

# ***Netradiční metody ve šlechtění rostlin***

Explantátové kultury  
DNA markery  
Genetické modifikace  
Genomické přístupy

## Explantátové kultury (*in vitro*)

---

Velké populace buněk  $10^5$  -  $10^6$ /ml

Kultivace za kontrolovaných podmínek

Regenerace rostlin cestou somatické  
embryogeneze

**Šlechtitelské biotechnologie - aplikace**

# Přehled aplikací

---

Meristémové kultury

Embryokultury

Somatická hybridizace = fúze protoplastů

rody *Solanum*, *Brassica* a *Cucumis*

PřF Univerzity Palackého v Olomouci,

VÚ bramborářský v Havlíčkově Brodě,

ÚEB AV ČR v Olomouci,

Jihočeská univerzita

Indukce haploidie ÚEB AV ČR, VÚRV Praha-Ruzyně, UPOL

Mutageneze *in vitro* selekce, izolace mutantních linií

Somaklonální variabilita

# DNA markery

---

## Rezistentní šlechtění

markery kosegregující se znakem odolnosti

### Pšenice

geny rezistence ke rzi, lokusy *Lr9*, *Lr24* a *Lr35*

### Ječmen

– gen *waxy*, charakter endospermu

– gen pro  $\beta$ -amylázu

– gen pro  $\alpha$ -amylázu

gen pro odolnost k viru BYDV

Pracoviště: VÚRV Praha-Ruzyně, Zemědělský VÚ  
Kroměříž

---

**Brambor** – geny rezistence k háďátku  
bramborovému a plísni bramborové  
(*Phytophthora infestans*), lokusy *H1*, *R1*

Pracoviště: VÚ bramborářský Havlíčkův Brod, AF  
ČZU

**Meruňka** – mapování a identifikace AFLP  
markeru vázaného s genem pro odolnost k viru  
šarky švestky

Pracoviště: VÚRV Praha-Ruzyně ve spolupráci  
s pracovištěm v USA.

# GMO zdroje

---

**BIOTRIN nezisková organizace ČR**

<http://www.biotrin.cz/>

**EU**

<http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu>



JOINT RESEARCH CENTRE

Deliberate Release and Placing on the EU Market of GMOs - GMO Register

# Genetické modifikace

---

## **Typy transgenů již využívaných nebo využitelných ve šlechtění rostlin**

Rezistence k herbicidům

Rezistence k virům

Rezistence k hmyzím škůdcům

Rezistence k bakteriálním a houbovým chorobám

Změny ve složení zásobních látek rostlin

Plody s prodlouženým dozráváním

Pylová sterilita

Modifikace barvy květu u okrasných druhů

Odolnost vůči abiotickým stresovým faktorům

Tvorba protilátek a rostlinných vakcín

Produkce biodegradovatelných polyesterů

Produkce farmakologicky využitelných vzácných proteinů transgenními rostlinami

Transgenní rostliny pro fytoremediaci

# Přehled znaků podle Joint Research Centre

- Altered lignin production
- Anti-allergy
- Antibiotic resistance
- Black Spot Bruise Tolerance
- Coleopteran insect resistance
- Delayed fruit softening
- Delayed ripening/senescence
- Drought stress tolerance
- Enhanced Photosynthesis/Yield
- Fertility restoration
- Glufosinate herbicide tolerance
- Glyphosate herbicide tolerance
- Isoxaflutole herbicide tolerance
- Lepidopteran insect resistance
- Male sterility
- Mannose metabolism
- Mesotrione Herbicide Tolerance
- Modified alpha amylase
- Modified amino acid
- Modified flower color
- Modified oil/fatty acid
- Modified starch/carbohydrate
- Multiple insect resistance
- Nicotine reduction
- Non-Browning Phenotype
- Nopaline synthesis
- Oxynil herbicide tolerance
- Phytase production
- Reduced Acrylamide Potential
- Sulfonylurea herbicide tolerance
- Viral disease resistance
- Visual marker



# Přehled GM plodin

<https://isaaa.org/gmapprovaldatabase/cropslist/default.asp>

- Alfalfa (*Medicago sativa*)
- Apple (*Malus x Domestica*)
- Argentine Canola (*Brassica napus*)
- Bean (*Phaseolus vulgaris*)
- Carnation (*Dianthus caryophyllus*)
- Chicory (*Cichorium intybus*)
- Cotton (*Gossypium hirsutum L.*)
- Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*)
- Eggplant (*Solanum melongena*)
- Flax (*Linum usitatissimum L.*)
- Maize (*Zea mays L.*)
- Melon (*Cucumis melo*)
- Papaya (*Carica papaya*)
- Petunia (*Petunia hybrida*)
- Plum (*Prunus domestica*)
- Polish canola (*Brassica rapa*)
- Poplar (*Populus sp.*)
- Potato (*Solanum tuberosum L.*)
- Rice (*Oryza sativa L.*)
- Rose (*Rosa hybrida*)
- Soybean (*Glycine max L.*)
- Squash (*Cucurbita pepo*)
- Sugar Beet (*Beta vulgaris*)
- Sugarcane (*Saccharum sp*)
- Sweet pepper (*Capsicum annum*)
- Tobacco (*Nicotiana tabacum L.*)
- Tomato (*Lycopersicon esculentum*)
- Wheat (*Triticum aestivum*)

# **Největší světové firmy – GM plodiny**

---

Monsanto

Syngenta

Pioneer High-Bred Agro

BASF

DuPont

Evropská komise - Registr povolených GM  
plodin, potravin a krmiv

[http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

## Genetické modifikace plodin - EU

	HT	Bt	Ht/Bt	VR	Bt/VR	F	C	E	P	Total
Alfalfa	3									3
Canola/oilseed rape	13					2				15
Carnations							13	1		14
Maize/corn	10	4	21			1				36
Cotton	8	4	8							20
Flax/linseed	1									1
Papayas				2						2
Potatoes		14			6					20
Rice	2									2
Rose							1			1
Soybeans	8		1			1				10
Sugar Beet	2									2
Tomatoes								1	1	2
Vegetable marrow				2						2
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>22</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>130</b>

