

# GENETICKY MODIFIKOVANÉ ROSTLINY (GMR)

**Lukáš Fischer**

Katedra experimentální biologie rostlin

PřF UK

- Geny – základ vlastností organismů
- Změny genetické informace rostlin a definice „genetické modifikace“ dle zákona
- Principy přípravy geneticky modifikovaných rostlin
- Příklady pěstovaných geneticky modifikovaných plodin
- Přínosy a potenciální rizika

# Geny – základ vlastností organismů

Proč je rýže bílá a mrkev oranžová?



Rýži chybí 3 geny pro enzymy tvořící oranžový  $\beta$ -karoten

# Proč jsou některé rostliny odolné vůči škůdcům a jiné ne?

















Citlivé rostliny nemají potřebné geny odolnosti  
(inhibitory proteáz, enzymy syntézy alkaloidů, ...)

# Gen → protein → znak

Geny předurčují řadu vlastností rostlin!



semeno		květ	lusk		stonek	
tvár	dělohy	barva	tvár	barva	umístění	velikost
						
šedý & kulatý	žluté	bílá	plný	žlutý	lusky a květy podél stonku	dlouhý
						
bílý & svrasklý	zelené	fialová	příškrčený	zelený	koncové lusky, vrcholový květ	krátký
1	2	3	4	5	6	7



„vlohy“ - J. G. Mendel

# Vlastnosti organismů jsou podmíněné dědičnou informací

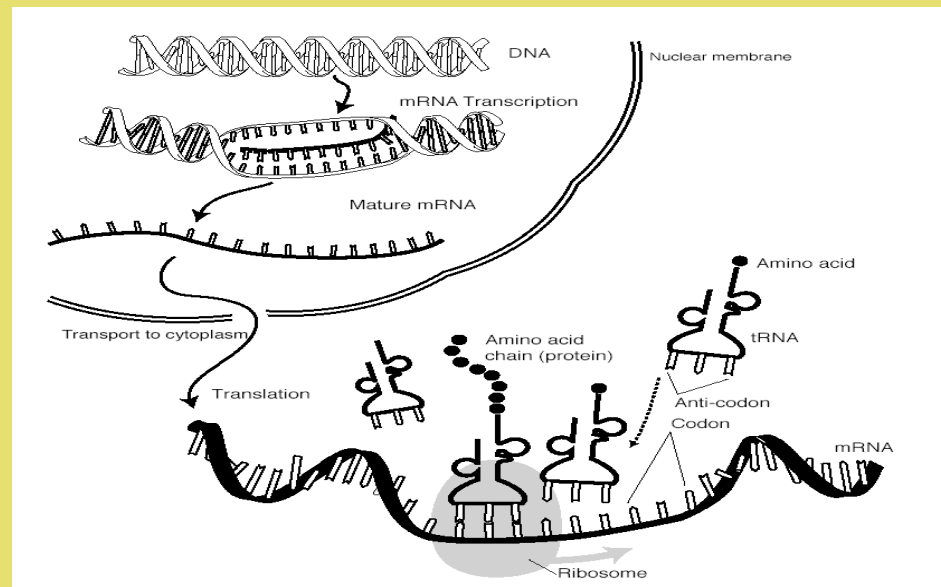
Gen → protein → znak

- sekvencí genů  
(jaké vznikají bílkoviny)



znak může být i projevem nefunkčnosti genu  
(např. bílý květ)

- aktivitou genů  
v jednotlivých buňkách  
(kde a kolik bílkovin vzniká)

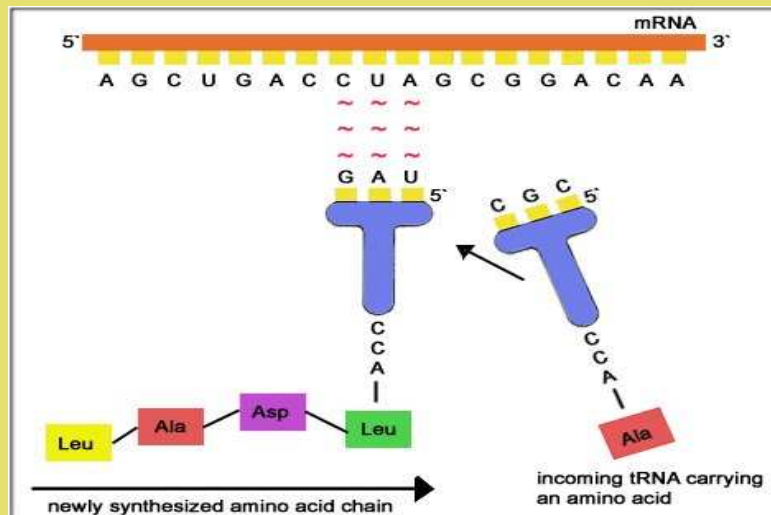




# Genetická informace

– sekvence DNA (pořadí nukleotidů - 4 typy) překládaná do sekvence bílkoviny (pořadí aminokyselin - 20 typů)

DNA:



