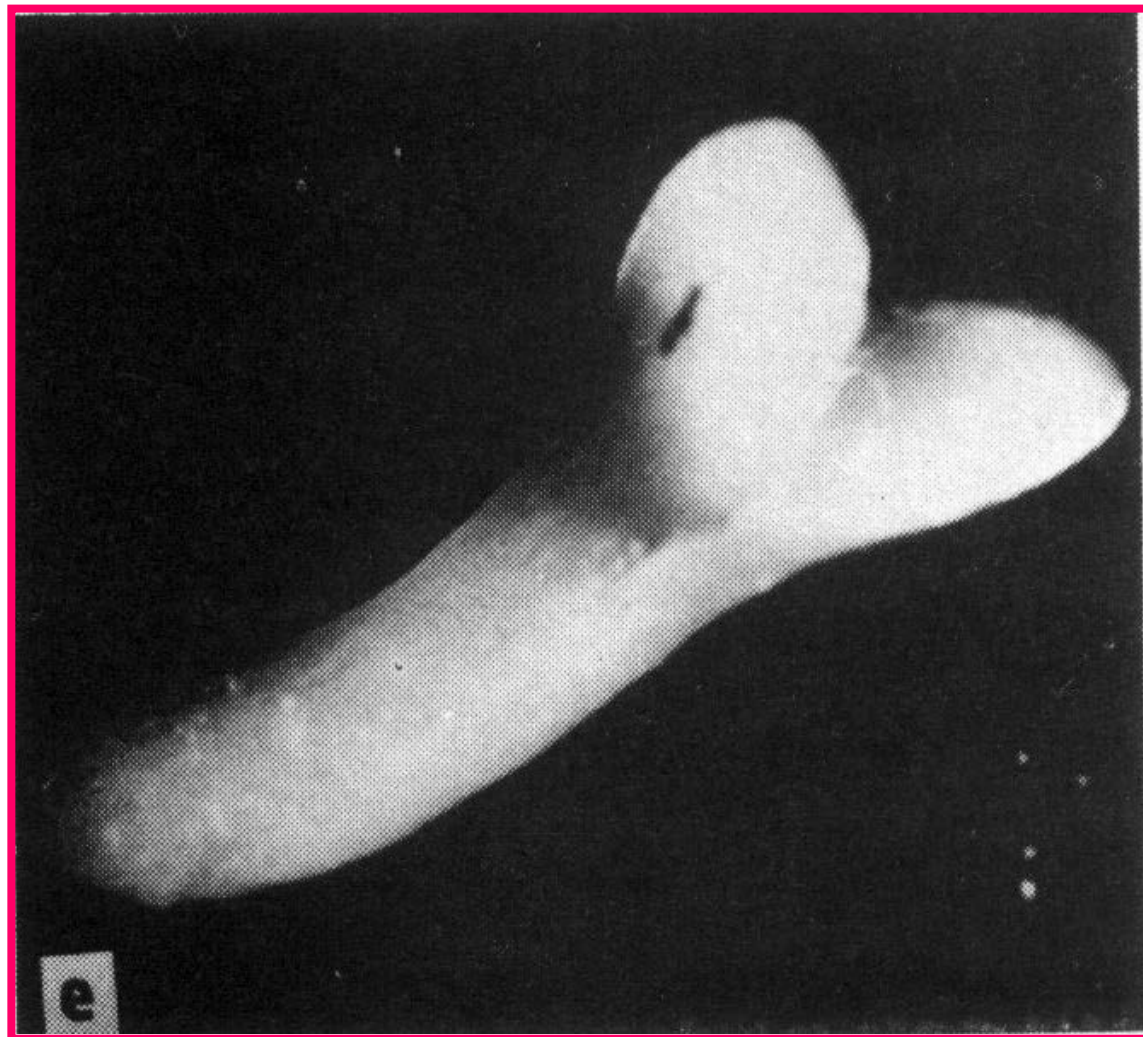


Základní schéma regenerace rostlin v podmínkách *in vitro*

Primární explantát

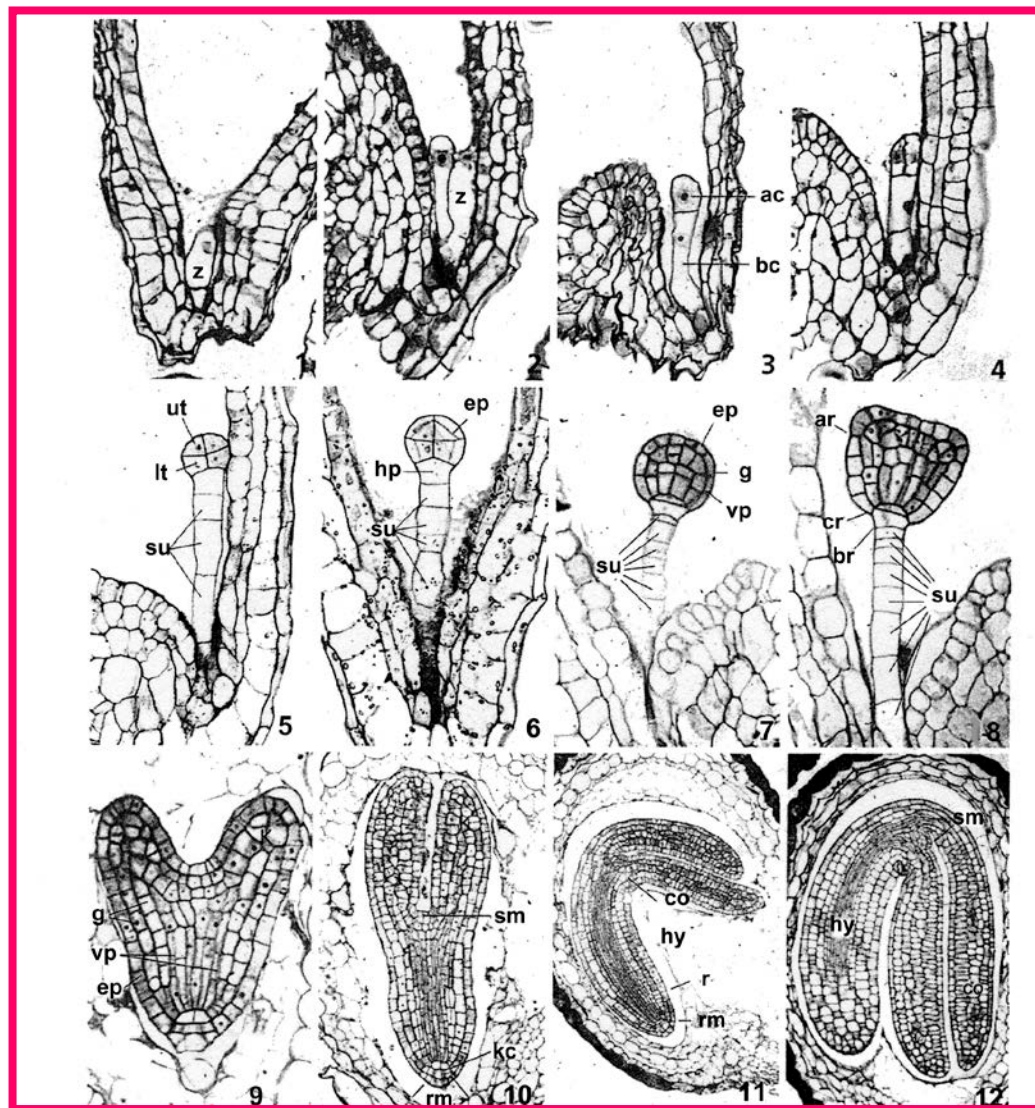


Embryoid



Novák, 1990

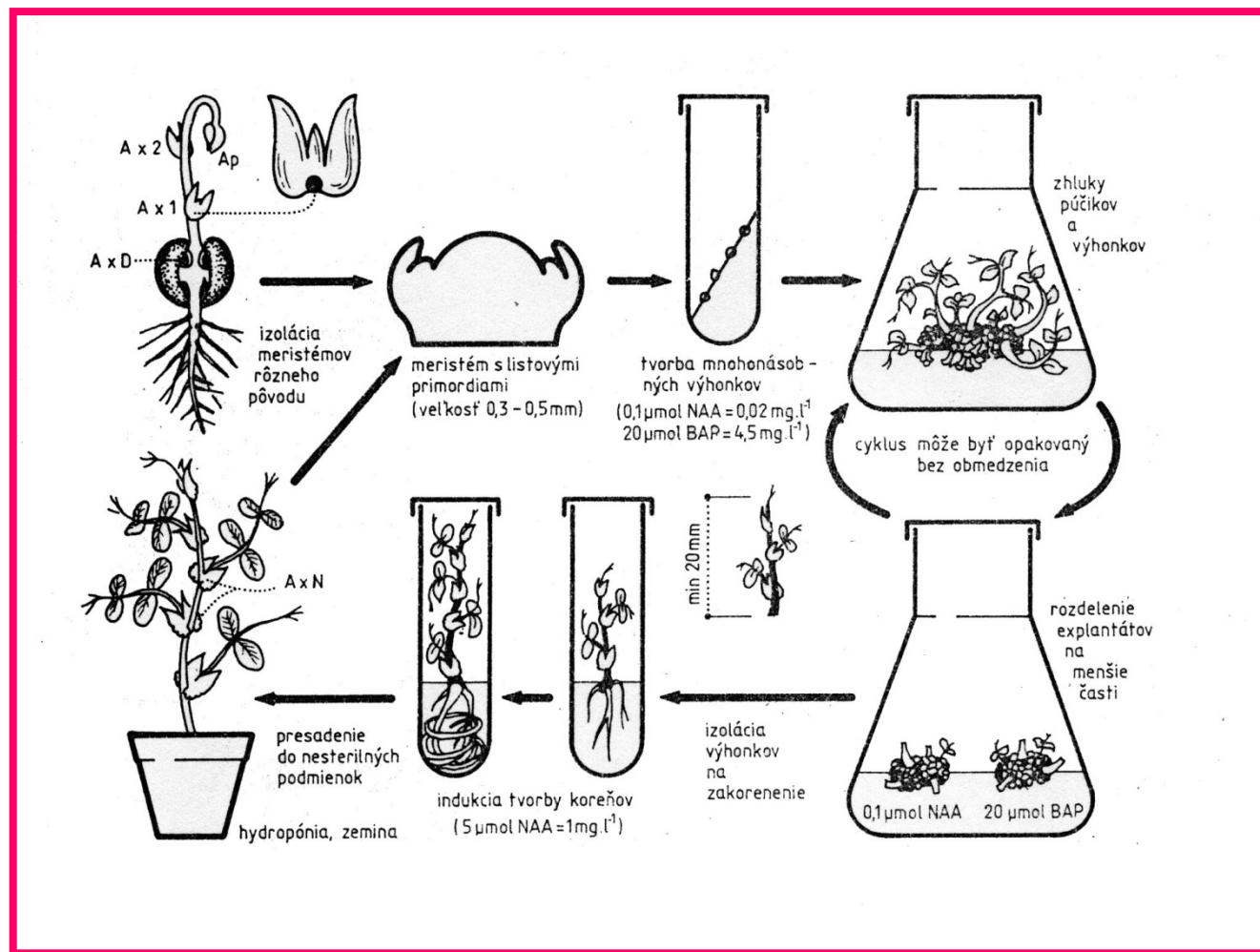
Jednotlivá stadia embryogeneze rostlin



Metody významné ve šlechtění

- **Regenerace rostlin** – genetické modifikace
- **Mikropropagace, klonové množení**
- **Konzervace genotypů**
- **Indukce haploidů**
 - kultury izolovaných prašníků
 - mikrospor
- **Mezidruhová hybridizace**
 - embryo kultury
 - opylení *in vitro*
- **Somatická hybridizace** – fúze protoplastů

