

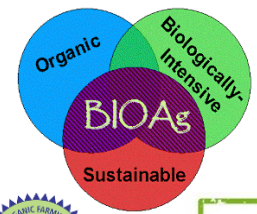
# Rostlinná biochemie

Ochrana proti škůdcům a chorobám. Genové manipulace.  
Bioremediace

doc. Mgr. Jan Lochman, PhD  
Ústav Biochemie



# Moderní zemědělství



- v minulosti hlavní kritéria pro šlechtění – výnos, vzhled, velikost



*Solanum habrochaites*

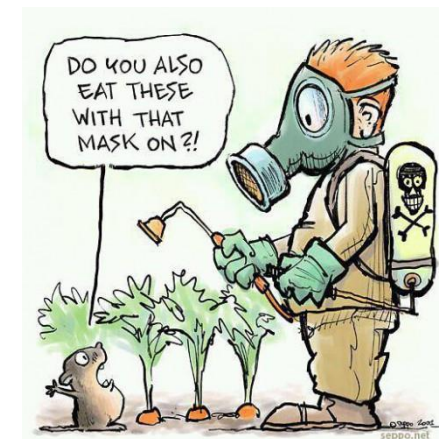


*Solanum pimpinellifolium*



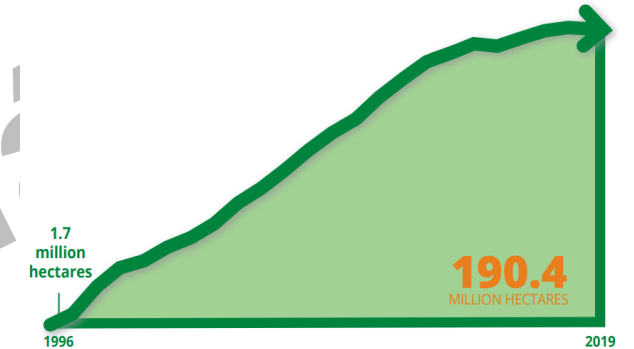
*Solanum lycopersicum* cv. Money maker

- hlavní problém zemědělství = monokulturní plodiny
- rezistence nebyl bod zájmu = chemie to vyřeší

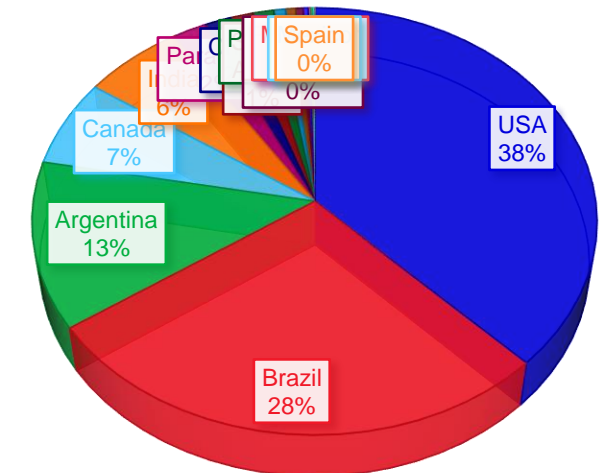


# GMO plodiny

- první generace orientovaná na producenty a zpracovatele
- druhá generace = přídavná hodnota pro spotřebitele
- v Evropě problematické (k 2020, 58 GMO plodin schváleno)
- 92 Mha sója, 54 Mha kukuřice, 23 Mha bavlna, 9 Mha řepka
- bt kukuřice MON810, bt lilek, Roundup Ready Sója, řepka Canola, HT vojtěška
  - bt = gen z *Bacillus thuringiensis* pro Bt protein toxický pro hmyz
- Molekulární křížení – QTL (Quantitative Trait Loci) mapování
  - založené na křížení pomocí molekulárních markerů
- Otevřená otázka dalších editačních metod
  - TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
  - CRISPR-Cas9 <https://www.isaaa.org/default.asp>



## GMO PLODINY

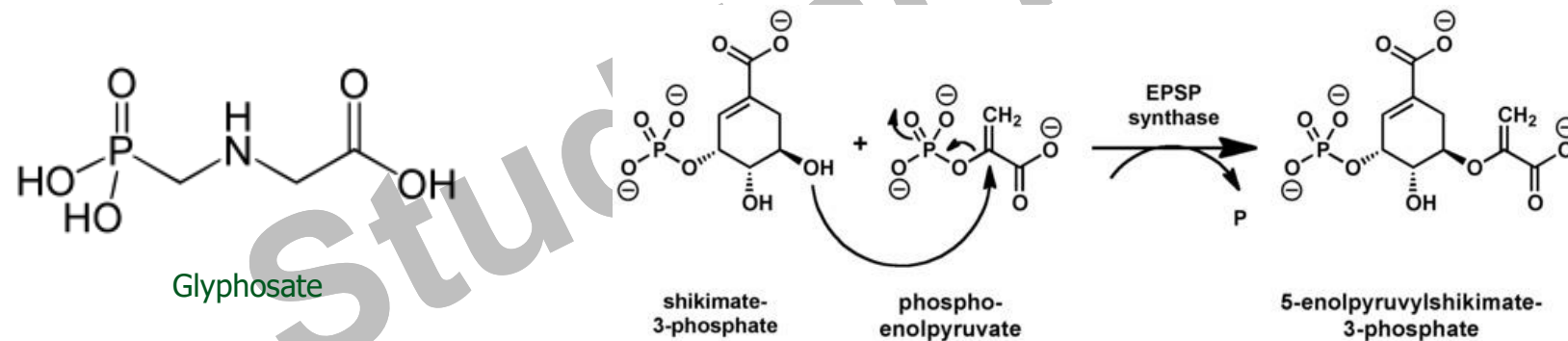






# Herbicity – Glyphosate (Round-Up)

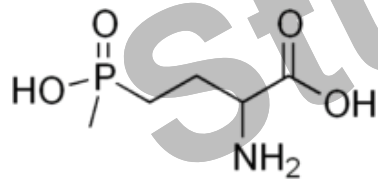
- Objeven 1970 firmou Monsanto jako derivát aminomethylphosphonové kyseliny pro změkčení vody
- U dvou derivátů lehce herbicidní účinky = John E. Franz nasyntetizoval derivát se silnou herbicidní aktivitou
- Vstřebání je primárně přes listy, minimálně přes kořeny
- Mechanismus účinku – inhibice rostlinné EPSP syntázy – syntéza aromatických aminokyselin
- Roundup ready plodiny – obsahují gen EPSP syntázy z *A. tumefaciens* rezistentní k inhibici



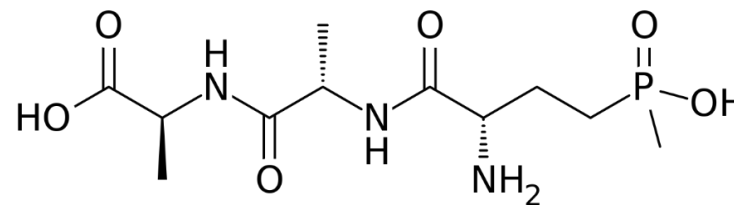


# Herbicity – Glufosinát

- Mezi roky 1960 a 1970 vědci University of Tübingen a Meiji Seika Kaisha Company objevili, že bakterie rodu *Streptomyces* produkují tripeptid (bialaphos), který inhibuje růst bakterií.
- Obsahoval dva alaniny a AK analog glutamátu, který nazvali "phosphinothricin".
- Phosphinothricin inhibuje aktivity glutamin syntázy a prvně syntetizován v roce 1970 jako racemická směs
- Později nazván glufosinát
- Na konci 80tých let objeven u bakterií *Streptomyces* enzym, který inaktivuje phosphinothricin
- Izolovaný gen ze *Streptomyces hygrosopicus* nazván "bialaphos resistance" (bar).
- Izolovaný gen ze *Streptomyces viridochromeogenes* nazván "phosphinothricin acetyltransferase" (pat).



phosphinothricin

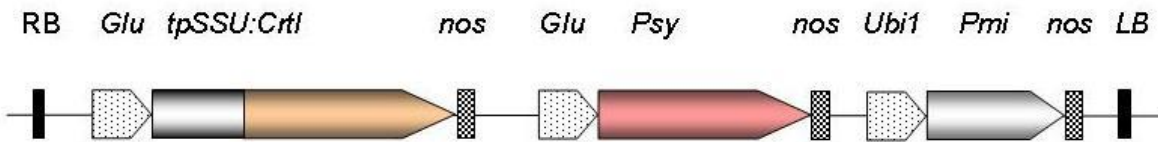


bialaphos

# Zlatá rýže



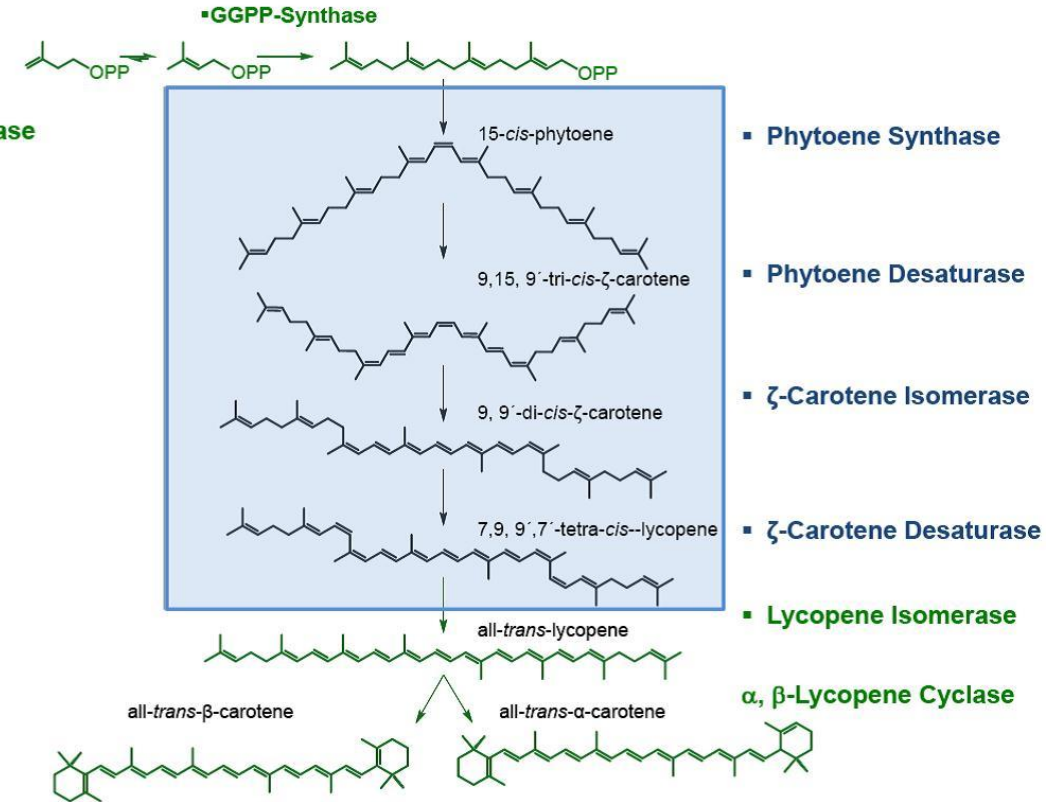
- Vyvinutá nejprve v 90. letech (GR1) a poté modifikovaná v roce 2004 s transgeny z kukuřice a běžnou půdní bakterií *Pantoea ananas* (GR2)
- geneticky modifikovaná rýže produkuje beta-karoten, prekurzor vitamínu A v bílém endospermu
- v červenci 2021 byla schválena pro pěstování na Filipínách



CrtI, karoten desaturasa (*Pantoea ananas*); Psy, phytoene syntasa z *Narcissus pseudonarcissus* (GR1) nebo kukuřice (GR2); Pmi, phosphomannosa isomerasa (*E. coli*) pro selekci