# Experimentální pěstování v EU

[http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp\\_browse.aspx](http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_browse.aspx)

ČR

## 2015 Univerzita Palackého

**Cytokininy** - jsou zapojeny 1) do kontroly růstu a vývoje rostlin (kontrola buněčného dělení, růst nadzemních částí i kořenů, klíčení semen)

2) do reakcí na stresové podmínky (sucho, změna okolní teploty, zvýšená slanost půdy)

GM ječmen s geny **CKX1, 2** z *A. thaliana*

produkce **cytokinin dehydrogenázy** – enzym schopný odbourávat cytokininy

Kódující sekvence + kořenově spec. promotor z rýže nebo beta glukuronidázy (pEXP:CKX1, pEXP:CKX2, bGLU:CKX1, CKX1:RNAi)

Enzym se tvoří v kořenech, inhibice obsahu cytokininu a zvětšení kořenového systému, transgenní rostliny s mnohem hustšími a rozvinutějšími kořeny, lepší regenerace po působení stresu suchem

**Další cíl:** tkáňově specifická exprese proteinů, produkce konkrétní látky v konkrétním rostlinném pletivu. Např. antimikrobiální peptidy - slouží jako obrana proti bakteriím – produkované pouze v zrnech ječmene

# 2014 PŘF KU

## kukuřice NK603

odolnost k herbicidu glyfosátu, ke škůdcům

Kódující sekvence *CS4-cp4 epsps*, protein CP4 EPSPS protein

T5-nos 3' transcript termination sequence of the nopaline synthase (nos) coding sequence from *Agrobacterium tumefaciens* which terminates transcription and directs polyadenylation

P-e35S Promoter and leader for the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S RNA containing the duplicated enhancer region

I-Hsp70 Intron from the maize heat-shock protein 70 gene

TS-CTP2 DNA sequence coding for the N-terminal chloroplast transit peptide

CS-cp4 epsps l214p DNA sequence coding for the CP4 EPSPS

L214P protein

# 2011 UPOL

## Ječmen

phyA Gene, fungal 3-phytase z *Aspergillus niger*

### Phytase unit

phyA Gene, fungal 3-phytase from *Aspergillus niger*

$\alpha$ -amylase promoter, promoter region from *Hordeum vulgare* cv.

Himalaya synthase gene

### Selection unit

*bar* gene, phosphinothricin acetyltransferase coding region from *Streptomyces hygroscopicus*, herbicide resistance

ubi promoter, promoter region from *Zea mays* polyubiquitin gene

### Reporter unit

luc gene, reporter gene from the (*Photinus pyralis*) for detecting gene expression

ubi promoter, promoter region from *Zea mays* polyubiquitin gene

## 2010 výzkumná stanice Nechanice

Cukrová řepa, odolnost ke glyfosátu

# 2010 Agritec

## Hrách

Six types of modified peas

a) for resistance to fungal pathogenes or insect pests mediated by the insertion of a modified gene for serine protease inhibitor

(gmSPI-2) fused to uidA (GUS) reporter gene, gen *bar*

b) for resistance to fungal pathogenes or insect pests mediated by the insertion of a fused gmSPI-2 gene for serine protease inhibitor

s GFP reporter gene, bar gene

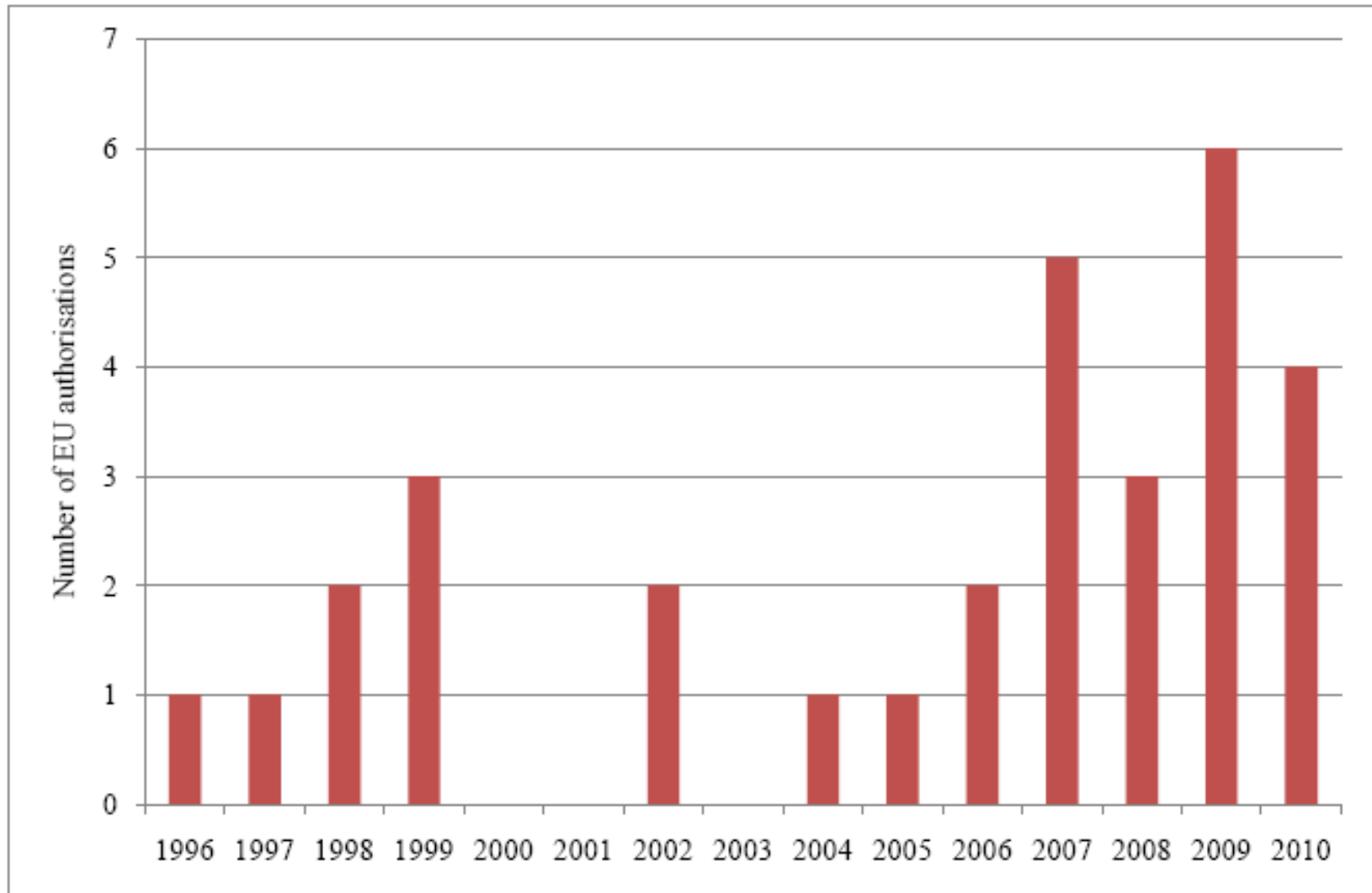
c) showing enhanced accumulation of seed proteins due to the insertion of plant Dof gene, nptII gene,