Schéma mikropropagace



Cyclamen

Malus

Lilium



Zakořeňování *Lilium*



Orchideje



Malus



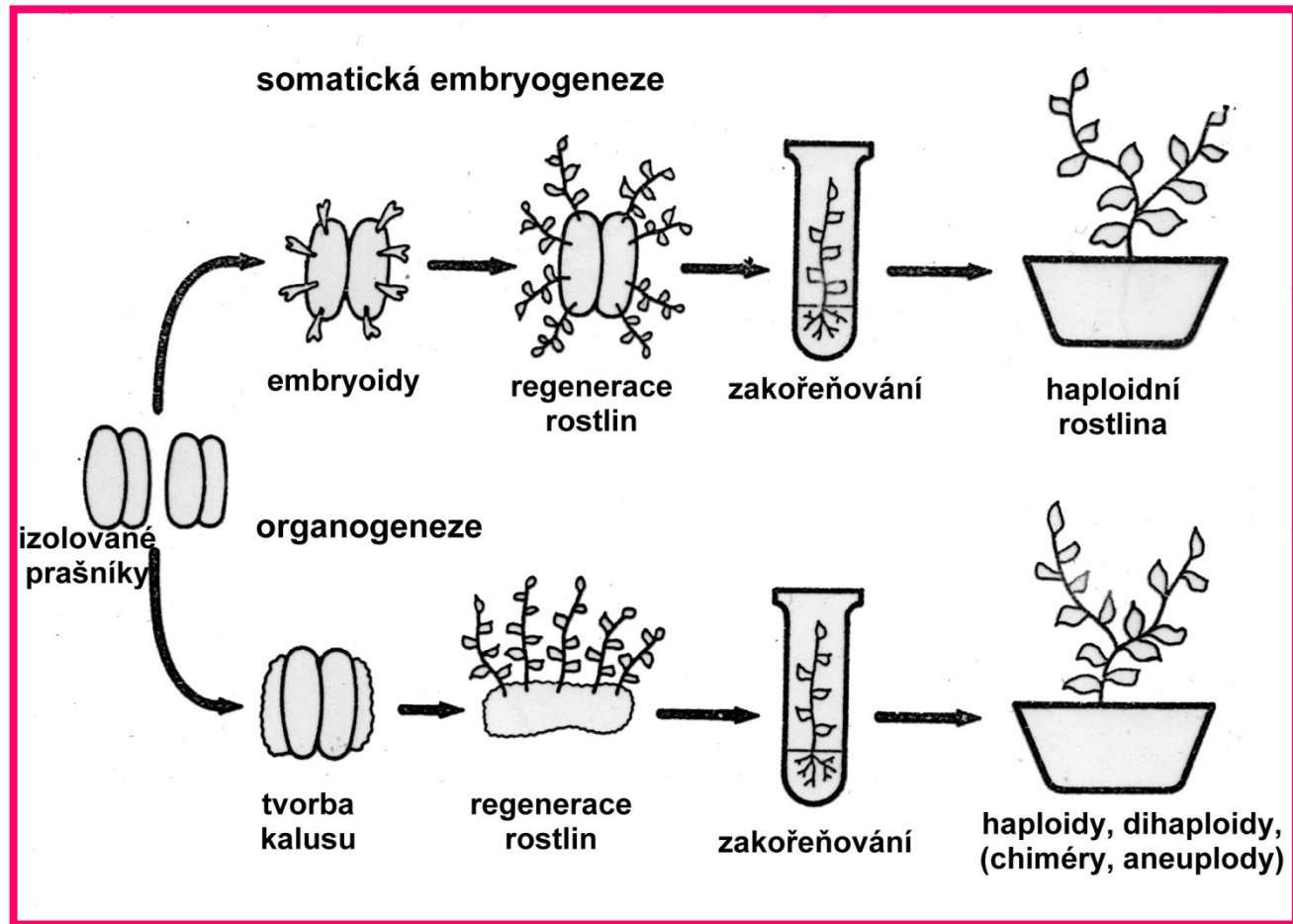
Kultivace v kontrolovaných podmínkách



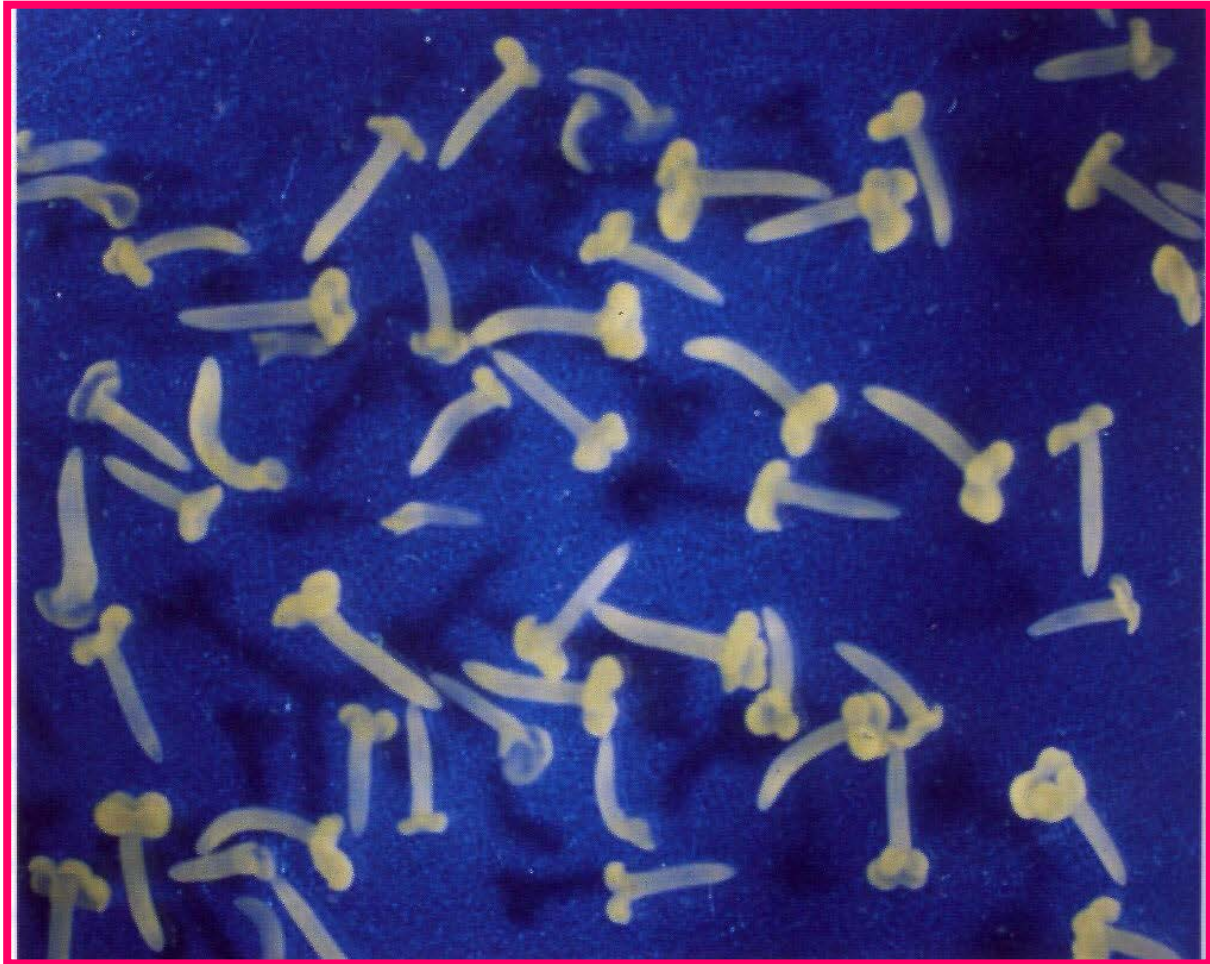
Haplodie v podmínkách *in vitro*

1. Kalusové a suspenzní kultury *in vitro*
2. Pylové a prašníkové kultury *in vitro*
 - (tabák, ječmen, rýže)
3. Mezdruhové křížení a eliminace chromozomů
 - (rod *Hordeum*)

Schematické znázornění androgeneze



Tvorba embryoidů v kultuře mikrospór *Brassica napus*



Tvorba embryoidů v kultuře prašníků *Capsicum annuum*



Regenerace rostlin v prašnickové kultuře *Hordeum vulgare*



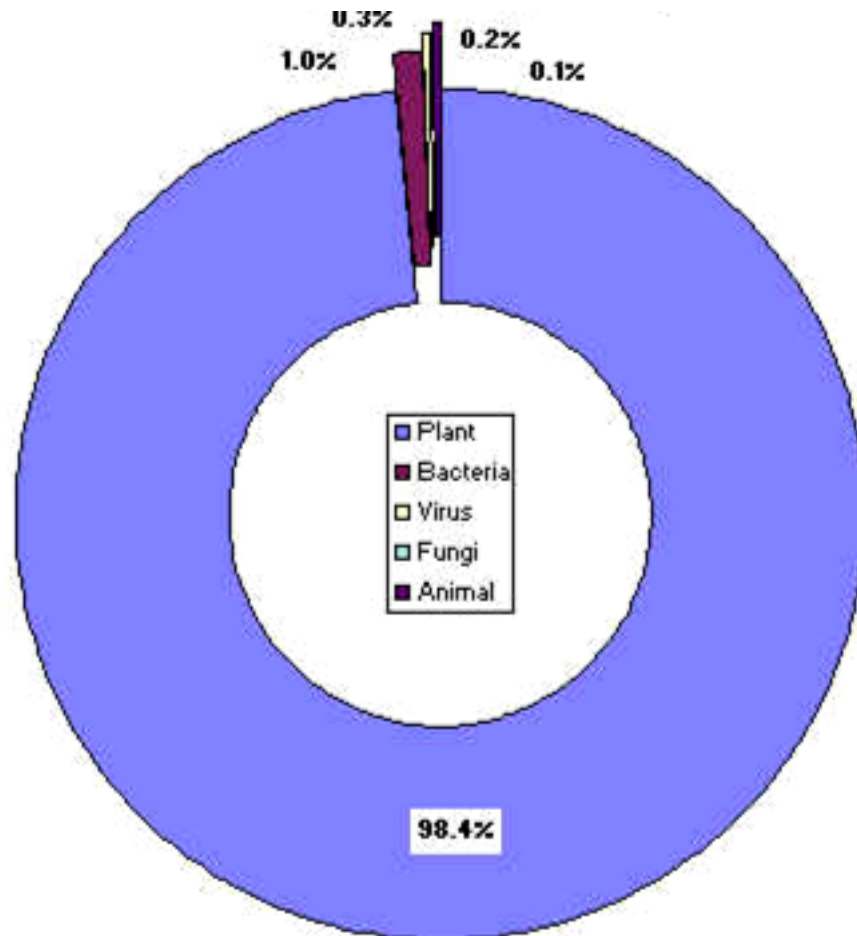
Genetické modifikace rostlin

- Jsou definovány jako přímé a cílené zásahy do dědičného materiálu organismů, čímž rozumíme DNA.

Význam

- **Teoretický** modelové rostliny, metody transformace
- **Aplikovaný** šlechtění, komerční využití - zemědělství, zahradnictví, lékařství, farmacie
- **Současnost** nové postupy – předmět Aplikovaná genetik a šlechtění

Podíl genetických modifikací u různých organismů



Metody transformace u rostlin

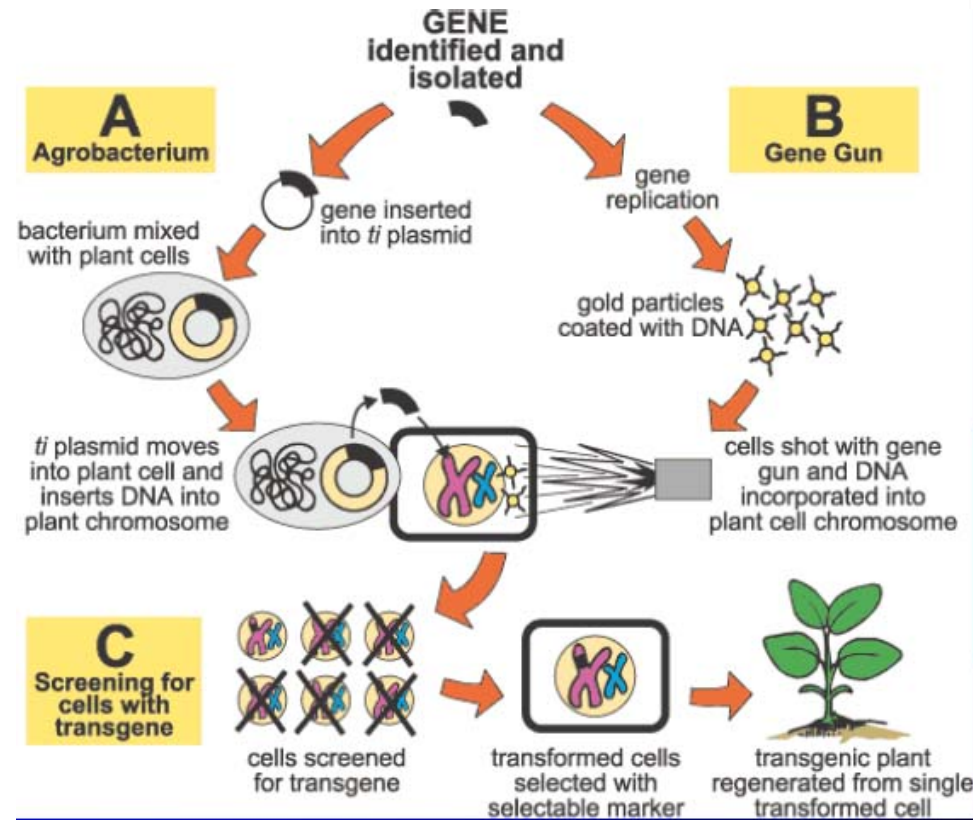
Podle přenosu DNA do buněk:

➔ Nepřímé:

- *Agrobacterium*
- semena, listové disky, kořeny, embrya, buňky
- vakuová infiltrace

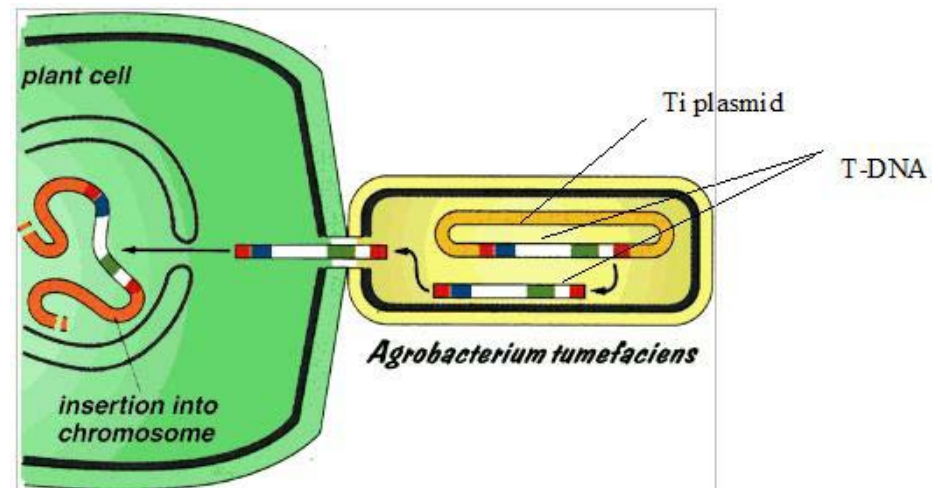
➔ Přímé:

- elektroporace protoplastů
- mikroinjekce DNA
- bombardování mikroprojektily
- PEG



Rod *Agrobacterium*

- ➔ Půdní gramnegativní bakterie
- ➔ Čeleď: *Rhizobiaceae*
- ➔ Druhy:
 - *A. tumefaciens*
 - *A. rhizogenes*
 - *A. rubi*
 - *A. radiobacter*
- ➔ Plazmidy Ti, Ri



Transgeny

- ➔ **Geny chimérické**

- ➔ **Geny markerové**
 - selektovatelné *hpt*, *npt*, *bar*
 - signální *GUS*, *GFP* (s rostlinnými promotory)

- ➔ **Exprese transgenu, počet transgenů**

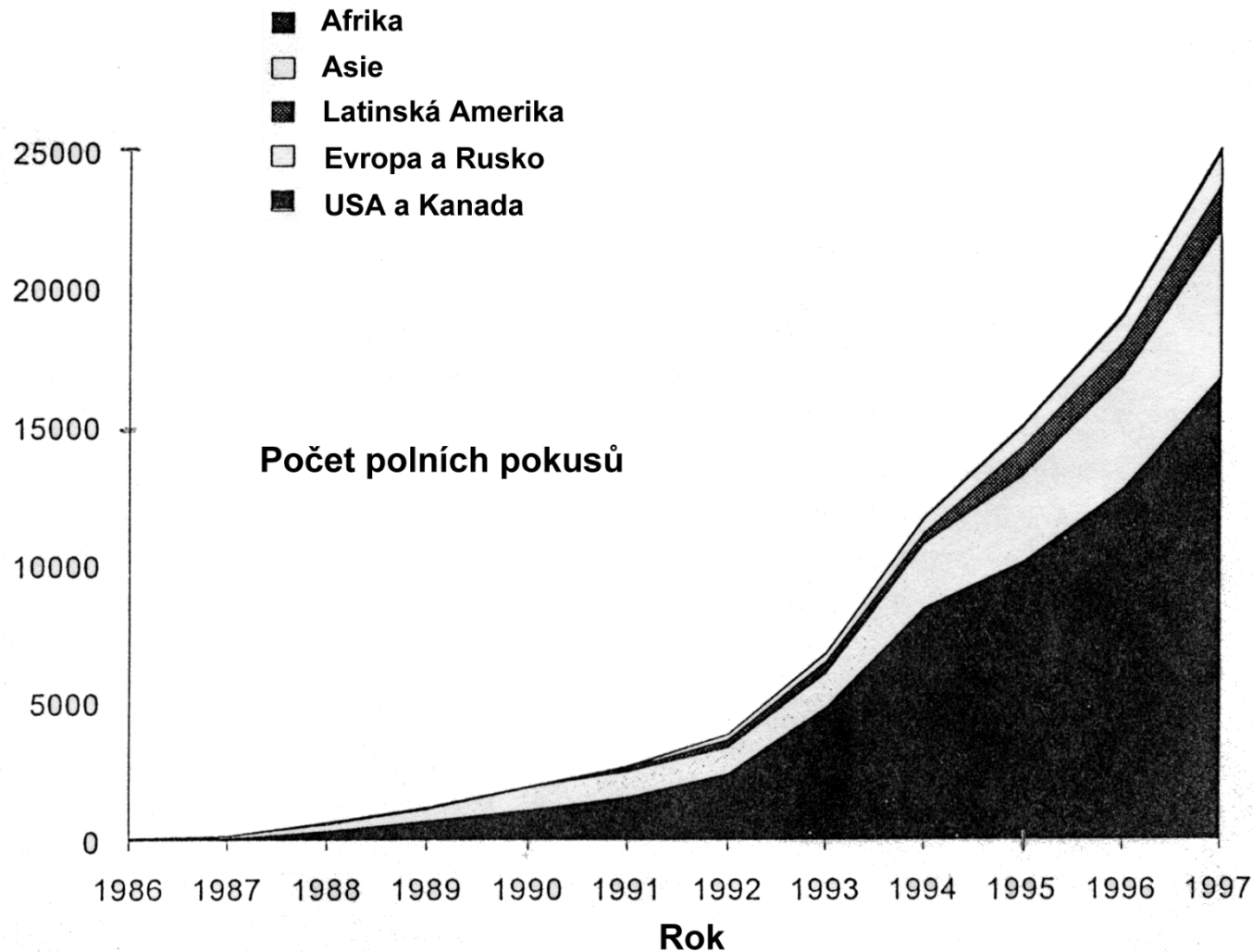
Historie transformace rostlin

- ➔ **1983** tabák
- ➔ **1984** mrkev, štirovník
- ➔ **1985** řepka olejka, petúnie
- ➔ **1986** vojtěška, huseníček, rajče, tykev
- ➔ **1987** chřest, bavlník, len, ředkvička, salát, brambor, žito, slunečnice
- ➔ **1988** květák, celer, rýže, sója,

