Možnosti zvýšení tolerance plodin k abiotickému stresu pomocí nových šlechtitelských technik

Chrastava, 22. 6. 2022

Pavlína Smutná

MENDELU
Agronomická
fakulta

Šlechtitelské techniky používané k navození nové genetické variability

- Přirozená hybridizace → řízená hybridizace (Kölreuter, 1761) → vzdálená hybridizace (mezidruhová, mezirodová, pomocí laboratorních technik lze zkřížit nekompatibilní genotypy).
- Spontánní mutageneze → indukovaná mutageneze.
- Indukce polyploidů (stabilizace genomu, obnova fertility u vzdálených kříženců).
- Rostlinné explantáty (fúze protoplastů, somaklonální variabilita).
- Genetické transformace:
    - Transgenóze, intragenóze (vkládání sekvencí DNA získaných z jiného organismu do genomu hostitelského organismu, místo začlenění je náhodné).
    - Editační techniky – umožňují řízené navození změn genetické informace.

MENDELU
Agronomická
fakulta

Genetická modifikace – cílená změna, které bylo dosaženo vnesením cizorodého dědičného materiálu do dědičného materiálu organismu, nebo vynětím části genetického materiálu organismu.
(*Zákon č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty definuje GMO jako organismus, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací*).

Pinkglow® pineapple
(https://www.pinkglowpineapple.com/)

MENDELU
Agronomická
fakulta

1983 – první publikovaná zpráva o úspěšné genetické transformaci, přenos chimérického genu pro rezistenci ke kanamycinu pomocí Ti-plazmidu do buněk tabáku (M. Van Montagu, J.Schell).

1987 vytvořena GM odrůda rajčete (firma Calgene, USA) s prodlouženou trvanlivostí plodů indukovanou zpětným genem pro produkci enzymu polygalakturonázy, který rozkládá pektin v buněčných stěnách (prodloužení skladovatelnosti zralých plodů).

1994 – schválení GM rajčete Flavr Savr pro komerční využití v USA, prodej do roku 1997.

1996 – 1999 prodej rajčatového protlaku z GM plodů v UK.

1996 – na trhu osm transgenních plodin (kukuřice, řepka, bavlník, sója).

2006 – 11 transgeních plodin, 25 zemí, plocha cca 100 mil. ha.

2020 – transgenní plodiny na cca 190 mil. ha.

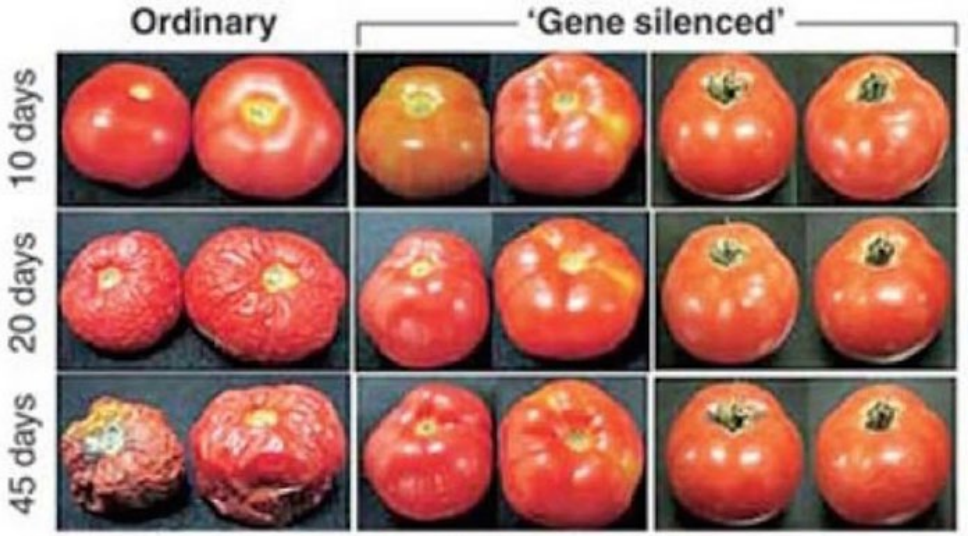


Image shows three sets of tomatoes. The ordinary control tomatoes (extreme left) soften and shrivel up, while texture of gene-silenced tomatoes remains intact for up to 45 days.