Phytoene Synthase

CRTI



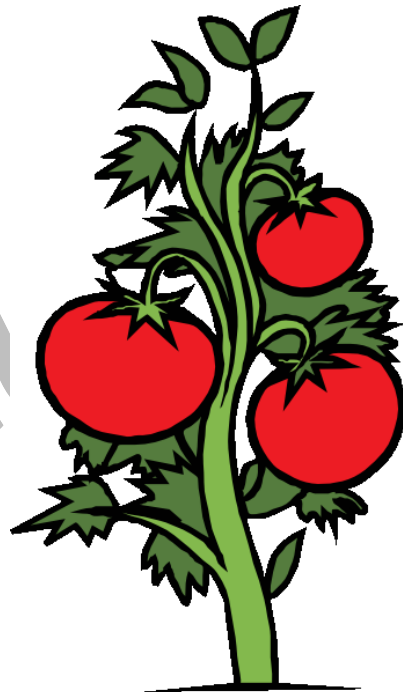


# Rostliny čelí celé řadě výzev

- Rostliny jsou přisedlé organismy
- Rostliny hostí celou řadu nepatogenních a patogenních mikroorganismů
- Rostliny chrání mechanické bariéry a rozvinul se u nich mnohovrstvý imunitní systém

## BIOTICKÝ STRES

Hmyz →  
Viry →  
Bakterie →  
Oomycety →  
Houby →  
Poranění →



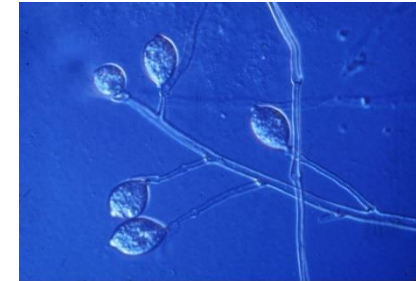
## ABIOTICKÝ STRES

← Teplotní stres (teplo, chlad, mráz)  
← Sucho  
← Záplavy  
← Zasolení  
← Ozón  
← Intenzivní světlo  
← Těžké kovy



# Patogen, škůdce, onemocnění

- Rostlinný patogen – organismus, jehož část životního cyklu se odehrává uvnitř rostliny
- Škůdce – herbivorní hmyz, nematoda savec nebo pták živící se vegetativními částmi rostliny
- Původ rostlinných patogenů
  - předchůdce suchozemských rostlin přinesl patogeny sebou z moře
  - po přechodu z moře některé druhy přešly k patogennímu způsobu života
  - příchod suchozemských rostlin poskytl nové útočiště již existujícím patogenům
- Počátky zemědělství (před cca. 10 tis. lety)
  - nový vztah mezi domestikovanými druhy a jejich škůdci a patogeny
  - objevení se geneticky identických jedinců v monokulturách
  - šlechtění za účelem výnosu a specifických vlastností

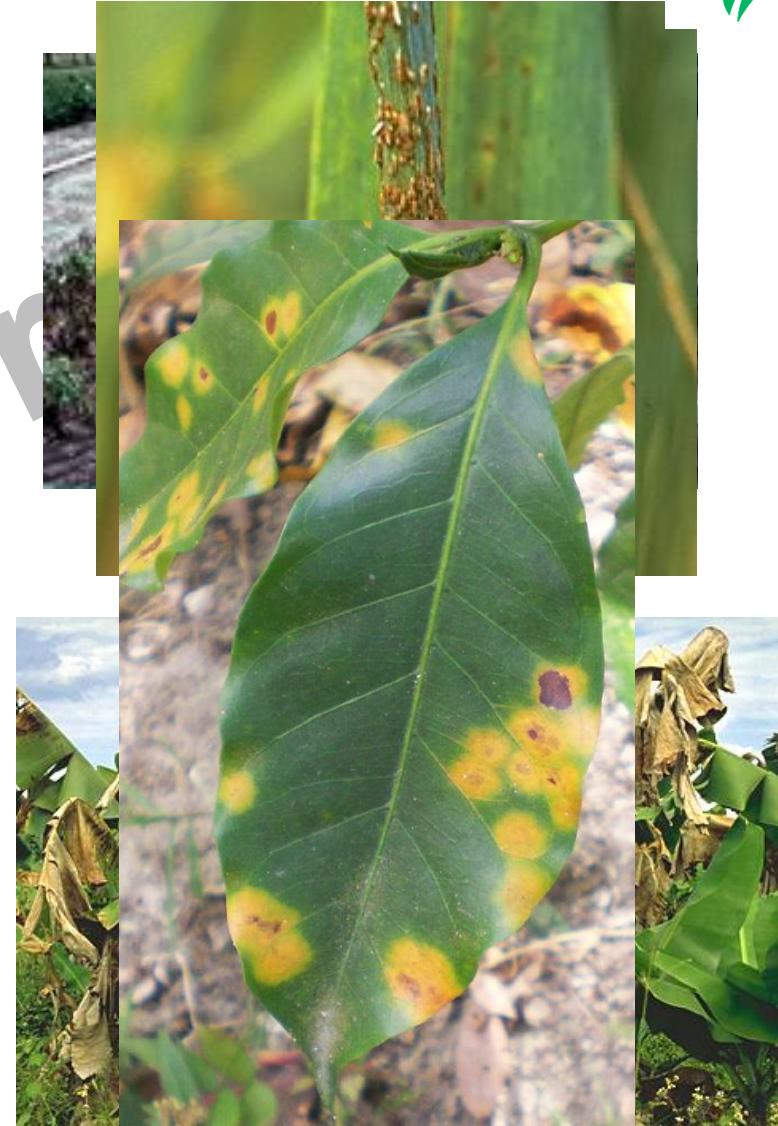






# Významné choroby

- Plíseň bramborová - oomyceta *Phytophthora infestans*
  - velký hladomor v Irsku (1840)
- Rez travní (černání stonků) – houba *Puccinia graminis*
  - kolaps pěstitelů pšenice (1950, USA)
  - vyšlechtění nové rezistentní variety
  - v Africe (1999) se objevil nový virulentní kmen Ug99
  - na Sicílii (2016) se objevil nový virulentní kmen TTTTF
- Černá Sigatoka – askomyceta *Mycosphaerella fijiensis*
  - ohrožuje pěstování kultivaru Cavendish (*Musa acuminata* Colla a *M. balbisiana* Colla)
  - až 50% ztráta výnosu – předčasné zrání plodů a hnědnutí listů
- Rez kávovníku – houba *Hemileia vastatrix*
  - zdecimovala produkci kávovníků na Srí Lance (1870)
  - vedla ke konzumaci čaje v Británii místo kávy





# Strategie útoku patogenu

**Nekrotrofní:** patogen zabijí rostlinou buňku

**Biotrofní:** rostlinná buňka přežívá

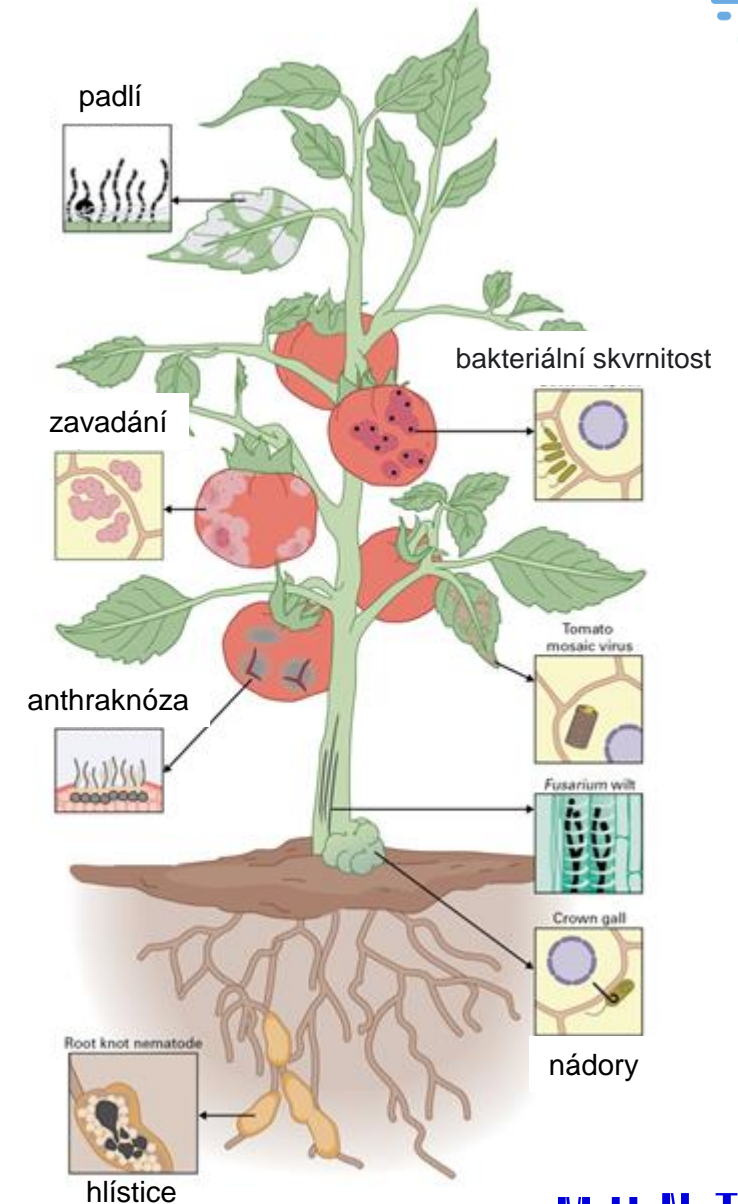
**Hemibiotrofní:** na počátku infekce patogen udržuje buňky živé, ale v pozdější fázi infekce je zabíjí

## Patogen není schopen rostlinu infikovat

- Rostlina obsahuje strukturní bariéry nebo toxické látky
- Aktivace obranných mechanismů
- Změna okolních podmínek

## Úspěšná infekce patogenu

- Příznivé okolní podmínky
- Rostlina není schopna patogen rozpoznat
- Obranná odpověď vůči patogenu je neúčinná



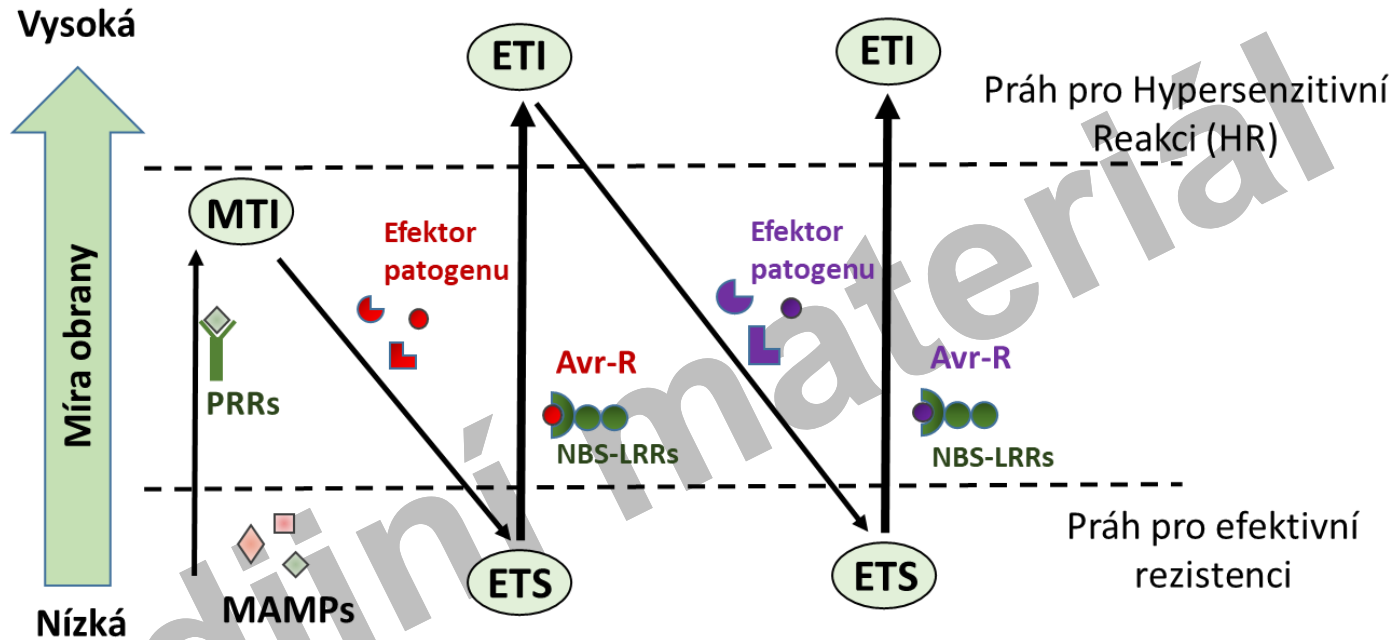
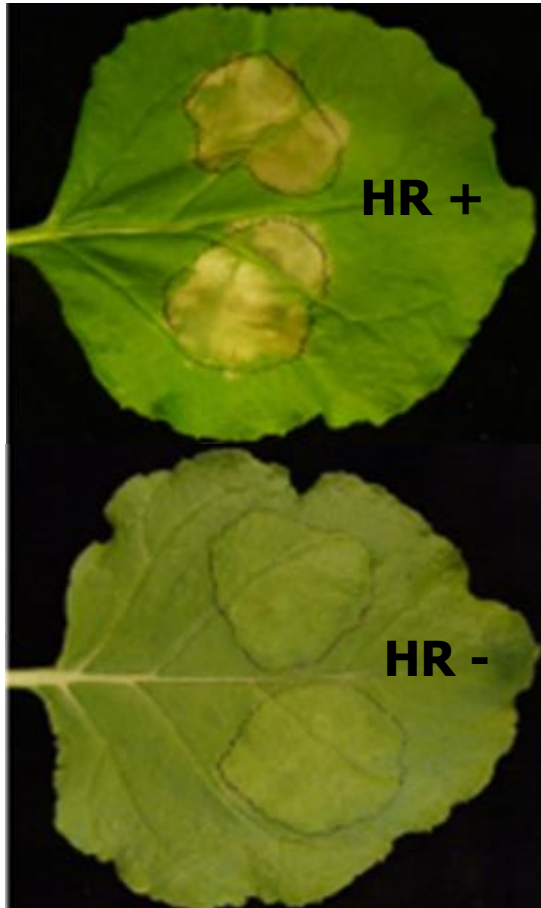