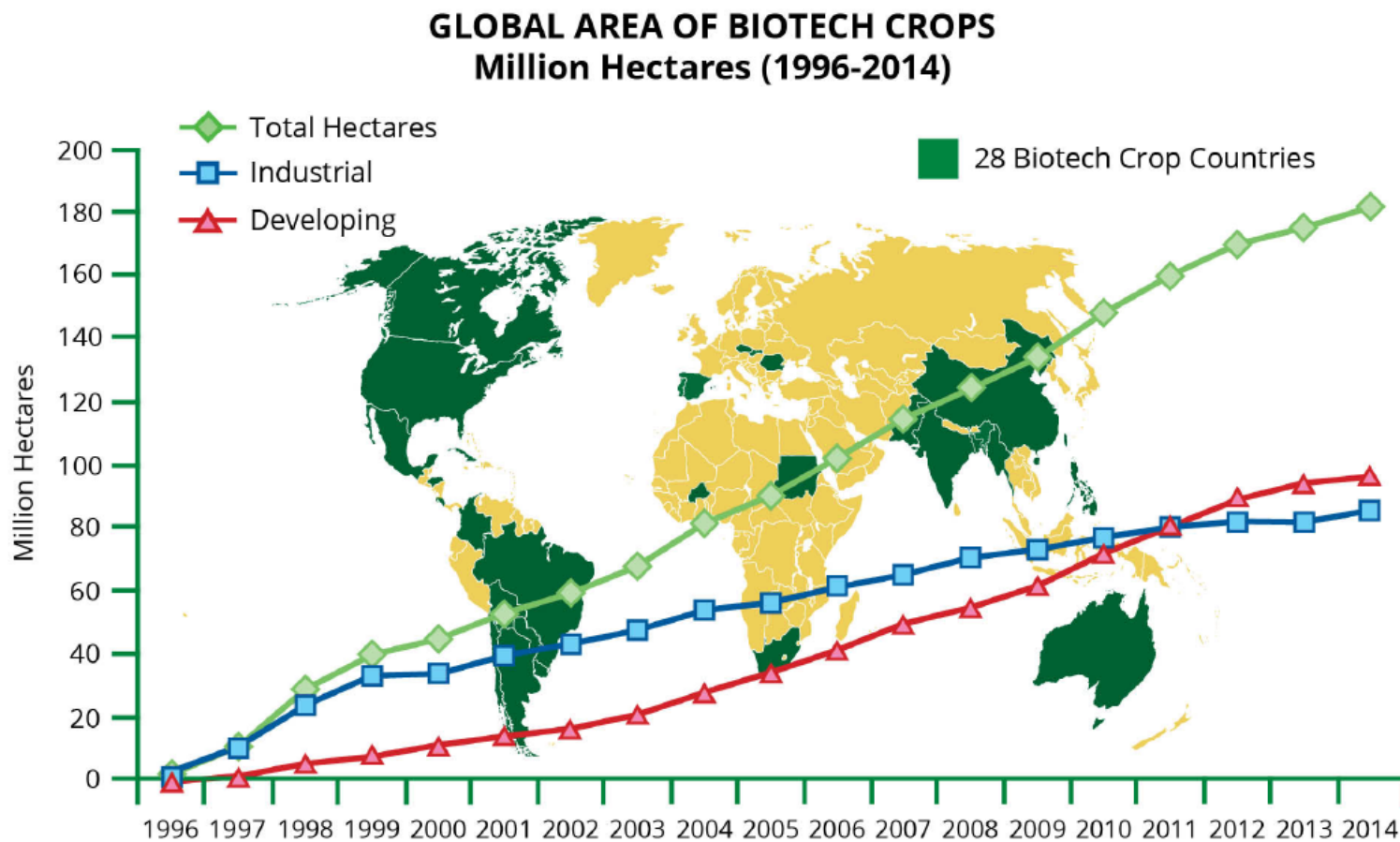
Historie transformace rostlin

- ➔ **1989** jabloň
- ➔ **1990** chryzantéma, citrus, jetel, papája, jahodník
- ➔ **1991** karafiát, kiwi, meloun, švestka
- ➔ **1992** cukrovka, pšenice
- ➔ **1993** hrách, ječmen

Počet polních pokusů s geneticky modifikovanými plodinami 1986–1997



Celková plocha GM plodin (mil. ha) 1996–2014



A record 18 million farmers, in 28 countries, planted 181.5 million hectares (448 million acres) in 2014, a sustained increase of 3 to 4% or 6.3 million hectares (~16 million acres) over 2013.

Source: Clive James, 2014.

Celková plocha GM plodin (mil. ha) 1996–2006

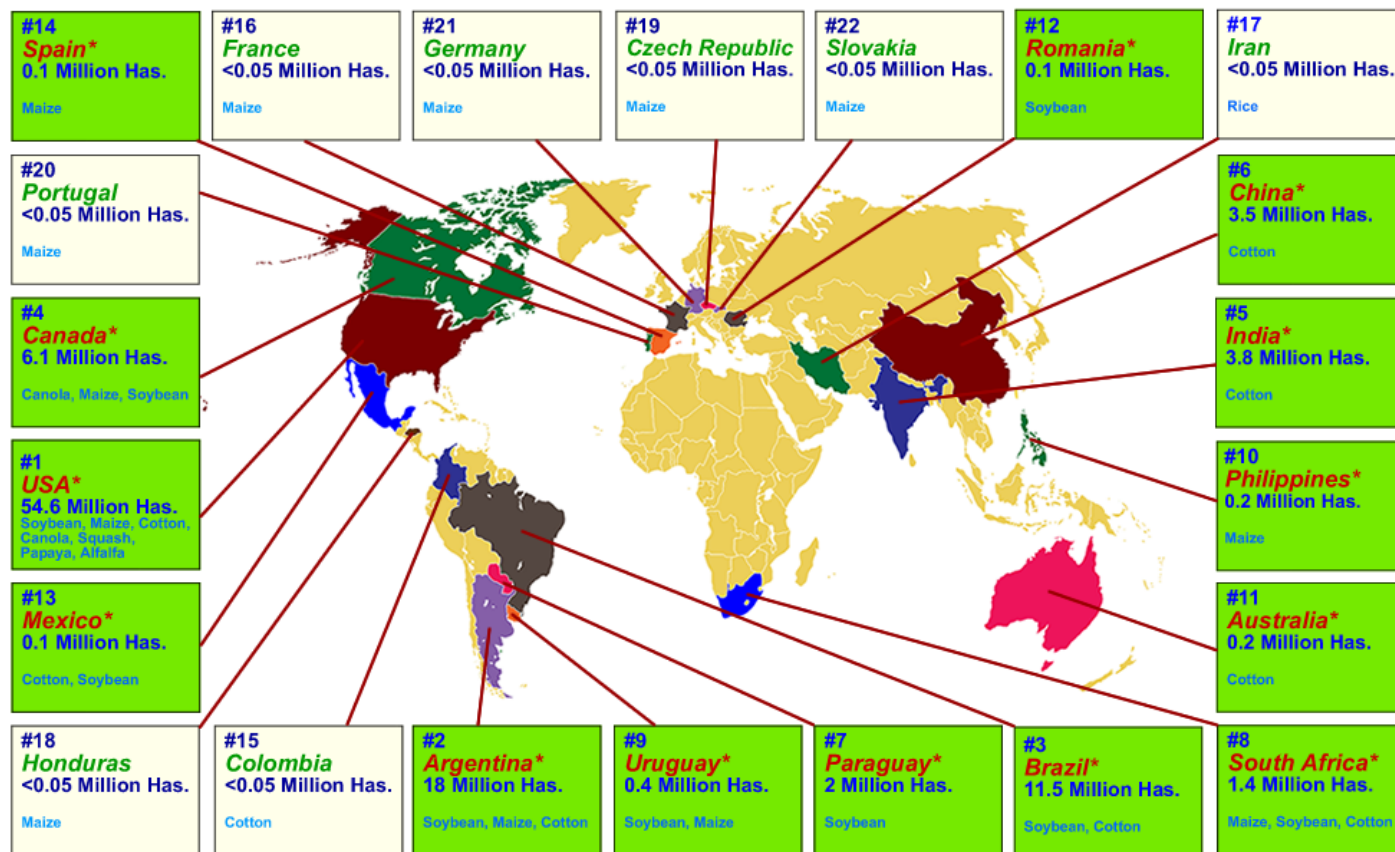
Rok	Hektarů (mil.)	Akrů (mil.)
1996	1,7	4,3
1997	11,0	27,5
1998	27,8	69,5
1999	39,9	98,6
2000	44,2	109,2
2001	52,6	130,0
2002	58,7	145,0
2003	67,7	167,2
2004	81,0	200,0
2005	90,0	222,0
2006	102,0	252,0
Celkem	576,6	1425,3

13% nárůst, 12 mil. hektarů (30 milionů akrů) mezi roky 2005 a 2006.

Zdroj: Clive James, 2006

Celková plocha GM plodin v 21 zemích r. 2006 (mil. ha)

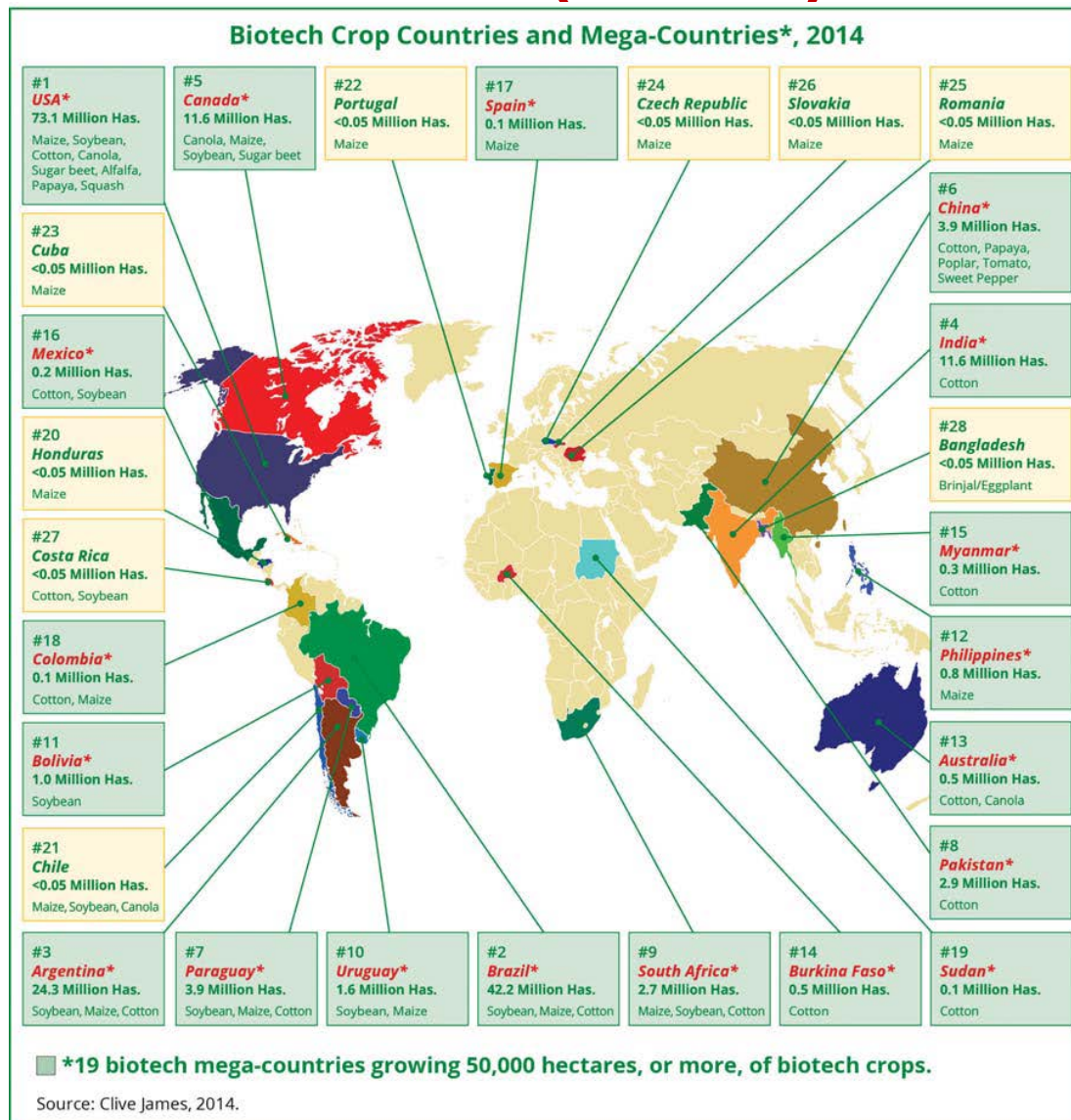
Biotech Crop Countries and Mega-Countries*, 2006



* 14 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

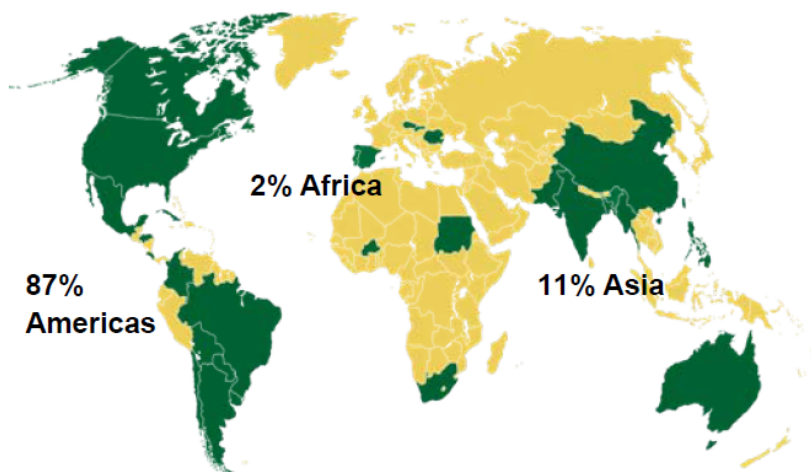
Source: Clive James, 2006

Celková plocha GM plodin v 28 zemích r. 2014 (mil. ha)

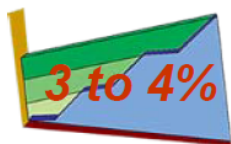


Celková plocha GM plodin v 28 zemích r. 2014

Global Area (Million Hectares) of Biotech Crops, 2014: by Country



Increase over 2013



28 countries which have adopted biotech crops

In 2014, global area of biotech crops was 181.5 million hectares, representing an increase of 3 to 4% over 2013, equivalent to 6.3 million hectares.

