



**Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR  
InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018**

## 2.4 GENETICKÉ MANIPULACE *in vitro*

- nekonvenční techniky, kterými lze modifikovat rostlinný genom
  - **buněčné přístupy** (somatická /parasexuální/ hybridizace)
  - **vlastní genové inženýrství**
- všechny techniky využívají totipotence buněk a jsou vázané na explantátové kultury



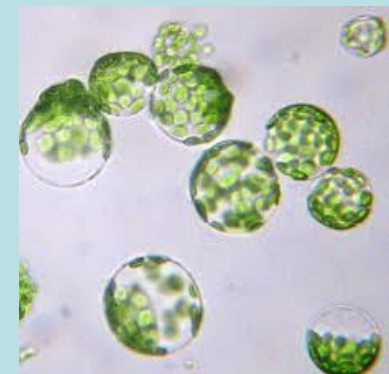
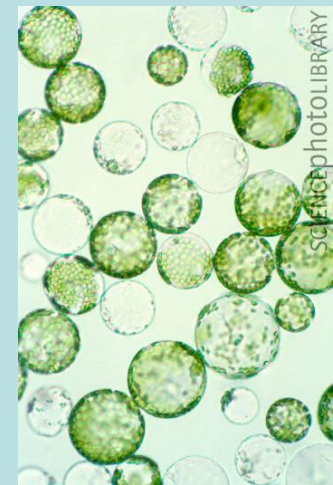
## 2.4.1 Somatická (parasexuální) hybridizace

- splynutí cytoplasmy a jaderné hmoty dvou nebo více somatických buněk
- možnost rozšíření genetické variability

### 2.4.1.1 Izolace a kultivace protoplastů

- předpoklad somat. hybridizace

protoplast = buňka zbavená buněčné stěny



## ● zdroj protoplastů

- mezofyl, endosperm, epidermis, pyl...
- kalusy z kalusových kultur - rozpadavé



## ● izolace protoplastů

- mechanicky – malá efektivita
- enzymaticky a) dvoustupňově (pektinázy, pak celulázy)  
b) jednostupňově (směs celuláz a pektináz)

## ● kultivace protoplastů

- v tekutém mediu
- nutriční a hormonální nároky jako u běžných explantát. kultur