# Strategie patogenů

|                      | Nekrotrofie   | Biotrofie  | Hemibiotrofie   |
|----------------------|---|--|---|
| Strategie útoku      | Sekrece enzymů degradujících buněčnou stěnu a/nebo toxinů                               | Těsný Intracelulární kontakt s rostlinou buňkou  | Počáteční biotrofní fáze  |
| Specifikum interakce | Zabít rostlinné pletivo a kolonizovat; výrazný rozklad patogenem                        | Rostlinná buňka zůstává živá s minimálním poškozením                                   | V počáteční fázi infekce zůstávají rostlinné buňky živé, v pozdější fázi značné poškození pletiva |
| Spektrum hostitelů   | Široké  | Úzké, pouze konkrétní druhy  | Střední   |
| Příklady             | Bakteriální hniloba ( <i>Erwinia</i> spp.), houbová hniloba ( <i>Botrytis cinerea</i> ) | Houbové plísně a rzi, viry, endoparazitické nematody, bakterie <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>Phytophthora infestans</i> (plíseň bramborová)   |



# Cik-Cak Model roslinné imunity



**MAMPs** – Molekulární vzory spojené s mikroby (flagelin, chitin nebo oligogalakturonidy)

**PRRs** – Receptory rozpoznávající molekulární vzory

**NBS-LRRs** – intracelulární receptory obsahující nukleotid vázající místo a leucin bohaté repetice

**MTI/ETI** – MAMPs/Efektory vyvolaná imunita



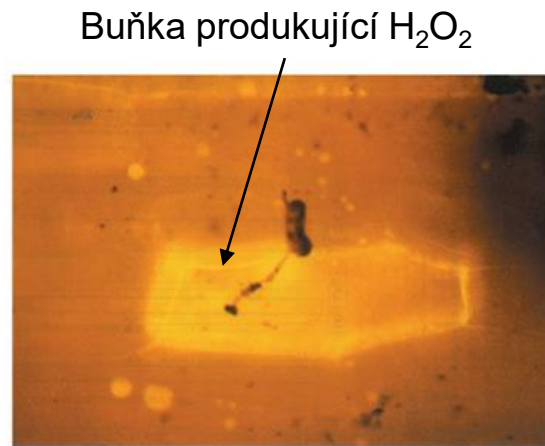


# Hypersenzitivní reakce

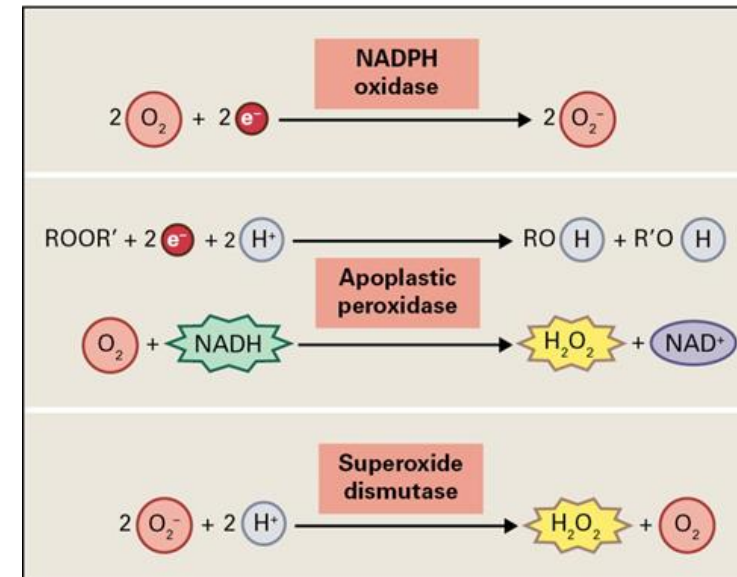
- Programovaná buněčná smrt
- Slouží k restrikci šíření patogenu a jeho usmrcení
- Klíčová role NADPH oxidázy a extracelulární peroxidázy



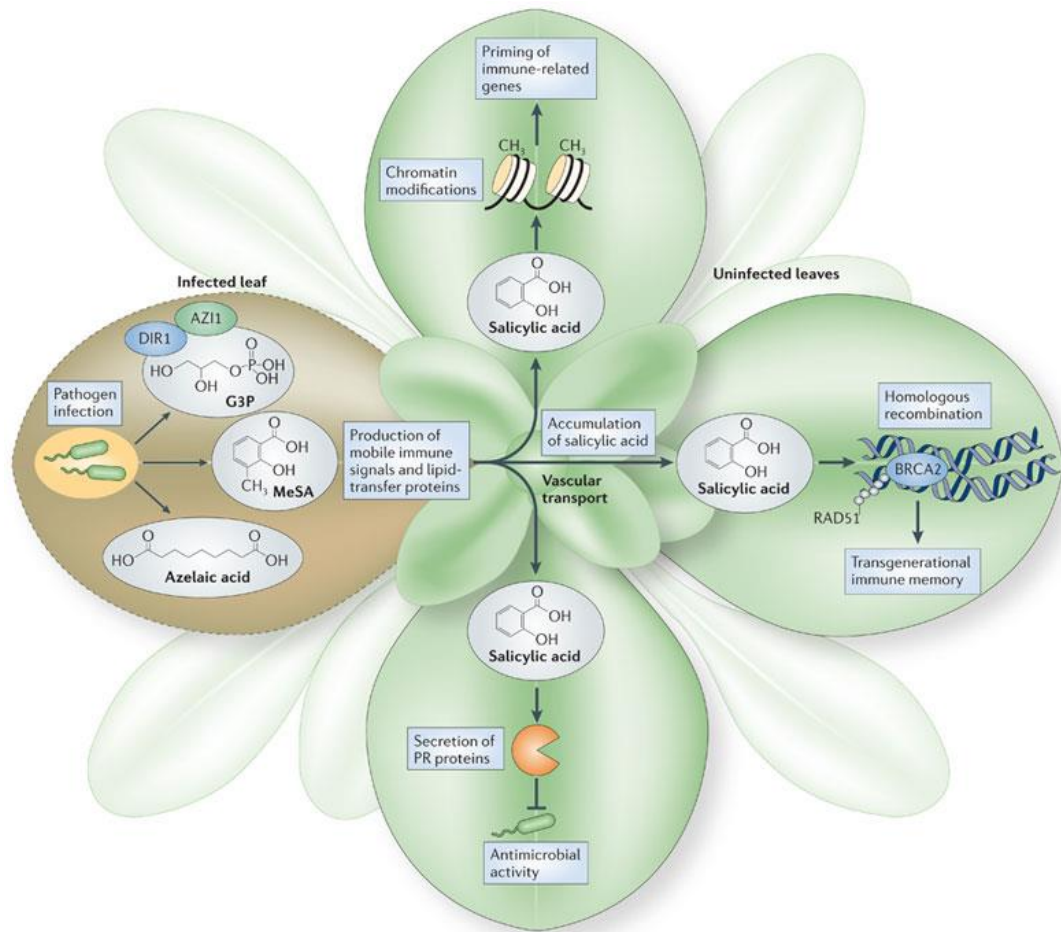
A Apresoriální klíčící vlákno



B



# Systemová rezistence



Nature Reviews | Immunology

## SAR (Systemově navozená rezistence)

- Slouží k obraně rostliny před biotrofními patogeny
- Je spojena s dráhou kyseliny salicylové
- Je spojena s akumulací SA-responzivních PR proteinů