Source: Clive James, 2014.

Biotech Mega Countries

50,000 hectares (125,000 acres), or more

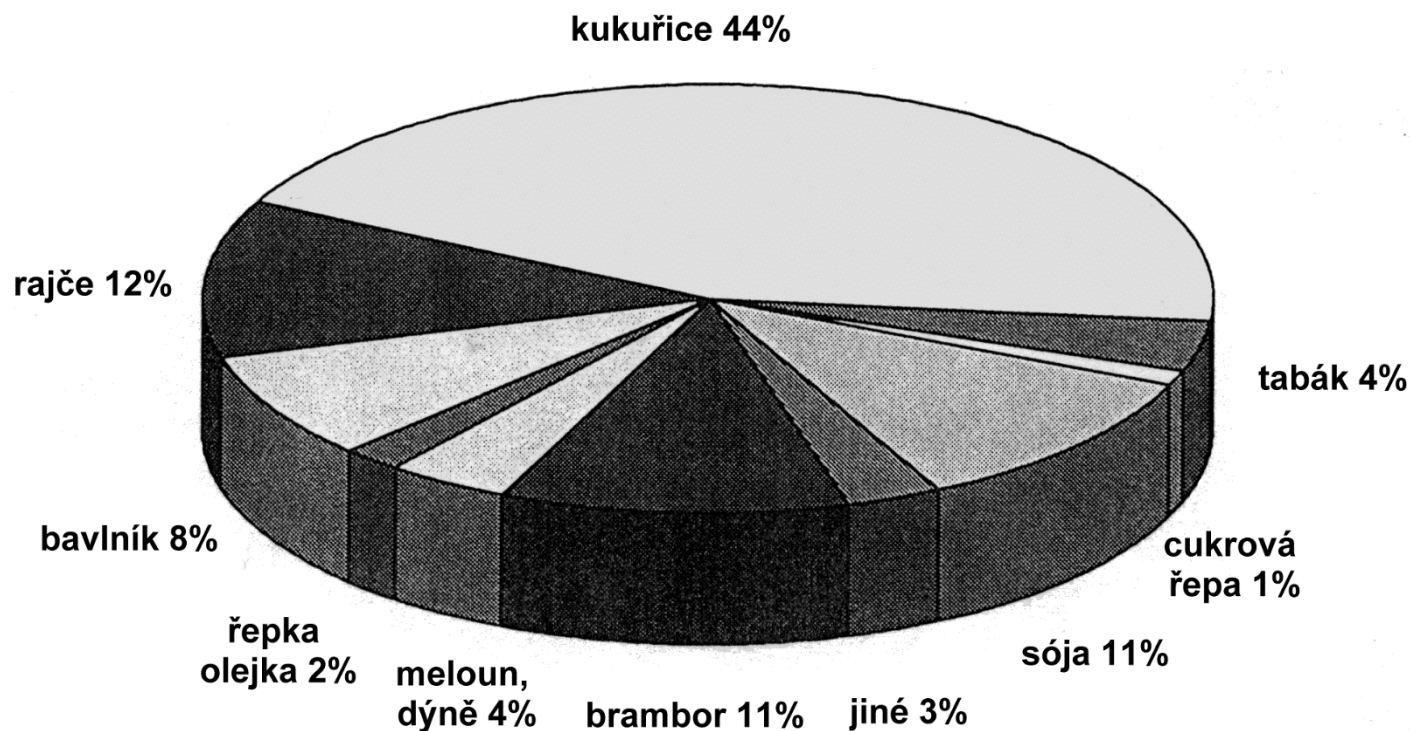
	Million Hectares
1. USA	73.1
2. Brazil*	42.2
3. Argentina*	24.3
4. India*	11.6
5. Canada	11.6
6. China*	3.9
7. Paraguay*	3.9
8. Pakistan*	2.9
9. South Africa*	2.7
10. Uruguay*	1.6
11. Bolivia*	1.0
12. Philippines*	0.8
13. Australia	0.5
14. Burkina Faso*	0.5
15. Myanmar*	0.3
16. Mexico*	0.2
17. Spain	0.1
18. Colombia*	0.1
19. Sudan*	0.1

Less than 50,000 hectares

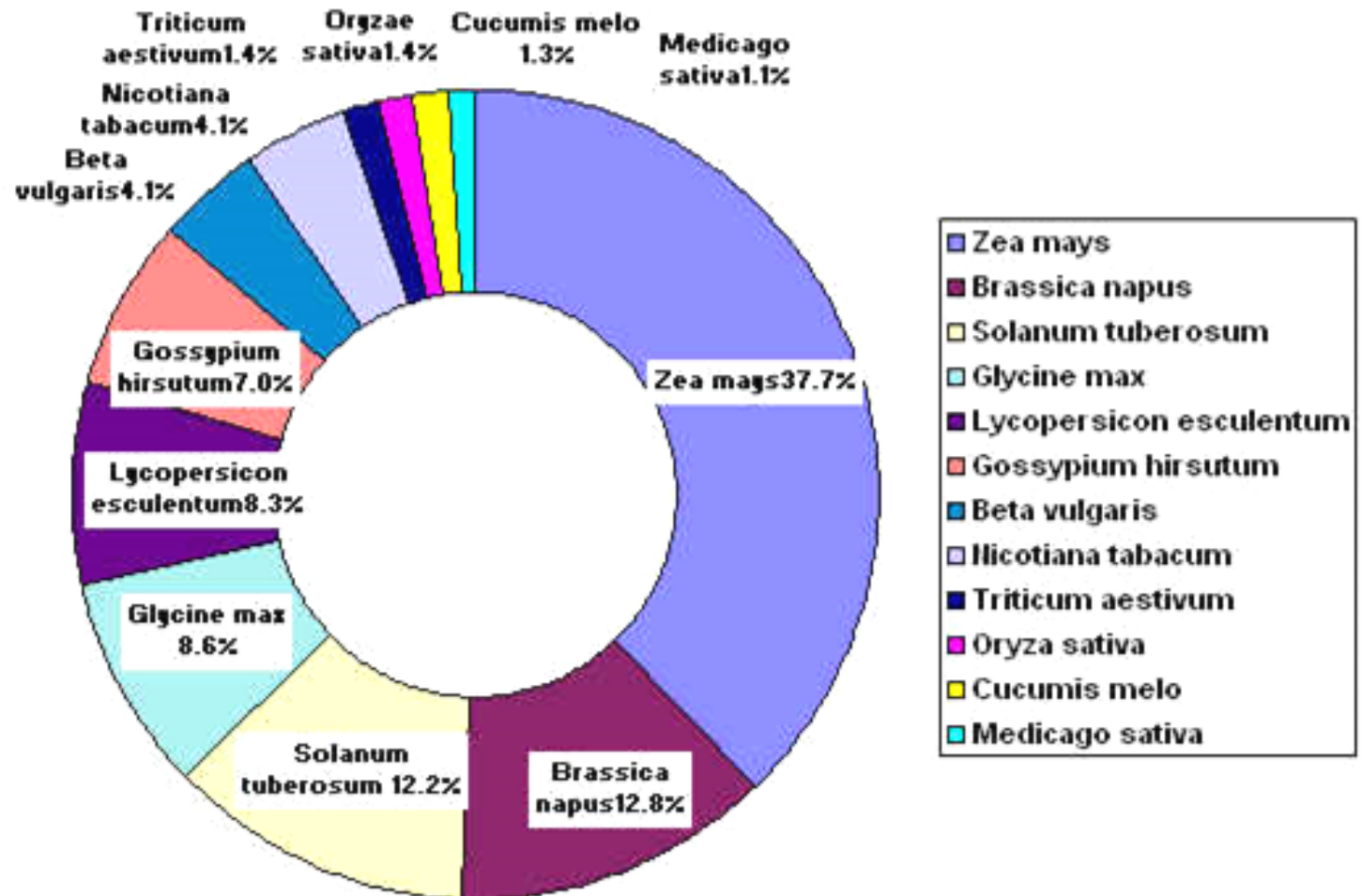
Honduras*	Romania
Chile*	Slovakia
Portugal	Costa Rica*
Cuba*	Bangladesh*
Czech Republic	

* Developing countries

Nejvíce rozšířené geneticky modifikované plodiny (1997)



Nejvíce rozšířené geneticky modifikované plodiny (2001)

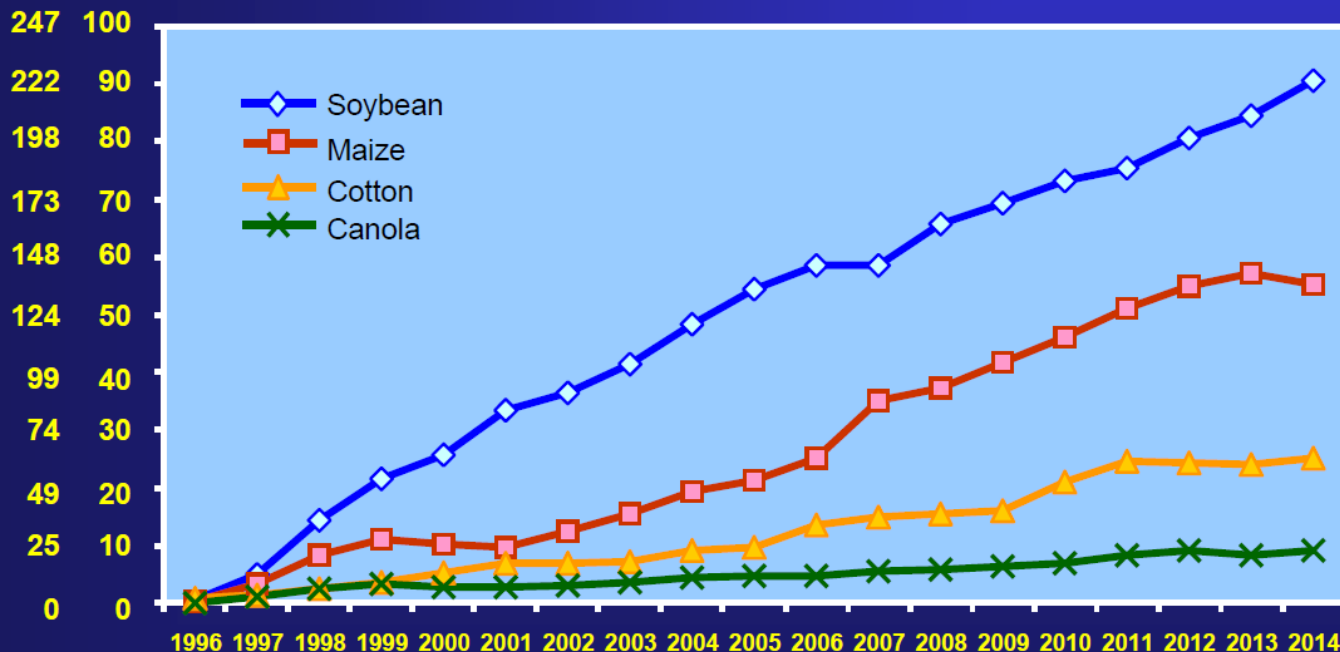


Celková plocha hlavních GM plodin 1996–2014 (mil. ha)

Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2014:
By Crop (Million Hectares, Million Acres)



M Acres



Source: Clive James, 2014

Cíle genetických modifikací

GM 1. generace

- ➔ **Rezistence k herbicidům.**
- ➔ **Rezistence vůči virům, bakteriím a hmyzím škůdcům.**

GM 2. generace

- ➔ **Zvýšení nutriční hodnoty.**
- ➔ **Zlepšení chuti, kvality a trvanlivosti potravin.**
- ➔ **Modifikace organismů pro přežití v extrémních podmínkách.**

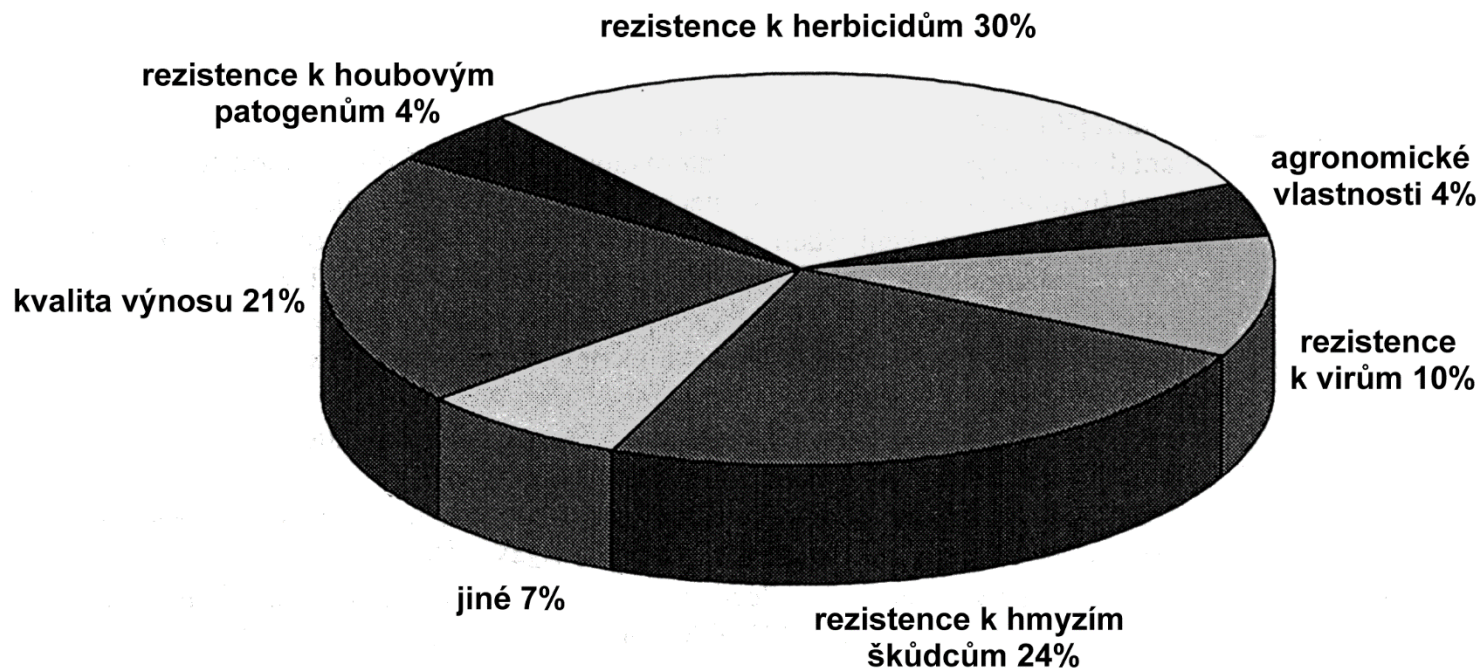
Cíle genetických modifikací

- ➔ Modifikace rostlin pro získání obnovitelných a ekologických zdrojů pro chemickou výrobu.
- ➔ Zvýšení mechanické stability proti škodám při transportu a skladování.