d) with earlier development of seed embryo caused by the insertion of plant L1L gene, with a selectable nptII marker gene,

e) for resistance to Pea Enation Mosaic Virus (PEMV) mediated by the insertion of a sequence coding for viral coat protein

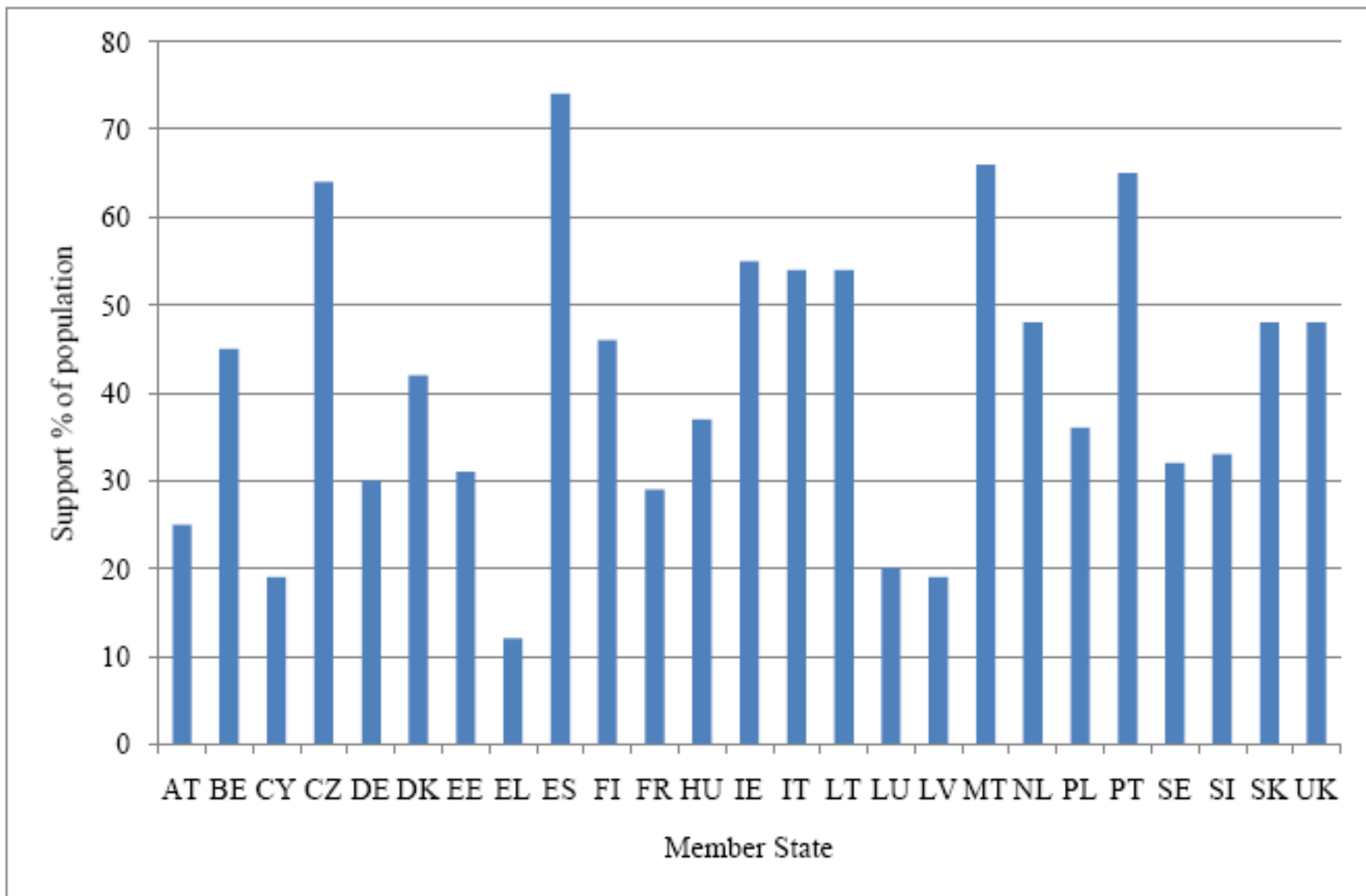
f) for resistance to Pea Seed-borne Mosaic Virus (PSbMV) mediated by the insertion of a sequence coding for viral coat protein

