

Mendelova genetika v příkladech

Transgenozе rostlin

Ing. Petra VESELÁ,

Ústav lesnické botaniky, dendrologie a geobiocenologie
LDF MENDELU Brno



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- Transgenoze rostlin

= vnášení jednotlivých klonovaných genů do genomu rostliny

Bakteriální genetika

- genetická informace:
 - bakteriální chromozom
 - plazmidy

Transformace rostlinných buněk

- pouze u rodu *Agrobacterium* prokázáno, že vnáší své specifické geny, lokalizované na Ti plazmidu do rostlinného genomu
- vnášený úsek T-DNA:
 1. geny pro nové cesty biosyntézy rostlinných hormonů - auxinů a cytokininů - nediferencované nádory (crown galls)
 2. geny pro syntézu nádorově specifických látek – opinů- zdroj uhlíku, dusíku a energie

Ti-plazmid *Agrobacterium tumefaciens*

- geny Ti plazmidu v interakci s chromozomálními lokusy → indukce nádorů
- Ti-plazmid má dva úseky nepostradatelné k indukci nádorů:
 1. T-DNA, vstupuje do rostlinných buněk, ale nenesení geny pro přenos a integraci
 2. úsek virulence, obsahuje geny nutné pro přenos T-DNA do rostlinných buněk

Úsek virulence plazmidu Ti

- geny úseku virulence zprostředkovávají oddělení T-DNA z plazmidu Ti a její přenos do rostlinných buněk
- úseku virulence, skládá se ze sedmi operonů:
 1. *virA*
 2. *virB*
 3. *virC*
 4. *virD*
 5. *virE*
 6. *virF*
 7. *virG*
- aktivita chromozomových genů virulence je nezbytnou podmínkou přenosu T-DNA do rostlinných buněk
- chromozomální geny virulence exprimovány konstitutivně; plazmidové geny *vir* exprimovány po indukci fenolickými látkami

T-DNA plazmidu Ti

- *Geny pro syntézu opinů*
- *Geny pro syntézu fytohormonů*
- *Hraniční sekvence T-DNA*
- hranice T-DNA tvoří silně konzervativní repetitivní sekvence 25bp se stejnou orientací na obou stranách T-DNA

Přenos T-DNA do genomu rostlinných buněk

- *Mechanismus excize T-DNA z plazmidu Ti v bakteriích A. tumefaciens*
 - důležitá zejména pravá hraniční sekvence , od níž začíná excize
 - hraniční sekvence 25 bp společně s úsekem virulence a chromozomálními geny, které se podílejí na virulenci, stačí k přenosu T-DNA
 - přenáší se lineární jednovláknová T-DNA (=T-vláknko)
- *Mechanismus integrace T-DNA do rostlinného genomu*
 - integrace T-DNA zprostředkována geny hostitele, které se za normálních podmínek uplatňují při syntéze DNA, rekombinaci a reparaci
 - integrace částečně závislá na proteinech, které jsou kódovány bakteriemi, i na rostlinných systémech reparace
 - integrace do počátků replikace rostlinné DNA, v S fázi buněčného cyklu
- v úseku spojení T-DNA a rostlinného genomu časté přestavby, delece, inserce rostlinné DNA
- integruje se jedna nebo několik kopií T-DNA

Vektory, mechanismy a metody transgenoze

Transgenoze prostřednictvím bakterií

Agrobacterium

- *Agrobacterium tumefaciens*:
 - půdní, patogenní bakterie
 - schopnost napadat pletiva většiny dvouděložných rostlin
 - napadení se projevuje tvorbou nádorů „crown-gall“

Transgenoze prostřednictvím bakterií

Agrobacterium

- pro využití bakterií *Agrobacterium* jako vektorů transgenů je třeba z T-DNA odstranit původní geny a nahradit je cílovými
- *Kointegrativní vektory*
 - jen malá frakce regenerujících pletiv transformovaných
- *Binární vektory*
 - plazmid Ti rozdělen na dva : jeden obsahuje úsek virulence, druhý obsahuje T-DNA a selektovatelný gen pro rezistenci k některému antibiotiku
 - plazmid již dostatečně malý, má vhodná restrikční místa

