



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Vybudovanie výskumného centra "AgroBioTech"

ITMS 26220220180

Partner	Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre (Partner 2)
Aktivita	3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách
Zodpovedná osoba	RNDr. Alena Gajdošová, CSc.
Cieľ	B. Realizácia aplikovaného výskumu v oblasti rastlinných biotechnológií
Výstup 4	Odporúčanie pre implementáciu legislatívnych požiadaviek, týkajúcich sa bezpečnosti GM rastlín, ako aj k oživeniu odbornej aj laickej diskusie o GMO.
Autori	Ing. Martin Jopčík, PhD. Ing. Jana Libantová, CSc. Ing. Jana Moravčíková, PhD. Mgr. Ildikó Matušíková, PhD. Ing. Dominika Ďurechová

V Nitre, dňa:

RNDr. Alena Gajdošová, CSc.
zodpovedná osoba odbornej aktivity 3.1

prof. Ing. Marián Brestič, PhD.
predseda vedeckého výboru a vedecký
garant



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Biobezpečnosť transgénnych rastlín - odporúčania pre implementáciu legislatívnych požiadaviek, ako aj k oživeniu odbornej a laickej diskusie o GMO.

Autori: Martin Jopčík, Jana Libantová, Jana Moravčíková, Ildiko Matušiková, Dominika Ďurechová

1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku

Využitie techník rekombinantnej DNA v oblasti genetických modifikácií rastlín prispelo k celkovej dynamizácii vedy o rastlinách. Otvorili sa nové možnosti produkcie geneticky modifikovaných poľnohospodárskych plodín, ktoré by inak nemohli vzniknúť klasickým šľachtením rastlín. Geneticky modifikované rastliny (GM rastliny) našli komerčné uplatnenie v mnohých častiach sveta. Treba však podotknúť, že v súčasnosti, hlavne v EÚ, je komercializácia rastlinných biotechnologických produktov brzdená obavami spoločnosti, ktoré sa týkajú možných rizík spojených s ich dopadom na zdravie ľudí, prípadne s ich zavedením do životného prostredia. Najviac diskutovanými sú predovšetkým gény rezistencie k antibiotikám, ktoré sa používajú pri selekcii transgénnych buniek od netransgénnych počas procesu regenerácie transgéennej rastliny v podmienkach *in vitro* (Miki and McHugh, 2004). Napriek tejto esenciálnej funkcii, sa ich úloha po získaní transgénnych rastlín končí a stávajú sa nadbytočnými. Snaha o zabránenie úniku a šírenia rezistencií na antibiotiká v prírode vyplýva hlavne z nezastupiteľnej úlohy, ktorú antibiotiká hrajú v boji s patogénnymi infekciami. Navyše podľa prijatej platnej legislatívy (§40 Zákona č. 77/2005 Z.z), geneticky modifikované rastliny obsahujúce gény odolnosti voči antibiotikám, ktoré sa využívajú v humánnej alebo veterinárnej medicíne po 31.12.2008 môžu byť používané len v uzavretých priestoroch (laboratóriá) a nezavádzajú sa do životného prostredia. Práve preto je opodstatnené hľadanie nových postupov, ako eliminovať nežiadúce transgény z genómu transgénnych rastlín po splnení ich funkcie.

2. Ciele výskumu

Ambíciou tohto projektu je, na základe získaných experimentálnych poznatkov, sformulovanie odporúčaní pre implementáciu legislatívnych požiadaviek týkajúcich sa bezpečnosti GMO a popularizácia témy transgénnych rastlín medzi verejnosťou (laickou a odbornou) s cieľom poukázať na ich prednosti a možnosti ich bezpečného používania v praxi.