## Genetické modifikace autorizované v jednotlivých letech - EU





## Souhlasné stanovisko s genetickými modifikacemi v zemích EU



# Kukuřice

Struktura vlastností GM kukuřice v notifikacích podávaných dle směrnice 2001/18/EC, respektive dle části B směrnice, sestupně dle poměrného zastoupení (celkový počet notifikací ve sledovaném období - 387)

a) Tolerantní ke glyphosatu (např. hybridy – <a href="#">NK603</a> , <a href="#">GA21</a> , <a href="#">5394</a> , <a href="#">49712</a> )	24,2 %	g) Tolerantní ke glyphosatu + rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera + rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera (např. hybrid – <a href="#">MON88017xMON810</a> , <a href="#">MON89034xMON88017</a> )	4,6 %
b) Tolerantní ke glyphosatu + rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera (např. hybrid – <a href="#">NK603xMON810</a> , <a href="#">MON89034xNK603</a> )	12,7 %	h) Tolerantní ke glufosinatu + rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera + rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera (např. hybrid – <a href="#">1507x59122</a> , <a href="#">Bt11xMIR604</a> )	3,9 %
c) Tolerantní ke glufosinatu + rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera (např. hybridy – <a href="#">1507</a> , <a href="#">Bt11</a> )	11,7 %	i) Tolerantní ke glyphosatu + rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera (např. hybrid – <a href="#">MON88017</a> )	3,4 %
d) Tolerantní ke glyphosatu + tolerantní ke glufosinatu + rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera + rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera (např. hybrid – <a href="#">59122x1507xNK603</a> , <a href="#">Bt11xMIR604xGA21</a> , <a href="#">Bt11xMIR162xMIR604xGA21</a> , <a href="#">MON89034x1507xMON88017</a> , <a href="#">MON89034x1507xMON88017x59122</a> )	9,8 %	j) Tolerantní ke glyphosatu + tolerantní k sulfonylmočovinám (např. hybrid – <a href="#">MON98140</a> )	2,7 %
e) Tolerantní ke glufosinatu + tolerantní ke glyphosatu + rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera (např. hybrid – <a href="#">1507xNK603</a> , <a href="#">Bt11xGA21</a> )	8,3 %	k) Tolerantní ke glyphosatu + tolerantní ke glufosinatu + rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera (např. hybrid – <a href="#">59122xNK603</a> )	2,4 %
f) Tolerantní ke glufosinatu + rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera (např. hybrid – <a href="#">59122</a> , kříženci s A188)	4,9 %	l) Rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera (např. hybrid – <a href="#">MON89034</a> , <a href="#">MIR162</a> )	2,2 %

- m) Tolerantní ke glufosinatu  
+ tolerantní ke glyphosatu  
+ tolerantní k sulfonylmočovinám  
+ rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera  
+ rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera  
(např. hybrid – 98140x1507x59122) 2,0 %
- n) Tolerantní ke glufosinatu  
+ tolerantní ke glyphosatu  
+ tolerantní k sulfonylmočovinám  
+ rezistence k některým druhům z řádu Lepidoptera  
(např. hybrid – 98140x1507) 1,7 %
- o) Rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera  
(např. hybrid – [MIR604](#), [Syntéza inhibitoru proteináz](#)) 1,7 %
- p) [Zlepšená fotosyntetická výkonnost/odolnost k suchu](#) 1,2 %
- q) Tolerantní ke glufosinatu  
+ tolerantní ke glyphosatu  
+ tolerantní k sulfonylmočovinám  
+ rezistence k některým druhům z řádu Coleoptera  
(např. hybrid – 98140x59122) 0,7 %
- r) [Produkce žaludeční lipázy v kukuřičném zmu](#) 0,5 %

- s) [Modifikace doby kvetení/ranosti](#) 0,5 %
- t) [Modifikace biosyntézy ligninu](#) 0,2 %
- u) [Produkce monoklonálních protilátek](#) 0,2 %
- v) [Zvýšená asimilace dusíku](#) 0,2 %

# Brambory

Struktura vlastností GM brambor v notifikacích podávaných dle směrnice 2001/18/EC, respektive dle části B směrnice, sestupně dle poměrného zastoupení (celkový počet notifikací ve sledovaném období - 49)

a) Škrob se <u>sníženým obsahem/bez</u> amyulózy		32,7 %
+ tolerance k herbicidu (gen <i>ahas</i> )	17,3 %	
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	7,7 %	
+ bez specifického selekčního markeru	7,7 %	
b) Rezistentní k houbovým chorobám		26,8 %
+ tolerance k herbicidu (gen <i>ahas</i> )	21,1 %	
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	3,8 %	
+ bez specifického selekčního markeru	1,9 %	
c) Škrob se zvýšeným obsahem amyulózy		15,3 %
+ tolerance k herbicidu (gen <i>ahas</i> )	11,5 %	
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	3,8 %	
d) Zvýšený obsah škrobu		7,7 %
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	7,7 %	

e) Výnos bramborových hlíz		3,8 %
- modifikace počtu průduchů v listech + <i>nptII</i>	1,9 %	
- snížená aktivita apyrázy + <i>nptII</i>	1,9 %	
f) Brambory jako bioreaktory pro produkci speciálních proteinů/látek		3,8 %
- spider silk-elastin fusion protein + <i>nptII</i>	1,9 %	
- farmaceuticky využitelné látky, jedlé vakcíny + <i>nptII</i>	1,9 %	
g) Rezistentní k virům		1,9 %
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	1,9 %	
h) Zvýšený obsah škrobu a zvýšený výnos bramborových hlíz		1,9 %
+ rezistence ke kanamycinu a hygromycinu (gen <i>nptII</i> a <i>hpt</i> )	1,9 %	
i) Zvýšený metabolismus redukujících cukrů v hlízách bramboru		1,9 %
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	1,9 %	
j) Zvýšený obsah zeaxantinu v hlízách bramboru		1,9 %
+ rezistence ke kanamycinu (gen <i>nptII</i> )	1,9 %	
k) Zvýšená rezistence k patogenům, zvýšená antioxidační kapacita		1,9 %
+ rezistence ke kanamyc. a hygromycinu (gen <i>nptII</i> a <i>hpt</i> )	1,9 %	