Photo credit: Asis Datta, Subhra Chakraborty, National Institute of Plant Genome Research, New Delhi

MENDELU
Agronomická
fakulta

Postup při genetické transformaci

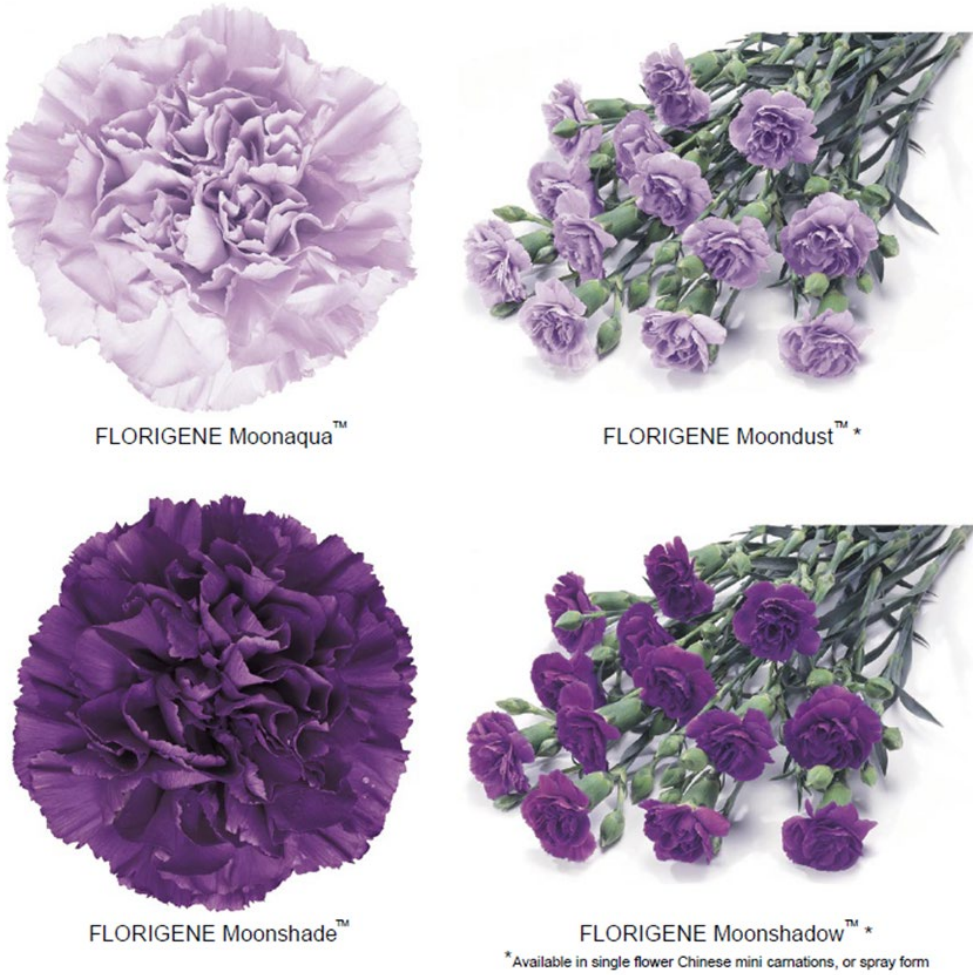
1. Izolace cílových genů a jejich klonování pomocí vektoru (plazmid).
2. Transformace rostlinných buněk – nepřímé metody s využitím bakterií rodu *Agrobacterium*. Pro transformaci se používají plazmidy, do kterých jsou vloženy cílové geny a geny pro selekci transformovaných buněk. Přímé metody využívají fyzikální postupy pro vnesení cizorodé DNA do buněčných jader.
3. Selekce buněk/rostlin s genetickou modifikací –markerové geny umožňují selekci transformovaných buněk, obvykle rezistence vůči antibiotikům, gen pro enzym metabolizující manózu, atd.
4. Regenerace transformovaných rostlin z vyselektovaných buněk, převod rostlin do nesterilního prostředí.
5. Kontrola funkčnosti a stability vneseného genu – generativní množení transgenní rostliny, sledování možných vedlejších efektů transgenóze na růst a vývoj rostliny.
6. Použití transgenního genotypu v klasickém šlechtitelském procesu – hybridizace s běžně pěstovanými odrůdami, selekce potomstev.

(*Roundup Ready sója, USA 2019*)

MENDELU
Agronomická
fakulta

Možné využití genetických transformací ve šlechtění rostlin

1. **tolerance k herbicidům** (sója, bavlník, kukuřice, řepka, cukrovka, vojtěška),
2. **rezistence vůči škůdcům** (kukuřice, bavlník, sója, lilek),
3. rezistence vůči chorobám (papája, cukrovka),
4. zlepšení nutriční kvality – škrob, vitamíny, snížený obsah antinutričních látek (rýže, brambory),
5. zlepšení technologické kvality (brambory, řepka, sója, jablka)
6. tolerance k abiotickým stresům (kukuřice – sucho),
7. navození pylové sterility (čekanka, řepka, kukuřice – hybridizační systém barnáza-Barstar),
8. okrasné rostliny – nové barvy květů, prodloužení doby kvetení.