Primárnym cieľom projektu je otestovať samozostrihovací *Cre/loxP* systém na prípravu geneticky modifikovaného tabaku, pomocou ktorého je odstránený gén rezistencie voči antibiotiku – kanamycínu (Moravcikova *et al.* 2008). Riadenie celého procesu je zabezpečené pletivovo-špecifickým promótorom, v našom prípade promótorom *DLL*, aktívnym v peli a embryu (Drea *et al.* 2006). Po genetickej transformácii rastlín tabaku s konštruktom obsahujúcim *Cre/loxP* systém je možné vyhodnotiť efektívnosť zostrihu neželaného génu a potenciálnu využiteľnosť tejto stratégie v praxi pri príprave „marker-free“ transgénnych plodín využiteľných v poľnohospodárskej praxi.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Keďže charakter (špecifická a sila) promotora, ktorý aktivuje proces zostrihu *loxP* ohraničujúcich sekvencií podmieňuje efektivitu tejto stratégie, ďalším cieľom výskumu je testovanie vhodných promótorov s vysokou špecifickou aktivitou v reprodukčných štádiách vývinu rastliny. Počet a dostupnosť takýchto promótorov je v súčasnosti limitovaný, na druhej strane však značne žiadaný v biotechnologických postupoch (Luo et al. 2007; Bai et al. 2008; Kopertek et al. 2010).

Sekundárnym cieľom projektu je hľadanie a charakterizácia génov z netradičných rastlinných zdrojov ako napr. z mäsožravej rastliny rosičky okrúhlolistej, využiteľných v rastlinnej transgenéze s cieľom zvýšenia poľnohospodárskych plodín ku biotickému stresu.

Za dôležitý aspekt projektu pokladáme aj vytvorenie integrovanej platformy základného a aplikovaného výskumu so šľachtiteľmi, ktorá je v súčasnosti na Slovensku poddimenzovaná. Cieľom tejto aktivity bude priebežne monitorovať požiadavky (šľachtiteľskej) praxe týkajúce sa kvalitatívnych a kvantitatívnych ukazovateľov nových odrôd a prepojiť ich s riešiteľským potenciálom základného a aplikovaného výskumu.

2. Objekty experimentálneho štúdia

Tabak virgínsky (*Nicotiana tabacum* L.) modelová rastlina pre genetickú transformáciu pomocou *Agrobacterium tumefaciens*.

3. Použitá laboratórna technika

Základné prístrojové vybavenie potrebné na prípravu DNA vektorových konštrukcií využívaných pri transformácii rastlín, prístroje a zariadenia využívané pri genetickej transformácii rastlín a zariadenia nevyhnutné pre molekulárno-biochemické analýzy transgénnych rastlín. Pracovisko disponuje laboratóriami, kultivačnými miestnosťami a miestnosťou pre udržiavanie rastlín *in vivo*, ktoré majú povolenie pre prácu s geneticky modifikovanými organizmami.

Zoznam použitých prístrojov zahŕňa nasledovnú sadu prístrojov: (vysokootáčková chladená centrifúga - Universal 32R 2ks (Hettich); vysokootáčková nechladená centrifúga – M24 (Boeco), vodný kúpeľ – EN 025 (Nuve), biologický termostat BT 120, termocyklér Primus 25/96 (MWG AG BIOTECH), UV transiluminátor (UVP), hybridizačná piecka 6/12V (UniEquip), fotodokumentačný systém QUANTUM ST4 (Vilber Lourmat), fototlačiareň - OP895CE (Sony), laboratórne trepačky – Unitwist 300 (UniEquip); OS-10 (BOECO) OS-20 (BOECO), UNIHOOD 550 (UniEquip), hlbokomraziaci box (-80°C) (Heraus), chladničky, mrazničky -20°C, vertikálne elektroforézy Mighty Small II SE 250, Compact Mini V10-CDC (GeneQ), horizontálne elektroforézy - HU 10 (SciPlast), HE 33 (Hofer), HE 99X (Hofer), elektroforetické zdroje - PS 606T (Apellex); PS608 (Apellex), HN (Hoelm-Nielson), spektrofotometer Ultrospec 1000 – Pharmacia, fluorimeter- FluoroScan II (Titertek), autokláv – STURDY SA-260 MA, analytické váhy (Sartorius), Prevažovačky – Unitwist (UniEquip), výrobnik ľadu Lec, drvič ľadu (Santos), pHmeter – Consort (Scientific Instruments), laminárny box s HEPA filtrom pre prácu s GMO, UNiFlow UVU700.