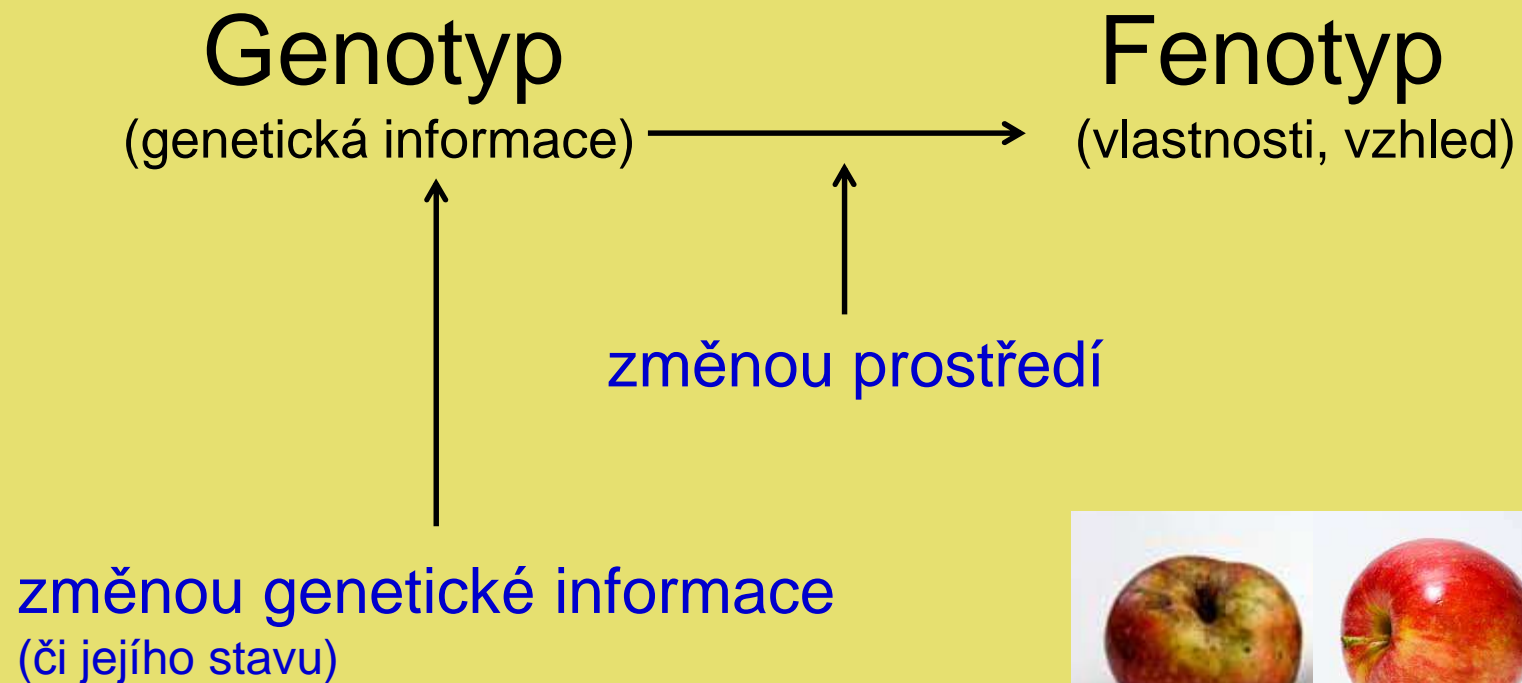
## Genetický kód – šifrovací tabulka

		Second base				
		U	C	A	G	
First base	U	UUU } Phenylalanine <b>F</b> UUC } UUA } Leucine <b>L</b> UUG }	UCU } Serine <b>S</b> UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyrosine <b>Y</b> UAC } UAA } Stop codon UAG } Stop codon	UGU } Cysteine <b>C</b> UGC } UGA } Stop codon UGG } Tryptophan <b>W</b>	U C A G
	C	CUU } Leucine <b>L</b> CUC } CUA } CUG }	CCU } Proline <b>P</b> CCC } CCA } CCG }	CAU } Histidine <b>H</b> CAC } CAA } Glutamine <b>Q</b> CAG }	CGU } Arginine <b>R</b> CGC } CGA } CGG }	C U C A G
	A	AUU } Isoleucine <b>I</b> AUC } AUA } AUG } Methionine start codon <b>M</b>	ACU } Threonine <b>T</b> ACC } ACA } ACG }	AAU } Asparagine <b>N</b> AAC } AAA } Lysine <b>K</b> AAG }	AGU } Serine <b>S</b> AGC } AGA } Arginine <b>R</b> AGG }	A U C A G
G	GUU } Valine <b>V</b> GUC } GUA } GUG }	GCU } Alanine <b>A</b> GCC } GCA } GCG }	GAU } Aspartic acid <b>D</b> GAC } GAA } Glutamic acid <b>E</b> GAG }	GGU } Glycine <b>G</b> GGC } GGA } GGG }	G U C A G	

**Gen = úsek DNA , předpis pro tvorbu proteinu**

**Proteiny = vykonavatelé (téměř) všech funkcí (enzymy, přenašeče a přijímače signálů, zprostředkovatelé buněčných pohybů, ....)**

# Jak změnit (vylepšit) vlastnosti organismu?

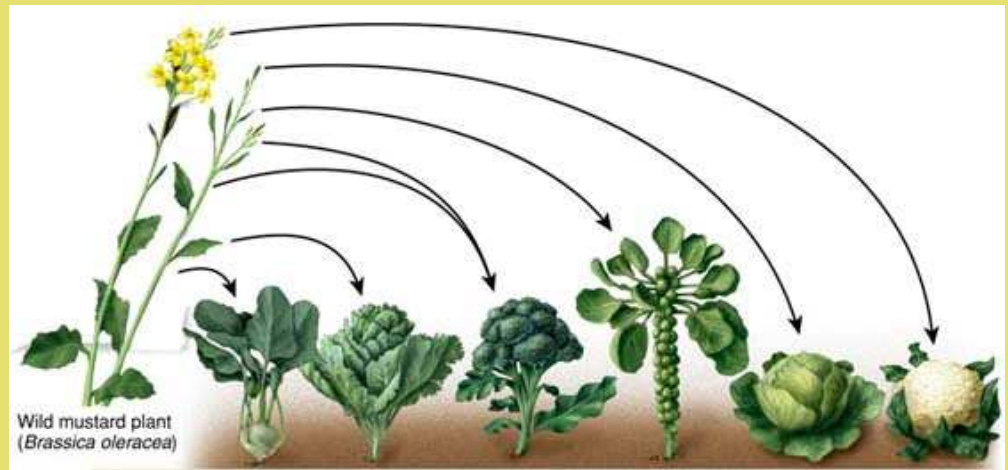




# Změna genetické informace

- **Klasické šlechtění**

(vnitrodruhové křížení, selekce a kombinování vlastností přítomných v populaci)



- **Hybridizace**

(mezidruhová/rodová, umělé opylení, fúze somatických buněk)



# Změna genetické informace

(či jejího stavu)

- **Mutageneze** (náhodné zvyšování variability, nově i s možností zacílení na určitý gen)
  - Epimutageneze (inaktivace genu bez změny genetické informace)
- **Genetická modifikace** (dle zákona)
  - Cisgenoze** – vnesen nezměněný celistvý úsek DNA z téhož či křížitelného druhu (velmi blízké přirozeným procesům)
  - Transgenoze** – vnesen jakýkoli úsek DNA (nekřížitelné druhy, syntetické molekuly, ...)