(www.florigene.com)

Tolerance k glyfosátu

Byla získána vložením cp4 epsps sekvence z *Agrobacterium* ssp. pro syntézu modifikovaného enzymu EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntáza). Tento enzym je důležitý pro syntézu některých aminokyselin (fenylalanin, tryptofan). Modifikovaný enzym není glyfosátem inhibován.

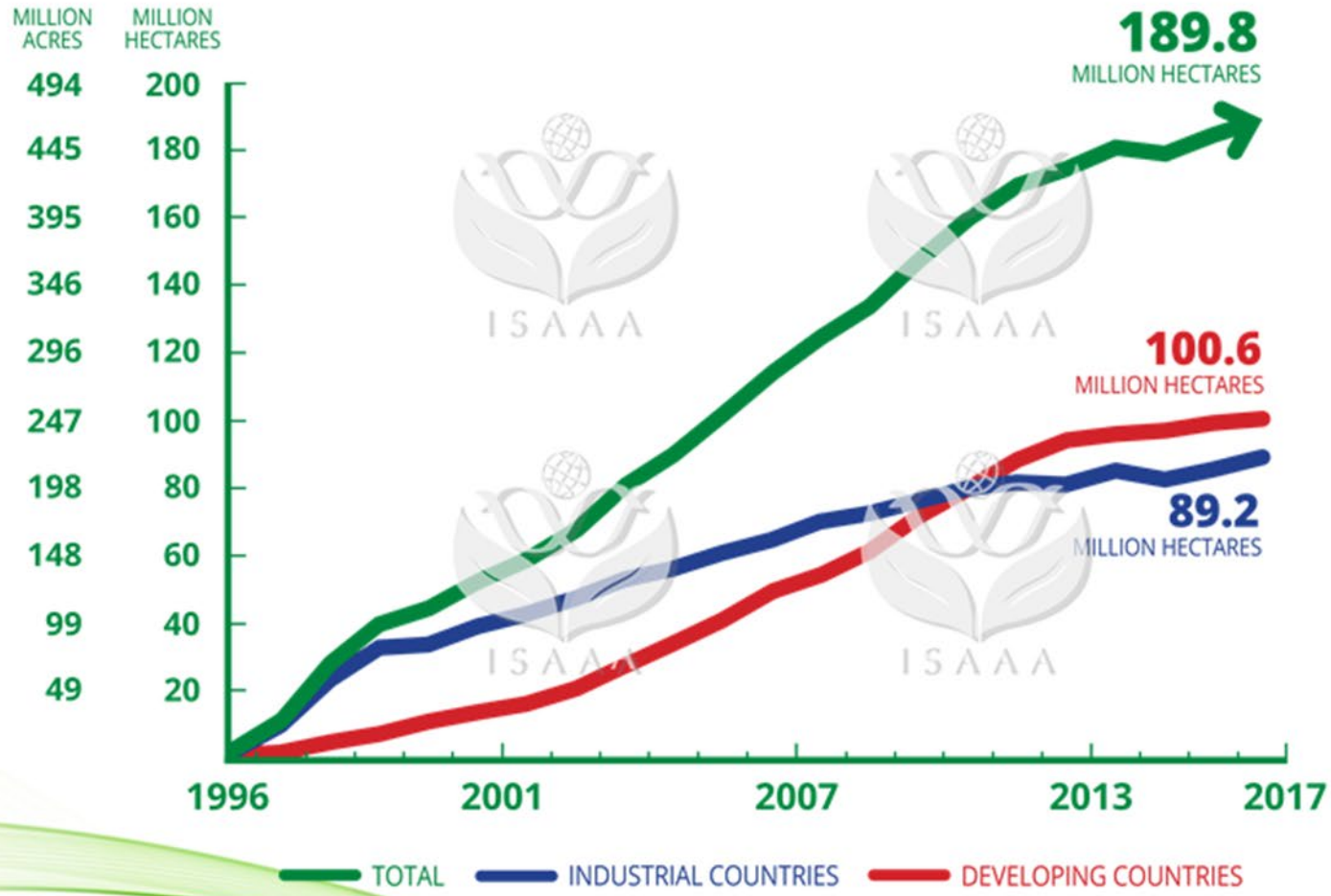
Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.