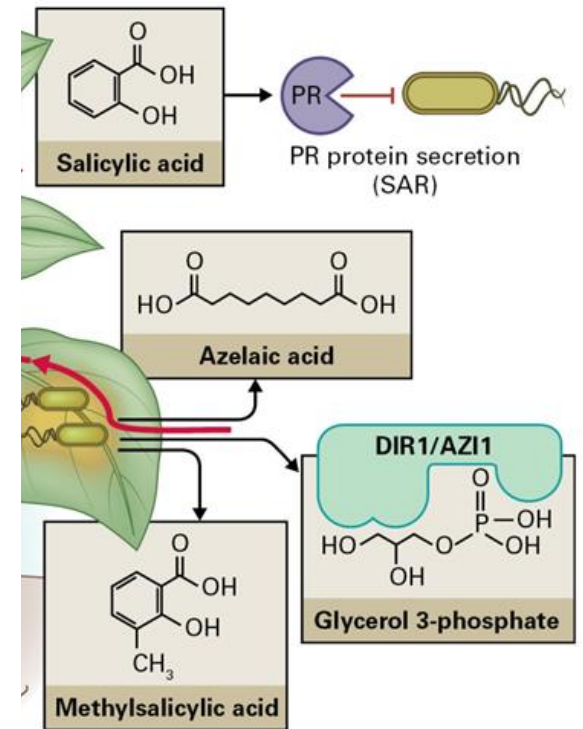
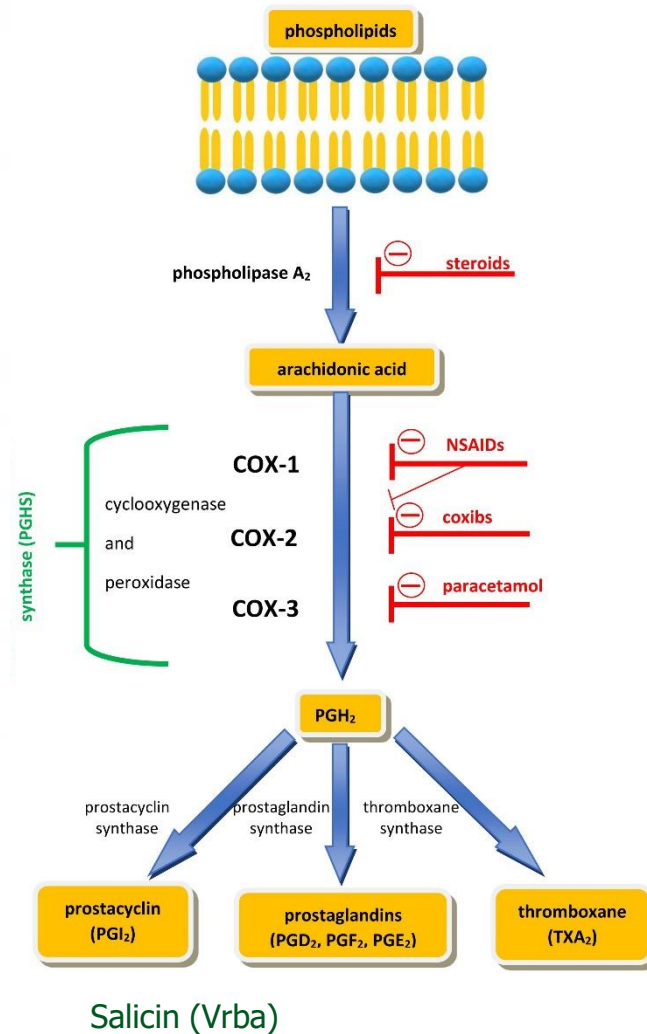
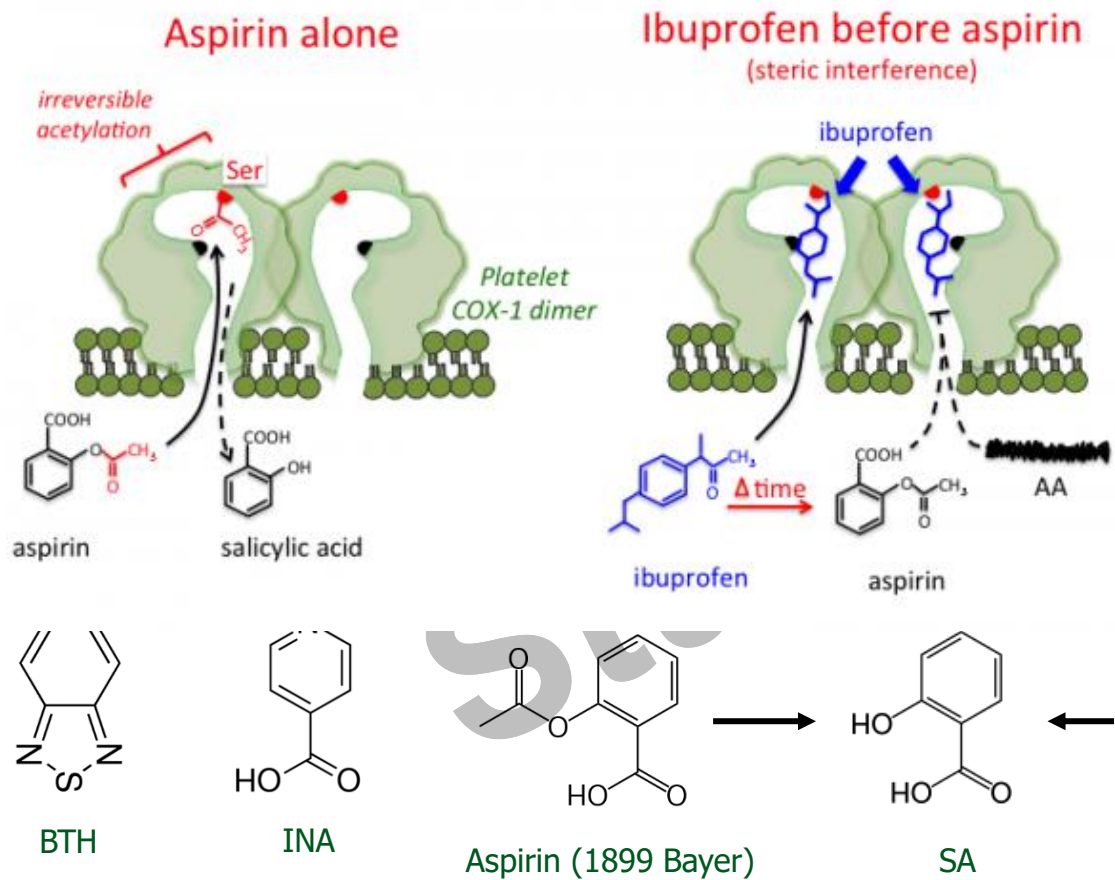
## ISR (Indukovaná systémová rezistence)

- Indukované symbiotickými bakteriemi a houbami kořenového systému
- Je spojena s dráhou kyseliny jasmonové/ethylenu
- Nedochozí k akumulaci PR proteinů, ale po napadení patogenem je jejich exprese silně akcelerována
- Je spojena s tzv. "Defence Priming" fenoménem



# SAR (Systémově navozená rezistence)

## NSAID – Aspirin Drug Interaction

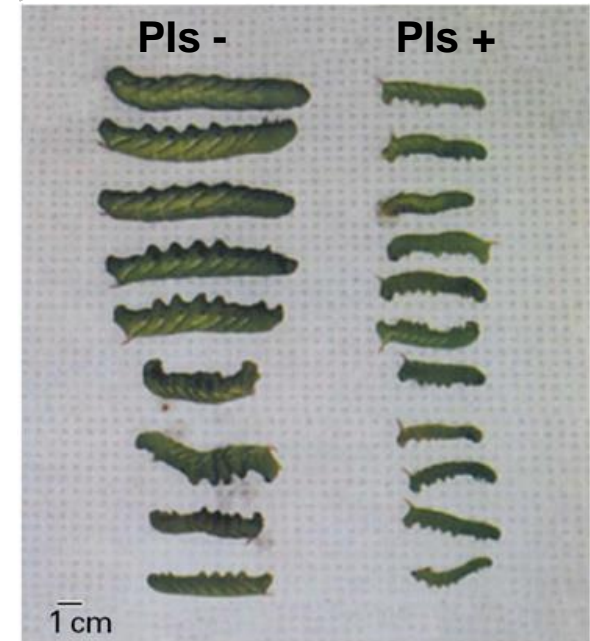
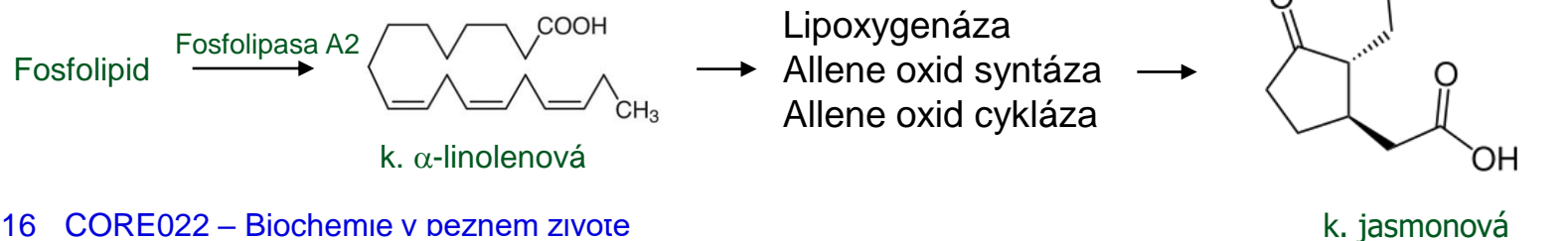






# ISR (Systémově indukovaná rezistence)

- Indukce mechanickým poraněním nebo ožerovým hmyzem
- U rajčete spojená s polypeptidem SYSTEMINEM (18 AK, účinný ve femto-molární koncentraci)
  - syntéza odštěpením C-konce pro-systeminu (200 AK) v místě poranění
  - aktivuje signální dráhy k. jasmonové a ethylenu
- Při napadení syntéza proteinázových inhibitorů (PIs)
  - serin, cystein a aspartyl inhibitory proteináz
  - interagují s proteinázami v žaludku hmyzu/nematod
  - inhibice jejich rozvoje/smrt



Larvy *Manduca sexta* (Lišaj)

<https://www.youtube.com/watch?v=TKQ-CIX9afA>

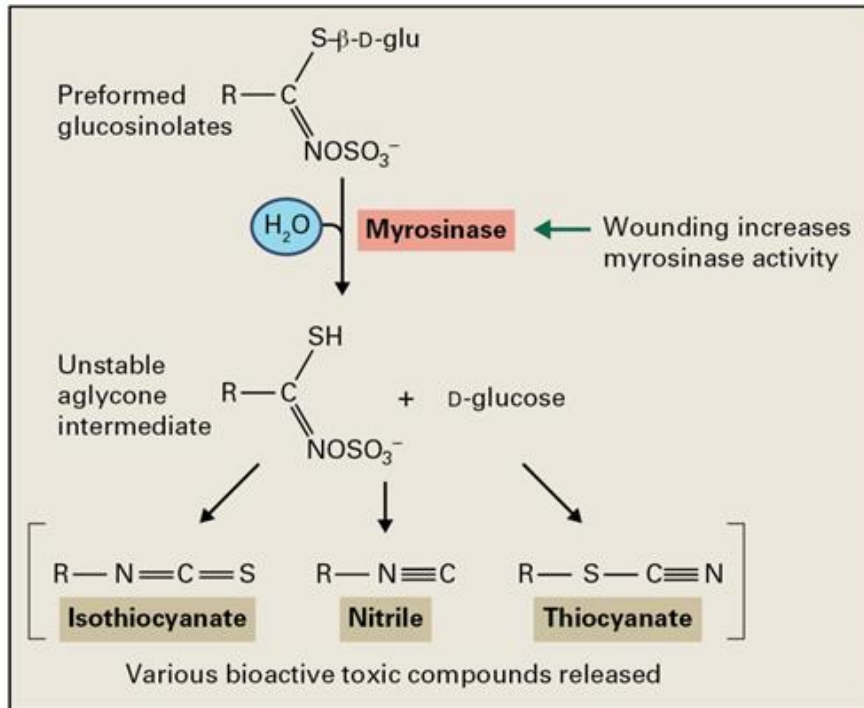




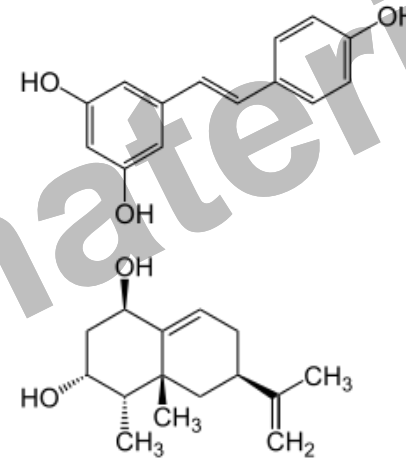
# Anti-mikrobiální látky

## Glukosinoláty

- Dodávají chuť a aroma (brokolice, křen hořčice)



