

F2 Podrobný opis aktivity	
Číslo a názov aktivity	3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách
Názov špecifického cieľa	3. Vybudovanie pracoviska komplexného výskumného, inovačného a kompetenčného regionálneho centra na ÚGBR SAV v Nitre
Cieľ aktivity	Aktivita bude riešená v rámci dvoch cieľov a to: A. Vytvorenie materiálno-technickej bázy pre aplikovaný výskum v oblasti rastlinných biotechnológií B. Realizácia aplikovaného výskumu v oblasti rastlinných biotechnológií
Termín realizácie aktivity	04/2013- 06/2015
Opis aktivity	<p>Doteraz publikované výsledky a poznatky potvrdzujú dôležitosť a význam aplikácie biotechnologických metód pre rýchlu produkciu atraktívnych a hospodársky cenných druhov poľnohospodárskych plodín. Prednosťou aplikovaných techník <i>in vitro</i> je možnosť získať z malého množstva východzieho materiálu značne množstvo bezvírusových a geneticky uniformných rastlín. K ďalším výhodám patrí možnosť dlhodobého uskladnenia a uchovania vyselektovaných genotypov v kultúre <i>in vitro</i>, ako aj možnosť transportu kultúr <i>in vitro</i> do zahraničia bez zdĺhavého overenia a pod. Techniky <i>in vitro</i> umožňujú urýchliť proces klíčenia semien, otestovať ich fertilitu priamym vysiatiím na kultivačné médium a zabezpečiť efektívnu reprodukciu, napr. hybridov alebo cenných genotypov využiteľných v šľachtiteľskom procese. Výhodou je aj možnosť imitácie rôznych stresových faktorov v podmienkach <i>in vitro</i> za účelom testovania reakcie vybraných druhov na stres a ich selekcie. Získanie dostatočného množstva otestovaného zdravého sadbového materiálu by obmedzilo dovoz zo zahraničia a umožnilo založenie produkčných výsadiel na Slovensku.</p> <p>Účelom vybudovania pracoviska komplexného výskumného, inovačného a kompetenčného regionálneho centra na SPU v Nitre pri ÚGBR SAV je vytvorenie podmienok pre zvyšovanie miery spolupráce ÚGBR SAV so spoločenskou a hospodárskou praxou prostredníctvom prenosu poznatkov a technológií z oblasti biotechnológií a genetiky rastlín a ich uplatnenia v poľnohospodárskej produkcii a v šľachtení. Riešenie aktivity bude zamerané na dosiahnutie dvoch cieľov:</p> <p>A. Vytvorenie materiálno-technickej bázy pre aplikovaný výskum v oblasti rastlinných biotechnológií. B. Aplikovaný výskum v oblasti rastlinných biotechnológií</p> <p>A. <u>Vytvorenie materiálno-technickej bázy</u> V rámci cieľu A budú vybudované dve laboratóriá, a to:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Laboratórium molekulárneho šľachtenia rastlín (LMŠR) – miestnosť č. C 1084 – toto laboratórium bude novo zriadené. 2) Laboratóriá reprodukčnej a vývinovej biológie (LRVB) – miestnosti č. C 2064, C 2065, kultivačné miestnosti C 78, C

1101, A 54b1, A 54b2.

Zariadenie obsahuje výmenu pevne zabudovaného laboratórneho vybavenia a príslušenstva pozostávajúceho z digestorov, ktoré slúžia na bezpečnú prácu s prchavými, dráždivými a horľavými látkami a sú vybavené nábehovými hranami slúžiacimi na úspornú prevádzku v pracovnom priestore digestora. Laboratória budú vytvárať vhodné pracovné prostredie pre výskum.

Laboratórne vybavenie a príslušenstvo pre kultiváciu rastlín pozostáva z regálového systému, klimatizácie a regulovaného multifunkčného osvetlenia pre jednotlivé úseky, oddelenia zabezpečujúce kultiváciu rastlín pri definovanej vlnovej dĺžke a regulovanej teplote.

Vstupy: Vstupom bude existujúca technická a personálna infraštruktúra, ktorou disponuje ÚGBR SAV a prístroje a zariadenia zakúpené v rámci aktivity tohto projektu.