Roundup Ready řepka (1995 – Kanada; 1999 USA), sója (USA 1996), kukuřice, bavlna, cukrovka, vojtěška, *pšenice* a *čirok.*

Bt plodiny – obsahují *cry* geny z *Bacillus thuringiensis* pro syntézu Bt toxinu.
B. Thuringiensis – půdní bakterie, která při sporulaci tvoří v buňce specifické bílkoviny (Cry-proteiny). Cry-proteiny mají krystalickou formu a po pozření hmyzem se za určitých okolností rozpustí. Jejich rozpustnost je ovlivněná pH hodnotou trávicích šťáv. Rozpuštěná bílkovina se specificky navazuje na receptory buněk výstelky trávicí trubice, což vede k narušení buněčných membrán a následně k úhynu hmyzu.
Vysoká specifičnost toxicity je podmíněna specifičností reakce Cry-proteinu s receptory. Účinky jednotlivých genů pro Cry-proteiny jsou omezeny na úzkou skupinu hmyzu, např. *Cry1a* skupina – Lepidoptera; *Cry3* skupina – Coleoptera.

1902 – *B. thuringiensis* způsoboval úhyn housenek bource morušového v Japonsku,
1911 – izolován Bt toxin z moučných červů,
Od roku 1930 – komerční produkce preparátu Sporein (bioinsekticid)
1987 – Bt tabák s odolností vůči můře *Manduca sexta*
Od roku 1995 – komerční pěstování Bt plodin (kukuřice, bavlna, sója)
cry1Ab, cry 1AC, cry9C proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*)
cry3Bb proti bázlivci (*Diabrotica virgifera*)
cry1Ac proti škůdcům bavlníku (černopáska bavlníková).

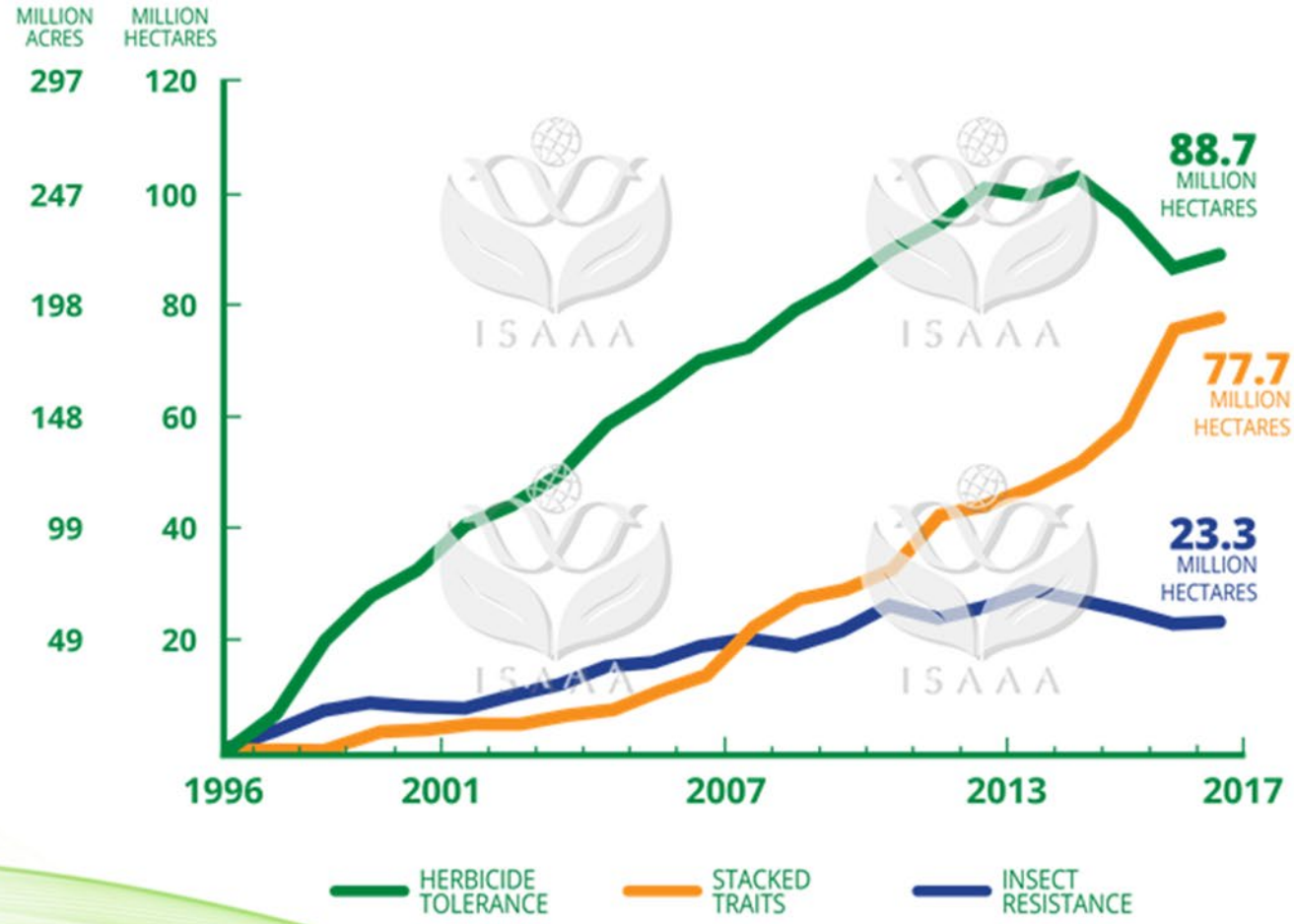
Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2017: Industrial and Developing Countries (Million Hectares, Million Acres)