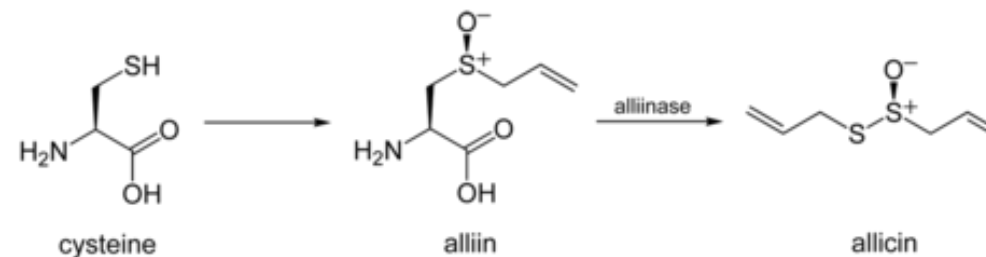
## Phytoalexiny



Resveratrol – stilben pocházející z fenyl-propanoidní dráhy

Capsidiol – seskviterpen z pepře a tabáku

- Allicin – volatilní látka, dává chuť i aroma česneku a cibuli

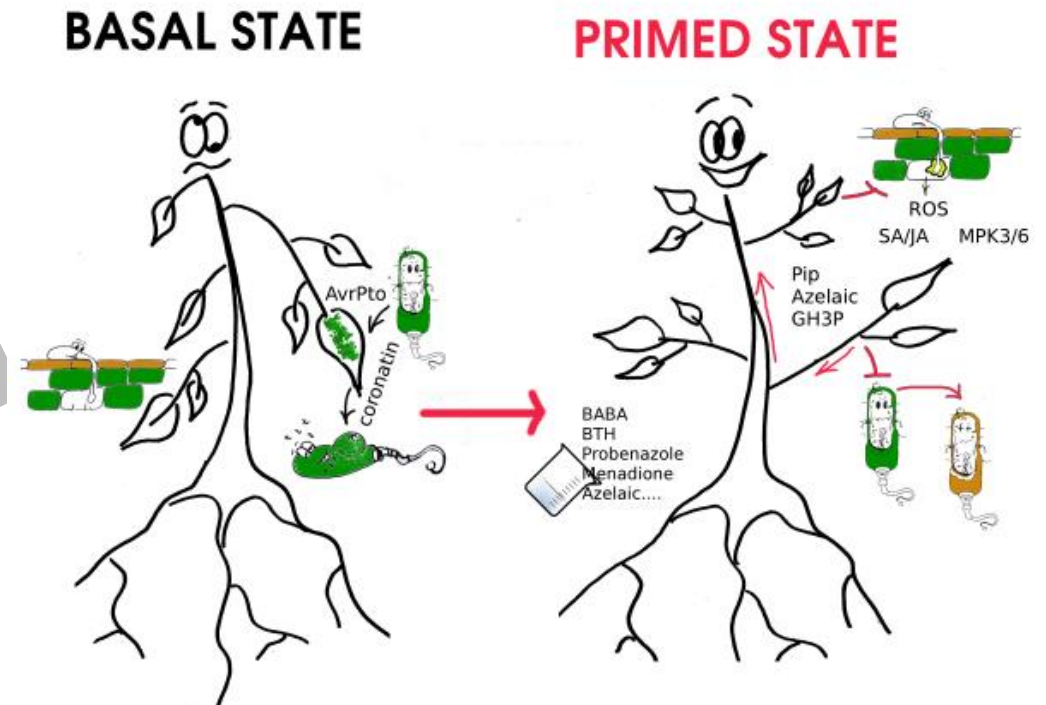


# Obranný priming

- aktivace multi-genových obranných mechanismů poskytujících dlouhotrvající rezistenci
- Spojen především z rezistencí indukovanou mykorrhizními houbami, poraněním nebo chemikáliemi (beta-aminomáselná kyselina)
- Molekulární mechanismy spojené s tímto fenoménem jsou popsány pouze z části

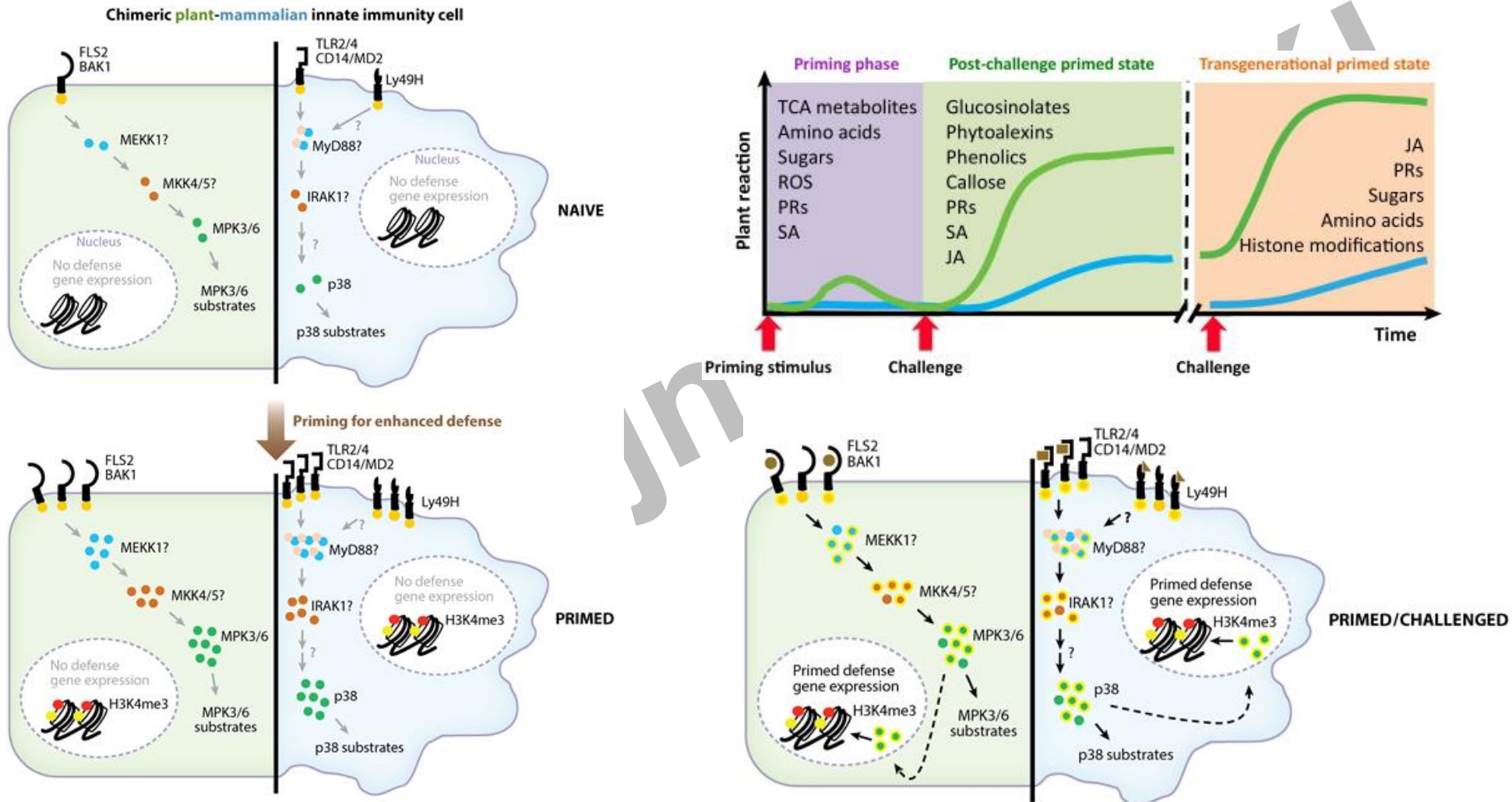
## ZÁKLADNÍ MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY

- Mitogen-aktivované protein kinázy
- Obohacení plazmatické membrány receptory rozpoznávající molekulární vzory
- Epigenetické změny





# Obranný priming



# GMO papája

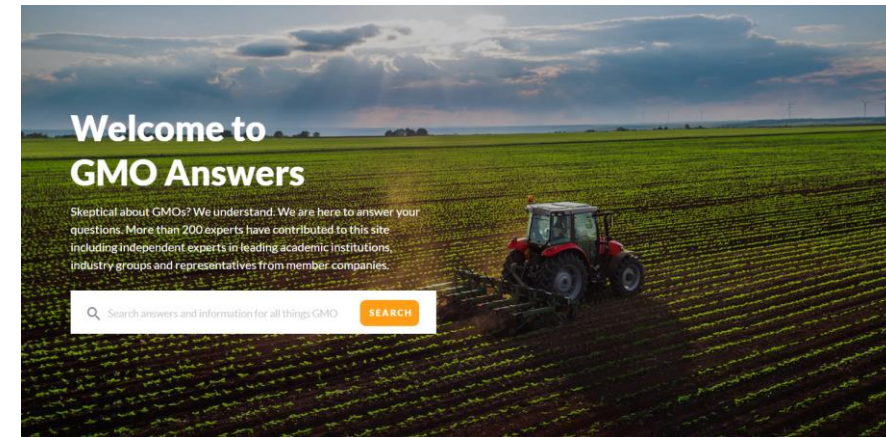
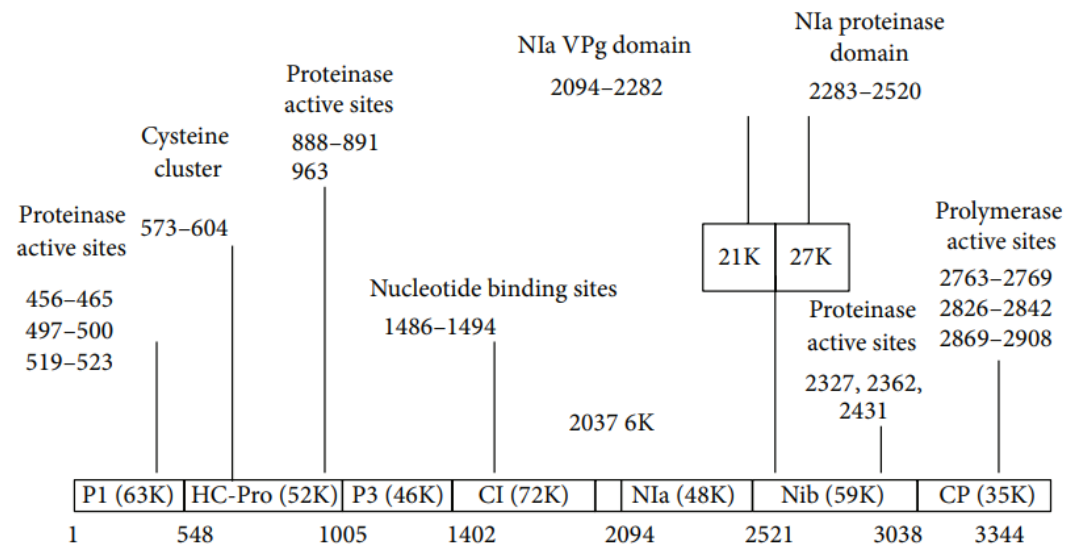


- Papája je druhou nejdůležitější havajskou ovocnou plodinou
- Papaya Ringspot Virus (PRSV) byl poprvé detekován ve 40. letech 20. století
- Koncem 90. let zasáhl virus každou oblast produkující papáju, což vedlo k poklesu produkce o více než 50 % mezi lety 1993 a 2006.
- Tyto drastické okolnosti vedly ke spolupráci mezi státními úředníky v oblasti zemědělství a pěstiteli papáji ve snaze zvládnout šíření viru (mšicemi)
- Součástí strategie bylo financování havajského ministerstva zemědělství na vývoj transgenní odrůdy papáje.
- v roce 1995 předložení regulačního povolení ke komerční produkci GMO papáje:
  - USA schválily GMO papáju v roce 1998
  - Kanada schválila GMO papáju v roce 2003
  - Japonsko schválila GMO papáju v roce 2011 (po 12 letech)



# GMO papaja

- transgenní papája byla vyvinuta prostřednictvím technologie obalového protein (CP), umlčování RNA a replikázových genů.

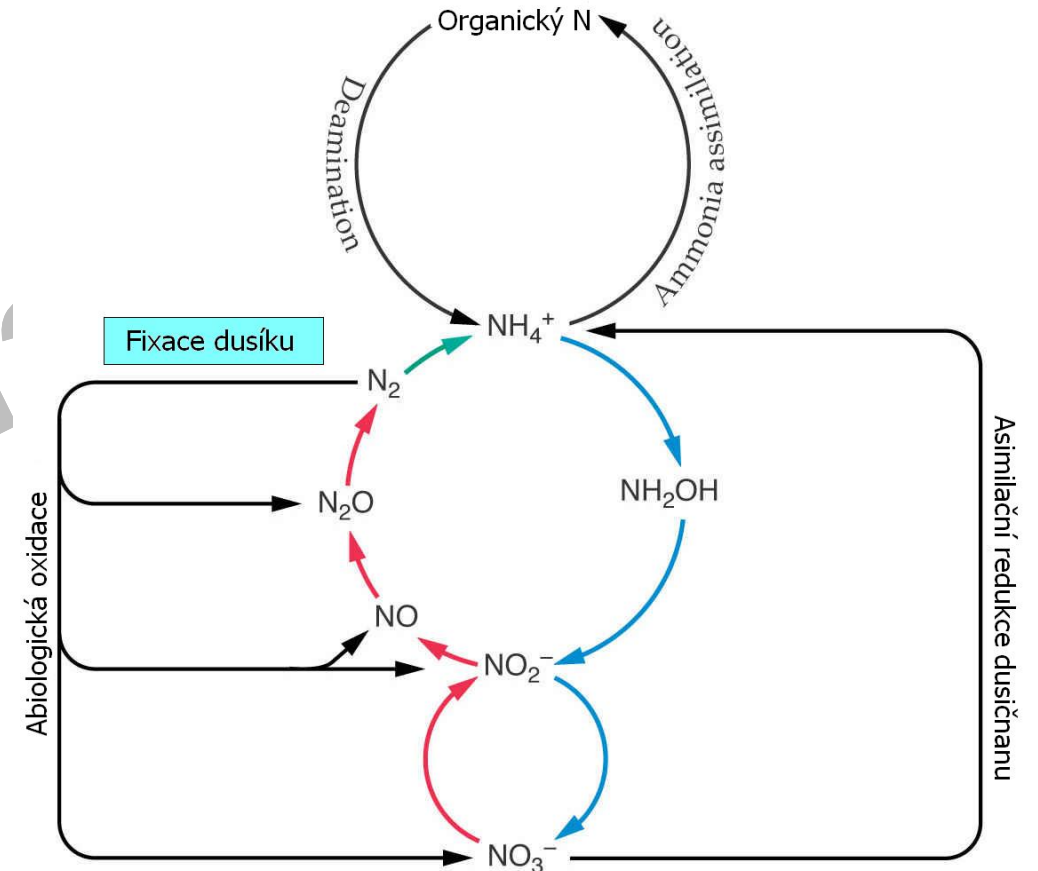


<https://youtu.be/2G-yUuiqIZ0>



# Fixace dusíku

- dusík je čtvrtým nejhojnějším prvkem na zemi
- nejvíce dusíku využívaného organismy je recyklováno ze směsi dusíkatých látek vytvořených jinými organismy
- hlavní zdroj dusíku pro směs využitelných dusíkatých látek je získáván procesem fixace dusíku
- proces fixace dusíku je prováděn pouze prokaryoty
- nejdůležitější krok asimilace anorganického dusíku na organické metabolity je katalyzován enzymem glutamin syntetasou.