# Řepka olejná - obnova fertility

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
<u>bar</u>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) enzyme	eliminates herbicidal activity of glufosinate (phosphinothricin) herbicides by acetylation
<u>barstar</u>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	barnase ribonuclease inhibitor	restores fertility by repressing the inhibitory effect of barnase on tapetum cells of the anther
<u>nptII</u> *	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection

# Řepka olejná - fytáza

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
<a href="#"><u>nptII</u></a> *	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
<a href="#"><u>phyA</u></a>	<i>Aspergillus niger</i> var. van Tieghem	3-phytase enzyme	increases the breakdown of plant phytates which bind phosphorus and makes the latter available to monogastric animals



# Vojtěška – snížený obsah ligninu

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
<a href="#"><u>ccomt (inverted repeat)</u></a>	Medicago sativa (alfalfa)	dsRNA that suppresses endogenous S-adenosyl-L-methionine: trans-caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase (CCOMT gene) RNA transcript levels via the RNA interference (RNAi) pathway	reduces content of guaiacyl (G) lignin
<a href="#"><u>nptII</u></a> *	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection



# Jabloň – méně PPO, proti hnědnutí

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
<a href="#">PGAS PPO suppression gene</a>	<i>Malus domestica</i>	double stranded RNA (dsRNA)	double stranded RNA (dsRNA) from the suppression transcript is processed into small interfering RNAs (siRNAs) that direct the cleavage of the target mRNA through sequence complementarity and suppresses PPO resulting in apples with a non-browning phenotype.
<a href="#">nptII</a> *	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection

## Evropská unie – **komerční využití**

---

- **Kukuřice** MON810 odolnost k hmyzímu škůdci zavíječi kukuřičnému
- **Brambory** Amflora, změna obsahu škrobu  
zpracovatelský průmysl, 2012 firma BASF pěstování v EU ukončila
- **Cukrová řepa** tolerantní k herbicidu a s odolností k patogenu rhizománii, 2010 pokusy zastaveny

# ČR

---

- Výzkumné projekty: slivoně, len, hrách, tabák
- Uzavřené nakládání i polní pokusy
- Pracoviště: Biologické centrum AV České Budějovice  
VÚRV Ruzyně, Praha  
ÚEB Praha  
Palackého univerzita Olomouc

# Využití

## Produkty ve fázi klinických testů

---

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

# Komerční produkty na trhu

---

<b>Produkt</b>		<b>Rostlina</b>
<b>Avidin</b>	Prodigene	kukuřice
<b><math>\beta</math>-glukuronidáza</b>	Prodigene	kukuřice
<b>Trypsin</b>	Prodigene	kukuřice
<b>Lidský laktoferin</b>	Meristem Therapeutics	kukuřice, rýže
<b>Lidský lysozym</b>	Ventria Bioscience	rýže
<b>Lipáza</b>	Meristem Therapeutics	kukuřice
<b><math>\alpha</math>-amyláza</b>	Syngenta	kukuřice, tabák

# Nové trendy

---

## Transgenoze vs. cisgenoze

Introdukce genů z příbuzných druhů, které jsou s recipientním druhem křížitelné

brambor *Solanum tuberosum*

*Solanum bulbocastaneum* donor rezistence k patogenu  
*Phytophthora infestans*

brambor – méně toxického akrylamidu

Komericializace USA, firma Simplot

jabloň – odolnost ke strupovitosti

ječmen – vyšší aktivita fytázy

# Transgen – intragen – cisgen

**Transgene** A transgene is a (synthetic) gene with some or all regulatory sequences and coding sequences from donors other than crossable plants, including micro-organisms and animals. These genes belong to a new gene pool for plant breeding

**Intrigene** An intrigene is a gene comprising of natural functional elements, such as coding part, promoter and terminator originating from different genes from the crop plant itself or from crossable species. All natural gene elements belong to the traditional breeders' gene pool

**Cisgene** A cisgene is an existing natural gene from the crop plant itself or from crossable species. It contains its native promoter and terminator. The gene belongs to the traditional breeders' gene pool and is the already existing result of natural evolution.

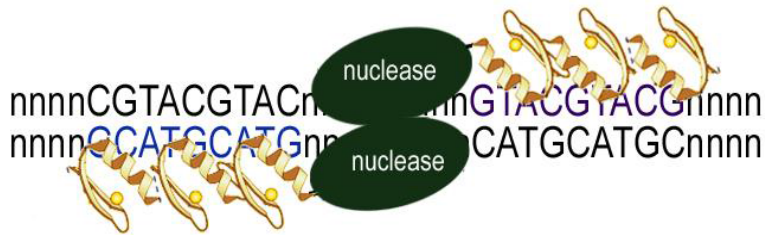
# Metody využívající cílené nukleázy

## **Tvorba inzerčních míst pro transgeny**

v definovaných místech rostlinného genomu

**Zinkové prsty ZFN-3** (Zinc Finger Nuclease-3 technique)  
= SDN-3 (site-directed nuclease 3)

A



ZFN-3 cílené začlenění transgenů  
(inzercí) homologní rekombinací  
Nukleáza - 2řetězcový zlom  
Genová kazeta několik kbp  
Vnesení transgenů, cisgenů

Využití proteinů ZF vyskytujících se u eukaryot.