Metóda: Laboratória budú zriadené na základe doteraz existujúcich laboratórií a pracovných tímov. Aktivity laboratórií budú stavať na doteraz získaných výsledkoch a skúsenostiach. Koordinácia aktivít výskumných tímov bude však značne posilnená a orientácia výskumu bude nasmerovaná na aplikáciu výsledkov výskumu v poľnohospodárskej, šľachtiteľskej a pestovateľskej praxi. Prenos výsledkov výskumu do praxe bude zabezpečený v tesnej spolupráci s AgroBioTech Transfer centrom.

Výstupy:

1. Laboratórium molekulárneho šľachtenia rastlín (LMŠR)
2. Laboratóriá reprodukčnej a vývinovej biológie

B. Aplikovaný výskum

Aplikovaný výskum bude orientovaný na prioritné oblasti rozvoja spoločnosti, ako sú využívanie, ochrana a reprodukcia biologických zdrojov, kvalita života, progresívne technológie a ochrana životného prostredia.

Aplikovaný výskum bude pokrývať nasledovné oblasti:

Oblasť molekulárnej biológie a biotechnológií rastlín - za účelom vypracovania postupov pre prenos génov do rastlinných genómov využitím systému *Agrobacterium tumefaciens*, s cieľom zlepšenia úžitkových vlastností hospodársky významných plodín. Výskum bude pokrývať aj problematiku odstránenia selekčných markerových génov rezistencie k antibiotikám z genómu transgénnych rastlín s cieľom zabrániť nekontrolovaného úniku génov rezistencie do životného prostredia (potenciálny outcrossing).

Molekulárne šľachtenie rastlín bude rozvíjané ako metóda komplementárna ku konvenčnému šľachteniu, ako je napr. indukovaná mutagenéza, ktorá významne prispieva k zefektívneniu šľachtiteľského procesu a môže byť aplikovaná pre

mnohé poľnohospodárske plodiny. Cieľom bude zavedenie nových genotypov do poľnohospodárskej produkcie, čo bude príspevkom pre trvalo udržateľné poľnohospodárstvo, udržanie biologickej diverzity a potravinovú bezpečnosť.

Oblasť systémovej biológie, genomiky a proteomiky – s cieľom charakterizovať nové genotypy získané aplikáciou biotechnologických postupov (biotech rastliny), ako aj genetické zdroje rastlín pomocou moderných genomických a proteomických prístupov. Identifikovať kľúčové komponenty dôležité pre potravinárstvo a výživu, sledovať reakciu rastlín na biotické a abiotické stresové faktory, ako aj adaptačné mechanizmy rastlín na nepriaznivé podmienky, čo v konečnom dôsledku umožní zefektívnenie šľachtiteľského úsilia a regulovanie podmienok kultivácie rastlín tak, aby sa dosiahla maximálna a kvalitná produkcia.

Oblasť propagácie rastlín *in vitro* – za účelom rutínnej aplikácie pre rýchle a ekonomicky výhodné klonálne množenie sadbového materiálu hospodársky významných plodín. Cieľom tejto aktivity bude vypracovanie protokolov pre *in vitro* propagáciu vybraných druhov rastlín využitím rôznych *in vitro* techník (propagácia pomocou axilárnych výhonkov, adventívnu regeneráciu, využitím somatickej a gametickej embryogenézy) s využitím pre produkciu haploidných šľachtiteľských línií, ako aj pre masové množenie cenných genotypov pre potreby šľachtiteľskej a pestovateľskej praxe. Vypracované protokoly budú k dispozícii množiteľom pre aplikované množenie týchto plodín.

Oblasť reprodukčnej a vývinovej biológie bude rozvíjaná taktiež na cytologickej a molekulárnej úrovni za účelom poznania regulácie vývinových procesov pri hospodársky významných plodinách s cieľom cielenej regulácie týchto procesov žiadaným smerom.