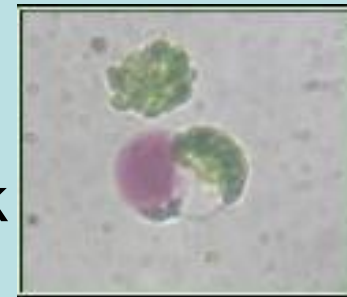
## ● fúze protoplastů

- spontánní - malá frekvence
- indukovaná - frekvence 10 - 35 %



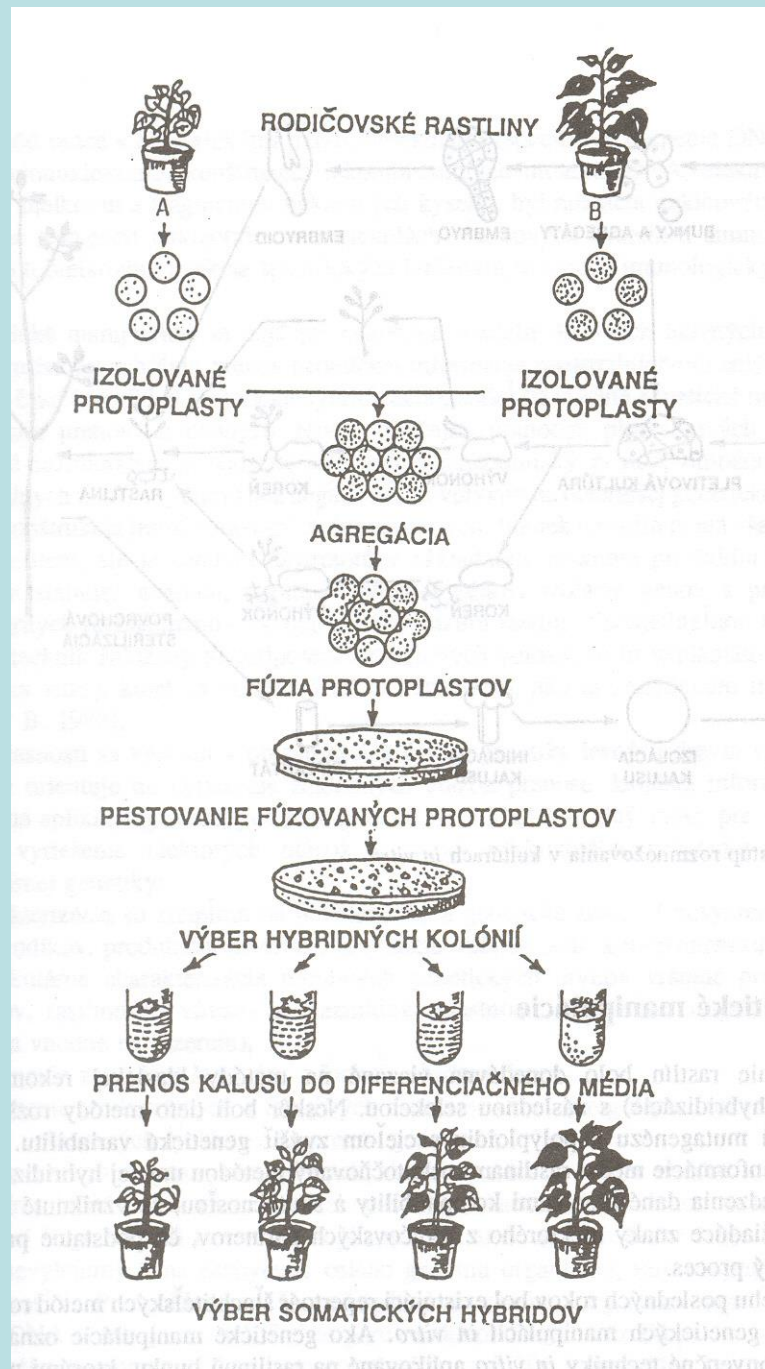
## ● regenerace buněčné stěny

- po fúzi vytvoření buněčné stěny a dělení buněk



## ● organogeneze - regenerace rostlin

- vznik somatických (parasexuálních) hybridů (**cybridů**)
- pravý s. hybrid (splynutí jader i cytoplasmy)
- nepravý s. hybrid (jádro z jedné a cytoplasmu z druhé nebo obou buněk)



## 2.4.1.2 Využití parasexuální hybridizace

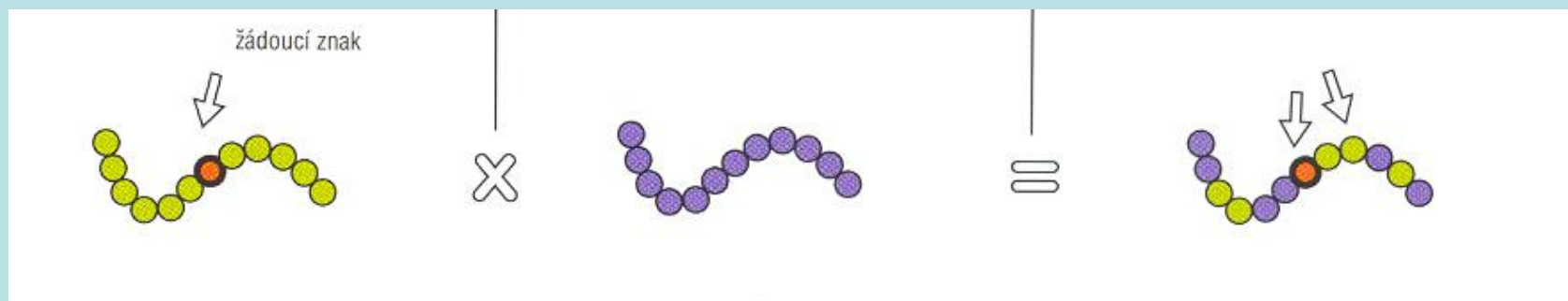
- překonání sexuální inkompatibility
- křížení fylogenet. vzdálených druhů
- získání **asymetrických hybridů**  
(celý soubor jaderných genů z jednoho + cytopl. z jiného rodiče)
- získání hybridů se součtem genotypů rodičů
- přenos cytoplazmatické samčí sterility
- přenos genů rezistence vůči virovým, houbovým chorobám

- **přenos rezistence vůči stresům (teplotním, zasolení,..)**
- **přenos rezistence vůči hmyzím škůdcům**  
(syntéza fytoalexinů)
- **přenos genů pro syntézu zásobních proteinů, vitamínů, alkaloidů**