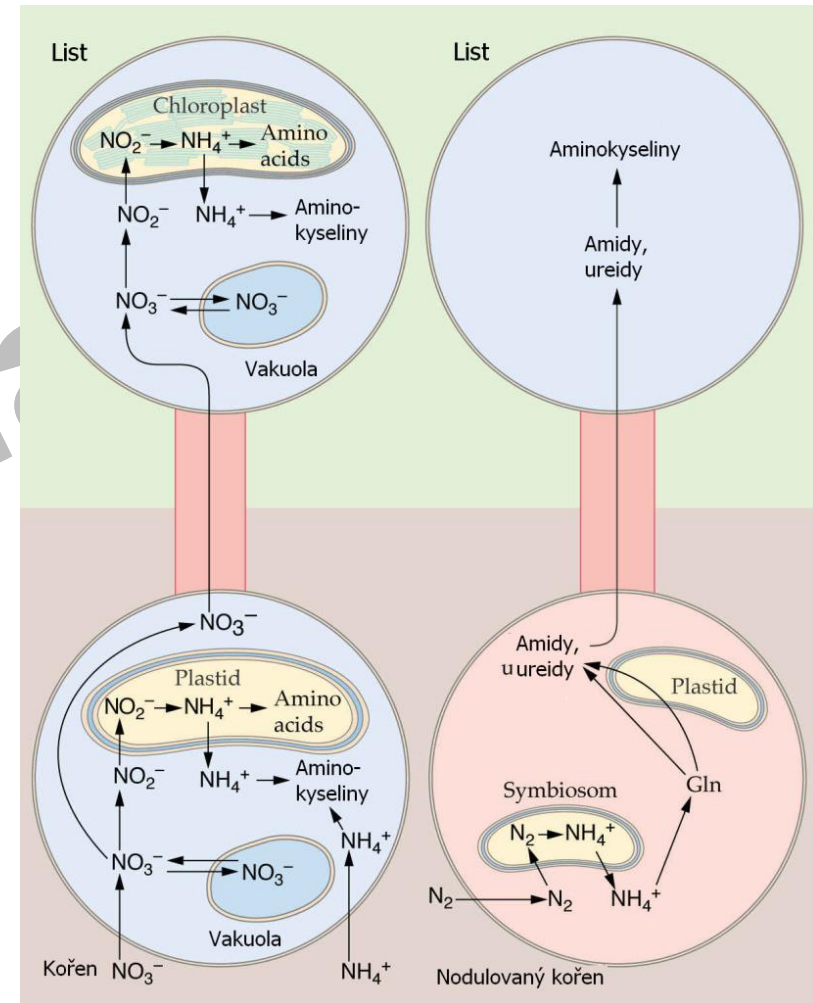
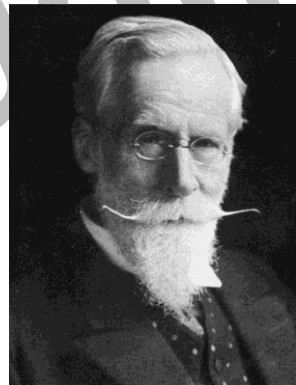
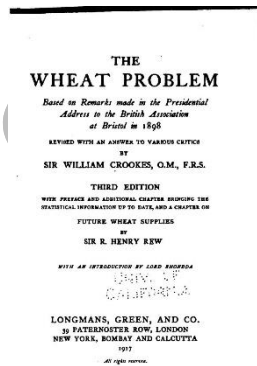




# Metabolismus dusíku

Rostliny mohou přijímat dusík ve formě:

- amonného iontu
- dusičnanu a následné redukci na amonný ion
- v případě přítomnosti bakteriálního symbionta fixujícího dusík ve formě atomárního dusíku
- nedostatek dusíku byl velkým problémem na počátku 20 století - The Wheat Problem (Sir William Crookes)



Rostlina bez nodulů

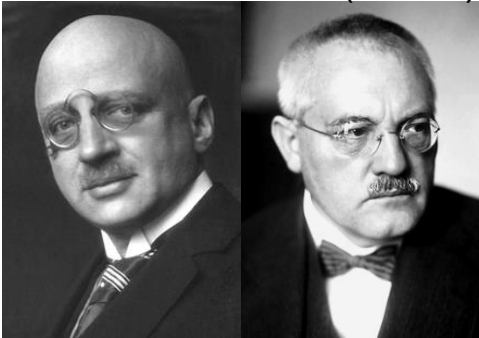
Rostlina s noduly



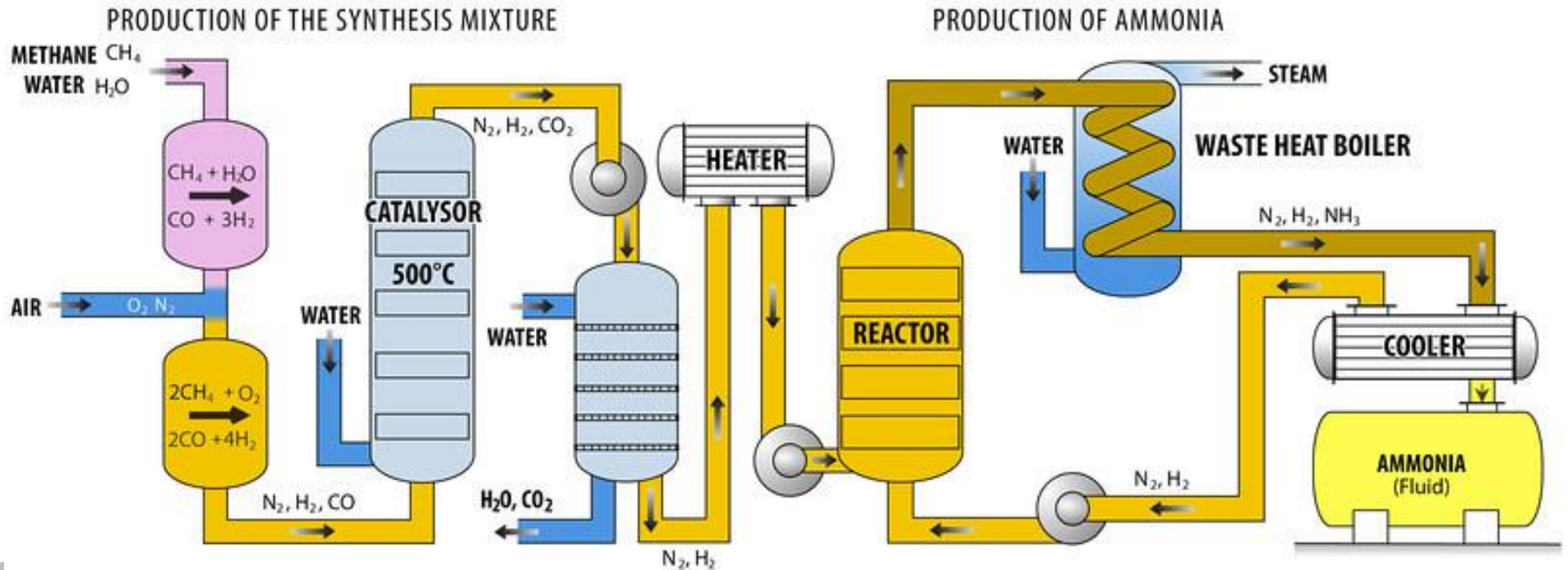


# Haber-Boschova syntéza

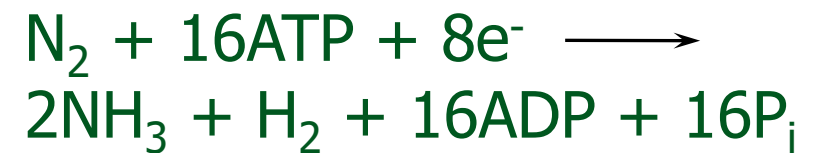
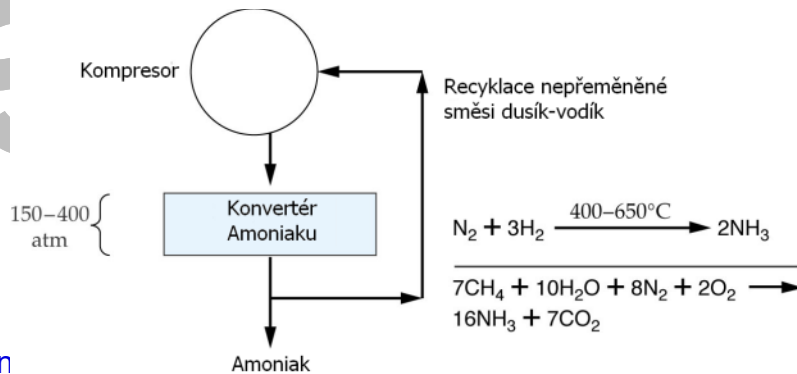
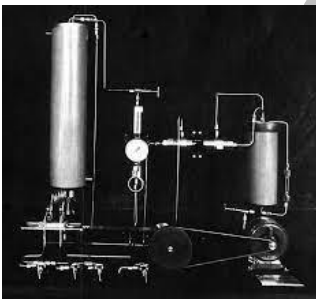
1909 1913 (BASF)