ISAAA

MENDELU
Agronomická
fakulta

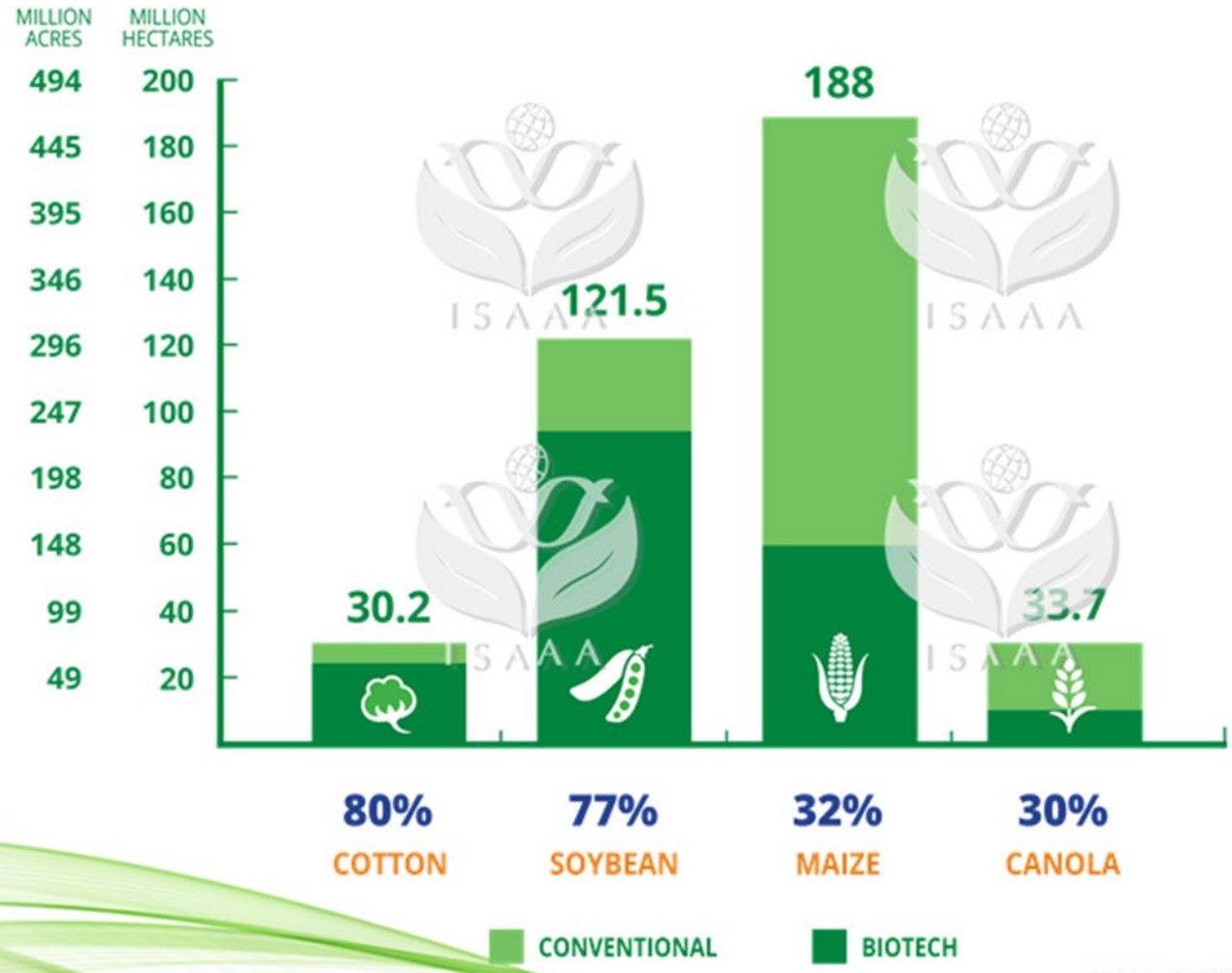
Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2017: By Trait (Million Hectares, Million Acres)