# Genetická modifikace

-volba, když ostatní metody selhávají

- požadovaná vlastnost není v křížitelných druzích dostupná
- nelze sloučit dobré vlastnosti ze dvou jedinců (druhů) do jednoho, resp. oddělit dobré vlastnosti od špatných

např.:

geny odolnosti jsou svázané s geny způsobujícími špatnou konzumní kvalitu plodů (jde o různé projevy téhož genu – odolnost révy vůči Perenospoře)



# GM - co a jak měnit?

základem je dobře vymyslet:

**jaké vlastnosti měnit?**

**jak změny vlastností dosáhnout?**

- **podmínkou je pochopit základních fyziologické, metabolické a regulační procesy**

(i tak je mnoho „dobře vymyšlených“ modifikací bez efektu či se silnými nežádoucími vedlejšími účinky)

Možnosti řešení:

- nové geny
- cílené změny sekvence genů
- změny aktivity a regulace genů  
(místa a času exprese)

# GM - co dokáže jeden gen?

(Ize jich vnášet i více současně či postupně)

## Jeden gen

= protein strukturní, zásobní

(ale i toxin, antigen pro imunizaci, protein pro lékařství)

= protein/enzym - tvorba/degradace metabolitu (nebo např. herbicidu)

- tvorba/degradace signální molekuly (fytormonu)

= regulační protein



**aktivita více cílových genů**

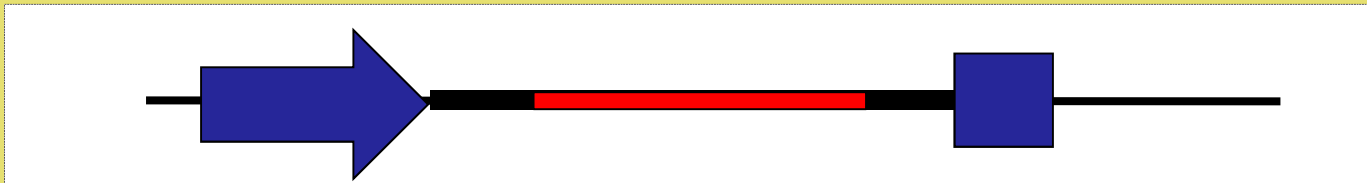
= „návod“ pro blokování jiného genu (inaktivace)

# Příprava geneticky modifikovaných organismů

zabudování nové genetické informace, úseku DNA

úsek DNA:

- zpravidla gen kódující bílkovinu
- sekvence univerzální, jen instrukce „v jazyce příjemce“
  - **regulační sekvence** pro transkripční a translační aparát příjemce



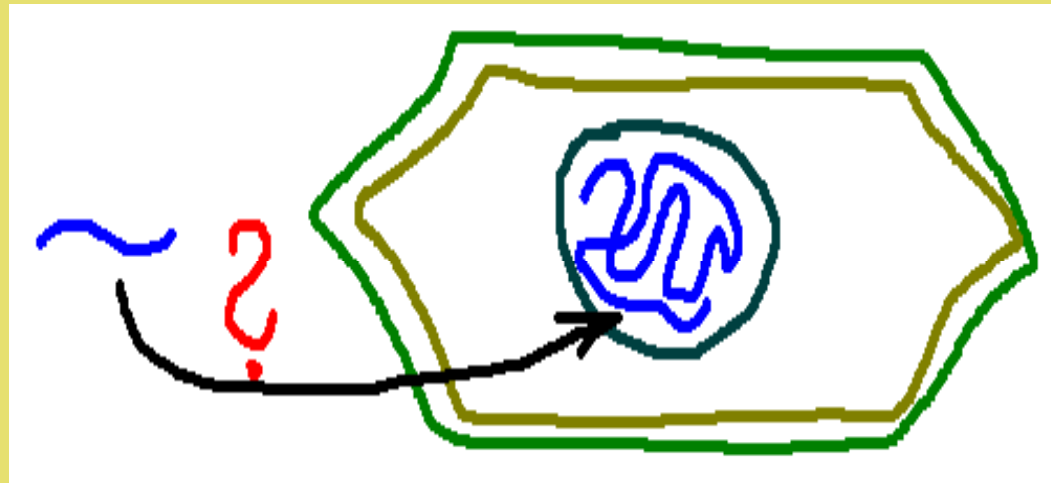
- jinak není přenos genů teoreticky limitován



# JAK PŘIPRAVIT GMR?

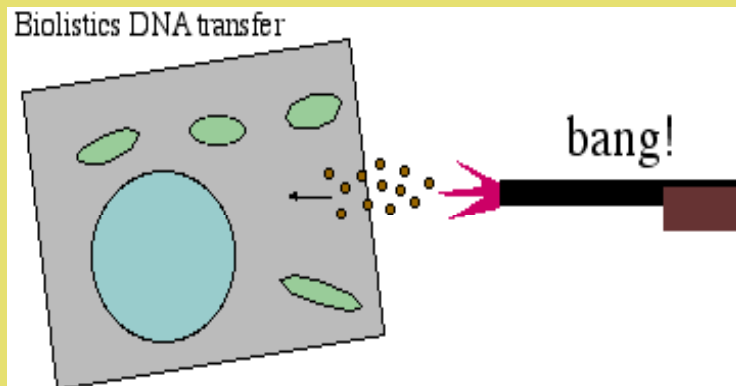
- Metody transformace rostlinných buněk
- Princip přípravy GM rostlin

# Metody vnášení DNA do rostlinných buněk



- prostřednictvím agrobaktéria
- balistické metody – „gene gun“

# Biolistická metoda transformace neboli nastřelování (Particle gun, Gene gun)



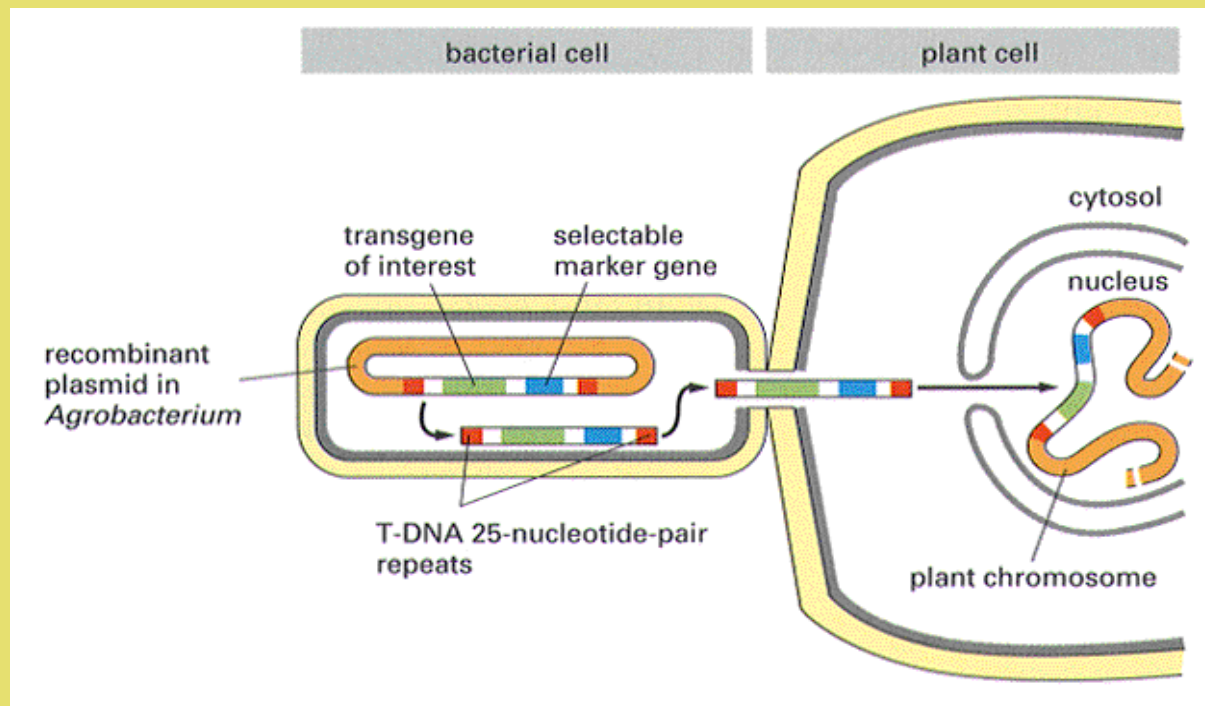
- nabalení DNA na zlaté či wolframové kuličky
- nastřelení na rostlinný orgán, buněčnou kulturu,...