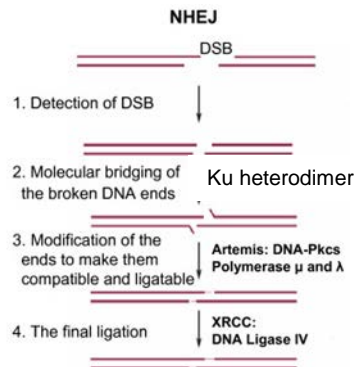
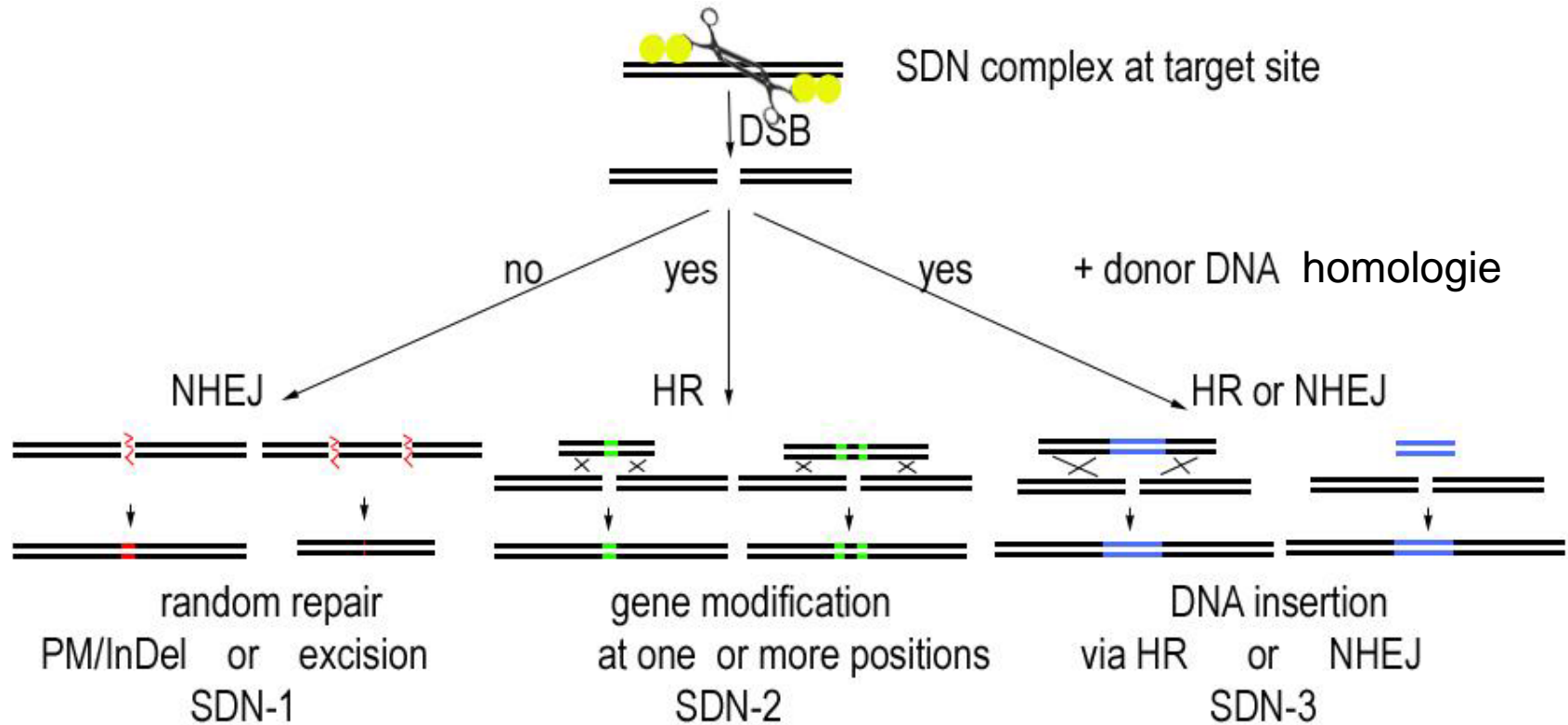
Fúze domén s 3-6 ZF repeticemi, každá rozpozná 3bp. Specificky navrženo pro cílové místo 9-18 nt.

**ZFN-1** náhodné mutace, jednonukleotidové záměny, In/Del v důsledku nehomologní reparace

**ZFN-2** cílené bodové mutace v důsledku homologní rekombinace



# Cílené nukleázy a reparace Site-directed nuclease (SDN)



DSB double-strand breaks  
NHEJ non-homologous end joining  
HR homologous recombination

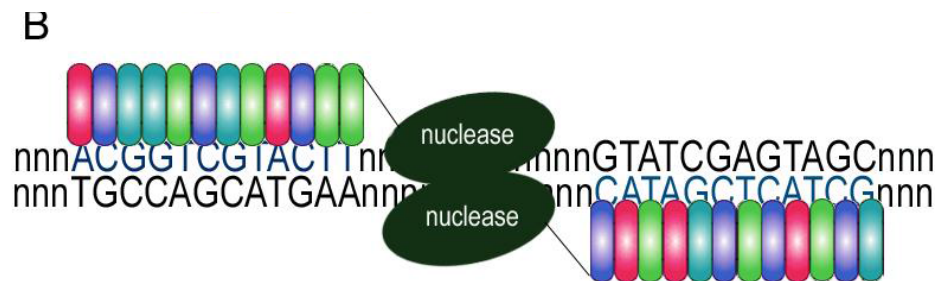
Techniky SDN-3 se z hlediska rizik vložených genů neliší od běžně používaných technik genetické modifikace.