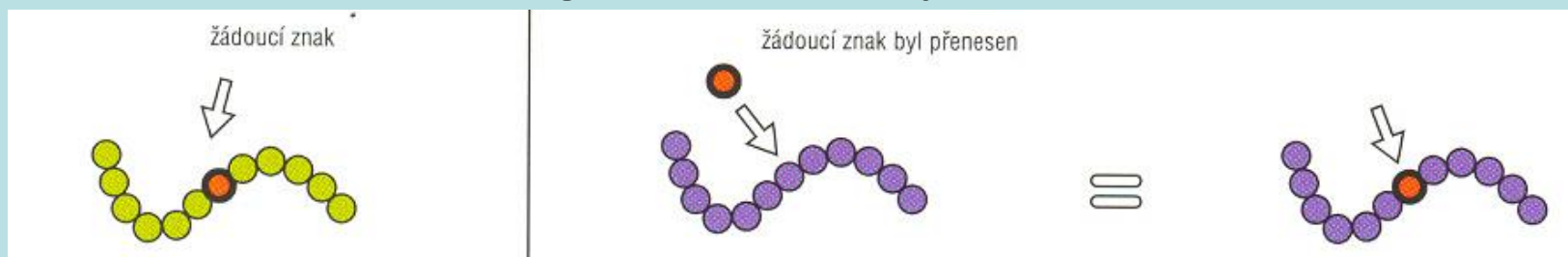


## 2.4.2 Genové inženýrství

### klasické šlechtění



### genové inženýrství

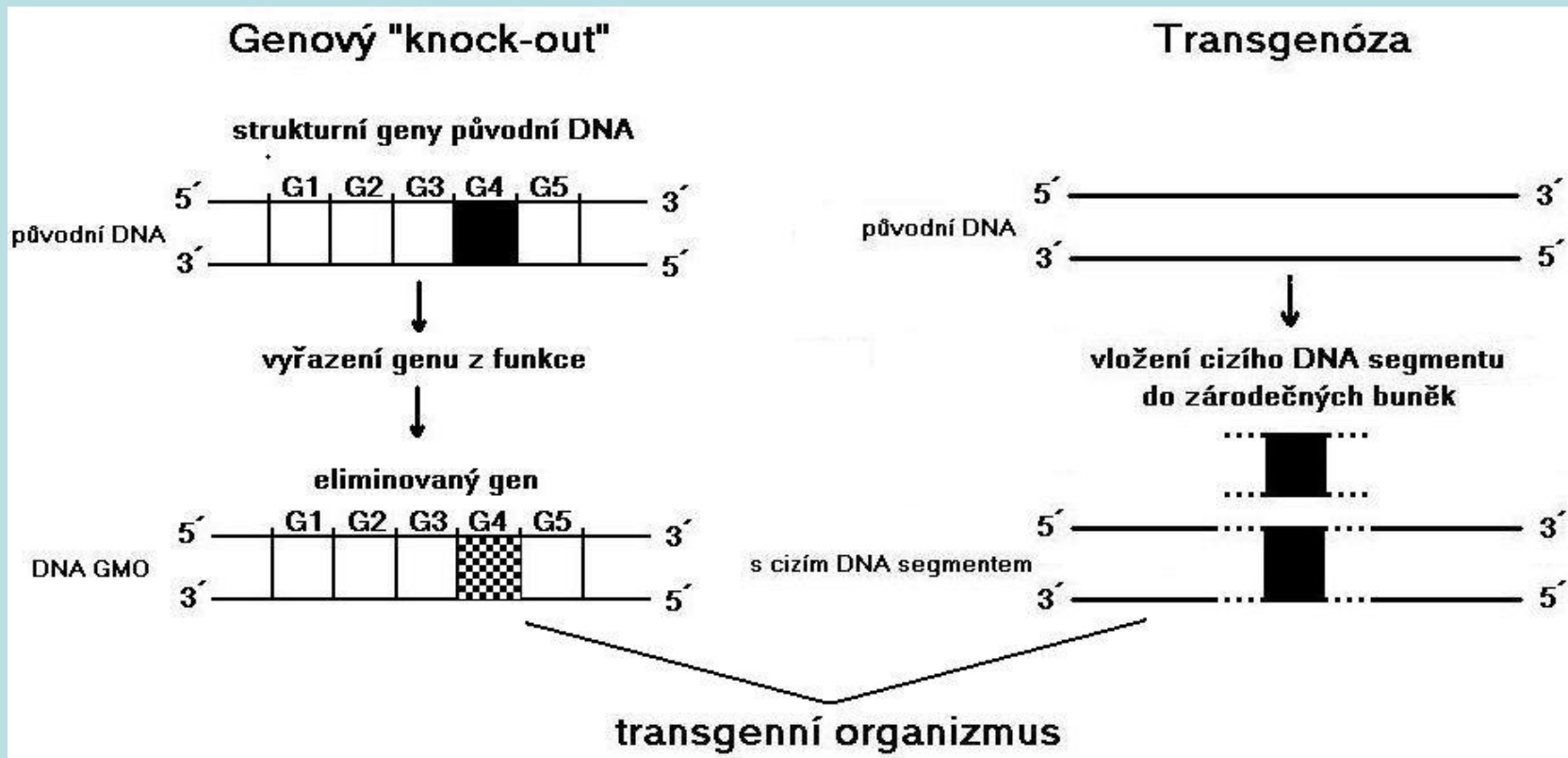


– techniky vedoucí k umělé tvorbě geneticky pozměněných (transformovaných) buněk zásahem do jejich DNA

– z transformovaných buněk lze regenerovat transgenní rostliny

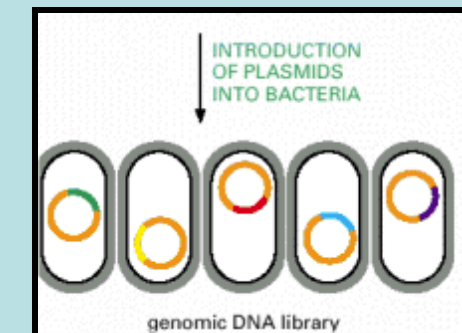
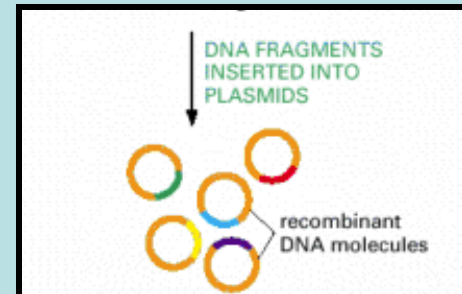
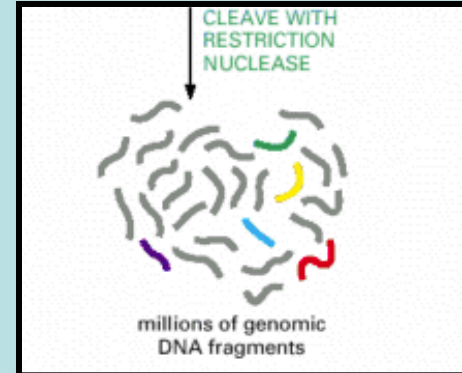
## • umožňuje cílenou modifikaci genomu