# Transformace pomocí agrobaktéria (*Agrobacterium tumefaciens*)

- půdní bakterie – „genetický parazitismus“ na rostlinách
- přenáší několik svých genů do buněk poraněné rostliny
- z transformované buňky se tvoří nádor, který produkuje výživné látky pro agrobaktérium



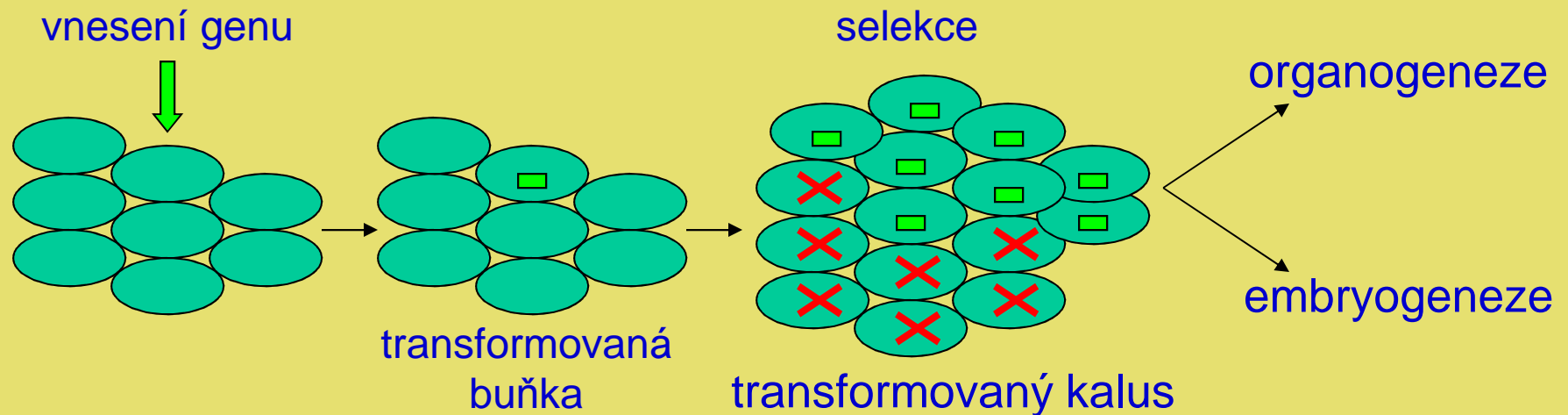
# „Ochočené“ agrobaktérium (podvedené genovými inženýry)



- Geny způsobující vznik nádoru mohou být vyměněny za jakékoli jiné geny
- tyto geny jsou agrobaktériem účinně přeneseny do rostlinné buňky

# Princip přípravy transgenních rostlin

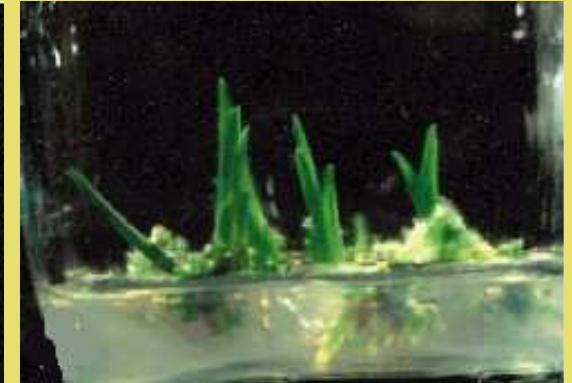
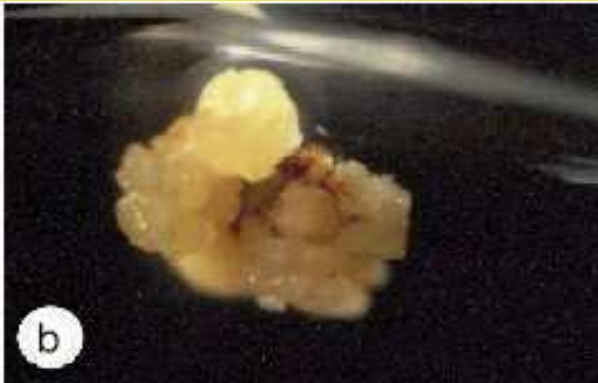
1. Na začátku je vždy jen jedna transformovaná buňka!  
(nelze transformovat všechny buňky rostliny naráz)
2. Pomnožení transformovaných buněk na „selekčním médiu“ (!)
3. Indukce organogeneze či somatické embryogeneze  
(aplikací vhodných regulátorů rostlinného růstu v *in vitro* podmínkách)





# Jak udělat z jedné buňky celou rostlinu?

- organogeneze (kalus – prýt – rostlina)



- somatic embryogenesis (som. embryo – rostlina)