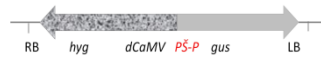
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

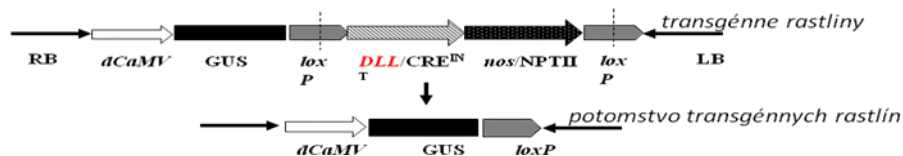
4. Pracovné postupy

Príprava konštruktú/ov

A: pre testovanie pletivovo-špecifických promótorov (*APRS*, *MXL*, *ESL* a *DLL*) pre rastlinné biotechnológie



B: so samozostrihujúcou sa kazetou



Transformácia rastlín

Rastlinné listové explantáty tabaku sa využili ako východiskový materiál na genetickú transformáciu pomocou *A. tumefaciens* LBA4404 (Horsch *et al.* 1985) s rastlinným vektorovým konštruktom pre testovanie expresného profilu pletivovo-špecifických promótorov v transgénnom organizme (A) resp. konštruktom so samozostrihujúcou Cre/loxP kazetou (B). Transgénne rastliny sa vygenerovali na médiach s rastovými regulátormi a príslušným selekčným antibiotikom.

Analýzy transgénnych rastlín

U jednotlivých transgénnych rastlín sa vyhodnotila prítomnosť transgénov metódou PCR. Počet integrovaných T-DNA kópií sa určila Southern blot analýzou. Enzymatická aktivita GUS proteínu v transformantoch bola detekovaná histochemicky, a kvantifikovaná fluorimetricky (Jefferson *et al.* 1987). V prípade rastlín transformovaných vektorovým konštruktom so samozostrihujúcou kazetou PCR analýzou pomocou vhodne navrhnutých primerov bol vyhodnotený prípadný predčasný zostrih loxP ohraničenej kazety už počas regenerácie. Vyselektované rastliny s jednou intaktnou T-DNA kópiou a so silnou GUS aktivitou boli prenesené do rastovej miestnosti, aby sme po samoopelení boli získané semená. V potomstve transgénnych rastlín bola vyhodnotená efektívnosť zostrihu selekčného markerového génu Cre/loxP systémom. Na základe spracovania získaných výsledkov bola vyhodnotená účinnosť prípravy „marker-free“ potomstva transgénnych rastlín a prípadná aplikovateľnosť navrhutej Cre/loxP stratégie pre iné poľnohospodársky významné plodiny.

5. Výsledky a očakávané prínosy

Cieľom genetických modifikácií rastlín je zabezpečiť kontrolovanú expresiu určitého špecifického transgénu, následkom čoho dochádza k zlepšeniu nejakej z vlastností pôvodného netransformovaného genotypu. Za kontrolovanú transgénnu expresiu sú zodpovedné promótor, ktoré rozhodujú kedy, kde a v akej miere sa transgén prejaví. Pri odhade predpokladaného expresného profilu v transgénnom organizme sa vychádza z jeho expresného profilu v pôvodnom organizme, pričom zmena profilu oproti pôvodnému organizmu sa označuje ako ektopická aktivita promótoru.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