## The Haber Bosch Ammonia Process



1918







# Symbiotická fixace dusíku

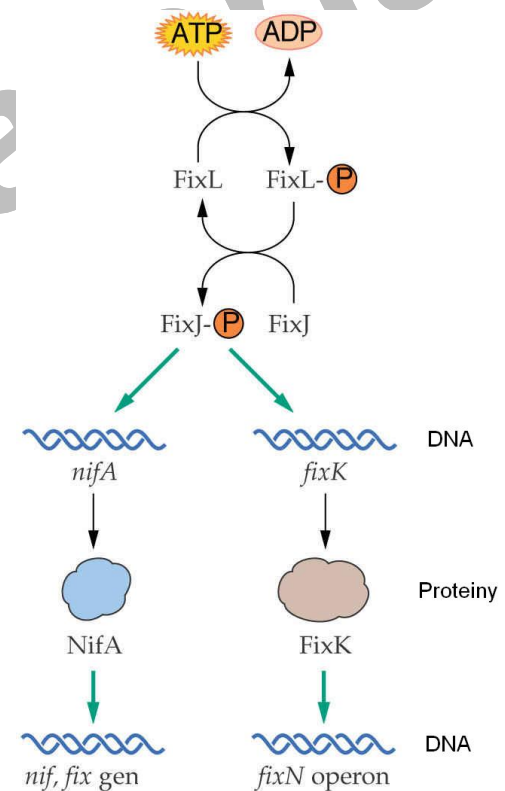
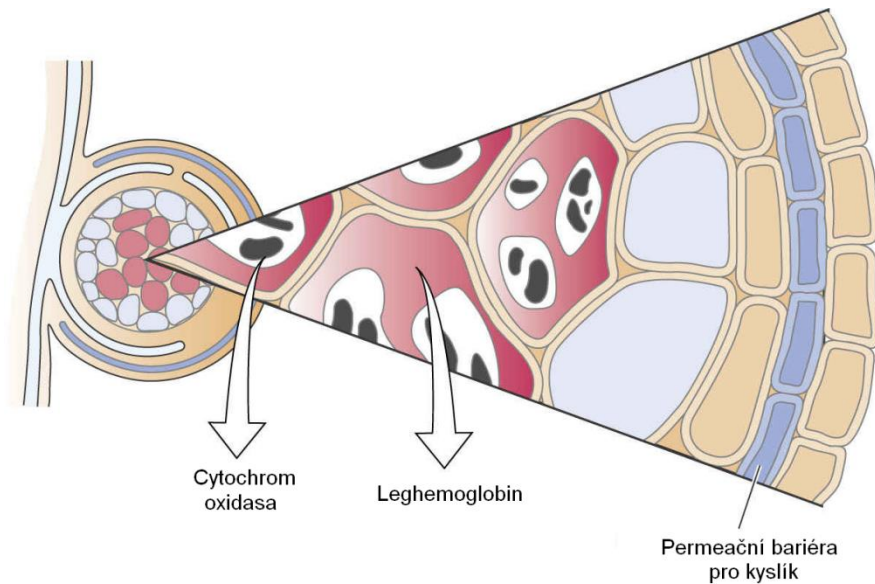
- v přírodních ekosystémech pochází 80-90% rostlinami využitelného dusíku z procesu fixace.
- při fixaci  $N_2$  existují tři základní typy symbiózy:
  - i. Symbióza gram-negativních bakterií (rhizobií) s celou řadou luštěnin (hrách, fazole, sojové boby, čočka, vjtěška)
  - ii. Symbióza gram-pozitivních bakterií actinomycet s některými dvouděložnými rostlinami (olše, myrta, přesličník)
  - iii. Symbióza mezi cyanobakteriemi a celou řadou rostlin (kapradí, jaterník, mech)
- výsledná symbióza vznikla zřejmě jako výsledek pozitivních a negativních tlaků během koevoluce symbiotického partnera a rostliny





# Fixace N<sub>2</sub> v nodulech

- při fixaci N<sub>2</sub> je nezbytné vytvořit mikro-aerobní redukční prostředí, ve kterém může docházet k aerobní tvorbě ATP
- pro udržení nízké koncentrace kyslíku v nodulech jsou potřeba tři základní faktory:
  - i. permeační bariéra v parenchymu nodulů
  - ii. přítomnost leghemoglobinu vázajícího volný kyslík
  - iii. výrazné snížení K<sub>m</sub> rhizobiální cytochrom oxidasy (50nM/8nM)

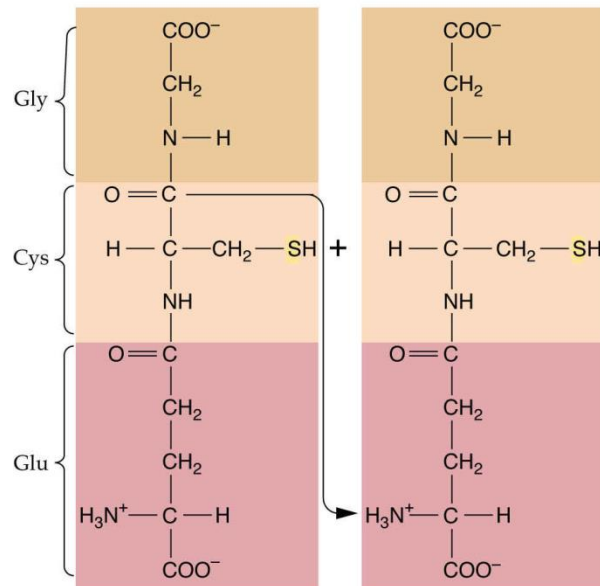


Regulace pomocí hemo-protein kinasy regulované c kyslíku

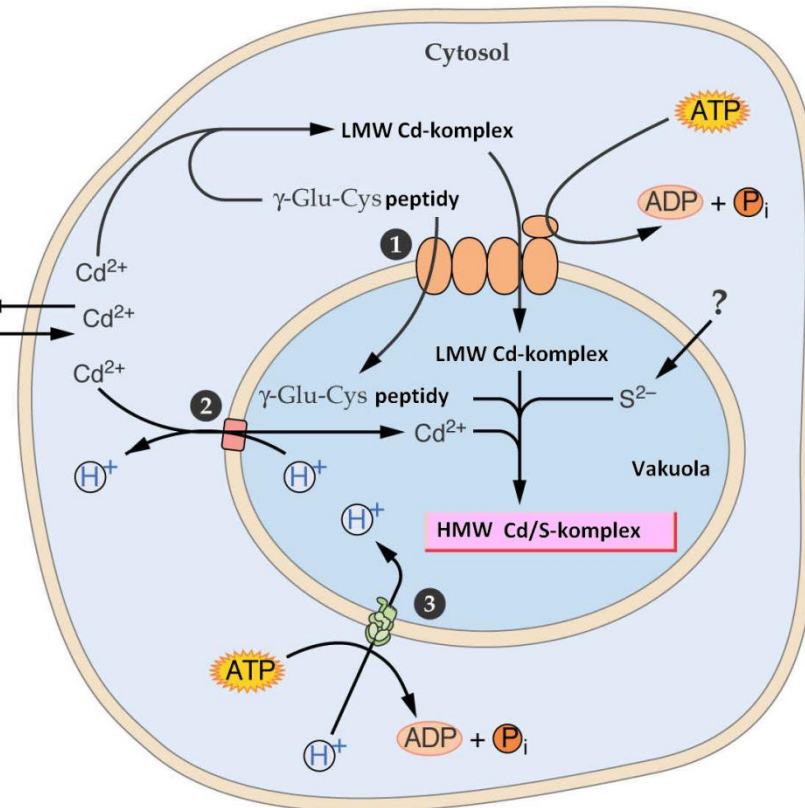


# Fytochelatiny (Bioremediace)

- jsou syntetizovány jako odpověď na expozici těžkými kovy nebo vysokou koncentrací mikroprvků (Cu)
- základní molekulou pro jejich syntézu je glutathion



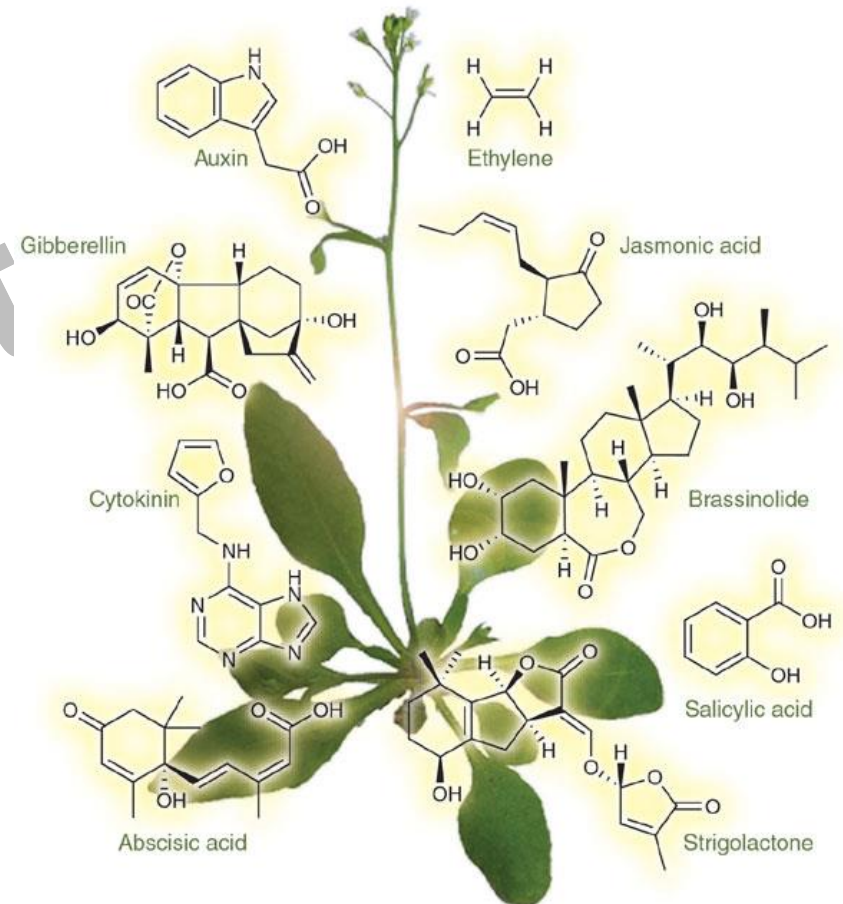
Gly





# Fytohormony

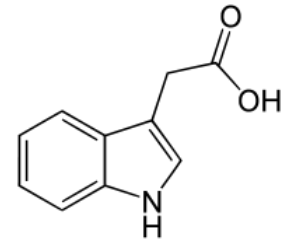
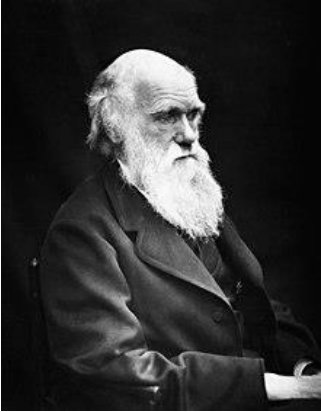
- **Fytohormony mají různé struktury a funkce**
- **Auxiny** (odvozené od indolu) stimulují buněčnou elongaci
- **Gibereliny** (deriváty giberelanu) stimulují prodlužování internodií
- **Cytokininy** (zeatin) stimulují buněčné dělení
- **Kyselina abscisová (ABA)** reguluje vodní homeostázu
- **Brasinosteroidy** – klíčová role v buněčném vývoji
- **Ethylen a kyselina jasmonová** – potencují senescenci
- **Peptidické hormony** regulují vývoj
- **Kyselina salicylová a jasmonová** se účastní obranných reakcí



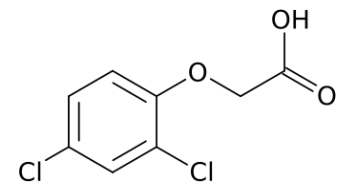


# Auxin

- V roce 1880 C. Darwin a syn pozorovali růst semenáčku za světlem
- Předpokládali přenos signálu z růstové špičky do růstové zóny
- V roce 1926 Frits Went izoloval z růstových špiček semenáčku ovsa látku, kterou nazval auxin
- Později identifikována jako indol-3-octová kyselina (IAA)
- Další látky mající aktivitu auxinů – fenylloctová kyselina; 2,4-dichlorooctová kyselina (2,4-D)
- 2,4-D – účinný herbicid způsobující narušení morfogeneze a zvýšenou produkci ethylenu
- Použit jako „agent orange“ ve Vietnamu, destruuje pouze dikoty – monokoty ho degradují
- Zabraňuje opadávání listů a plodů (antagonista ethylenu)
- Indukuje tvorbu plodů
- Za normálních okolností produkují semena auxin pouze po oplodnění