- vložení cizího DNA segmentu (genu) do DNA příjemce
- vyřazení nežádoucího genu z funkce, tzv. genový knock-out



## 2.4.2.1 Obecný postup genového inženýrství

- výběr vhodného donora
- izolace DNA
- “nastříhání” DNA restrikčními nukleázami
- identifikace a izolace genu (vytvoření genové) knihovny



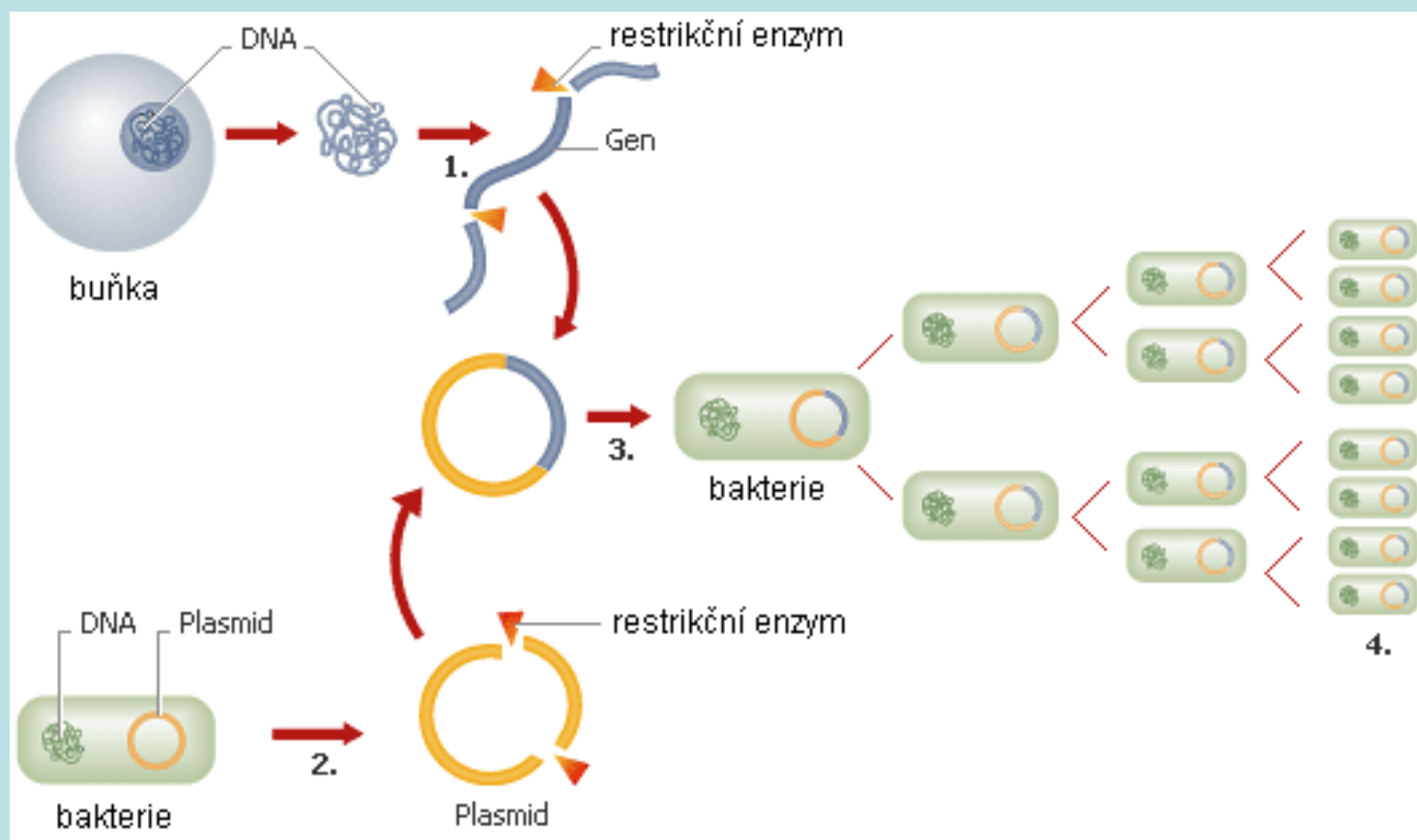
# ● molekulární klonování (namnožení molekuly DNA)

## in vitro

- procesem polymerázové řetězové reakce (PCR)