Očakávané výstupy

Oblasť molekulárneho šľachtenia a biotechnológií rastlín predstavuje strategickú oblasť ekonomiky tretieho tisícročia na Slovensku. Cieleny prenos génov do rastlinných genómov spolu s mutačnými technikami významne prispeje k zefektívneniu šľachtiteľského procesu a prinesie zlepšenia úžitkových vlastností hospodársky významných plodín. Výsledkom bude:

- vytvorenie nových cenných genotypov,
- efektívne množenie ekonomicky významných plodín využitím *in vitro* kultúr a začlenenie do poľnohospodárskej produkcie, čo bude príspevkom pre trvalo udržateľné poľnohospodárstvo, udržanie biologickej diverzity a potravinovú bezpečnosť.
- vypracované metodiky pre mikropropagácia vybraných druhov a odrôd drobného ovocia.

	<ul style="list-style-type: none"> - Odporúčanie pre implementáciu legislatívnych požiadaviek, týkajúcich sa bezpečnosti GM rastlín, ako aj k oživeniu odbornej aj laickej diskusie o GMO.
Metodológia aktivity	<p><u>A. Vybudovanie materiálno-technickej bázy:</u></p> <p>Vybudovanie materiálno-technickej bázy bude realizované v súlade s harmonogramom stavebných činností.</p> <p>Nákup prístrojového vybavenia bude prebiehať na základe pravidiel verejného obstarávania. Minimálne technické parametre obstarávaných zariadení sú vyšpecifikované a spracované vo forme dokumentu, ktorý je k dispozícii u žiadateľa. Následne budú rozpracované metódy a ich aplikácia - pilotné overenie.</p> <p>Súčasne budú riadiaci prebiehať nasledovné činnosti:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) príprava koncepcie a orientácie špecializovaných laboratórií pre riešenie výskumných a vývojových projektov na národnej a medzinárodnej úrovni b) príprava koncepcií výskumných pracovísk a kolektívov pre riešenie aktuálnych problémov na základe integrovaného výskumu a vývoja hlavne formou aplikovaného výskumu; <p><u>B. Aplikovaný výskum</u></p> <p>Úspešnosť regenerácie pletív v kultúre <i>in vitro</i> závisí od komplexu faktorov - typu explantátu, zloženia kultivačného média, hodnoty pH média, regeneračnej schopnosti kultivovaných druhov, odrôd, dokonca vybraných genotypov atď. Efektívnosť diferenciacie a intenzity proliferácie výhonkov závisí zvlášť od typu a koncentrácie rastových látok v médiu a nárokov konkrétnej odrody, ako aj genotypu na rastové látky, ako aj na celkové podmienky kultivácie. V nadväznosti na doterajšie výsledky budeme sa venovať optimalizácii podmienok kultivácie pri nových odrodách, ktoré sú pre pestovanie perspektívne a rozšíria sortiment doposiaľ testovaných odrôd.</p> <p>Návrh postupov na dosiahnutie cieľov aktivity:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Založenie kultúr <i>in vitro</i> z rôznych explantátov (axilárne a apikálne púčiky, izolované meristémy, segmenty listov a listových stopiek) v rôznom časovom intervale ich odberu. - Testovanie kultivačných médií s rôznymi typmi a koncentraciami rastových regulátorov podľa typu explantátu a požiadaviek na realizáciu morfogénnej reakcie – indukcia priamej organogenézy z púčikov a adventívnej organogenézy. - Stanovenie optimálnej hodnoty pH média pre kultiváciu uvedených druhov a ich odrôd. - Zvládnutie etapy zakoreňovania – v podmienkach <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> a stanovenie optima pre zakoreňovanie odvodených rastlín jednotlivých odrôd vybraných druhov. - Časť rastlín získaných mikropropagáciou bude odovzdaná na ďalšie sledovanie ich adaptability a založenie pokusných plôch - Odber východzieho materiálu, izolácia a sterilizácia primárnych explantátov pre založenie kultúr <i>in vitro</i>. - Príprava a testovanie rôznych variantov kultivačných médií s

modifikáciou niektorých komponentov média, zvlášť typu a koncentrácie rastových látok podľa typu explantátu a požadovanej morfogénnej reakcie.

- Testovanie rôznej hodnoty pH kultivačného média za účelom zistenia tolerancie ku kyslosti prostredia.

- Modifikácia podmienok *in vitro* za účelom regulácie procesov regenerácie.