GM 3. generace

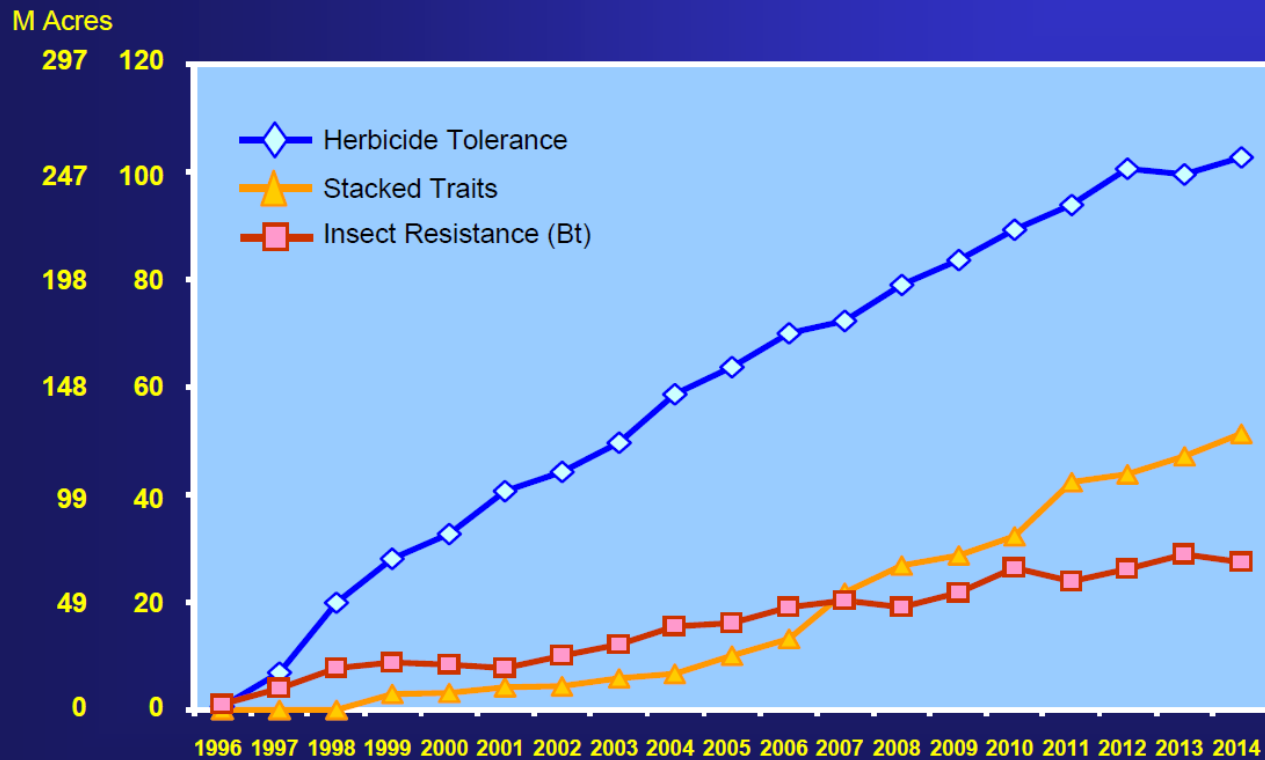
- ➔ Nové typy rostlin

Nejčastější znaky u geneticky modifikovaných plodin r. 1997



Celková plocha GM plodin podle znaku 1996–2014 (mil. ha)

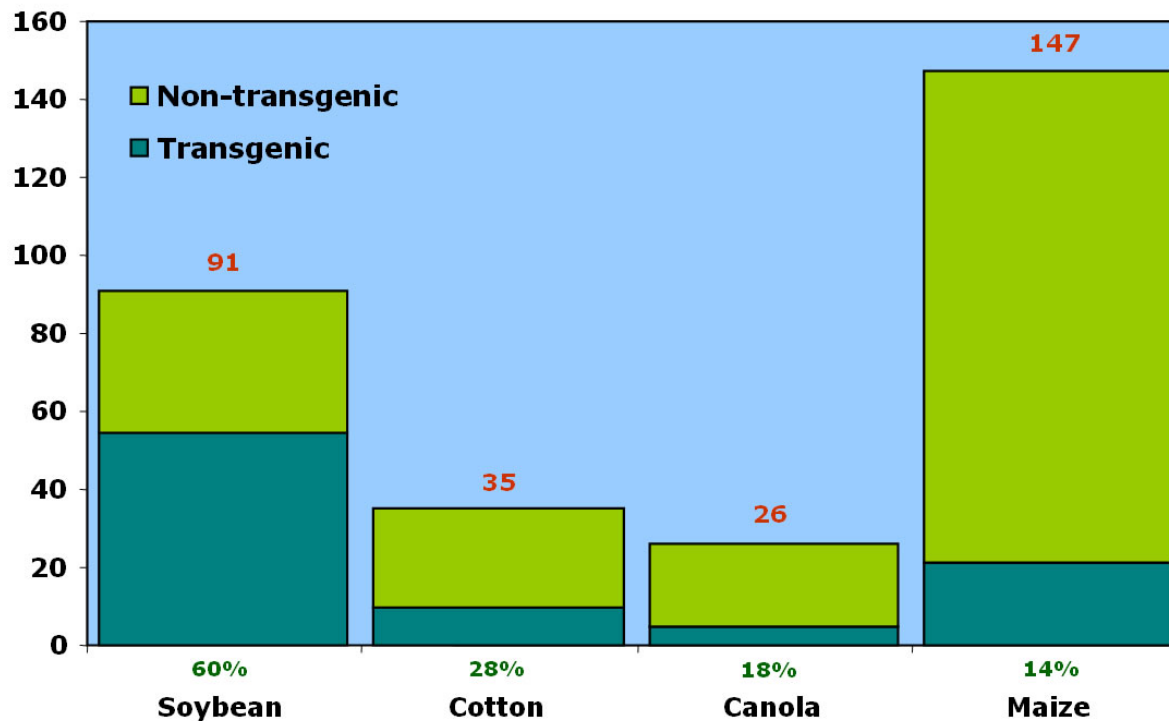
Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2014:
By Trait (Million Hectares, Million Acres)



Source: Clive James, 2014

USA 2010 Kukuřice Smartstax 8 genů

Podíl GM čtyř hlavních plodin na celkové produkci r. 2005



Source: Clive James, 2005

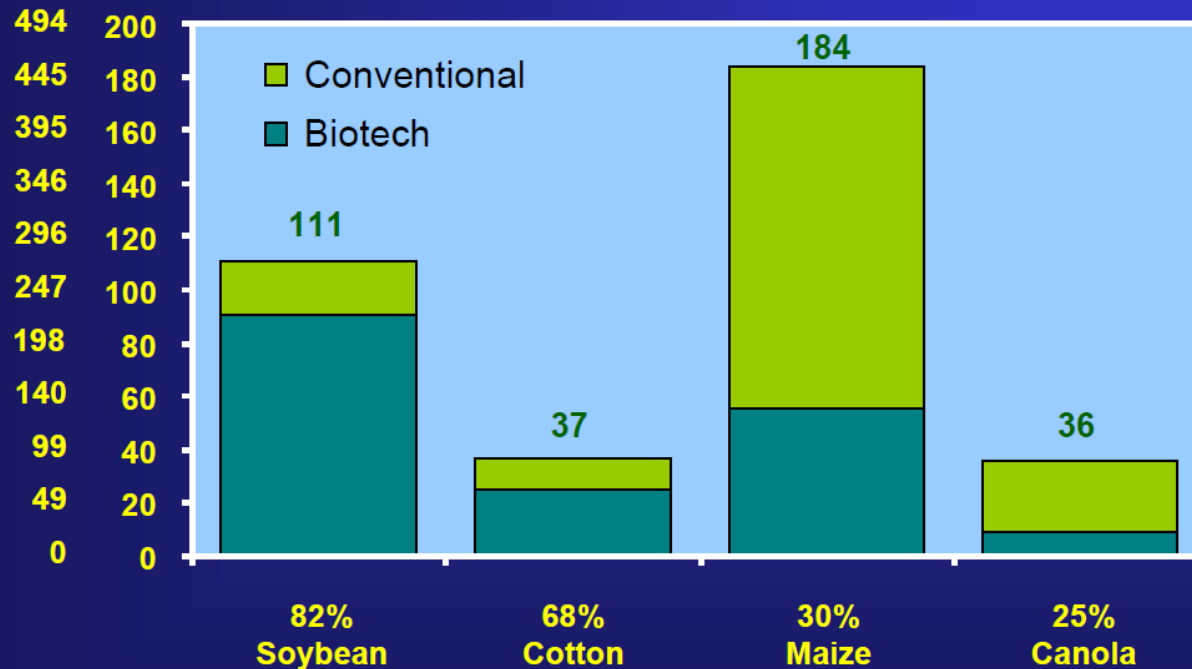


Podíl GM čtyř hlavních plodin na celkové produkci r. 2014

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2014



M Acres



Source: Clive James, 2014
 Hectarage based on FAO Preliminary Data for 2012.

Transgeny pro odolnost k herbicidům

Strategie

1. Transgen kóduje nadbytek enzymu, který je inaktivován herbicidem.
2. Transgen kóduje odlišnou formu enzymu, která není herbicidem inaktivována.
3. Transgen kóduje enzym, který rozkládá herbicid.

Transgeny pro odolnost k herbicidům

Transgen pro odolnost vůči herbicidu glyfozátu (Roundup)

- Herbicid blokuje aktivitu **enzymu 5-enolpyruvátšikimát-3-fosfosyntázy – EPSPS**.
- Transgen kóduje **podobný enzym EPSPS**, který však není glyfozátem blokován.
- Kukuřice, bavlník, sója, řepka olejná, rajče.
- Komerční název těchto plodin **Roundup-ready**

Transgeny pro odolnost k herbicidům

Transgeny pro necitlivost k herbicidům typu fosfinotricinu (známější název glufosinát)

- ➔ Herbicid blokuje **enzym glutaminsyntetázu** zneškodňující amoniak.
- ➔ 2 transgeny (bakteriální původ rod *Streptomyces*)
 - gen **bar** (*bialaphos resistance*)
 - gen **pat** (*phosphinothricinacetyltransferase res.*)
- ➔ Enzymy kódované těmito geny přeměňují herbicid na netoxickou sloučeninu – přenáší acetylové skupiny na AK Alanin fosfinotricinu.
- ➔ Řepka olejka, kukuřice, rýže, pšenice, bavlník, rajče, brambor, cukrová řepa
- ➔ Komerční název plodin **Liberty**.

Transgeny pro odolnost k herbicidům

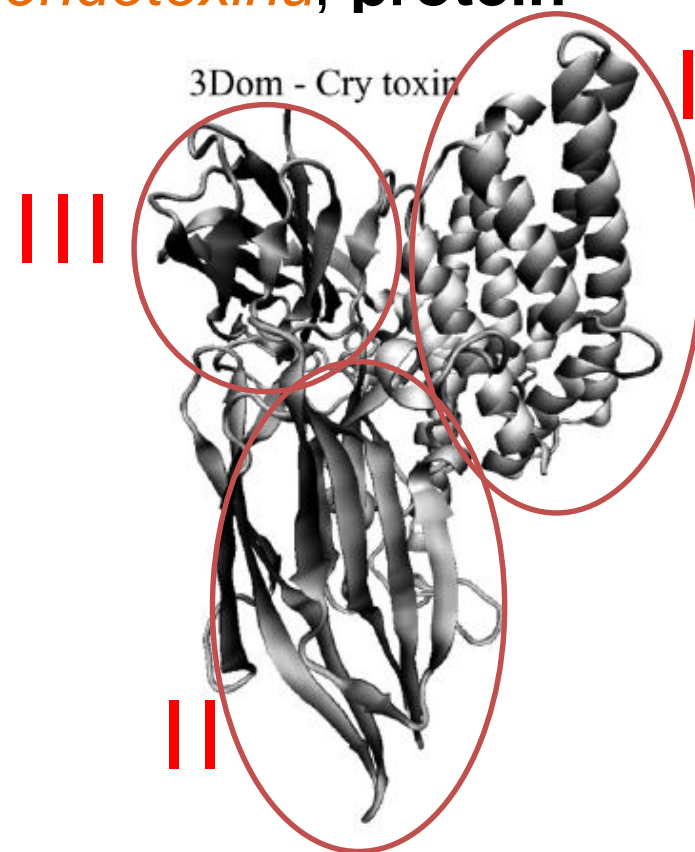
Transgen pro rezistenci proti herbicidům typu sulfonylmočoviny (např. sulfuron)

- Inaktivace enzymu **acetolaktátsyntázy** podílející se na syntéze aminokyselin.
- Transgen – gen z mutantní linie rostliny *Arabidopsis thaliana*.
- Řepka olejka, rýže, len, rajče, cukrová řepa, kukuřice

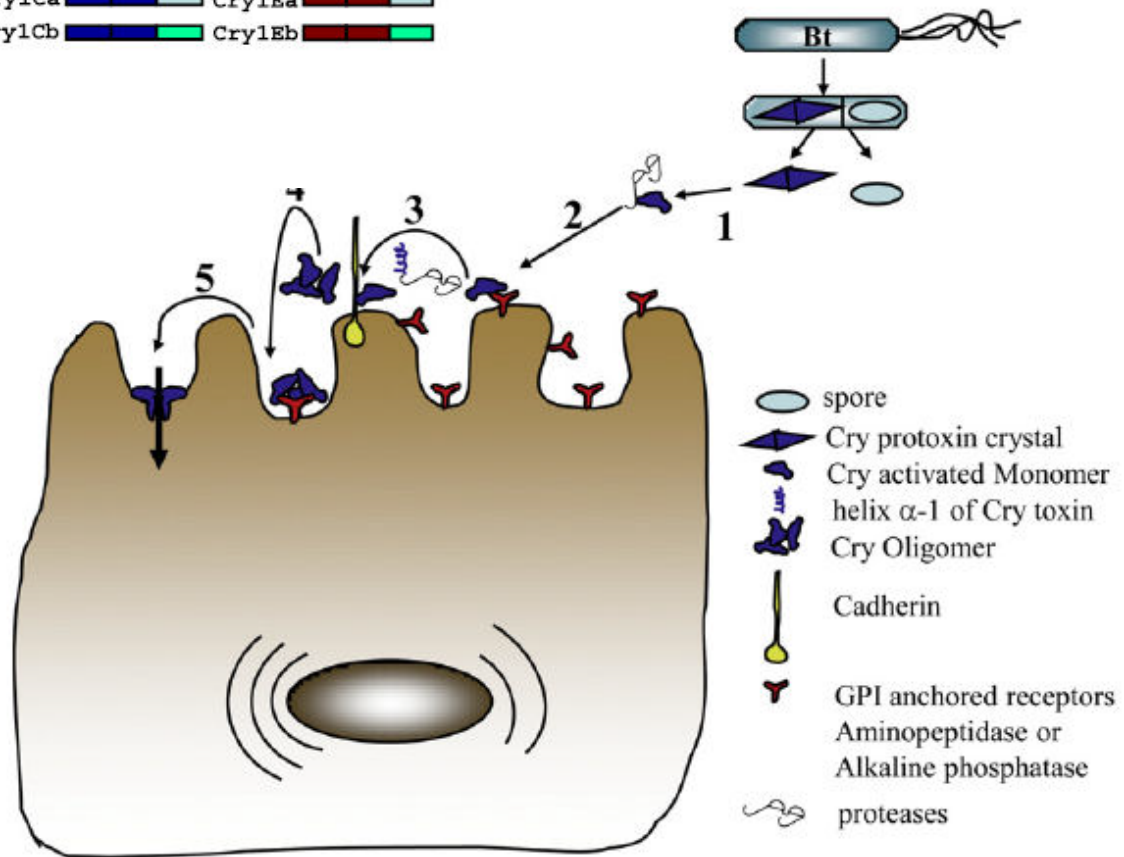
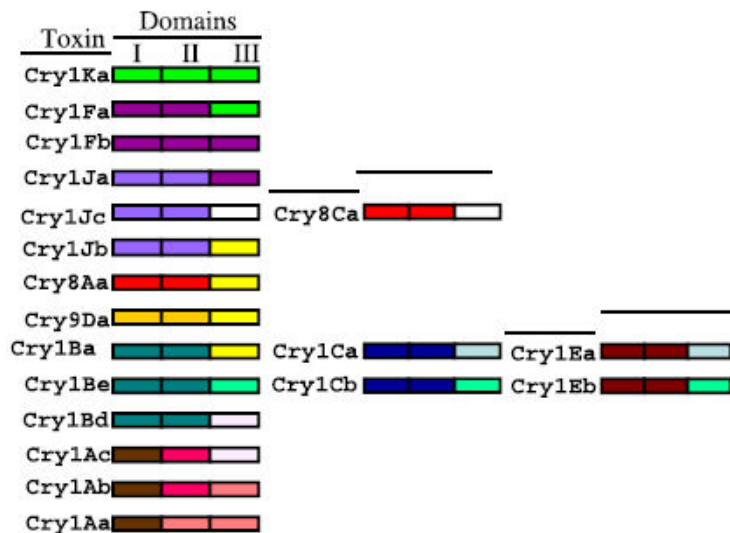
Transgeny pro odolnost k hmyzím škůdcům