## in vivo

- pomocí prokaryot (bakterie, např. E. coli nebo eukaryot),



## ● transformace buněk (vnos cizorodé DNA)

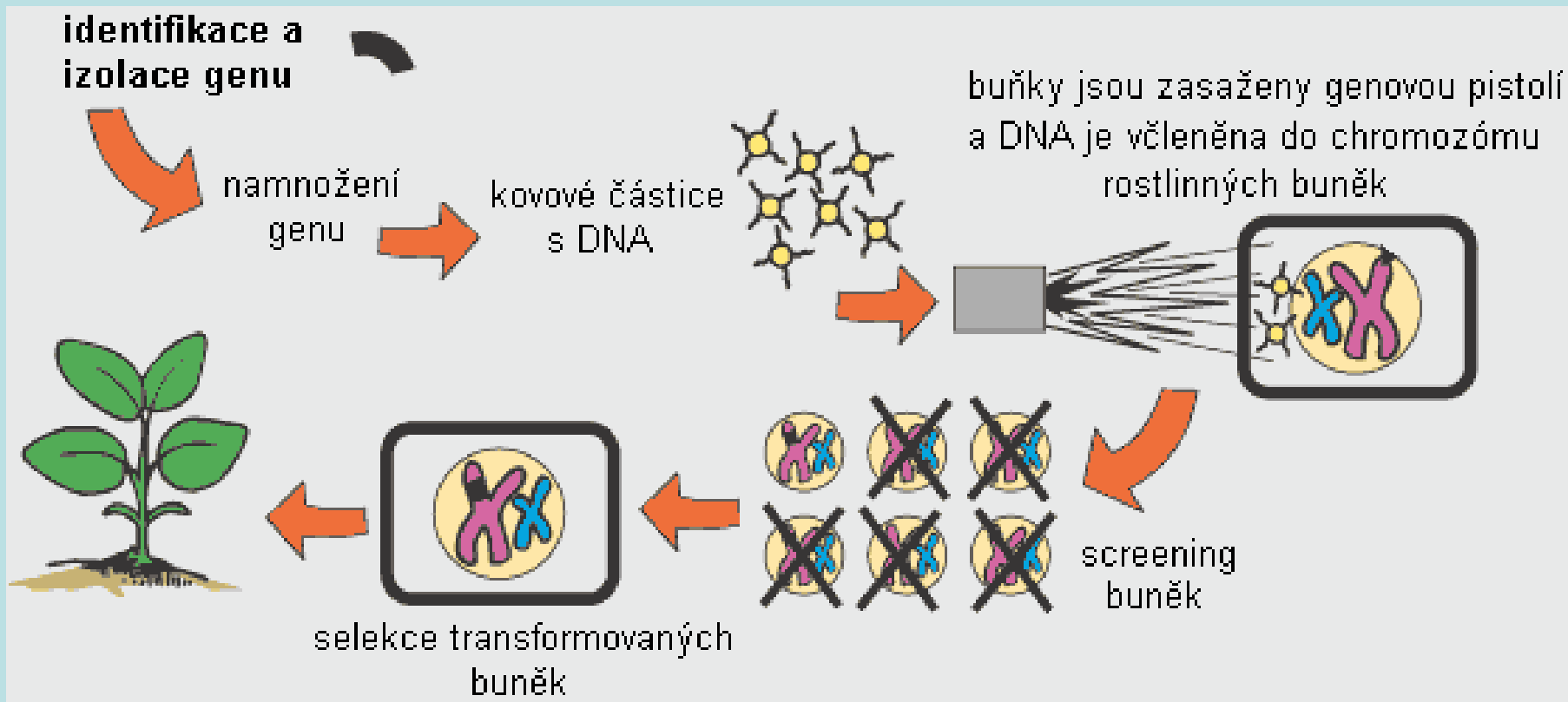
### a) přímé vnášení genů

- pomocí PVA nebo PEG
- elektroporace
- pomocí laseru
- mikroinjekce
- biolystická metoda