Indol-3-octová kyselina

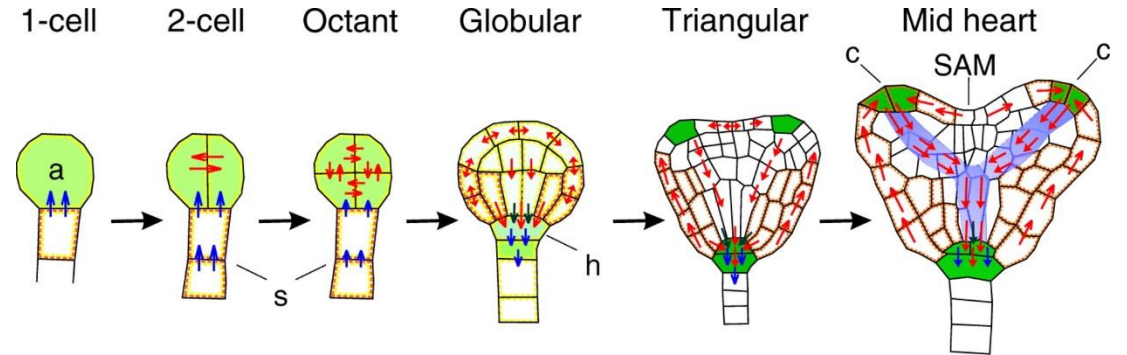


2,4-D



# Auxin

- Během časně embryogeneze formuje polaritu (stonek/kořen)
- Ovlivňuje buněčné dělení a diferenciaci
- Podněcuje prodlužování buněk – nejvyšší koncentrace v růstových zónách
- Primárně je tvořen v růstové špičce (nadzemní část)
  - Transportován polárním přenosem (vyžaduje energii)
  - Přenos zajišťují specifické eflux/influx přenašeče (PIN)
  - Polární transport = asymetrické rozložení přenašečů



|     |        |        |        |       |        |   |                    |     |               |             |              |                   |
|-----|--------|--------|--------|-------|--------|---|--------------------|-----|---------------|-------------|--------------|-------------------|
| Key | → PIN1 | → PIN4 | → PIN7 | ABCB1 | ABCB19 | Auxin concentration gradient (low-high) | Future vasculature | SAM | a Apical cell | c Cotyledon | h Hypophysis | s Suspensor cells |
|-----|--------|--------|--------|-------|--------|---|--------------------|-----|---------------|-------------|--------------|-------------------|



auxin

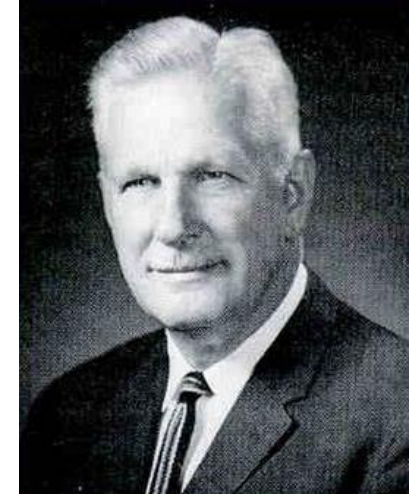
CTRL



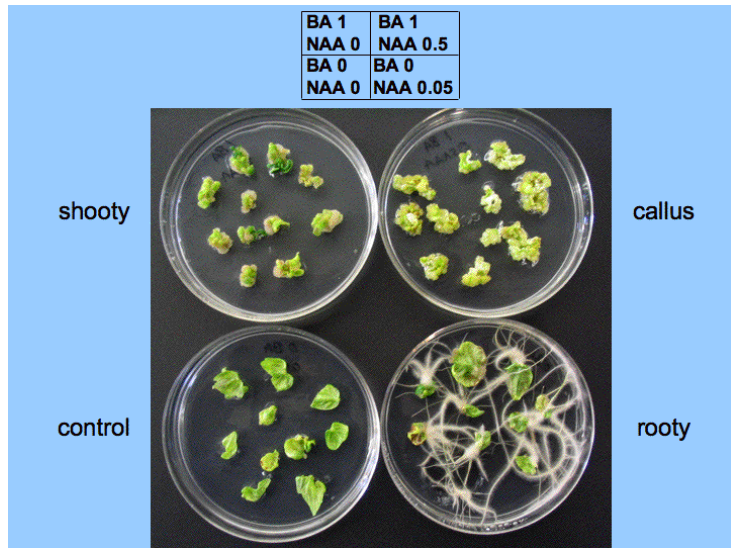
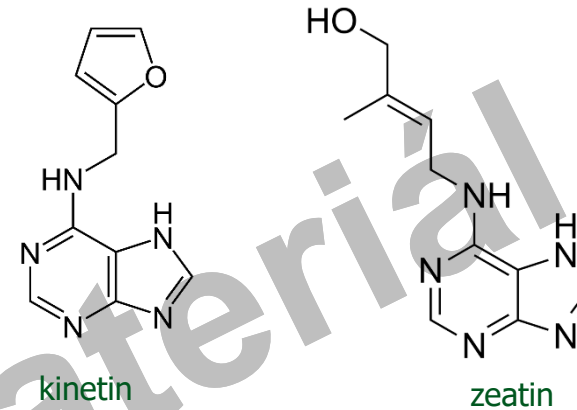
auxin

# Cytokinin

- Prenylované deriváty adeninu
- Zvyšují růst stimulací buněčného dělení a indukují laterální růst
- Antagonisté auxinu
- Oddalují senescenci – opak ethylenu
- Maturované buňky mohou opět aktivovat k dělení a vývoji
- Formace kalusu – může regenerovat zpět v rostlinu



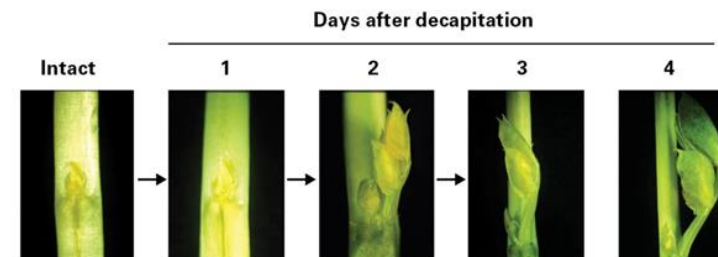
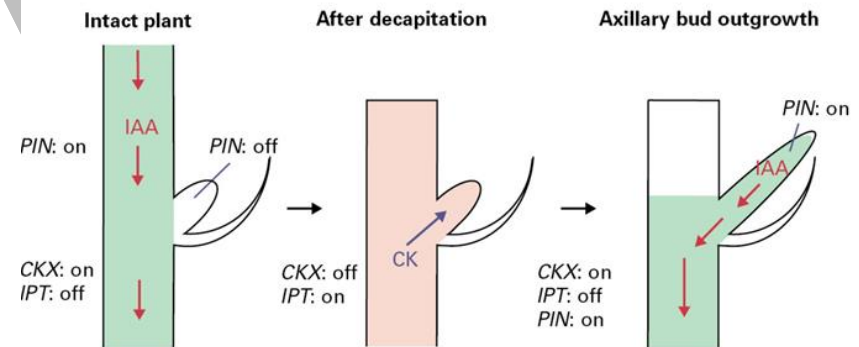
Folke K. Skoog



BA – Benzylaminopurin (CK)  
NAA - 1-Naftalenoctová kyselina (Auxin)



B WT AtCKX1

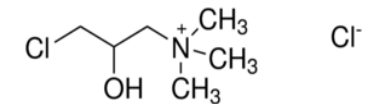
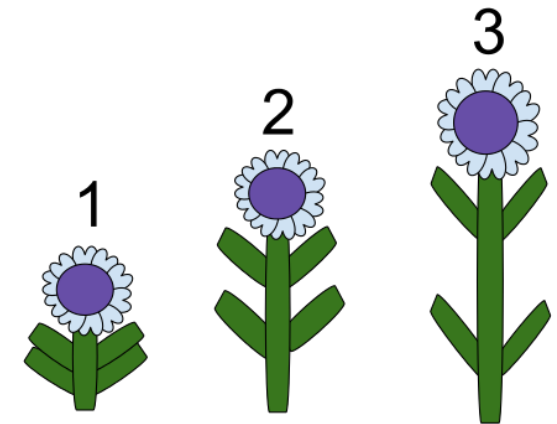
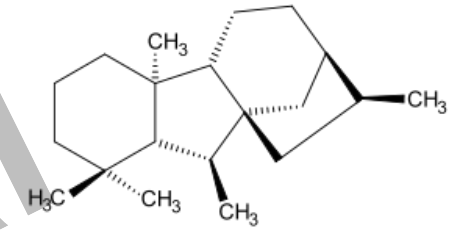


CKX - Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (degradace)  
IPT – isopentenyl transferasa (syntéza)



# Gibereliny

- Infekce rýže houbou *Gibberella fujikuroi* vede k extrémně vysokým rostlinám bez semen
- 1926 – Eiichi Kurozawa izoloval z této houby látku mající tento efekt
- Nazval ji gibberellin
- Gibereliny jsou směsí látek s podobnou strukturou *ent*-gibberellanu
- Nejdůležitější giberelin je GA1 a GA
- Podobně jako IAA gibereliny stimulují prodlužování stonků a rovněž regulují kvetení
- Rovněž se podílí na vytváření plodů a jejich růstu
- Gibereliny ukončují dormanci semen expresí enzymů ztenčujících obal semene (amylázy)
- **Prakticky se využívají v zemědělství:**
  - Produkce protáhlých hroznů bez semen
  - Pro stimulaci amyláz u ječmene (pivovarnictví)
  - Inhibitory jsou používány pro zkrácení růstu stonků
  - V 50-letech umožnily zelenou revoluci u kukuřice (zakrsle rostliny s vyšším obsahem zrn)

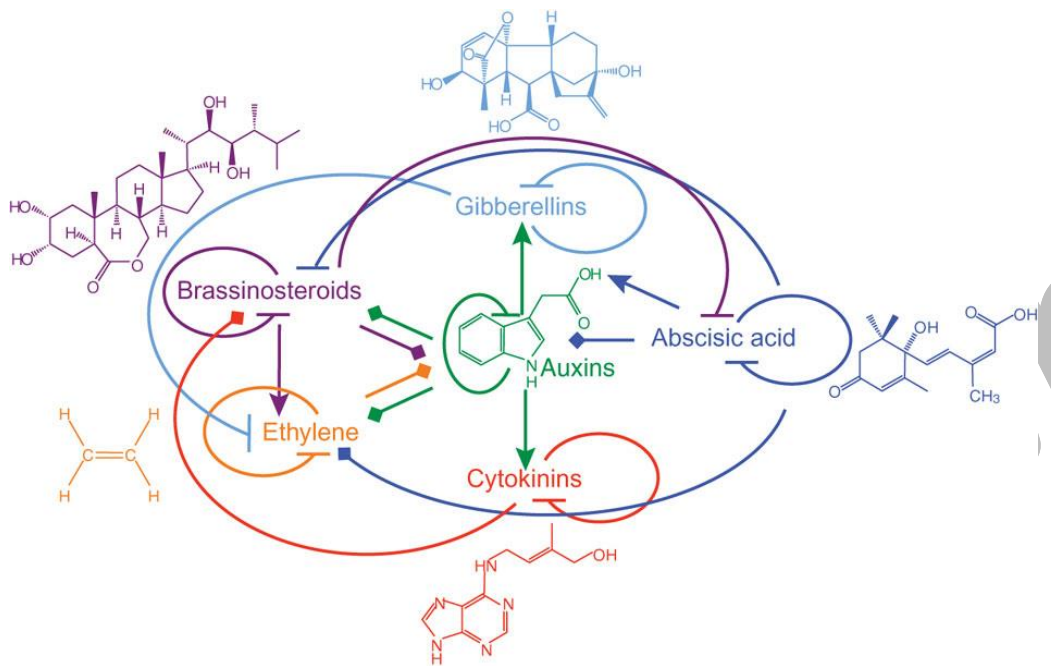


2-chlorotrimethylammonium chlorid (Cycocel, BASF)





# Fytohormony - shrnutí



|               | Germination | Growth to Maturity | Flowering | Fruit Development | Abscission | Seed Dormancy |
|---------------|-------------|--------------------|-----------|-------------------|------------|---------------|
| Gibberellin   | ✓           | ✓                  | ✓         | ✓                 | ✗          | ✗             |
| Auxin         | ✗           | ✓                  | ✓         | ✓                 | ✗          | ✗             |
| Cytokinins    | ✗           | ✓                  | ✓         | ✓                 | ✗          | ✗             |
| Ethylene      | ✗           | ✗                  | ✓         | ✓                 | ✓          | ✗             |
| Abscisic Acid | ✗           | ✗                  | ✗         | ✗                 | ✓          | ✓             |



**Děkuji za pozornost**

**Otázky?**

Studijní materiál