1. *Bacillus thuringiensis*

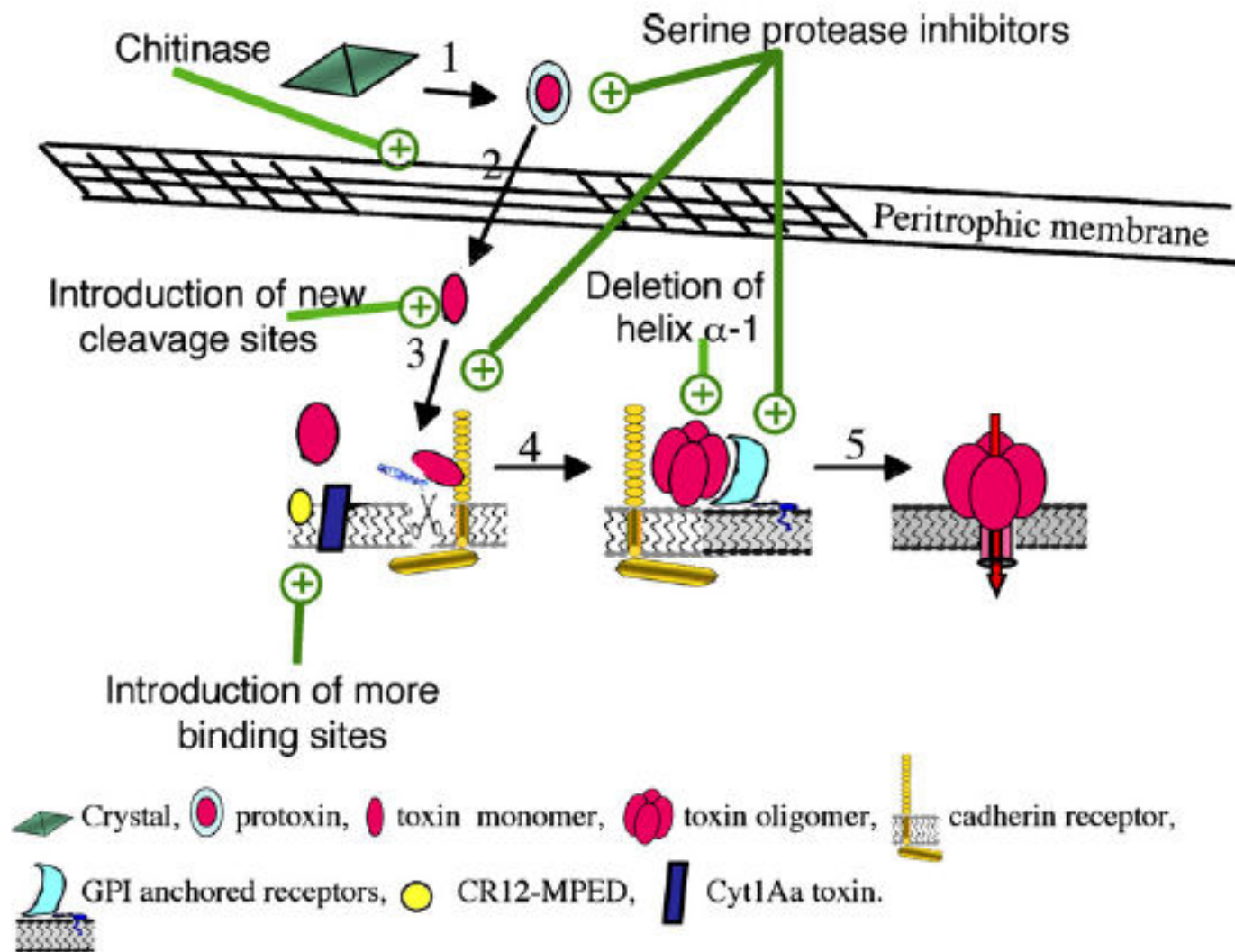
- Tvorba toxického proteinu *δ-endotoxinu*, **protein Cry**.
- selektivní pro škůdce Lepidoptera, Diptera, Coleoptera
- Geny *cry*
- Transgeny: různé geny pro *δ-endotoxiny*.



GENETIKA ROSTLIN



- spore
- ◆ Cry protoxin crystal
- Cry activated Monomer
- ⋈ helix α-1 of Cry toxin
- ⋈ Cry Oligomer
- ⋈ Cadherin
- ⋈ GPI anchored receptors
- ⋈ Aminopeptidase or Alkaline phosphatase
- ⋈ proteases



- ➔ **kukuřice** - zavíječ kukuřičný
– kukuřice MON810 gen *cry1Ab*



- ➔ bavlník



- ➔ rajče

- ➔ brambor - mandelinka bramborová

Transgeny pro odolnost k hmyzím škůdcům

Další typy transgenů

2. Rostlinné geny kódující proteiny, které naruší trávení hmyzu

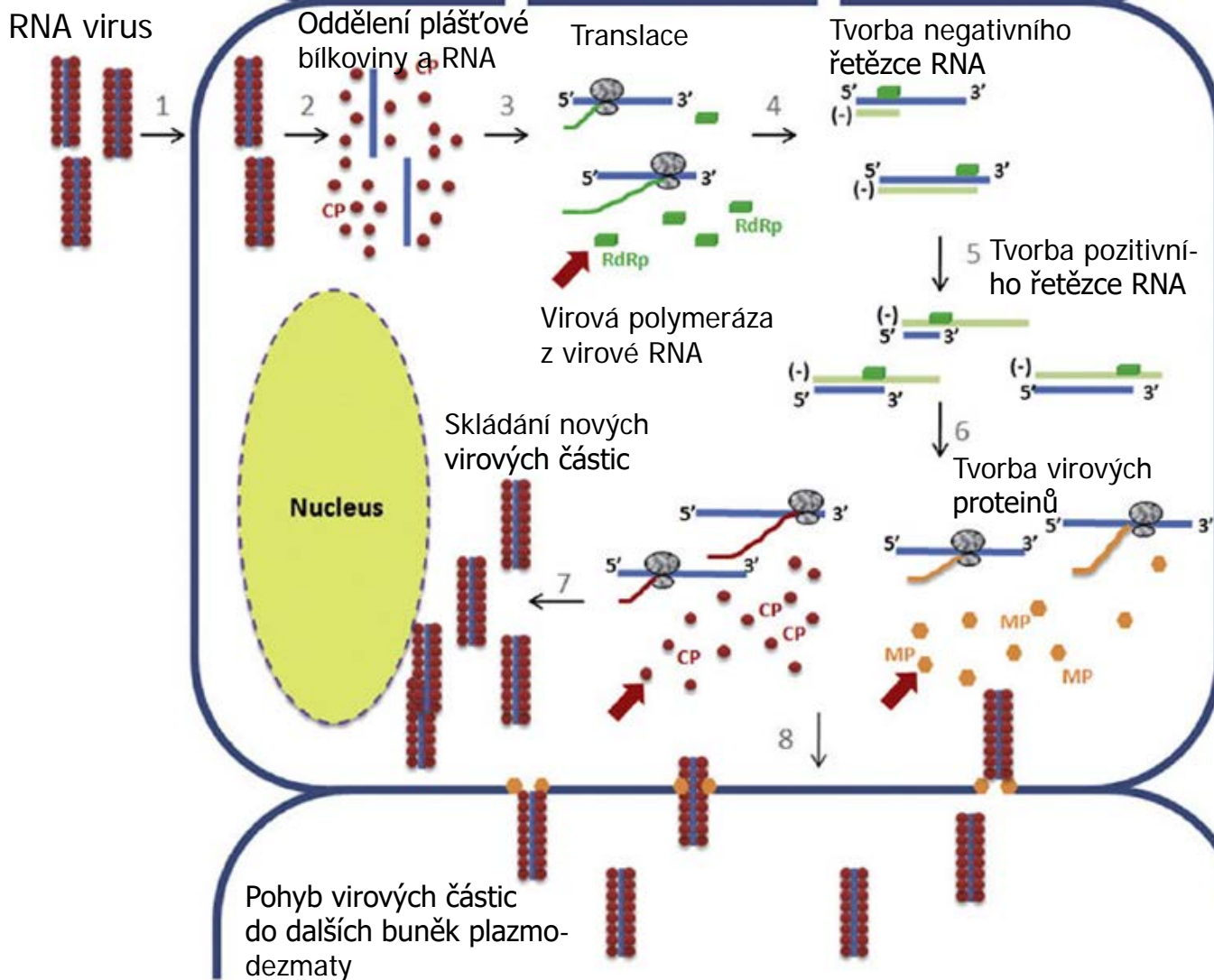
- ➔ **Inhibitory proteáz, amyláz**
- ➔ **Geny pro chitinázy**

Transgeny pro odolnost k virům

1. Rezistence zprostředkovaná genem pro plášťový protein

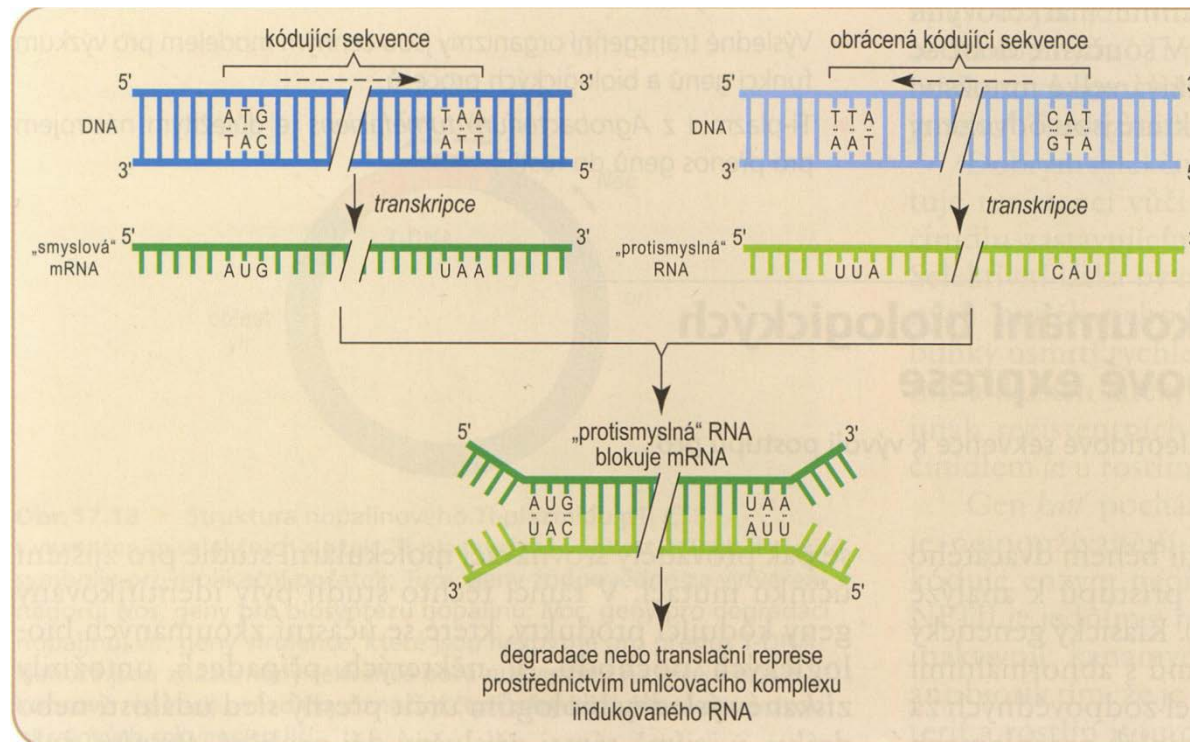
- ➔ **tabák** – TMV
- ➔ **brambor** – virus X, Y
- ➔ **dýně** – ZYMV, WMV2
- ➔ **pšenice** – BYDV
- ➔ **vojtěška** – AMV
- ➔ **rýže** – RTSV, RSV, RYMV
- ➔ **papája** – PRSV
- ➔ **podzemnice** – TSWV

Životní cyklus virové RNA v buňce



Transgeny pro odolnost k virům

2. Rezistence k proteinu pro přenos z buňky do buňky
3. Rezistence podmíněná antimediatorovými transgeny



Transgeny pro odolnost k houbovým a bakteriálním chorobám

- Geny pro PR proteiny – ječmen a geny pro chitinázy z *Trichoderma harzianum* = odolnost k *Rhizoctonia*.
- Geny pro rasově specifickou rezistenci brambor – gen ze *S. bulbocastanum*.
- rajče - gen *Pto* z odolného genotypu+ promotor 35S = odolnost k *Pseudomonas*.
- Geny pro antibakteriální proteiny brambor – gen pro lysozym z bakteriofáza T4.
- geny pro thioniny z ječmene do tabáku = odolnost k *Pseudomonas syringae*.