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



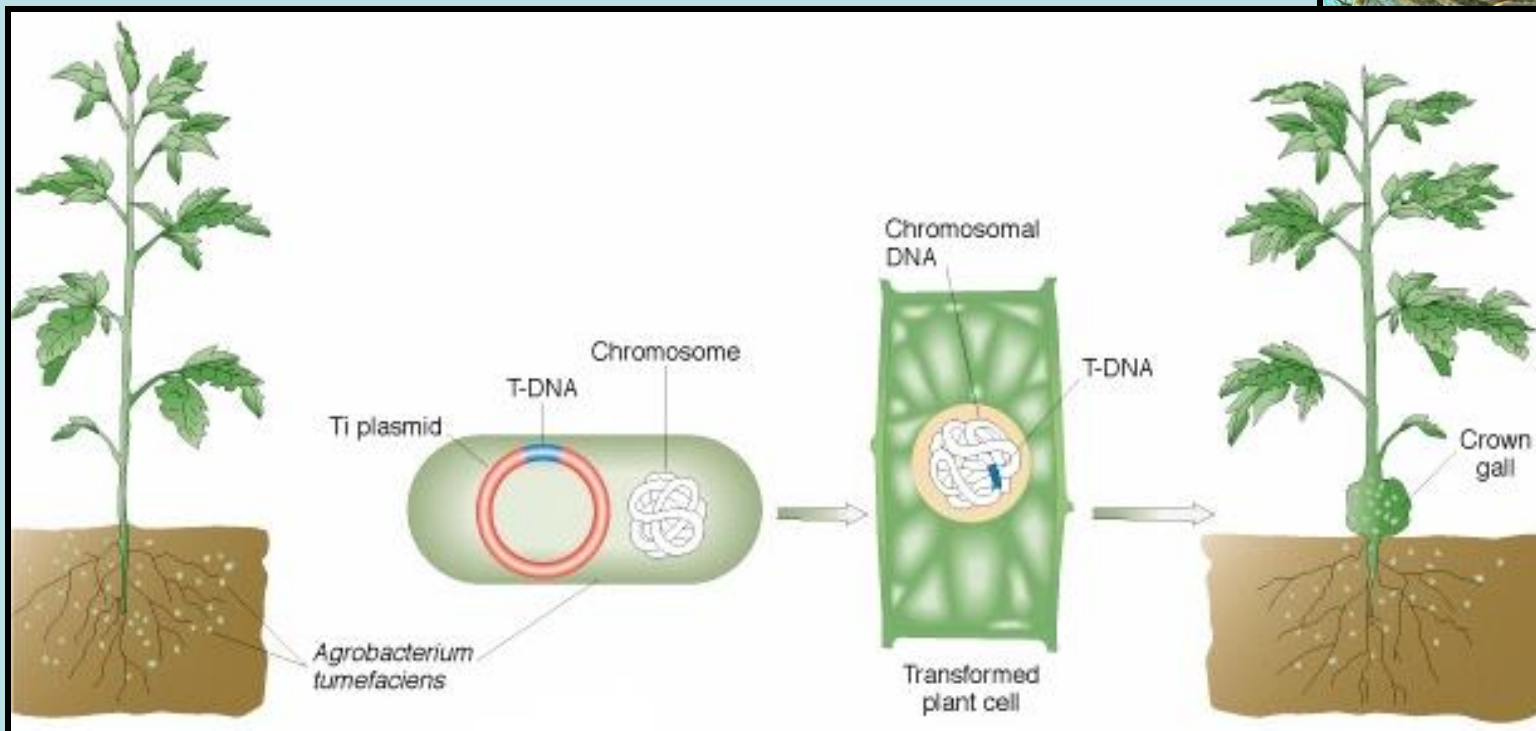
# Biolystická metoda

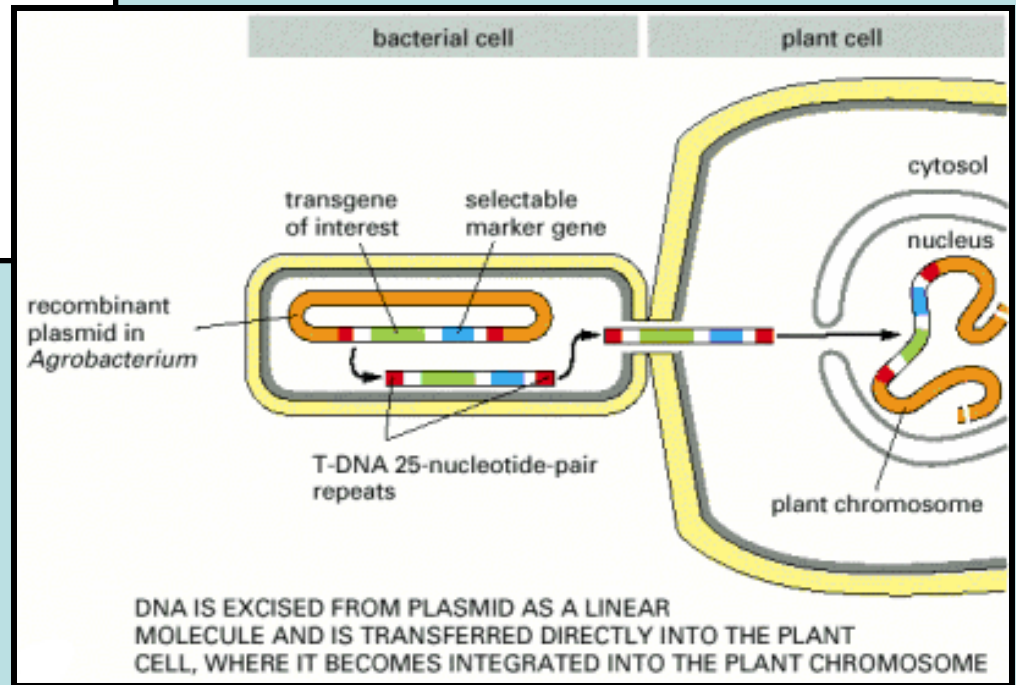
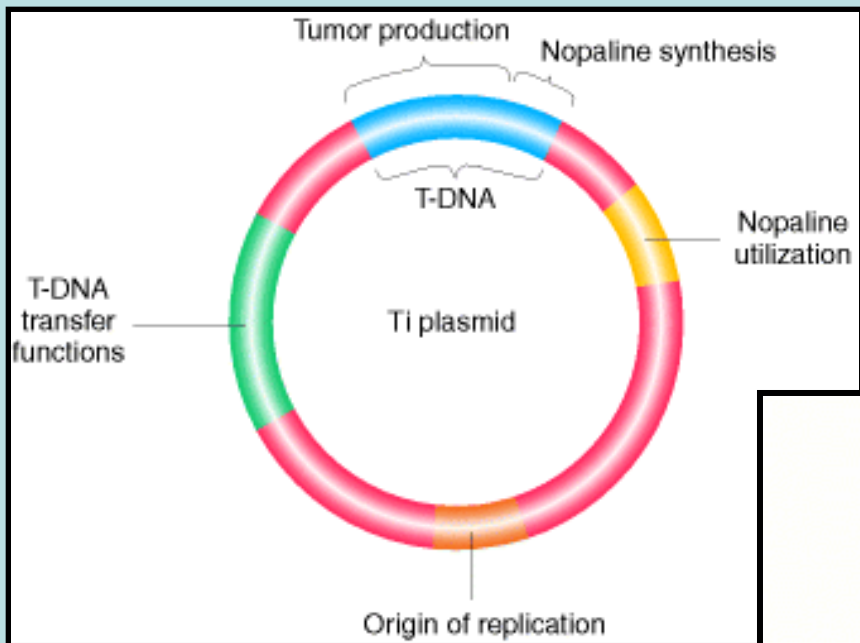