V našich experimentoch bol testovaný expresný profil štyroch pletivovo-špecifických promótorov *MXL*, *ESL*, *APRS* a *DLL* izolovaných z arábkovky Thálovej v transgénnych rastlinách tabaku, pričom bola očakávaná aktivita týchto promótorov v peli a/alebo v embryu. Zistili sme, že u troch zo štyroch promótorov (*MXL*, *ESL*, *APRS*) bol expresný profil v transgénnych rastlinách pozmenený v prípade, že jeho vzdialenosť od *CaMV35S* promótoru/enhancera, (ktorý riadil expresiu selekčného markérového génu) bola menšia ako 3 kb. Najväčšia ektopická aktivita bola zaznamenaná u promótoru *MXL*, nasledovaná promótorami *ESL* a *APRS*. Klonované medzerníky medzi tieto testované promótory a *CaMV35S* promótor znižovali ektopickú expresiu transgénu v jednotlivých pletivách. Pri hodnotení náchylnosti jednotlivých pletív, najcitlivejšie sa na ektopickú aktivitu javila stonka nasledovaná kalusom, listom a koreňom. Promótor *DLL* sa javil ako imúnny od vplyvu promótoru/enhancera *CaMV35S*. Pri hodnotení špecifickej aktivity promótorov bolo zistené, že promótory *MXL*, *APRS*, ak boli mimo dosahu *CaMV35S* promótoru/enhancera a promótor *DLL*, sa vyznačovali špecifickou aktivitou počas vývinu peľu, čo im dáva využiteľnosť pri príprave transgénnych rastlín s netransgénym peľom. Promótor *DLL*, ktorý sa vyznačoval špecifickou aktivitou v embryu a peli bol v nedávnych experimentoch úspešne použitý na prípravu potomstva transgénnych rastlín, v ktorých selekčný markérový gén bol odstránený počas vývinu embrya za pomoci *Cre/loxP* systému s účinnosťou dosahujúcou 96%.

Ďalšia časť našej experimentálnej práce je zameraná na izolácii génov z netradičných rastlinných zdrojov, ktoré by mohli zohrávať významnú úlohu pri obrane rastlín voči patogénnej infekcii. Gény pre glukonázu a chitinázu sú v modelovom organizme pre transgenézu – tabaku - postupne charakterizované na molekulárnej úrovni a proteíny izolované z transgénnych rastlín sú testované na schopnosť inhibovať rast fytopatogénnych húb *in vitro* podmienkach vo zvýšenej miere.

Očakávaným prínosom tohto výskumu v rámci zvyšovania biobezpečnosti transgénnych rastlín je preverenie faktorov, ktoré ovplyvňujú správanie sa promótorov v transgénnom organizme. Následne pri cielej transgenéze, je možné presne kontrolovať expresiu vybraného transgénu v hostiteľskom organizme, čo je nevyhnutným predpokladom prípravy bezpečných geneticky modifikovaných rastlín.

Druhým prínosom je využitie jedného z testovaných promótorov (*DLL*) v *Cre/loxP* stratégii prípravy transgénnych rastlín bez selekčného markera kódujúceho gén rezistencie ku antibiotikám v potomstve. Selekčný gén, ktorý úlohu v transgénnom organizme už splnil a viac už nebol pre vyselektovanú transgénnu rastlinu potrebný bol *Cre* rekombinázou z rastlinného genómu zostrihnutý. Gén pre *cre* rekombinázu riadil promótor *DLL*, ktorý s mimoriadne vysokou účinnosťou zabezpečoval celý proces zostrihu v peli a embryu. Charakterizáciou promótoru *DLL* v *Cre/loxP* stratégii zostrihu nežiadúcich sekvencií, výskum svojimi závermi prispel k portfóliu generovania transgénnych plodín, ktoré spĺňajú prísne kritériá bio-bezpečnosti.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Odporúčania pre implementáciu legislatívnych požiadaviek, týkajúcich sa bezpečnosti GM rastlín, ako aj k oživeniu odbornej a laickej diskusie o GMO.