Transgeny navozující změny ve složení zásobních látek rostlin

Zásobní oleje - řepka olejná, sója

Cíl:

- ➔ potravinářské využití: ↑kys. olejová, ↓kyselina eruková a linolenová, γ-linolenová
- ➔ průmyslové využití: ↑ kyselina stearová a laurová

Kyselina	Počet uhlíků : počet dvojných vazeb
laurová	12 : 0
palmitová	16 : 0
stearová	18 : 0
olejová	18 : 1
linolová	18 : 2
linolenová	18 : 3
eikosenová	20 : 1
eruková	22 : 1

- ➔ **22:1** → **18:1** antisens konstrukt pro thioesterázu
- ➔ **18:0** → **18:1** delta⁹ desaturáza
 - řepka až 90 % kys. olejové (z 60 %)
 - sója až 79 % (z 22 %)
- ➔ **18:1** → **18:0** antisens konstrukt pro delta⁹ stearát desaturázu = 18:1 pouze 1–2 %, 18:0 40 % (margariny)
- ➔ **18:0, 18:1** → **12:0** Lauroyl thioesteráza
 - mýdla, detergenty, cukrářské tuky
- ➔ **α-linolenová 18:3 δ^{9,12,15}** → **γ-linolenová 18:3 δ^{6,9,12} desaturáza**
 - ω6 mastné kyseliny v rostlinných olejích vs. ω3 v mořských rybách PUFA

PUFA (polyunsaturated fatty acids)

- ➔ **EPA** Kyselina eikosapentoenová 20:5n3
- ➔ **DHA** Kyselina dokosahexaenová 22:6n3
- ➔ **DHA a EPA** nezbytné pro lidský metabolismus, pozitivní efekt na kardiovaskulární, nervová a autoimunitní onemocnění
 - v mořských rybách
 - syntéza v GM plodinách, enzymy desaturázy a elongázy
 - Cíl: 18 % EPA a 12 % DHA (jako rybí tuk)
- ➔ **Sója** 10 % až 20 % EPA, 3 % DHA
- ➔ **Řepka olejná** 15 % EPA
- ➔ **Len, rýže**

➤ **Zásobní proteiny semen**

- optimalizace spektra aminokyselin u obilovin a luskovin, obohacení methioninem
- zein z kukuřice (28 % methioninu)
- glycinin ze sóje
- prolamin z rýže (20 % methioninu)
- albumin ze slunečnice (16 % met.+ 8 % cystein)

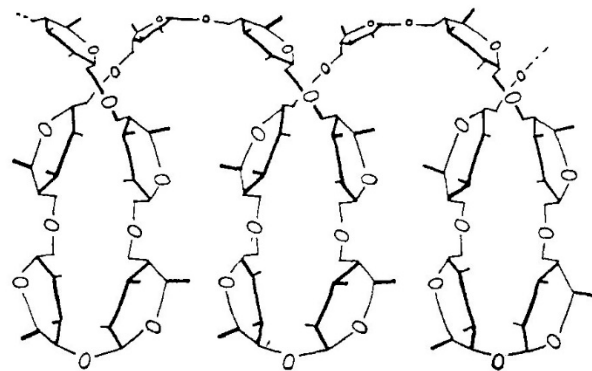
➤ **kukuřice, sója, řepka**

Změny ve složení škrobu brambor

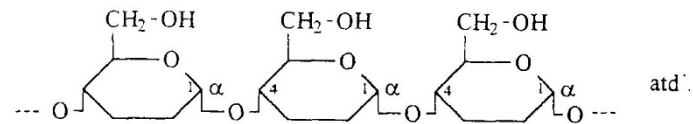
- ➔ Škrob se sníženým obsahem amylozy (bez amylozy)
 - gen pro **enzym GBSS** (granule-bound starch synthase), syntéza v amyloplastech
 - Firma BASF - brambory Amflora 98 % amylopektinu
 - Papírenský průmysl
- ➔ Škrob se zvýšeným obsahem amylozy
 - **enzymy SBE** (starch branching enzyme) zajišťují větvení lineárních řetězců amylozy za vzniku amylopektinu

Biodegradovatelné plasty

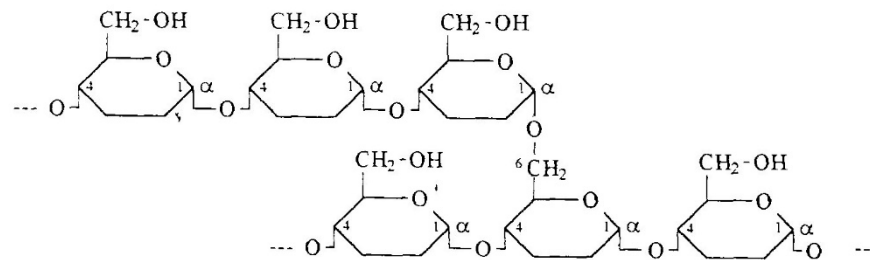
- ➔ Bioreaktory pro produkci speciálních proteinů



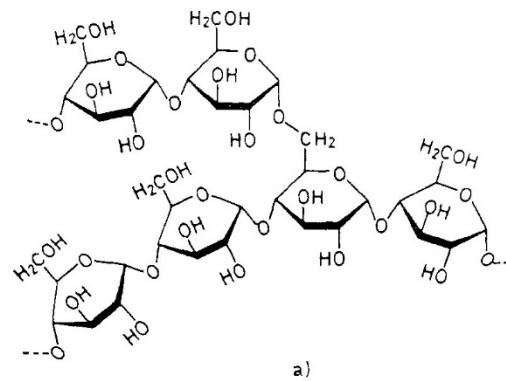
Obr. 17-2. Amylosa.



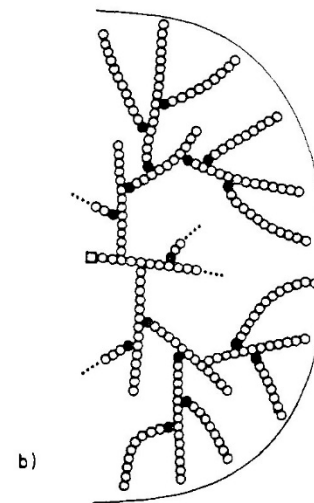
amyloza



amylopektin



a)



b)

Transgeny u rajčat s prodlouženým dozráváním

- ➔ Transgen *flavr savr* - antimediatorová RNA blokuje tvorbu enzymu polygalakturonidázy
- ➔ Transgen zamezující expresi 1 genu biosyntézy **etylénu**

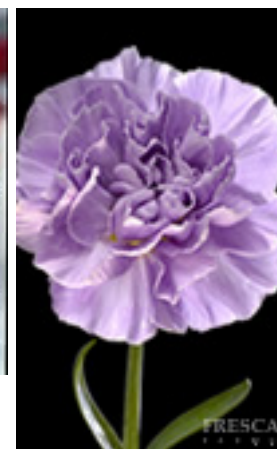
Modifikace barvy květu

➔ Okrasné druhy

- transgeny pro nové cesty biosyntézy flavonoidů a antokyanů

➔ Karafiát

- geny z *Viola* sp. a petúnie
- *Petunia* x hybrida
- změna bílého zbarvení na fialové - delfinidin



Moonacqua

Transgeny pro pylovou sterilitu

System Barnáza – Barstar

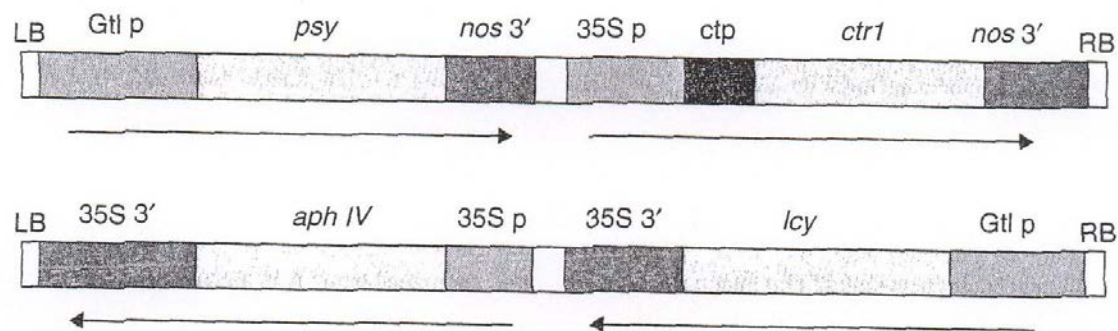
➔ Barnáza

- extracelulární RNáza z *Bacillus amyloliquefaciens*
- + promotor specifický pro tapetum

➔ Barstar – inhibitor Barnázy (protein)

Nové typy plodin

➔ **Rýže** – obohacená o beta-karoten, provitamin A



- *psy* – phytoen syntáza (narcis), promotor pro gluteliny rýže Gtl p
- *ctr1* – karoten desaturáza (*Erwinia*), promotor 35S
- *lcy* – lykopen beta-cykláza

➔ Řepka olejná

- zvýšený obsah vitamínu E
- geny *VTE3*, *VTE4* (enzymy metyl transferázy) *A. thaliana*

➔ Kávovník

- bezkofeinové boby
- gen *CaMXMT1* (theobromin sytáza) z *Coffea canephora*

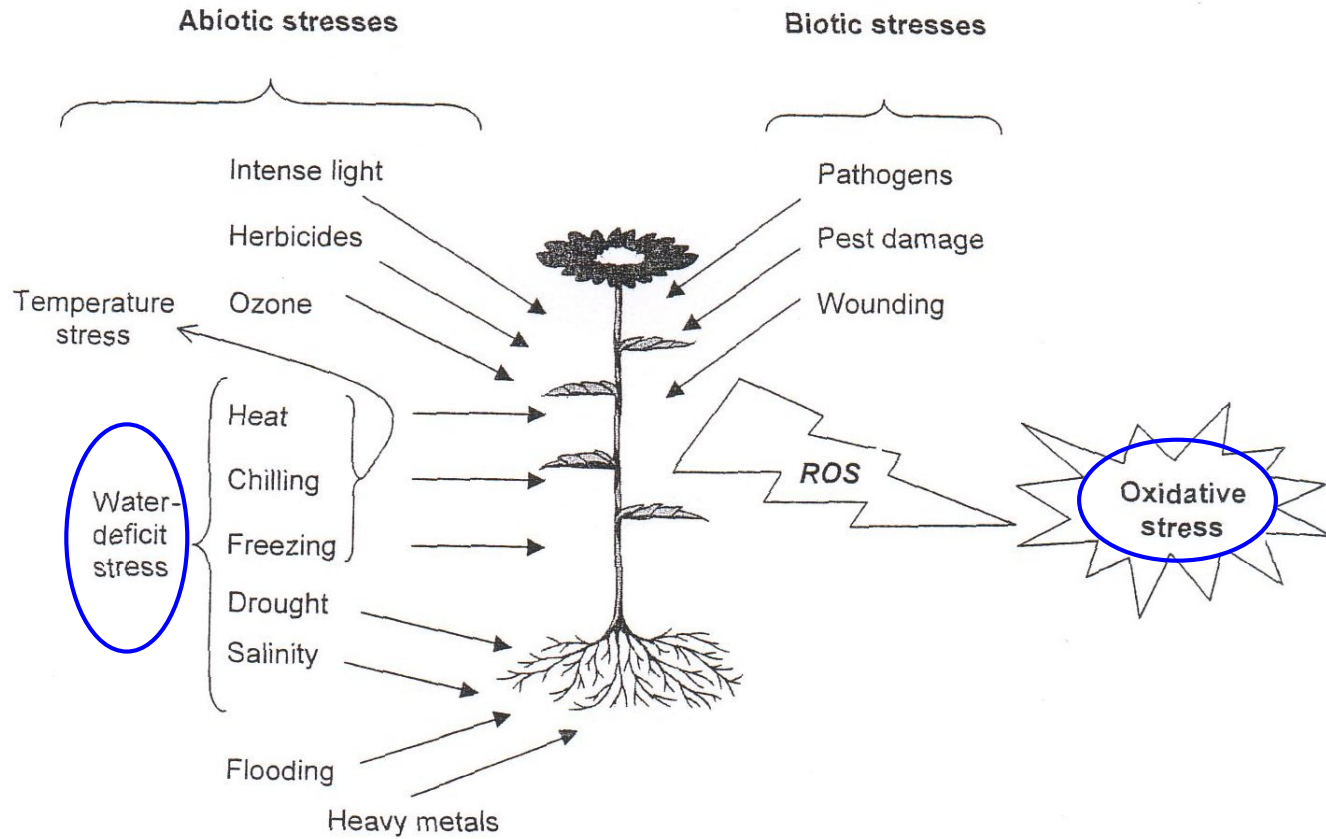
➔ Rýže

- zvýšený obsah železa

➔ Papája

- přizpůsobení půdám s vyšším obsahem hliníku

Odolnost vůči stresovým faktorům



Odolnost vůči stresovým faktorům

1. Odstranění oxidativního stresu

- odstranění kyslíkových radikálů
- antioxidanty – **superoxiddismutáza (SOD)**

2. Navození odolnosti vůči dehydrataci

- změny ve složení lipidů cytoplazmatické membrány,
- změny ve spektru mastných kyselin, geny pro desaturázy