Transgenoze prostřednictvím bakterií

Agrobacterium

- Transgenoze rostlinných pletiv (*Arabidopsis thaliana*):
 - *Arabidopsis thaliana* představuje výjimku z faktu, že k transformaci bakteriemi *A. tumefaciens* je třeba použít metodu tkáňových kultur
 - floral dipping: namáčení květních meristémů *A. thaliana* suspenzí bakterií *A. tumefaciens* s vektorovými plazmidy nesoucími vhodné transgeny
- T-DNA včleněna do samičího gametofytu a přenesena přes vajíčko do následné generace
- k transformaci dochází až v průběhu vývoje květů, pravděpodobně při meióze nebo po ní

Přímá transgenoze prostřednictvím DNA

- **Transgenoze protoplastů**
 - buněčná stěna představuje bariéru průniku cizorodé DNA
 - potíže při regeneraci rostlin
- **Transgenoze buněk a pletiv**
 - mikroinjekce do buněčných jader
 - kokultivace mikrospor nebo pylových láček s exogenní DNA
 - mikroprojektily
 - zlaté nebo wolframové mikroprojektily smíchané s roztokem plazmidové DNA
 - do pletiv se kuličky vstřelují přístrojem, který dává impulzy
 - ve většině případů (95%) se mikroprojektil dostane jen do cytoplazmy, u zbývajících 5% buněk zasažených mikroprojektilem do buněčného jádra většina (98-99%) do 48h odumírá
 - aby došlo k integraci transgenů do genomu, je třeba, aby mikroprojektil pronikl do jádra a buňka zásah přežila

Rozdíl mezi přímou transgenozí a využitím bakterií *Agrobacterium*

- transgenoze systémem bakterií *Agrobacterium* je efektivnější
- transgenozí bakteriemi *Agrobacterium* lze využít pro většinu dvouděložných a některé jednoděložné a nahosemenné rostliny
- přímá transgenoze je účinná obecně, i když efektivita často nízká (použití zejm. u jednoděložných rostlin)
- přímá transformace umožňuje vnášet kratší úseky a vnášená DNA vykazuje více nepravidelností než při využití bakterií *Agrobacterium*
- u obou systémů dochází k integraci cizorodé DNA do náhodných míst rostlinného genomu (různý stupeň exprese až úplné potlačení exprese)

Stabilita přítomnosti transgenů

- zpravidla stejná jako ostatních unikátních sekvencí DNA v genomu
- projev však nemusí být vždy zcela stabilní (obvykle nižší stupeň exprese než v původním rostlinném hostiteli - vliv polohy v genomu)

Praktické příklady transgenoze rostlin

- δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis*
 - aktivovaný protein pro hmyz vysoce toxický, poměrně selektivní
 - δ -endotoxinový protein aktivován štěpením proteinázou v zažívacím ústrojí hmyzu
 - GM kukuřice odolná proti zavíječi kukuřičnému

Praktické příklady transgenozy rostlin

- Plodiny rezistentní k herbicidům
 - glyfosát (aktivní složka herbicidu), pro hmyz a živočichy netoxický
 - „Roundup Ready“ plodiny: rezistence ke glyfosátu
- Inhibice senescence listů
 - exprese genu *ipt* pod promotorem *Sag12* (exprimován v průběhu senescence)
 - listy zůstávají zelené a fotosynteticky aktivní

Praktické příklady transgenozy rostlin

- Inaktivace genu – antisense technologie
 - gen v obrácené orientaci, syntéza RNA reverzně komplementární k mRNA vytvořené normální verzí genu → hybridizace → degradace dsRNA
 - degradace ACO - redukce zrání plodů a senescence

Transgenní rostliny pěstované v ČR

- kukuřice MON 810 (firma Monsanto)
 - vložen gen pro Bt-toxin
 - odolnost proti zavíječi kukuřičnému
- „Roundup Ready“ plodiny
 - odolnost vůči glyfosátu (účinná látka herbicidu Roundup)
- **brambory Amflora**
 - zablokování syntézy amylozy (pomocí antisense RNA) ve prospěch amylopektinu
 - využití pro technické účely