- 1) **Odporúčanie pre implementáciu legislatívnych požiadaviek:** Uvádzanie geneticky modifikovaných rastlín do životného prostredia iba s génmi záujmu. Využívanie technologických postupov pri príprave geneticky modifikovaných rastlín zahrňujúcich zostrih DNA sekvencií (napr. selekčných markérových génov), ktoré už splnili svoju úlohu pri príprave primárnych transformantov napr. pomocou Cre/loxP stratégie (Polóniová et al. 2015).
- 2) **Odporúčanie pre implementáciu legislatívnych požiadaviek:** Využívanie promótorových regulačných sekvencií zabezpečujúcich expresiu transgénu iba cielených pletivách alebo počas špecifických štádií vývinu rastliny v geneticky modifikovaných rastlinách uvádzaných do životného prostredia (Jopčík et al. 2014a; Jopčík et al. 2014b)
- 3) **Odporúčanie pre implementáciu legislatívnych požiadaviek:** Premyslená stratégia vzdelávania populácie pri implementácii geneticky modifikovaných plodín na trh využívajúca argumenty odbornej verejnosti, keďže v súčasnosti u konzumentov GMO prevláda neistota a obavy, ktoré nie sú výsledkom odborne vedenej diskusie.

Zoznam aktivít zameraných na odbornú a laickú diskusiu o GMO:

a) Dr. Jana Libantová pracuje ako **Členka zboru expertov pre Biologickú bezpečnosť GMO pri MŽP SR.**

b) Pozvaná prednáška

Meno a priezvisko riešiteľa: J. Moravčíková

Aktivita v rámci ktorej bola prednesená pozvaná prednáška: 3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách

Názov prednášky: Bio-bezpečné transgénne rastliny ako nové genetické zdroje pre poľnohospodárstvo. (Jana Moravčíková)

Názov podujatia: 7. medzinárodná vedecká konferencia „Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo“

Termín konania: 28. 05. 2013

Miesto konania: Piešťany

c) Populárno-vedecký článok v denníku SME, 26.6.2013



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Meno a priezvisko riešiteľa: J. Libantová

Aktivita v rámci ktorej vyšiel príspevok v denníku SME: 3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách

Citácia publikácie:

„Potrebujeme nakrmiť ľudí, aj vďaka GMO“ (Jana Libantová)

<http://tech.sme.sk/c/6820854/potrebujeme-nakrmit-ludi-aj-vdaka-gmo.html>

Termín kedy bola publikácia vydaná: 26.6.2013

d) Pozvaná prednáška

Meno a priezvisko riešiteľa: J. Moravčíková

Aktivita v rámci ktorej bola pozvaná prednáška: 3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách

Názov prednášky: Geneticky modifikované rastliny, ich výhody a nevýhody. (Jana Moravčíková)

Názov podujatia: Predzberová prehliadka MONSANTO INNOVATION CENTRA Borovce

Termín konania: 10. 10. 2013

Miesto konania: Borovce

Merateľné ukazovatele výsledkov

JOPČÍK, Martin - LIBANTOVÁ, Jana. The CaMV35S promoter modulates the specificity of Arabidopsis thaliana pollen - and/or embryo-specific promoters in transgenic plants. In Plant transformation technologies III: Vienna International Science Conferences and Events Association, 12-14 February 2014. Vienna, 2014, p. 40. Typ: AFG

ĎURECHOVÁ, Dominika - MATUŠÍKOVÁ, Ildikó - MORAVČÍKOVÁ, Jana - JOPČÍK, Martin - LIBANTOVÁ, Jana. *In silico* analysis of chitinase promoter isolated from *Drosera rotundifolia* L. In Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2014, vol.3, special iss.2, p.71-73. ISSN 1338-5178. Typ: ADFB

ĎURECHOVÁ, Dominika - MATUŠÍKOVÁ, Ildikó - MORAVČÍKOVÁ, JOPČÍK, Martin - LIBANTOVÁ, Jana. Sequence analysis of sundew chitinase gene. In Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, doi: 10.15414/jmbfs.2015.4.special2.4-6 Typ: ADFB



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES

Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

6. Zoznam použitej literatúry

BAI, X.Q. - WANG, Q.Y. - CHU, C.C., 2008. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/loxP system controlled by a floral specific promoter. In *Transgenic Res*, vol. 17 (6), p. 1035-43.