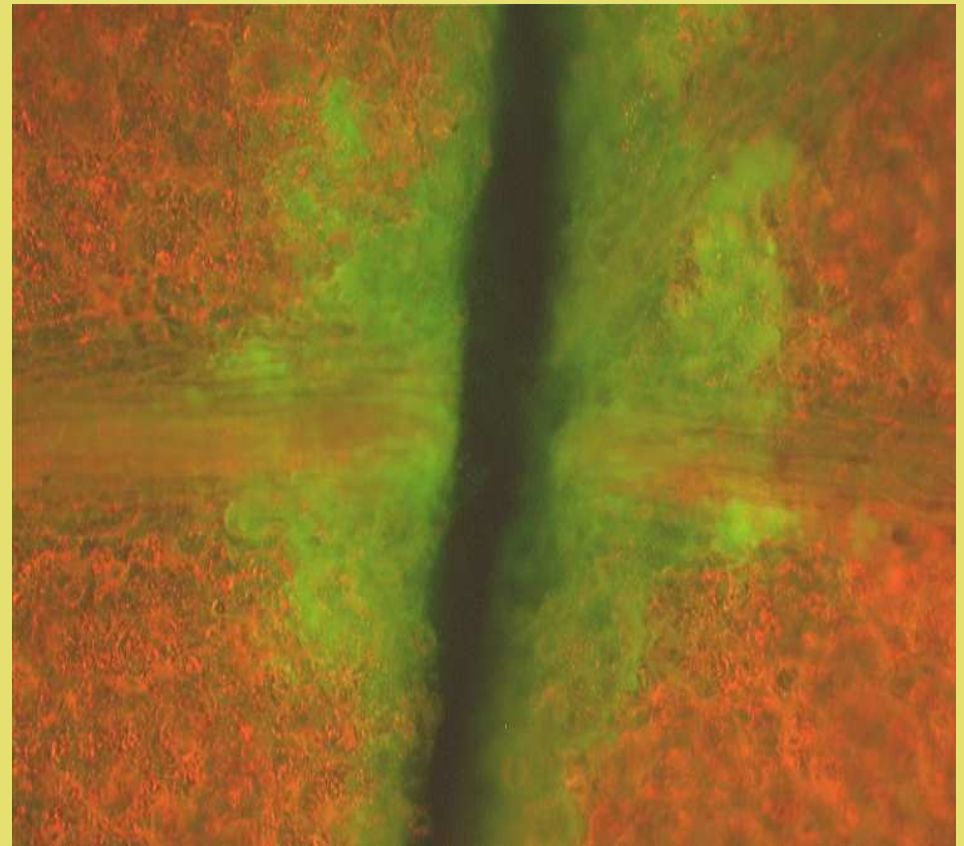
# Transformace bramboru pomocí agrobaktéria - kokultivace



agrobaktérium

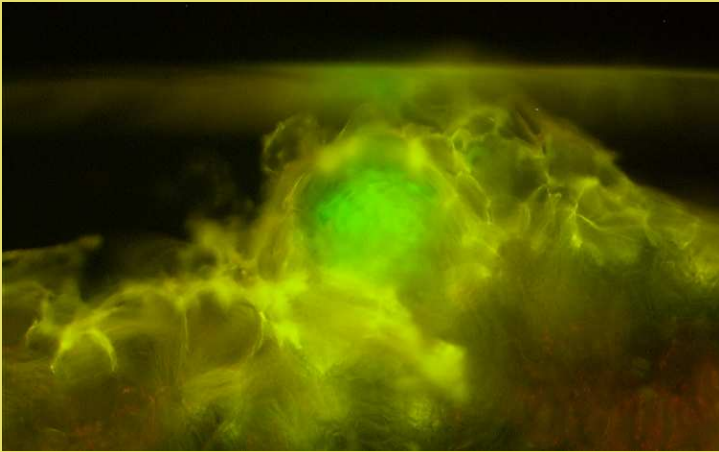


kokultivace  
s poraněnými  
listy



vstup agrobaktéria do pletiva v místě poranění

# Dediferenciace, tvorba kalusu a organogeneze



10 dní po transformaci



3-4 týdny po transformaci



5-6 týdnů po transformaci

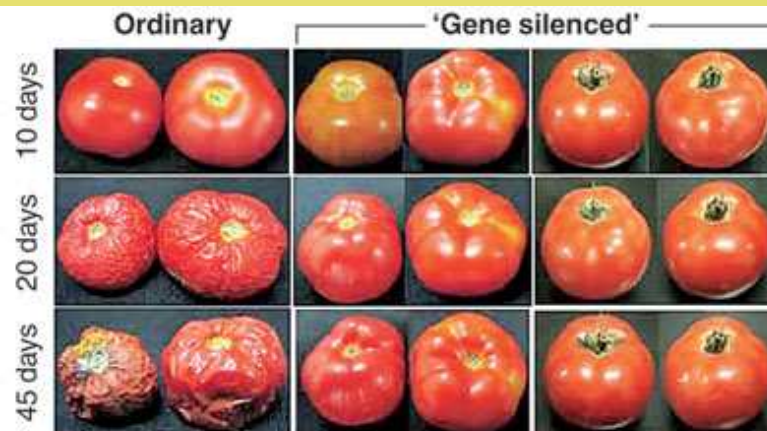
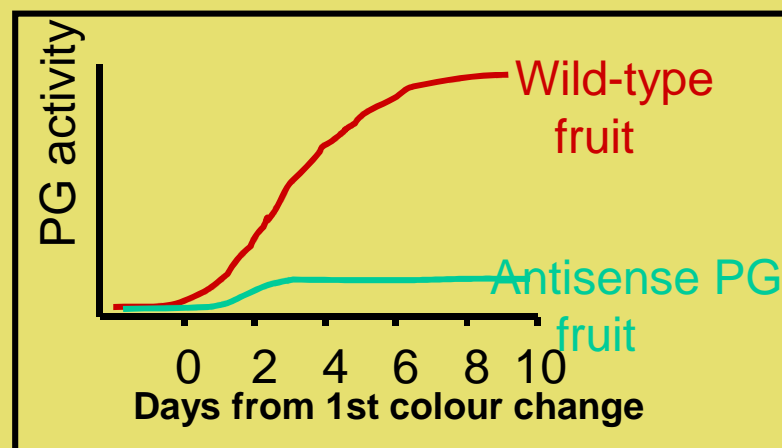
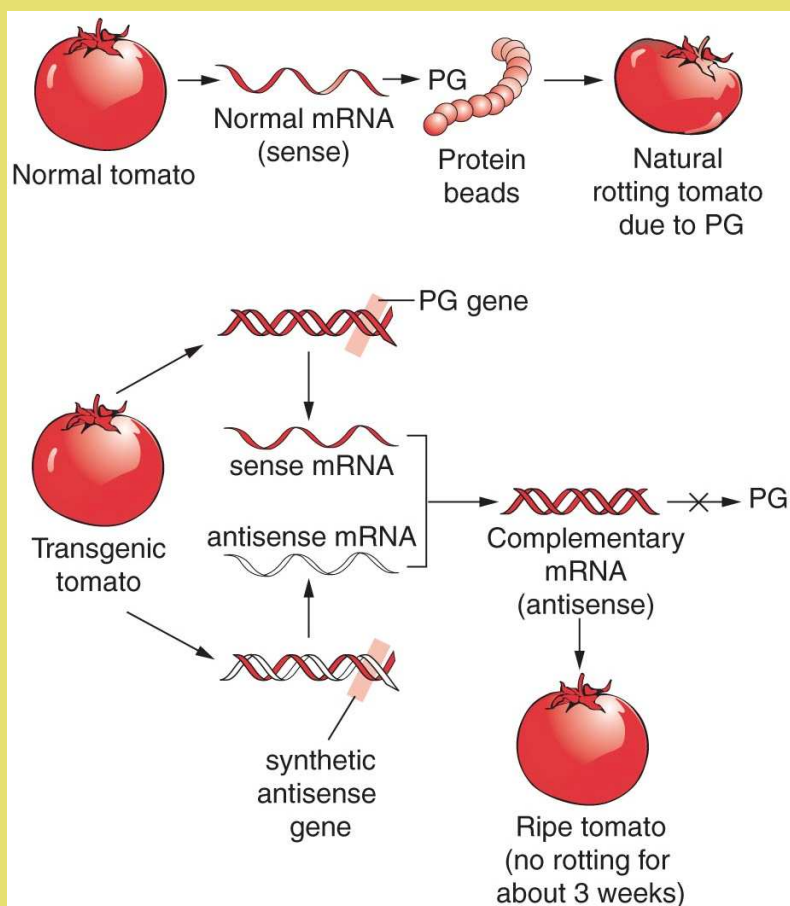
# GM rostliny