Tolerance k herbicidům (glyfosát, glufosinát, sulfonyl-močoviny)

Rezistence vůči hmyzu

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2017



ISAAA

MENDELU
Agronomická
fakulta

Po roce 2000 rozvoj dalších technik umožňujících navodit změny v genetické informaci organismu.

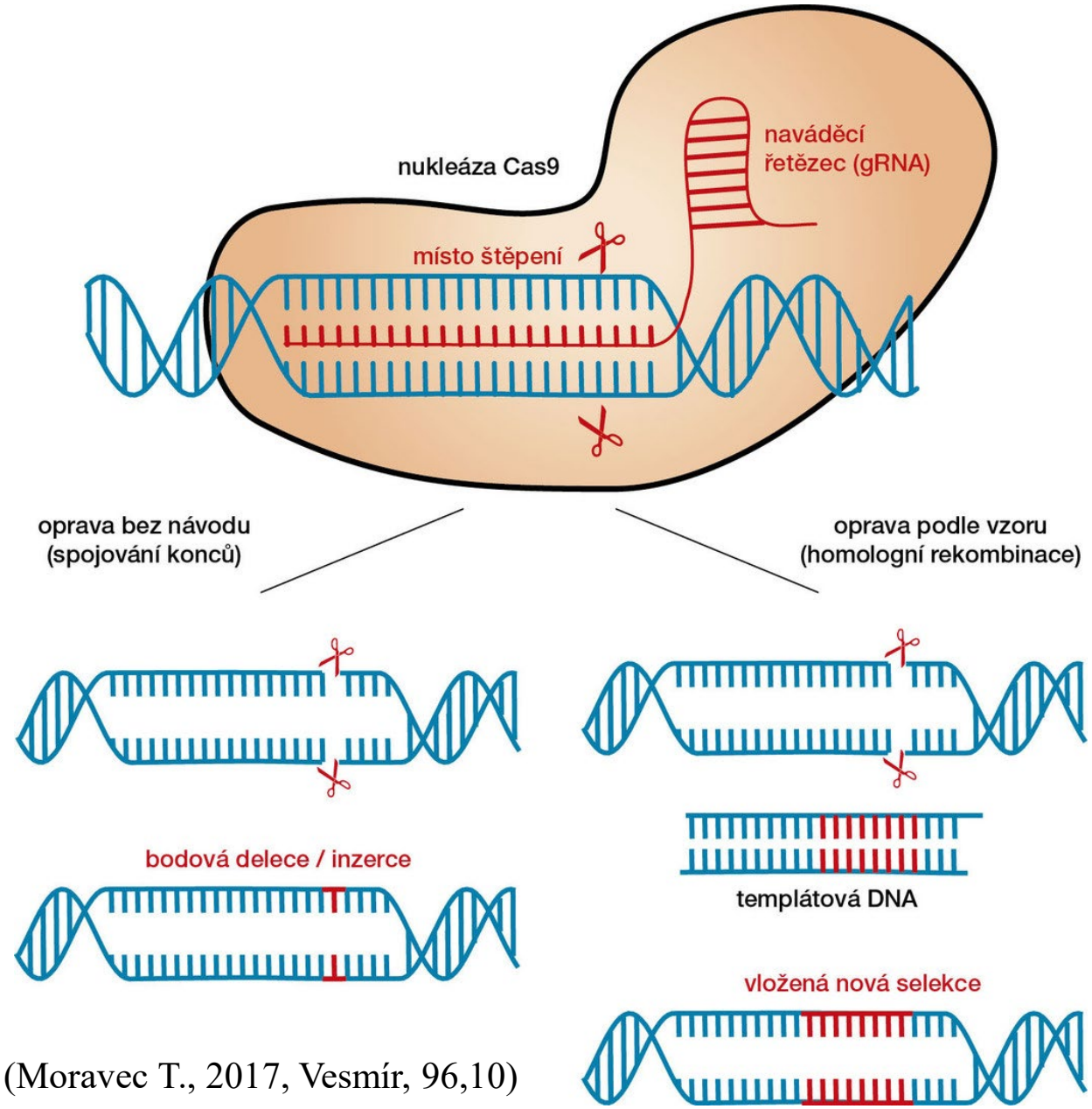
Nové šlechtitelské / genomické techniky (NBT; NGT):