DREA, S.C. - LAO, N.T. - WOLFE, K.H. - KAVANAGH, T.A., 2006. Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of OEP16-related genes in land plants. In *Plant J*, vol. 46 (5), p. 723-35

HORSCH, R. B. - FRY, J. E. - HOFFMANN, N. L. - EICHHOLTZ, D. - ROGERS, S. D. - FRALEY, R. T. 1985. A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. In *Science*, vol. 227 (4691), p. 1229-31

JEFFERSON, R. A. - KAVANAGH, T. A. - BEVAN, M. W. 1987. Gus Fusions - Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher-Plants. In *Embo J*, vol. 6 (13), p. 3901-7

JOPČÍK, M. - MATUŠÍKOVÁ, I. - MORAVČÍKOVÁ, J. - LIBANTOVÁ, J., 2014a. Expression pattern of *Arabidopsis thaliana* pollen- and embryo-specific promoter in transgenic tobacco plants. In *Acta Biologica Cracoviensia: series Botanica*, vol. 56, no.1, p. 73-79.

JOPČÍK, M. - MORAVČÍKOVÁ, J. - MATUŠÍKOVÁ, I. - LIBANTOVÁ, J., 2014b. Spacer length-dependent protection of specific activity of pollen and/or embryo promoters from influence of CaMV 35S promoter/enhancer in transgenic plants. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol.118, no.3, p.507-518.

KOPERTEKH, L. - SCHULZE, K. - FROLOV, A. - STRACK, D. - BROER, I. - SCHIEMANN, J., 2010. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. In *Plant Mol Biol*, vol. 72 (6), p. 597-605.

LUO, K. - DUAN, H. - ZHAO, D. - ZHENG, X. - DENG, W. - CHEN, Y. - STEWART, C. N. - MCAVOY, R. - JIANG, X. - WU, Y. - HE, A. - PEI, Y. - LI, Y., 2007. "GM-gene-deletor": fused loxP-FRT recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. In *Plant Biotech J*, vol. 5 (2), p. 263-374.

MIKI B -MCHUGH S., 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. In: *Journal of Biotechnology* vol. 107 p. 193-232.

MORAVČÍKOVÁ, J. - VACULKOVÁ, E. - BAUER, M. - LIBANTOVÁ, J., 2008. Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision Cre/loxP strategy focused on generation of marker-free transgenic plants. In *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, vol. 23, no. 8, p.1325 - 1334.

POLÓNIOVÁ, Z. - JOPČÍK, M. - MATUŠÍKOVÁ, I. - LIBANTOVÁ, J. - MORAVČÍKOVÁ, J., 2015. The pollen- and embryo-specific *Arabidopsis* DLL promoter bears good potential for application in marker-free Cre/loxP self-excision strategy. In: *Plant Cell Reports* vol. 34 p. 469 - 481



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

_____ *podpis* _____

Ing. Martin Jopčík, PhD.

_____ *podpis* _____

Ing. Jana Libantová, CSc.

_____ *podpis* _____

Ing. Jana Moravčíková, PhD.

_____ *podpis* _____

Mgr. Ildiko Matušíková, PhD.

_____ *podpis* _____

Ing. Dominika Ďurechová

Práca bola riešená v rámci projektu Európskeho spoločenstva: Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“, projekt číslo 26220220180.