- 1992 - 1. GM na trhu – viru odolný tabák  
1994 - Flavr Savr rajčata (delší skladovatelnost)
- rostliny odolné vůči škůdcům, (chorobám), herbicidům, suchu, ...
- produkce proteinů pro medicínské účely
- rostliny s vylepšenými nutričními vlastnostmi (Golden rice)
- fytofarmacie (odstraňování kontaminantů z půdy, ...)
- jedlé vakcíny (produkce antigenů  
a perorální vakcinace)
  - žloutenka, papillomaviry



# Rajčata s prodlouženou trvanlivostí „Flavr Savr“

- snížení hladiny PG expresí téhož genu v antisense orientaci
- cílená degradace transkriptů detekovaných komplementárními sRNA



# Odolnost vůči hmyzím škůdcům - Bt toxin

- toxin bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt)
  - insekticidní účinky (na různé čeledi hmyzu) – asi 40 typů
  - ve formě protoxinu (delta endotoxin), který je štěpen v trávicím ústrojí hmyzu - proteázovou aktivitou a alkalickým pH
- jako biopesticid používán od 60. let



- zejména bavlník a kukuřice x zavíječi



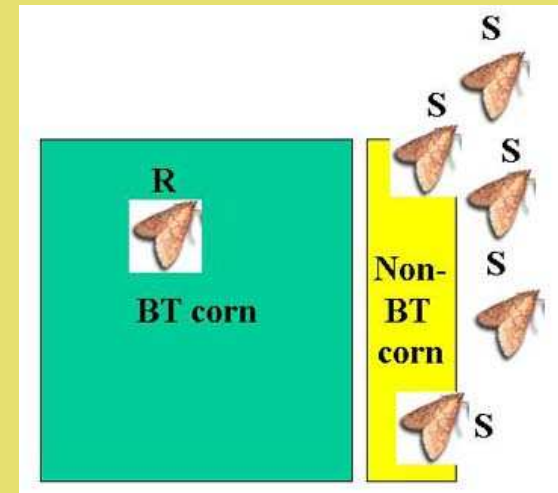
# Bt toxin

**Výhody:**

- méně insekticidů - zvýšení biodiverzity
- zvýšení výnosu
- zdravější potraviny (kukuřice, méně sekundárních houbových infekcí a toxinů)

**Rizika:**

- požívání vyprášeného pylu housenkami vzácných motýlů (monarchů) na okolních porostech (prokázáno jen laboratorně)
- vytvoření rezistence u škůdce - ponechání refúgií s netransformovanou plodinou



# Rezistence k herbicidům

(inhibitorům klíčových metabolických/vývojových pochodů)

## Usnadnění boje s plevely

- vnesený gen kóduje enzym
  - se stejnou aktivitou jako cílový enzym, ale necitlivý k herbicidu (někdy lze docílit i neGM postupy – př. glyfosát - dvě bodové mutace)
  - odbourávající herbicid v rostlině

bez ošetření



+ herbicid

- méně herbicidů
- šetrnější, lépe biodegradovatelné látky (ale i ty se kumulují)
- možné použít až když je potřeba (ale i kdykoli je potřeba)
- ještě „sterilnější“ monokultury (snížení biodiverzity)

# Zlatá rýže

- boj s deficiencí vitamínu A v JV Asii
- vneseny 3 geny pro enzymy biosyntézy  $\beta$ -karotenu v endospermu rýže (z geranyl geranyl difosfátu)

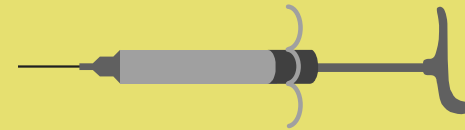


**$\beta$ -karoten = prekurzor vitamínu A**

# Jedlé vakcíny

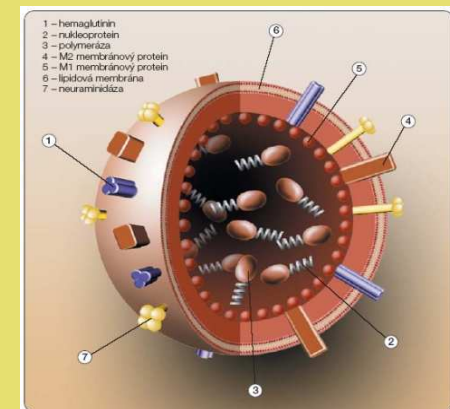


nebo



- transgenní rostliny mohou produkovat antigeny patogenů (např. žloutenky typu B), kterými mohou být při požití imunizováni živočichové

- úspěšně testováno na myších i lidech
- plodiny využitelné jako jedlé vakcíny: ovoce a zelenina (požitelná bez tepelné úpravy)



Obr. 1 Schematický náčrt viru chřipky A; podle [12] – Beran, et al., 2005

## Přehled GM rostlin již pěstovaných či připravovaných:

- rostliny se zvýšenou odolností vůči:
  - hmyzím škůdcům (Bt toxin)
  - herbicidům (Roundup)
  - virům, hlístům, houbám, bakteriím
  - abiotickým stresům (sucho, mráz, zasolení)
- rostliny se zvýšenou produkcí
- plody s prodlouženou trvanlivostí či skladovatelností

## Přehled GM rostlin již pěstovaných či připravovaných:

- plodiny s vylepšenými vlastnostmi, složením, ...
  - oleje (vyšší obsah nenasycených mastných kyselin, ...)
  - fruktany, modifikovaný škrob
  - změny v aminokyselinovém složení (Met, Cys)
  - zdravější (syntéza karotenu v rýži)
  - zvýšení obsahu vlákniny
  - zvýšení stravitelnosti
  - plodiny s odstraněnými alergeny
- jedlé vakcíny (vakcinace na sliznicích při požití)