Hlavní rozdíl mezi SDN-3 a transgenozí je, že DNA je vkládána na předem určenou oblast genomu, tudíž techniky SDN-3 jsou schopné minimalizovat nebezpečí spojené s narušením genů a/nebo regulačních sekvencí v genomu příjemce.

Techniky SDN-3 mohou způsobit nezáměrné změny v genomu přijímající rostliny, těchto změn bude méně než při použití mutagenese v konvenčním šlechtění.

## Taleny

Výrazné omezení nežádoucích efektů: specifitější cílení endonukleázy **FokI** (z *Flavobacterium okeanoikoites*) na konkrétní místo genomu (fúze specifických domén), i když při neznalosti sekvence celého genomu nelze ani při této technice vyloučit změny v sekvenci mimo zvolenou zásahovou oblast.



## TAL - transcription activator-like effector

technika využívající transkripční faktory produkované patogenem *Xanthomonas*.

Jsou injikované do rostl. buněk sekrečním systémem typu III bakterií, transport do jádra. Cílené na specifické elementy promotorů (pár reziduí, pozice 12 a 13), aktivace exprese rostl. genů.

funguje na principu SDN-3

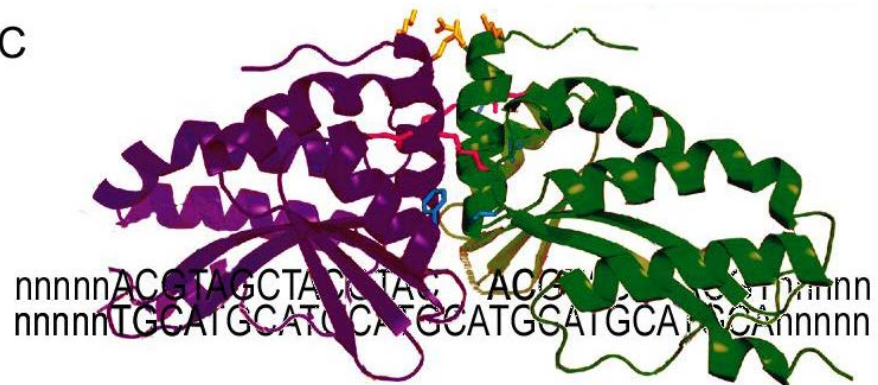
## Meganukleázy

Rozpoznávací místo 14 – 40 bp

I-SceI kvasinky

I-CreI *Chlamydomonas reinhardtii*

C



Cíl: vypracování technik tak, aby ve výsledku byla v genomu jen donorová DNA v cíleném místě.

## Introdukce do genomu

elektroporace protoplastů

biolostické metody

*A. tumefaciens* při kokultivaci v suspenzní kultuře, s protoplasty i listové disky

## Výsledky

kukuřice – snížení obsahu kyseliny fytové vyšší aktivitou fytázy

## Komericializace

kukuřice, odolnost k herbicidu (Dow AgroSciences, 2013)

# Nové trendy - **přehled**

---

- Cisgeneze a intrageneze
- Zinc Finger Nuclease Technology (ZFN) (ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3 )
- Oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM)
- Grafting - roubování
- Agro-infiltrace
- RNA-dependentní metylace DNA prostřednictvím RNAi/siRNA
- Reverzní šlechtění
- Syntetická biologie/genomika

# Oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM)

Do definovaného místa v genomu je začleněna specifická bodová mutace prostřednictvím syntetizovaného oligonukleotidu (DNA, RNA), který je homologní s cílovým genem.

Délka oligo 20 – 100 bp

Introdukce do buněk, oligo hybridizuje s cílovým místem, přirozené reparační mechanismy

Otestováno: tolerance k herbicidům, není potřeba bakteriální transgen pro necitlivost k herbicidu

Tabák, rýže, kukuřice

# Roubování

Na GM podnož je naroubován non-GM roub – žádné transgenní elementy nejsou v listech a plodech.

Studium mobility transgenů mezi podnoží a roubem.

Jabloň – menší růst, kvalita plodů neovlivněna. Transgen ani mRNA nebyly detekovány v roubu

Rajče, ořešák – gen pro siRNA, rezistence k infekci *Agrobacterium*

U ořešáku siRNA detekovány v jádrech plodů

Komericializace ořešák, vinná réva

# Agroinfiltrace

T-DNA *A. tumefaciens* je vnesena do rostliny bez začlenění do genomu, nedědí se. Dochází však k efektivní expresi transgenů.

Přechodná exprese genů plazmidu.

Metoda *floral dip*

Využívá se jako diagnostický nástroj.

Transientní expresí genů jsou testovány imunitní reakce, neznámé funkce genů pod řízením silných promotorů.

*Nicotiana benthamiana* – studium exprese proteinu VP2 infekční nefrózy drůbeže (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV).

Protein VP2 pro využití jako vakcína produkovaná rostlinami, navodí imunitu kuřat vůči viru.

Rychlý test funkčnosti vakcíny u brambor.



# RNA-dependentní metylace DNA **prostřednictvím RNAi/siRNA**

Začlenění DNA fragmentu - homologie s oblastí promotoru

Expresí vzniká dsRNA - štěpení na malé RNA  
sRNA metylace promotoru, což má za následek  
transkripční umlčení genu.