- Na základe výsledkov regenerácie primárnych explantátov budú stanovené optimálne nutričné požiadavky pre získanie kultúry s vysokým multiplikačným potenciálom (kultúra mnohonásobných výhonkov).

- Bude stanovená regeneračná schopnosť uvedených testovaných druhov a ich odrôd na základe kvantifikácie parametrov regenerácie a výsledkov ich štatistického zhodnotenia.

- Bude vypracovaný efektívny mikropropagačný protokol.

- Optimalizácia podmienok transferu regenerantov z podmienok *in vitro* do *in vivo*.

Na transformáciu pomocou *A. tumefaciens* použijeme rôzne rastlinné transformačné vektorové konštrukcie a kmene agrobaktérií. Optimalizácia transformácie bude zahŕňať sledovanie faktorov ovplyvňujúcich transformačnú a regeneračnú účinnosť:

* Vplyv genotypu. Je známe, že transformácia závisí od regeneračnej schopnosti daného genotypu. Úspešnosť transformácie vyhodnotíme pomocou počtu získaných transgénnych výhonov pripadajúci na počet explantátov.

* Použitie kmeňov *A. tumefaciens* s rôznou virulentnosťou (LBA 4404, AGLO, C58).

* Doba ko-kultivácie rastlinného pletiva s bakteriálnou suspenziou.

* Vplyv acetosyringonu na transformačnú účinnosť. Acetosyringon je fenolická látka napomáhajúca chemotaxii agrobaktéria k poraneným bunkám pletiva. Jeho prítomnosť môže významne ovplyvniť transformačnú účinnosť. Budeme sledovať transformačnú účinnosť pri ko-kultivácii bez acetosyringonu alebo v prítomnosti rôznych koncentrácií acetosyringonu.

* Vplyv antibiotík a vplyv zloženia kultivačného média na regeneráciu transgénnych rastlín. Na základe experimentov vyberieme najvhodnejšie antibiotikum a kultivačné podmienky.

* Molekulárno-biochemické analýzy transgénnych rastlín. Analýzami transgénnych rastlín dokážeme, že príslušné transgény boli nielen integrované do rastlinného genómu (detekcia na úrovni DNA), ale aj funkčné (analýza na úrovni proteínov).

- Kvalitatívne stanovenie GUS aktivity - histochemicky so substrátom X-GlcA. X-GlcA je substrát pre β -D-glukuronidázu kódovanú *gusA* génom. Substrát sa používa ako kvalitatívny histochemický marker špecifických GUS expresií v bunkách a pletivách.

- Kvalitatívne stanovenie GFP - fluorescenčným mikroskopom.

	<p>- PCR analýzy - detekcia prítomnosti transgénov (gus, nptII) v genóme transgénnych rastlín pomocou špecifických primerov v termocyklery za štandardných podmienok.</p> <p>* Získané výsledky z jednotlivých experimentov vyhodnotíme a pre testované druhy navrhne optimálny transformačný a regeneračný protokol.</p>
Výstupy (výsledky) aktivity	<p>Výstupom aktivity 3.1 budú:</p> <p>A. <u>Vytvorenie materiáľno-technickej bázy</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Laboratórium molekulárneho šľachtenia rastlín (LMŠR) 2. Laboratóriá reprodukčnej a vývinovej biológie (LRVB) <p>B. <u>Aplikovaný výskum</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - vytvorenie nových cenných genotypov, - efektívne množenie ekonomicky významných plodín využitím <i>in vitro</i> kultúr a začlenenie do poľnohospodárskej produkcie, čo bude príspevkom pre trvalo udržateľné poľnohospodárstvo, udržanie biologickej diverzity a potravinovú bezpečnosť. - vypracované metodiky pre mikropropagácia vybraných druhov a odrôd drobného ovocia. - Odporúčanie pre implementáciu legislatívnych požiadaviek, týkajúcich sa bezpečnosti GM rastlín, ako aj k oživeniu odbornej aj laickej diskusie o GMO.
Zodpovedná osoba	Alena Gajdošová
Odborní pracovníci	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ján Salaj 2. Alena Gajdošová 3. Gabriela Libiaková 4. Martin Jopčík 5. Radoslava Matúšová 6. Andrea Hricová 7. Martin Hajduch 8. Ľubica Uvačková 9. Katarína Klubíková <p>Odborní pracovníci boli vybraní na základe ich vedeckých skúseností v oblasti genetiky a šľachtenia, bunkovej, vývinovej a reprodukčnej biológie, pletivových kultúr, molekulárnej biológie, genetického inžinierstva a proteomiky. Sú to vysokokvalifikovaní špecialisti s hodnotou „vedecký pracovník“, ktorí majú potrebné vedomosti a skúsenosti s prístrojovou technikou, ktorá sa plánuje zakúpiť.</p>
Spôsob získavania spätnej väzby	<p>Realizácia aktivity bude podliehať zodpovednej osobe, ktorá bude riešiť aj prípadné problémy. Každý člen participujúci na realizácii aktivity prostredníctvom čiastkových úloh bude podliehať priamo zodpovednej osobe. O priebehu realizácie aktivity sa budú viesť pravidelné reporty, ktoré budú prezentované všetkým členom zapojeným do realizácie projektu. Všetky problémy vyplývajúce z realizácie aktivity sa budú riešiť operatívne tak, aby nedošlo k posunu harmonogramu naplánovaného v projekte.</p>