# Nejvíce pěstované GM plodiny

## Druhy:

- Sója
- Kukuřice
- Bavlník
- Řepka

## Modifikace:

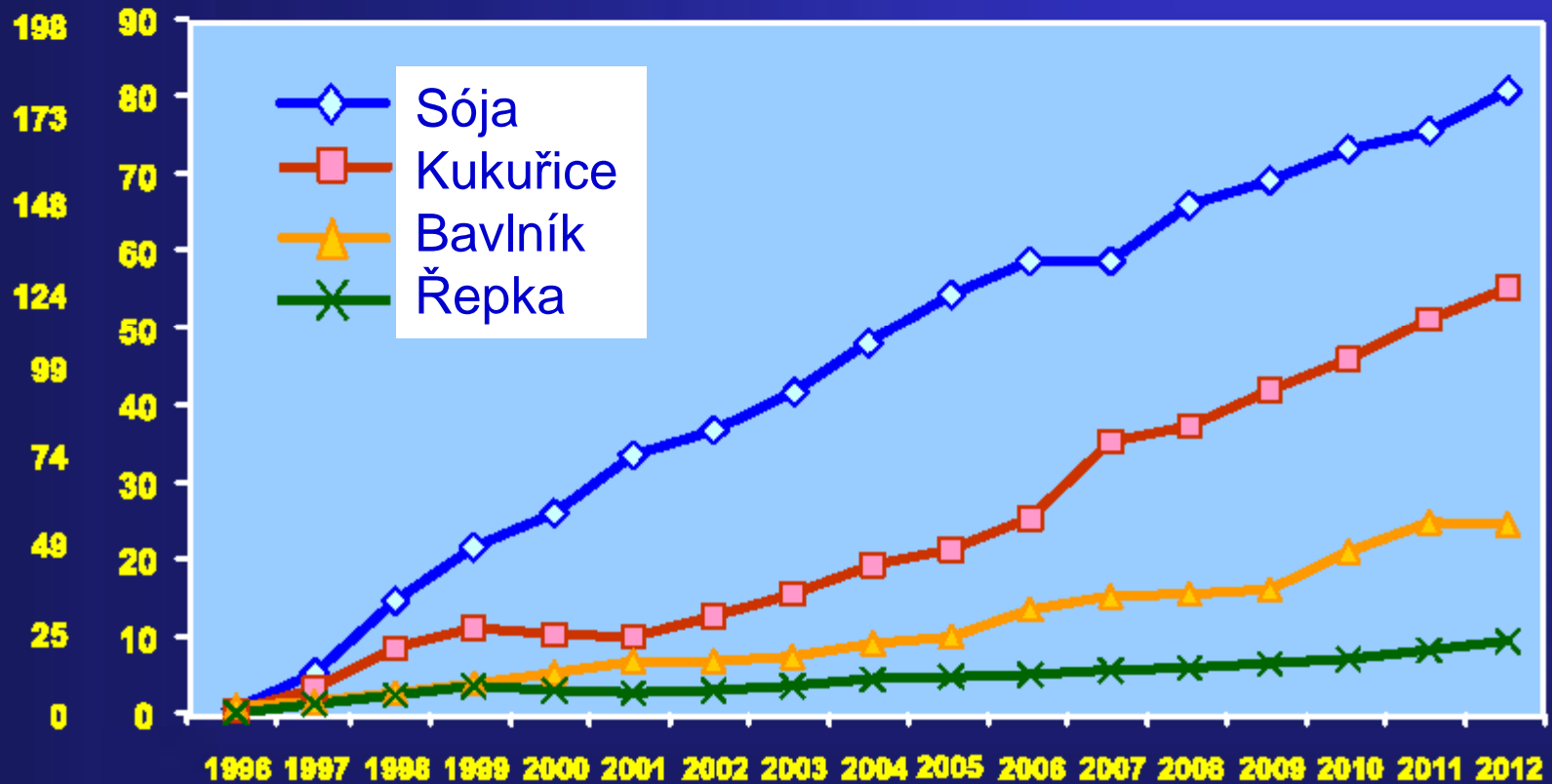
- Odolnost vůči herbicidům
- Odolnost vůči hmyzu
- Kombinace obojího