Výsledek

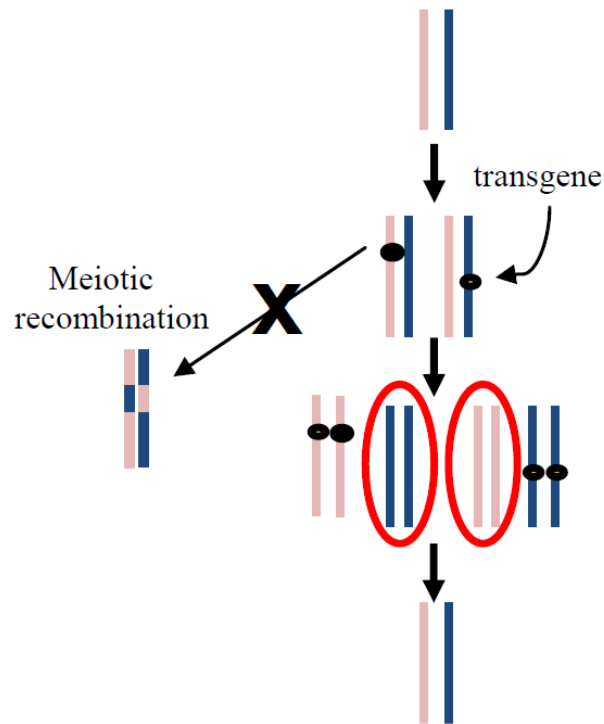
Kukuřice – umlčení genu pro fertilitu prostřednictvím  
methylace promotoru, sterilní rostliny

# Reverzní šlechtění pomocí dihaploidů

Tvorba homozygotních rodičovských rostlin parental z vybraných heterozygotů prostřednictvím suprese meiotické rekombinace pomocí RNA interference

Geny *dmc1*, *spo11*

Publikováno *A. thaliana*

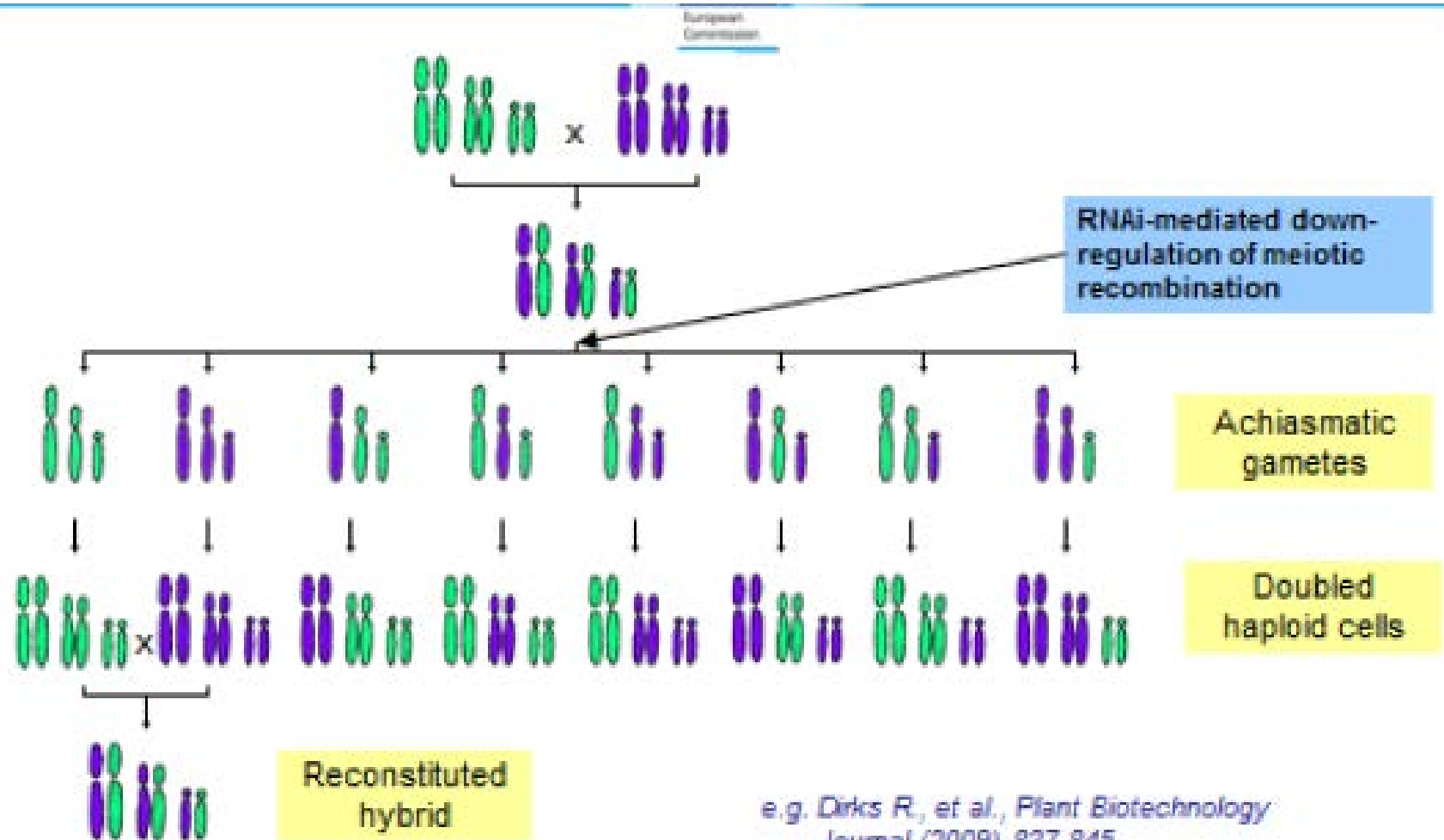


1. Original heterozygote – elite plant

2. Generate transgenic plants from this elite plant in which meiotic recombination is suppressed

3. Collect viable male or female spores from transgenic plants and generate double haploids (homozygous plants). Select double haploids that do not contain the transgene.

4. Cross non-transgenic double haploids to reconstitute the elite heterozygous plant.



e.g. Dirks R, et al., *Plant Biotechnology Journal* (2009) 837-845