	<p>Realizácia aktivity bude podliehať zodpovednej osobe, ktorá bude riešiť aj prípadné problémy. Každý člen participujúci na realizácii aktivity prostredníctvom čiastkových úloh bude podliehať priamo zodpovednej osobe. O priebehu realizácie aktivity sa budú viesť pravidelné reporty, ktoré budú prezentované všetkým členom zapojeným do realizácie projektu. Všetky problémy vyplývajúce z realizácie aktivity sa budú riešiť operatívne tak, aby nedošlo k posunu harmonogramu naplánovaného v projekte.</p>
Očakávaný dosah aktivity	<p>Zakúpené zariadenia a prístroje budú k dispozícii výskumným tímom zúčastnených partnerov a odborníkom z praxe a budú vytvárať bázu pre vybudovanie pracoviska komplexného výskumného, inovačného a kompetenčného regionálneho centra na SPU v Nitre pri ÚGBR SAV.</p> <p>Rastlinné biotechnológie predstavujú na Slovensku strategickú oblasť ekonomiky tretieho tisícročia. Aktivita je v priamom súlade s vecnými prioritami výskumu a vývoja SR, ktoré sú jasne zadefinované v dokumente „Dlhodobý zámer štátnej vednej a technickej politiky do roku 2015“.</p> <p>Aktivity projektu prispejú k rozvoju rastlinných biotechnológií a k zintenzívneniu spolupráce výskumno-vývojových inštitúcií so spoločenskou a hospodárskou praxou, k intenzívnemu transferu získaných poznatkov do praxe, k ich uplatneniu pri produkcii hodnotných potravín a tým nielen k zvýšeniu potravinovej bezpečnosti krajiny, ale aj k procesu tvorby znalostnej spoločnosti, k zvýšeniu vzdelanosti obyvateľstva a týmto spôsobom aj k akceptácii a pochopeniu moderných biotechnologických postupov, bez ktorých sa ekonomika tretieho tisícročia nezaobíde ani na Slovensku. Aktivita 3.1 prispeje tým k zvyšovaniu hospodárskeho rastu regiónov a celého Slovenska.</p> <p>Predpokladá sa, že získané výstupy aplikovaného výskumu budú využívať existujúce a novo vytvorené súkromné spoločnosti a drobní živnostníci, hlavne tí, ktorí sídlia v nitrianskom regióne. Výsledky nášho výskumu resp. obstaraná infraštruktúra budú pravidelne prezentované resp. využívané študentmi univerzít sbiologickým zameraním vo forme prednášok a stážových cvičení na ÚGBR SAV. Títo budú predstavovať potenciálnych užívateľov výsledkov aplikovaného výskumu.</p>
Náklady/výdavky na realizáciu aktivity	<p>Oprávnené výdavky: 978 706,83 EUR Neoprávnené výdavky: 0,00 EUR Nepredpokladáme v rámci aktivity projektu generovanie príjmu.</p>
Zodpovednosť za implementáciu aktivity	<p>Partner 2 – ÚGBR SAV</p>