# Celkové plochy oseté GM – dle plodin

## By Crop (Million Hectares, Million Acres)



M Acres



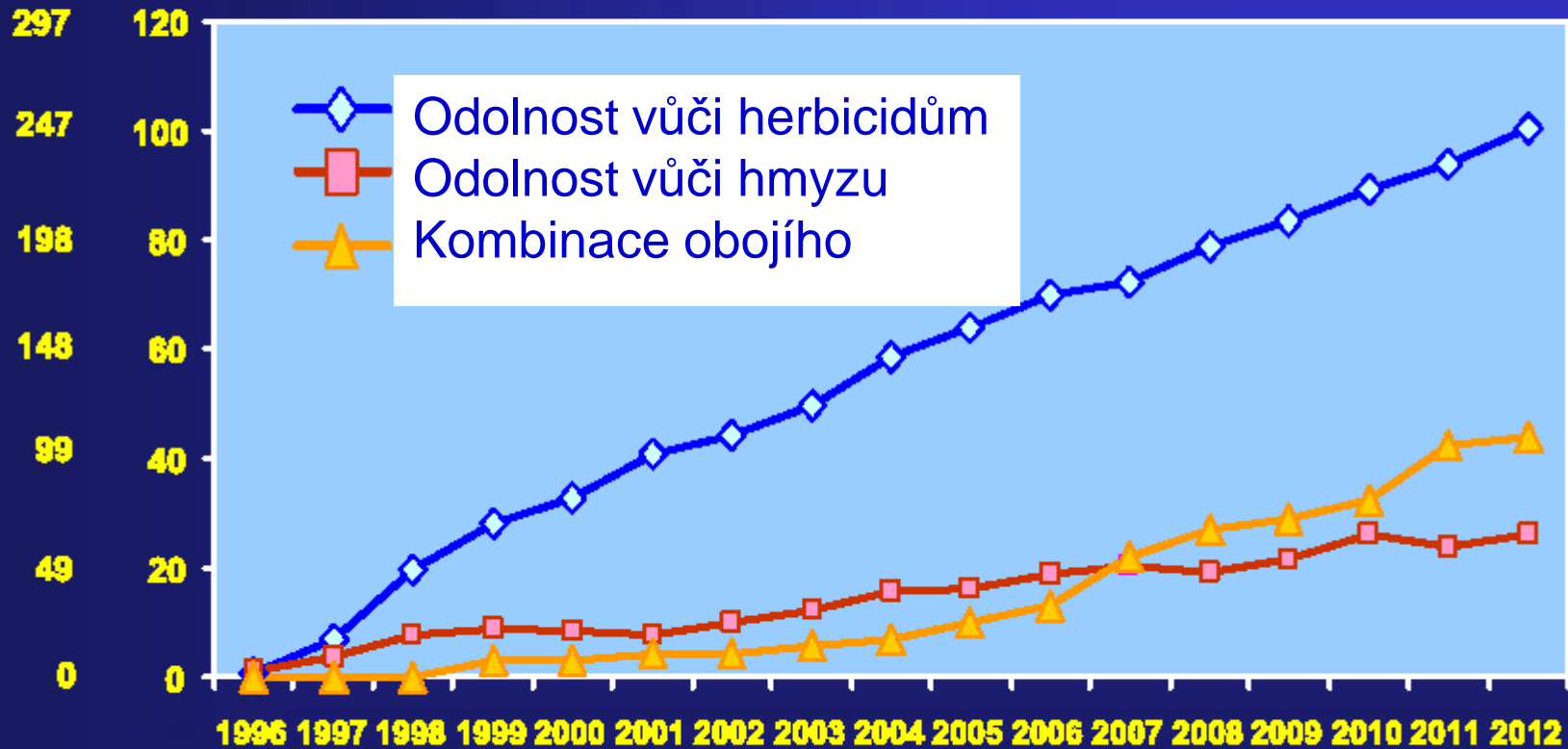
Source: Clive James, 2012

# Celkové plochy ošetřené GM – dle typů modifikace



## By Trait (Million Hectares, Million Acres)

M Acres



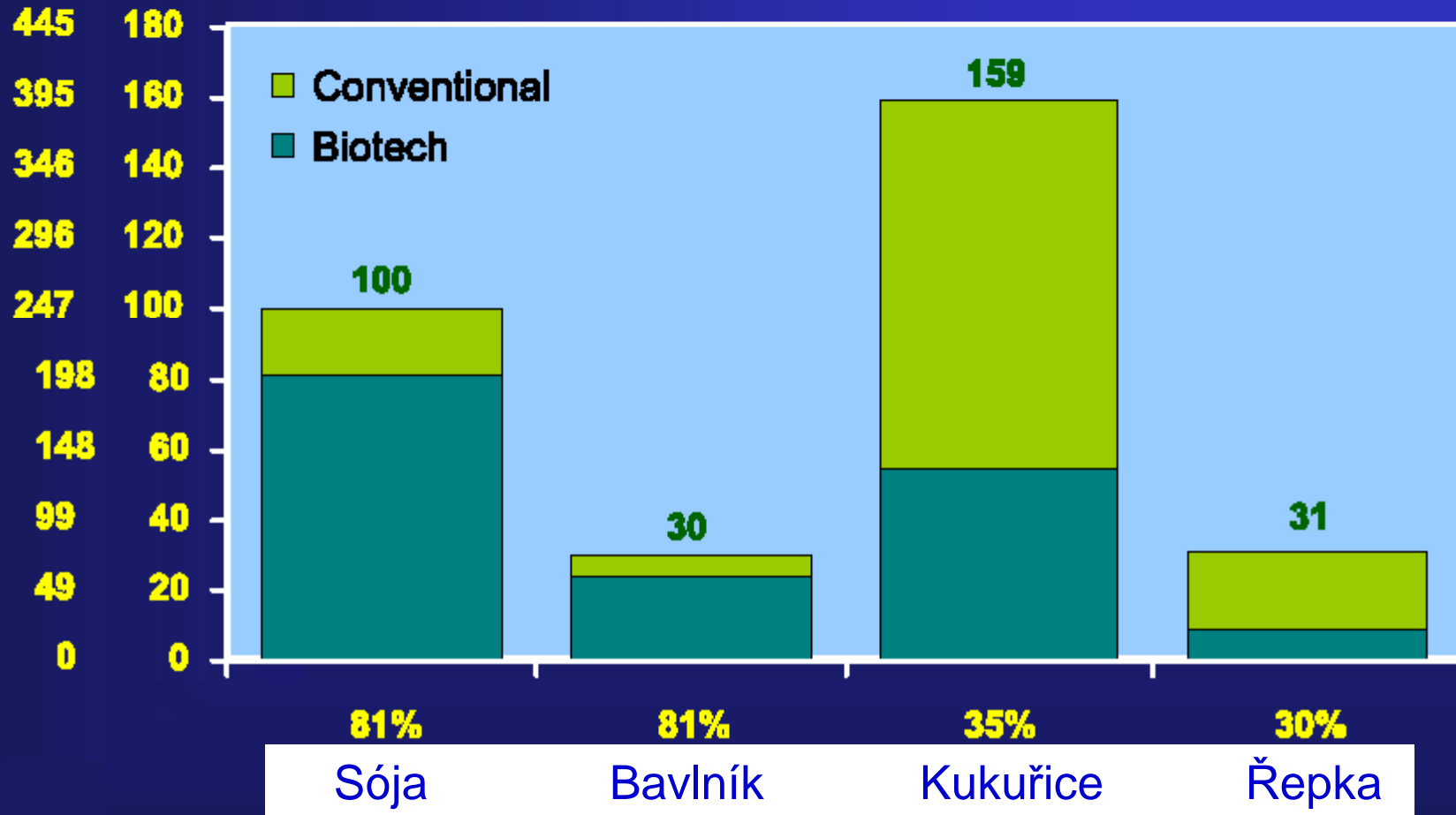
Source: Clive James, 2012

# Celkové plochy ošetřené GM a konvenčními plodinami

## Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2012



M Acres



Source: Clive James, 2012



\* 18 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

Source: Clive James, 2012.

## GM velmoci:

1. USA - 70 mil ha
2. Brazílie – 37
3. Argentina – 24
4. Kanada – 12
5. Indie - 11

# Porovnání klasického šlechtění a genetické modifikace

- **Klasické šlechtění**

- silná mutageneze
- vzdálená hybridizace
- mnoho neznámých změn
- pomalý proces

- **Genetické modifikace**

- přenos několika přesně definovaných a dobře prozkoumaných genů (zpravidla na předem neznámá místa genomu ☹)
- důkladný schvalovací proces
- relativně rychlé

# Rizika spojená s GM rostlinami

## Zdravotní rizika pro člověka

**NE** - přenos genů na člověka  
- vznik rezistentních bakterií

### Potenciální rizika:

- při vnesení genu pro alergenní protein
- aktivace endogenních toxinů či alergenů rostlin

**ALE důkladnější systém kontrol než u klasického šlechtění**  
- i v zájmu producentů

## Ekologická rizika

Bt – toxin  
(necílové organismy – např. Monarchové)  
vznik rezistence

Rezistence k herbicidům  
- horizontální přenos  
- biodiverzita  
- potravní řetězce