- Techniky navozující rozštěpení DNA na specifickém místě → změny DNA na úrovni jednoho nebo více nukleotidů (odstranění, náhrada, vložení, přímé nebo s použitím DNA/RNA templátů). Výsledkem je dědičná změna funkce genu, která se projeví na fenotypu. Editace genomu pomocí nukleáz (meganukleázy, zinkové prsty, TALENs a CRISPR/Cas9), cílená mutageneze pomocí oligonukleotidů.
- Techniky navozující epigenetické změny → nepostihnou vlastní sekvenci DNA, ale ovlivní její transkripci (přepis) do RNA. Tyto změny jsou obvykle částečně dědičné (metylace DNA, změny v expresi genů, např. navození pylové sterility).
- Techniky zaměřené na změny RNA – krátkodobé, nedědičné.
- Agroinfiltrace (umělá infekce *Agrobacterium tumefaciens*, přenos transferové DNA z bakterie a její exprese, nedědičné změny).

CRISPR/Cas

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) jsou úseky bakteriální DNA obsahující krátké repetice nukleotidů, které slouží pro vytvoření specifických RNA. Tyto RNA jsou schopné vyhledat DNA bakteriofágů a pomocí specifických enzymů (nukleáza Cas9) ji rozštěpí a tím zneškodní (přirozený způsob obrany bakterií proti bakteriofágům).

Po úpravě lze CRISPR / Cas systém společně s doprovodnými RNA použít pro štěpení DNA v konkrétním místě a její editaci – cílené změny, opravy defektních sekvencí, vkládání nových úseků.



(Moravec T., 2017, Vesmír, 96,10)

NBT

- Nové techniky šlechtění se od sebe navzájem významně liší, netvoří homogenní skupinu.
- Přesnost a kontrola navození změn je větší než u běžného šlechtění nebo transgenoze, u některých nedochází ke vložení cizorodé DNA.
- Zásahy do DNA pomocí NBT jsou na rozdíl od transgenoze obtížně detekovatelné, nemusí být odlišné od indukované mutageneze.

Příklady komerčních produktů vytvořených pomocí NBT

Jablka (RNAi)
- nehnědnoucí plody (Arctic® apples – prodej rozkrájených jablek).

Brambory (TALENS)
- snížený obsah rozpustných cukrů v hlíze, vyšší kvalita, lepší skladovatelnost,

Sója (TALENS)
- zvýšení nutriční kvality oleje, více kys. olejové, bez trans-nasycených mastných kyselin.

Žampiony (CRISPR/Cas)
- vyřazení genu pro polyfenol oxidázu – nehnědnoucí plodnice, delší skladovatelnost.

USA

GMO produkty jsou posuzovány z hlediska bezpečnosti pro pěstování, životní prostředí a zdraví člověka při konzumaci, hodnotí se konkrétní vlastnosti (např. Bt plodiny se posuzují podobně jako insekticidy). Schvalovací proces je obvykle ukončen do dvou let.
Pokud se neprokáže škodlivost, produkty se mohou používat bez omezení. Od roku 2022 musí být potraviny pocházející z transgenních organismů označovány logem, které upozorňuje, že byl použitý materiál získaný biotechnologiemi.

Stejný přístup k produktům NBT, ty bez vložené cizorodé DNA jsou bez legislativních omezení.

Evropská unie

V Evropě hodnocení rizika zahrnuje posouzení možných přímých i nepřímých škodlivých účinků GM produktů na zdraví člověka a zvířat, na životní prostředí a biologickou rozmanitost.

Je uplatňován přístup předběžné opatrnosti. Neposuzují se pouze vlastnosti produktu, ale také metody použité pro získání modifikace. Na základě vědeckého stanoviska Evropská komise vypracuje návrh, který předkládá členským státům k hlasování.

Schválení jen pro dovoz a zpracování, nebo pro pěstování (výrazně náročnější a dražší). Schvalovací proces trvá 6 a více let. Zákazy pěstování povolených GM na národní úrovni.

Požadavky na dohledatelnost původu a označování schválených GM produktů napříč potravinovým řetězcem. V případě pěstování musí držitel provádět monitoring vlivu GM plodin na životní prostředí.