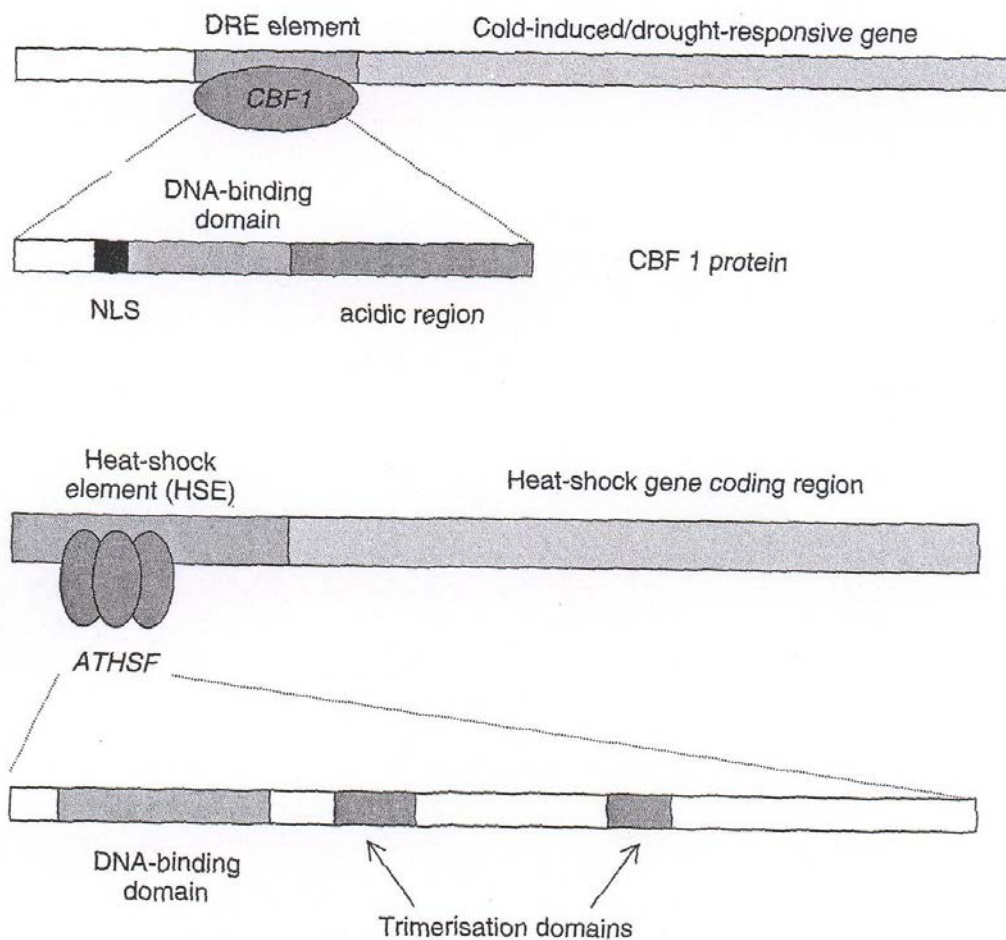
Odolnost vůči stresovým faktorům

3. Osmoprotektanta

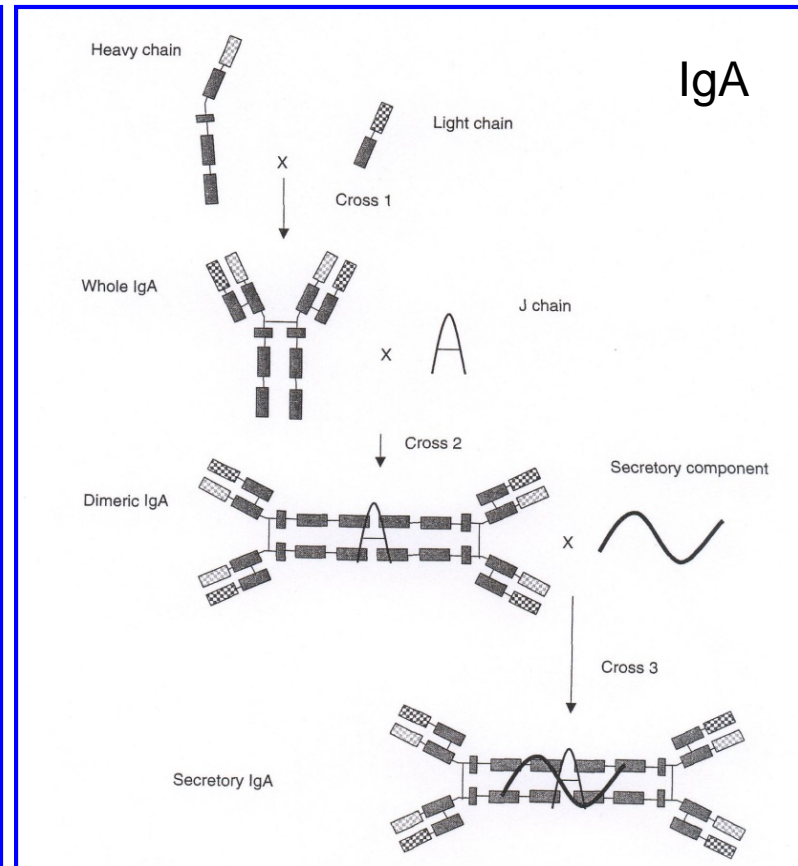
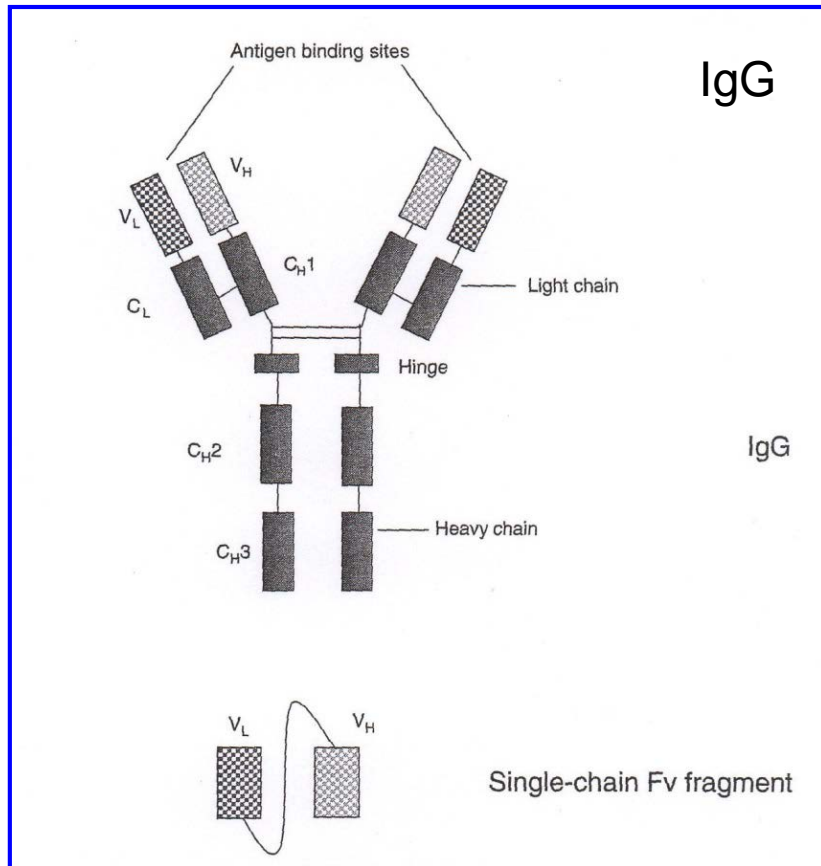
- fruktany, gen *SacB* (*Bacillus subtilis*) pro enzym levansukrázu
- transport do vakuol - cpy
- Gen *badh* (rostlinné, *E. coli*) – enzym betain aldehyd dehydrogenáza – akumulace glycin betainu z betainaldehydu

Odolnost vůči stresovým faktorům

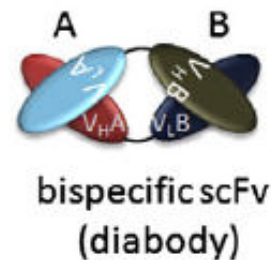
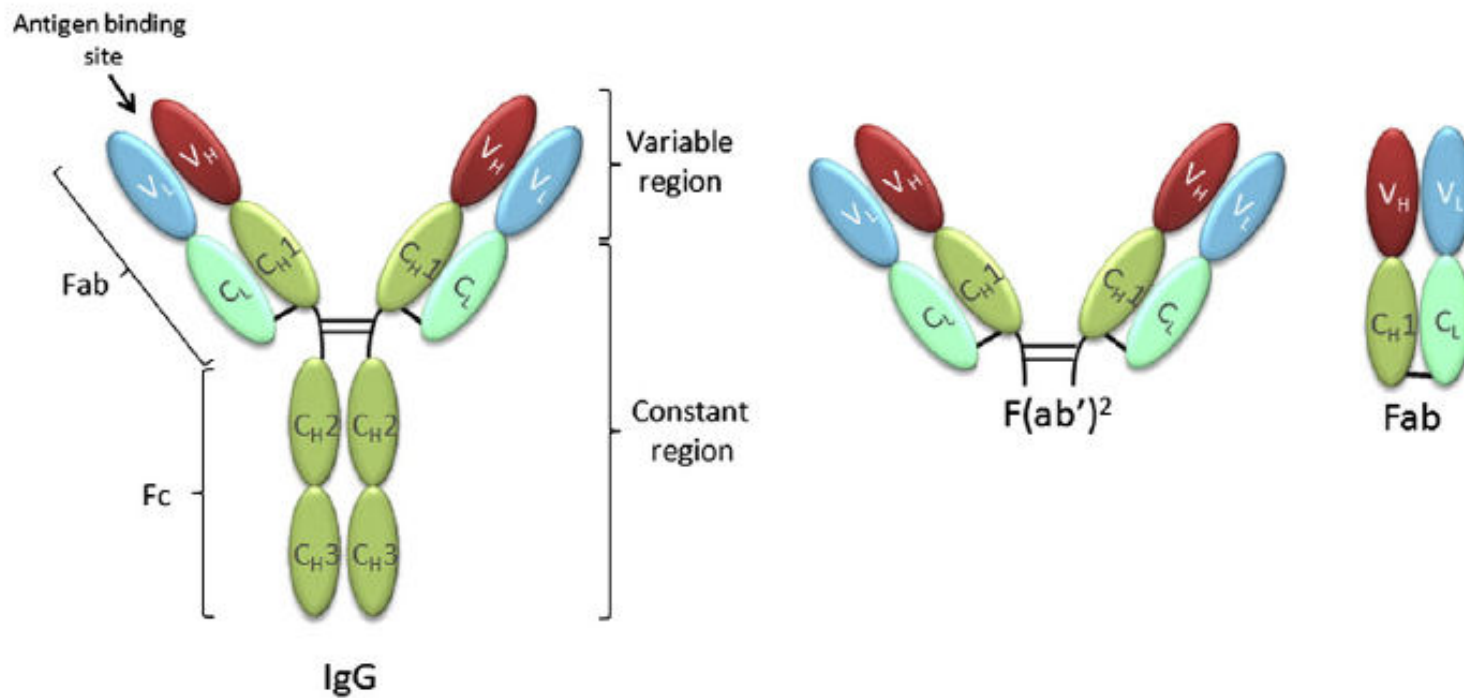
4. Geny pro transkripční faktory



Tvorba protilátek, rostlinné vakcíny



Tvorba protilátek, rostlinné vakcíny



Využití Produkty ve fázi klinických testů

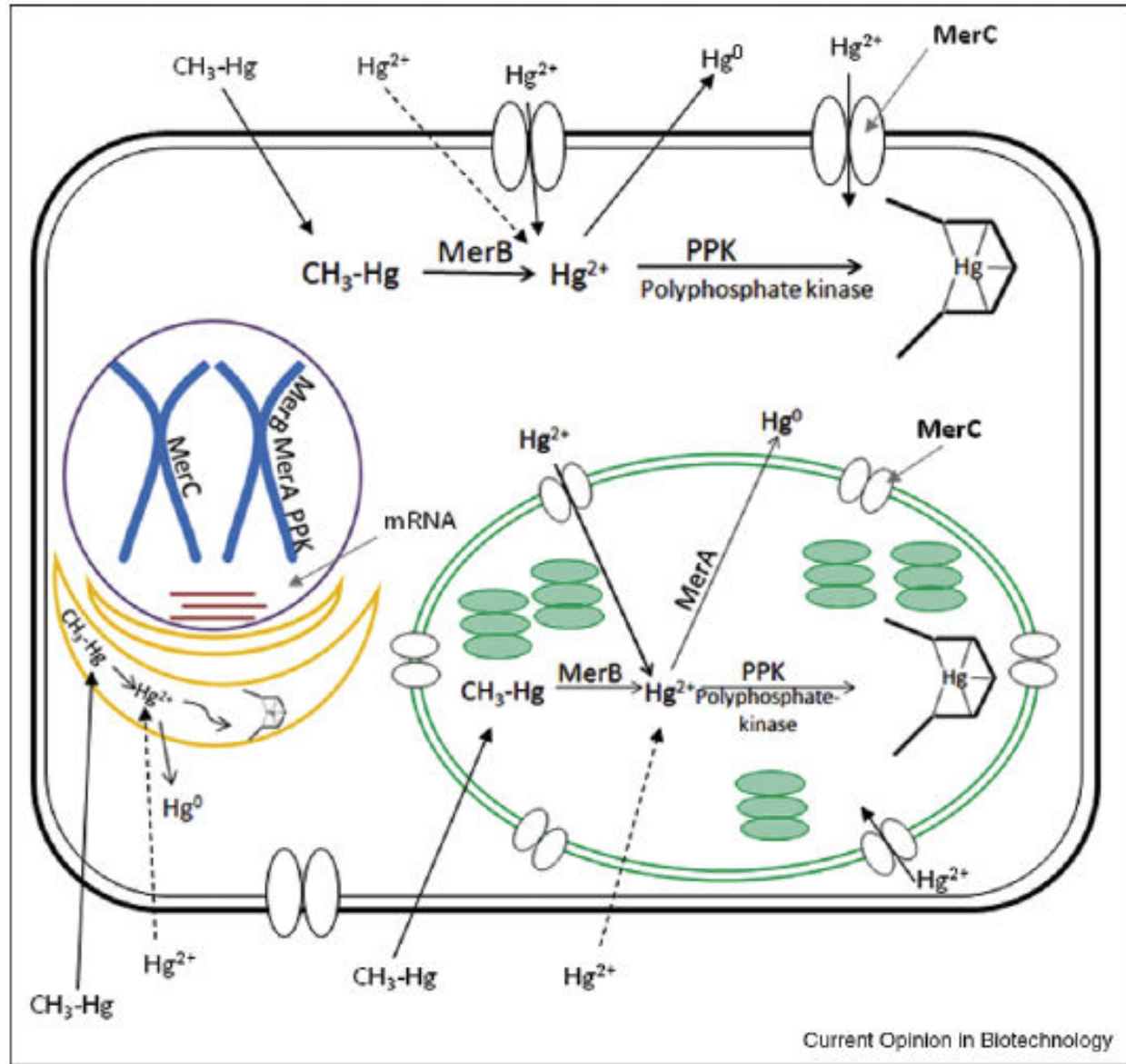
Produkt	Rostlina
Lidský somatotropin léčba trpasličího vzrůstu u dětí Turnerova syndromu	tabák
Albumin lidského séra Náhrada krve při traumatických stavech	tabák
Dow AgroSciences	
Lidský interferon α 2b Funkce jako léčivo při virových infekcích, leukemii i proti nádorům	okřehek
Biolex Therapeutics Inc	
Pankreatická lipáza cystická fibróza doplněk stravy	kukuřice
Meristem Therapeutics	
Protilátka proti zubnímu kazu Planet Biotechnology Inc. (CaroX™) schváleno pro EU, ještě není na trhu	tabák
Vakcína psích parvovirů Large Scale Biology Corp.	tabák

Komerční produkty na trhu

Produkt		Rostlina
Avidin	Prodigene	kukuřice
β-glukuronidáza	Prodigene	kukuřice
Trypsin	Prodigene	kukuřice
Lidský laktoferin	Meristem Therapeutics	kukuřice, rýže
Lidský lysozym	Ventria Bioscience	rýže
Lipáza	Meristem Therapeutics	kukuřice
α-amyláza	Syngenta	kukuřice, tabák

Další typy GMO

- ➔ Produkce **farmakologicky využitelných proteinů** – hirudin
- ➔ Produkce **biodegradovatelných polyesterů** – polyhydroxybutyrát (PHB)
- ➔ **Fytázy** - enzymy degradující kyselinu fytovou, využití fosforu rostlinami
- ➔ **Fytoremediace** - transgeny pro metalothioneiny



Finanční úspory při komerčním využití GMO

➔ **Rezistence k virům aj. škůdcům:**

- ↓ aplikace insekticidů a pesticidů - úspora 443 mil. kg
- Snížení CO₂ o 19 miliard kg (2010)
- vyšší výnosy o 7–9%
 - bavlník 750 tis. ha 60 mil. \$/rok
 - kukuřice 2,8 mil. ha 190 mil. \$/rok

➔ **Rezistence k herbicidům:**

- nižší aplikace herbicidů až o 40%
- vyšší výnosy
- šetří životní prostředí
- úspora 91 mil. ha pozemků

Bezpečnost transgenních rostlin

- ➔ **Geny pro rezistenci k antibiotikům**
- ➔ **Geny pro toxiny, herbicidy**
- ➔ **Geny kódující alergenní proteiny**

Legislativní zabezpečení manipulace s geneticky modifikovanými organizmy

- ➔ 1989 Česká komise transgenoze rostlin
 - Česká komise pro nakládání s GMO
- ➔ 1996 Zákon č. 92 O odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin
- ➔ Zákony ČR – r. 2000
 - Sb. z. č. 153/2000
 - Zákon o nakládání s GMO a produkty
 - Zákon 2004 Sb.z.č. 78/2004, 2016 novela zákona

Výukovou pomůcku zpracovalo
Servisní středisko pro e-learning na MU

<http://is.muni.cz/stech/>

CZ.1.07/2.2.00/28.0041

Centrum interaktivních a multimediálních studijních opor pro inovaci výuky a efektivní učení



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