## b) nepřímé vnášení genů

*Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterim rhizogenes*

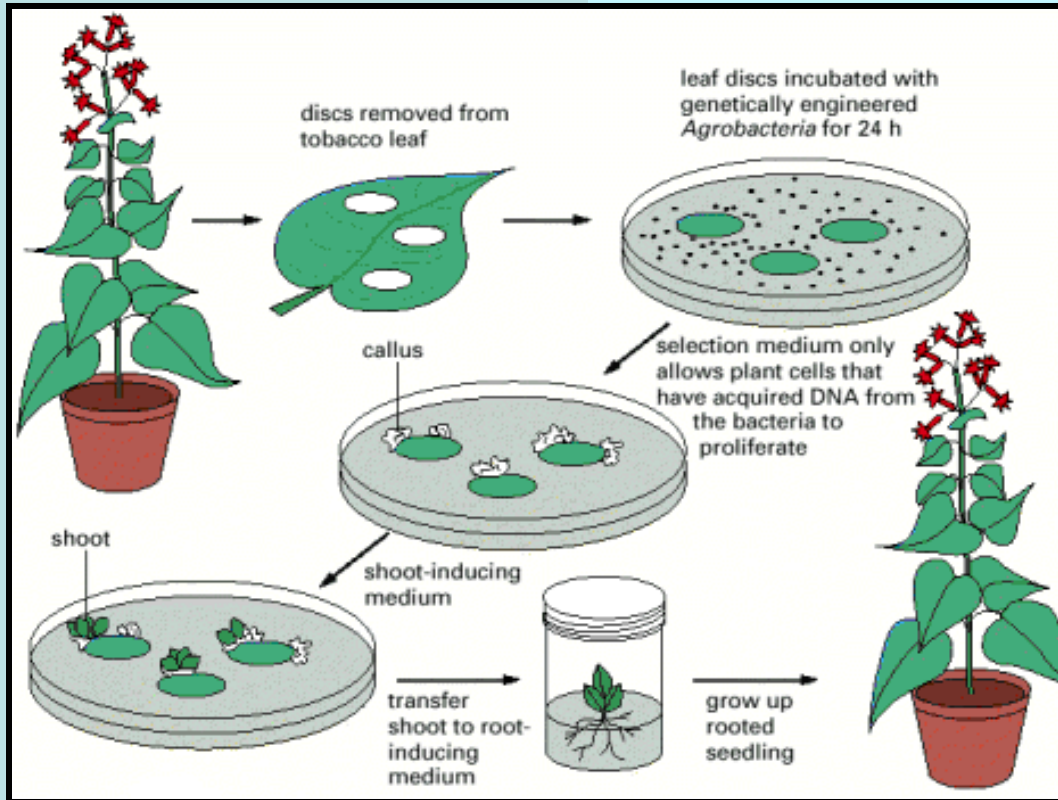
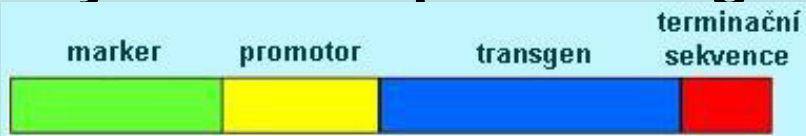




- geny způsobující vznik nádoru mohou být vyměněny za jakékoli jiné geny a přeneseny do rostlinné buňky