V roce 2018 Evropská komise rozhodla, že Směrnice 2001/18/ ES o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí se týká také organismů získaných novými šlechtitelskými technikami (NBT/NGT).
Ty, které se používaly před platností směrnice, tj. indukovaná mutageneze zářením nebo chemikáliemi a buněčná fúze, byly vyjmuty.

Stávající legislativní pravidla nejsou vyhovující, připravuje se novelizace.
Požadavky na posuzování vlastností produktu, ne způsobu, jakým byl vytvořen.
Genotypy, které nenesou cizorodý genetický materiál by neměly být považovány za GM.

Problémy s detekcí modifikací, spolehlivě lze detekovat pouze známé mutace.
Použití sekvencováni, případně metabolické a proteomické metody.

Rizika pěstování GM plodin

- „únik“ transgenů – riziko přenosu genů v rámci plodiny, mezi plodinami, mezi plodinou a planými nebo plevelnými druhy, vliv na ekosystém,
- neočekávaný pleiotropní efekt transgenů, vznik neočekávaných toxických nebo alergenních produktů,
- vyšší závislost zemědělců na šlechtitelských/semenářských firmách,
- organizační/administrativní náročnost, možnost kontaminace klasických produktů,
- nedůvěra spotřebitelů, problémy s odbytem.

Přínosy pěstování GM plodin

- jednodušší a levnější technologie pěstování,
- snížení vlivu na životní prostředí,
- produkce potravin s vyšší nutriční hodnotou,
- *produkce průmyslových surovin, léků, vakcín…*

Přínosy pro šlechtění – nové vlastnosti nezískatelné konvenčními postupy.

MENDELU
Agronomická
fakulta

Abiotické stresové faktory:

- nedostatek/nadbytek vláhy,
- nízká/vysoká teplota,
- nevhodné pH půdy,
- nedostatek živin,
- zasolení půdy,
- vyšší koncentrace toxických prvků v půdě.

Zvyšování tolerance rostlin pomocí NBT

1. Studium fyziologických a biochemických procesů u rostlin vystavených stresu.
2. Identifikace kandidátních genů a transkripčních faktorů zapojených do stresové reakce.
3. Modifikace těchto genů s cílem zvýšit toleranci rostlin.
4. Hodnocení modifikovaných rostlin.

Tolerance k suchu

1. Omezení dehydratace – schopnost rostliny udržet vysokou úroveň hydratace pletiv v podmínkách stresu suchem, a to zvýšením příjmu vody kořeny nebo snížením výdeje. Transpirace může být krátkodobě redukována pomocí uzavírání průduchů nebo dlouhodoběji omezením růstu rostliny.

2. Schopnost tolerovat dehydrataci v podmínkách silného stresu souvisí se schopností udržet turgor lepší osmoregulací, nebo ochránit buněčné stěny a membrány před poškozením akumulací ochranných proteinů, cukrů a antioxidačních látek.

Potenciálně použitelné transgeny

Osmoprotektanty

Gen SacB z *Bacillus subtillis* kódující enzym levansukrázu, který podmiňuje syntézu a akumulaci fruktanů – rozpustné polysacharidy se schopností depolymerace a opětné polymerace.

Bakteriální gen pro cholindehydrogenasu produkuje enzym indukující syntézu glycin betainu (třtina).

Zvýšení syntézy prolinu (citrusy).

Antioxidanty

Omezení oxidativního stresu pomocí látek odstraňujících kyslíkové radikály. Např. superoxiddizmutáza (vojtěška).

Ochrana buněčných membrán

Geny navozující změny ve složení lipidů, udržení semipermeabilní funkce, nižší ztráty vody.

Komerční využití:

Kukuřice Genuity@Drought Guard – vložený gen z *B. subtilis*, ochrana stability RNA a procesu translace během stresu suchem. Povoleno pro pěstování v USA, Kanadě a Japonsku, dovoz do EU.

Sója Verdeca – přenos genu pro transkripční faktor Hahb-4 ze slunečnice, regulace dehydratace. Povoleno pro pěstování v USA, Argentině a Brazílii.

Třtina – zvýšení syntézy glycin betainu, zatím bez komerčního využití.

Děkuji za pozornost

Veřejná konzultace EK k novým technikám ve šlechtění
Legislation for plants produced by certain new genomic techniques (29 April – 22 July 2022)

https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13119-Legislation-for-plants-produced-by-certain-new-genomic-techniques/public-consultation_en

MENDELU
Agronomická
fakulta