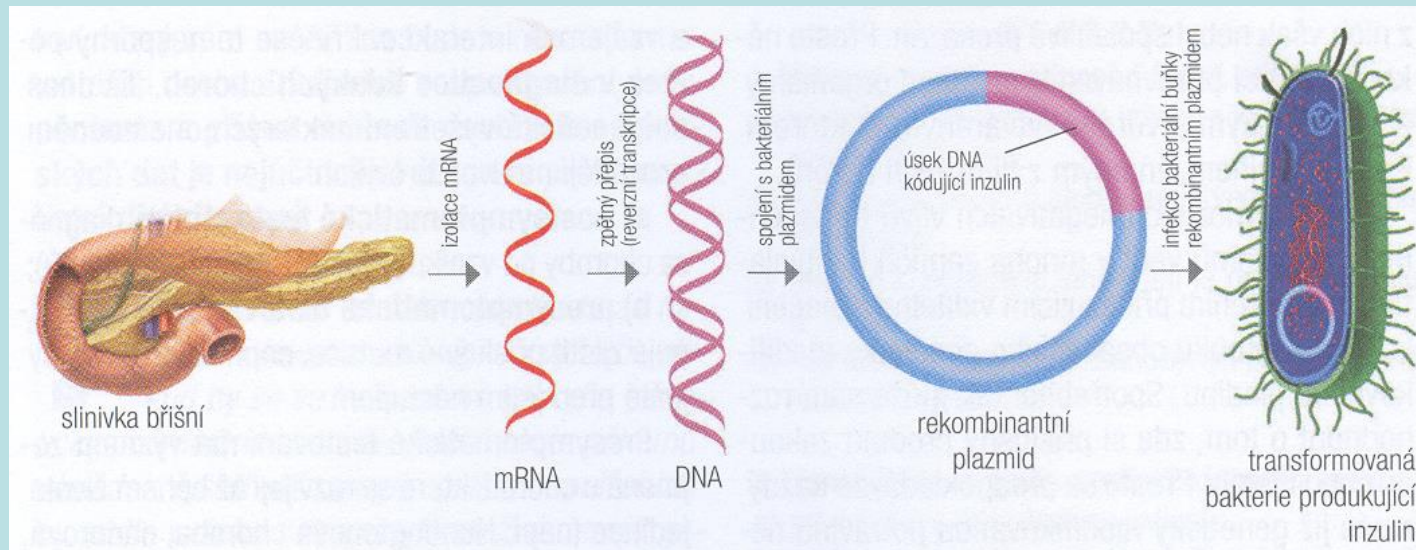
# selekce transformovaných buněk pomocí signálních znaků (markerů)



- regenerace rostlin in vitro
- molekulární důkaz přítomnosti genu
- testování transgenních rostlin

## 2.4.2.2 Využití genového inženýrství

### • výroba léčiv



- inzulín, lidský růstový hormon, srážlivý faktor, interferony atd.

## ● **průmysl kvasný, textilní**

- výroba aminokyselin, bílkovin, škrobu

## ● **životní prostředí:**

- likvidace ropných havárií, čištění odpadních vod ....

## • **pěstování zemědělských rostlin:**

- zlepšení technologických vlastností (odolnost herbicidům, houbovým a virovým chorobám, škůdcům, zvýšení nutriční hodnoty)
  - plodiny s rezistencí vůči herbicidům (sója, řepka, kukuřice, bavlník)
  - plodiny produkující bakteriální insekticidní toxiny (brambory, kukuřice)
  - plodiny s upraveným metabolismem cukru (brambory)
  - plodiny s prodlouženou trvanlivostí (rajčata)
  - plodiny s upraveným poměrem látek (rajčata, řepka)
  - plodiny se schopností asimilace vzdušného dusíku
  - rýže produkující betakaroten
  - peckoviny s odolností k viru šárky



## Nejvíce pěstované transgenní plodiny (2006)

Plodina	Plocha (mil. ha)	%
Sója – odolná k herbicidům	11	57
Kukuřice odolná k hmyzím škůdcům Bt)	11,1	11
Bavlník odolný k hmyzím škůdcům (Bt)	8,0	8
Kukuřice odolná k herbicidům	5,0	5
Kukuřice odolná k hmyzím škůdcům i herbicidům	9,0	9
Řepka odolná k herbicidům	4,8	5
Bavlník odolný k hmyzím škůdcům i herbicidům	4,1	4

## ● využití u lesních dřevin

- transgenoze úspěšnější u krytosemenných

*Juglans nigra*

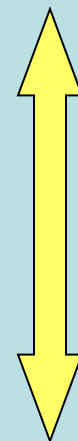
*Populus alba x grandidentata*

*Populus trichocarpa x deltoides*

*Populus alba x tremula*

*Malus pumila*

*Larix leptolepis*



regenerovány  
transgenní  
rostliny

- u nahosemenných docíleny transgenní projevy chloroplastů

# Znaky přenesené pomocí genového inženýrství u dřevin

## rezistence k hmyzu

TP (geny z *B. thuringiensis*)

TP (inhibitor proteinázy z brambor)

BŘ (inhibitor proteinázy ze sóje)

## rezistence k herbicidům

TP a MD rezistence ke glyfozátu (gen z mikroorg. *Salmonella*)

## zvýšení rhizogeneze

OŘ (gen z petunie)

## 2.4.2.3 Cíle genového inženýrství u dřevin

- **zvýšení produkce**
- **odolnost k vnějším stresům**
- **rezistence k herbicidům**
- **rezistence k houbovým patogenům**
- **rezistence k hmyzu**

Problémy: neznalost genomu

polygenní kontrola většiny znaků

délka života a hodnocení přenosu na potomstvo



## 2.4.2.4 Možné nežádoucí dopady

- **získaná rezistence škůdce (adaptace)**
- **zvýšený výskyt jiných škůdců**
- **snížení biodiversity**
- **kontaminace genofondu**

