

Obsah

1 ZÁKLADY GENETIKY A GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ (M. Ondřej)	13
1.1 Nejstarší historie genetiky	13
1.2 Mendelovy zákony	14
1.2.1 Monohybridizmus	15
1.2.2 Dihybridizmus	18
1.3 Genetika 1. poloviny 20. století	19
1.3.1 Genové interakce	19
1.3.2 Vazba genů	19
1.3.3 Dědičnost kvantitativních znaků	20
1.3.4 Cytoplazmatická dědičnost	21
1.3.5 Mutace	21
1.4 Genetika 2. poloviny 20. století	23
1.4.1 Mičurinská a lysenkovská biologie	23
1.4.2 Struktura DNA	24
1.4.3 Bakteriální genetika	24
1.4.4 Genetický kód	27
1.4.5 Základy genového inženýrství	27
1.4.6 Sekvencování celých genomů	29
1.4.7 Struktura rostlinného genomu	30
Závěr	31
2 ZÁKLADY ŠLECHTĚNÍ (M. Ondřej)	33
2.1 Z dějin křížení rostlin	33
2.2 Rozvoj a metody šlechtění	34
2.3 Šlechtění samosprašných rostlin	35
2.4 Šlechtění cizosprašných rostlin	35
2.5 Šlechtění klonově množených rostlin	36
2.6 Mutační šlechtění	36
2.7 Využití tkáňových kultur v šlechtění rostlin	37
2.8 Nové přístupy molekulární genetiky v šlechtění rostlin	39
2.8.1 Molekulární mapování	39
2.8.2 Transgenóza	40
Závěr	40
3 TRANSFORMACE ROSTLINNÝCH BUNĚK PŮVODNÍMI BAKTERIEMI RODU AGROBACTERIUM (M. Ondřej)	42
3.1 Historie transformace rostlinných buněk bakteriemi rodu <i>Agrobacterium</i>	42
3.2 Bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43

3.2.1 Rostlinné signální molekuly	46
3.3 Ti-plazmid <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
3.4 Úsek virulence plazmidu Ti	51
3.5 Chromozomové geny virulence	51
3.6 T-DNA plazmidu Ti	51
3.6.1 T _L -DNA plazmidu Ti	52
3.6.1.1 Geny pro syntézu opinů	53
3.6.1.2 Geny pro syntézu fytohormonů	57
3.6.1.2.1 Geny pro auxiny	59
3.6.1.2.2 Geny pro cytokininy	60
3.6.1.2.3 Gen 6b	61
3.6.2 T _R -DNA některých typů plazmidu Ti	61
3.6.3 Hraniční sekvence T-DNA	61
3.7 Přenos T-DNA do genomu rostlinných buněk	62
3.7.1 Mechanismus excize T-DNA z plazmidu Ti v bakteriích <i>A. tumefaciens</i>	63
3.7.2 Mechanismus integrace T-DNA do rostlinného genomu	63
3.8 Sekvencování T-DNA	65
3.9 Zvláštní typy plazmidů Ti	65
3.10 Bakterie <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	66
3.10.1 T _L -DNA plazmidu Ri	66
3.10.1.1 Gen <i>rolA</i>	67
3.10.1.2 Gen <i>rolB</i>	68
3.10.1.3 Gen <i>rolC</i>	68
3.10.1.4 Gen <i>rolD</i>	68
3.10.2 Možná využití genů <i>rol</i> v šlechtění ovocných stromů	68
3.10.3 Možná využití genů <i>rol</i> v šlechtění lesních stromů	69
3.10.4 T-DNA plazmidu Ri v rostlinných genomech a genetické nádory rostlin	70
Závěr	
4 VEKTORY, MECHANIZMY A METODY TRANSGENOZE (M. Ondřej)	73
4.1 Transgenoze a transformace	74
4.2 Tranzientní exprese	75
4.3 Transgenoze prostřednictvím bakterií <i>Agrobacterium</i>	75
4.3.1 Princip vektorů	78
4.3.1.1 Kointegrativní vektory	80
4.3.1.2 Binární vektory	82
4.3.1.2.1 Použití supervirulentních kmenů	83
4.3.2 Projev chimérických selektovatelných a reportérových transgenů	84
4.3.2.1 Selektovatelné transgeny	
4.3.2.1.1 Námitky antibiotechnologických aktivistů proti využívání transgenů pro rezistenci k antibiotikům	85
4.3.2.1.2 Systémy pro eliminaci selektovatelných transgenů z genomů transgenních rostlin	86
4.3.2.1.2.1 Místně specifická řízená excize transgenů	87
4.3.2.1.2.2 Systém MAT	88
4.3.3 Reportérové transgeny	88
4.3.3.1 Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu	88
4.3.3.2 Transgen pro β -glukuronidázu	89
4.3.3.3 Transgen pro luciferázu	89
4.3.3.4 Transgen pro zeleně fluoreskující protein	89

4.3.4	Sekvence DNA míst připojení k matrix a exprese transgenů	90
4.3.5	Transgenoze rostlinných pletiv	90
4.3.5.1	Transgenoze a tkáňové kultury rostlin	92
4.3.5.2	Transgenoze <i>Arabidopsis</i>	93
4.3.5.3	Transgenoze jednoděložných rostlin	93
4.3.5.4	Transgenoze velkými úseky DNA	94
4.3.5.5	Homologní transgenoze	95
4.4	Přímá transgenoze prostřednictvím DNA	97
4.4.1	Historické pokusy	97
4.4.1.1	Aplikace exogenní bakteriální DNA na klíčící semena	98
4.4.1.2	Aplikace DNA celého eukaryontního genomu	99
4.4.2	Transgenoze protoplastů	99
4.4.3	Transgenoze buněk a pletiv	100
4.4.3.1	Mikroprojektily	100
4.5	Rozdíl mezi přímou transgenozí a využitím bakterií <i>Agrobacterium</i>	102
4.6	Transgenoze chloroplastů	103
4.7	Stabilita přítomnosti transgenů	104
	Závěr	105
5	TRANSGENOZE GENY PRO TOLERANCI K HERBICIDŮM (M. Ondřej)	108
5.1	Úvod	108
5.2	Rezistence k herbicidům	108
5.2.1	Rizika pro člověka	109
5.2.2	Rizika pro přírodní prostředí	109
5.3	Jednotlivé typy herbicidů a transgenů	110
5.3.1	Glyfozát	110
5.3.1.1	Mechanismus účinku herbicidů a transgenů	110
5.3.1.2	Ekologické a toxikologické studie transgenních rostlin tolerantních ke glyfozátu	113
5.3.2	Fosfinotricin	116
5.3.2.1	Mechanismus účinku herbicidů a transgenů	116
5.3.2.2	Ekologické a toxikologické studie transgenních rostlin tolerantních k fosfinotricinu	116
5.3.3	Herbicide, které blokují acetolaktátsyntázu	118
5.3.3.1	Mechanismus účinku herbicidů a transgenů	118
5.3.3.2	Ekologické a toxikologické studie transgenních rostlin tolerantních k herbicidům blokujícím ALS	119
5.3.4	Transgeny pro toleranci k dalším herbicidům	119
5.4	Zhodnocení obecných rizik používání transgenních rostlin tolerantních k herbicidům	120
	Závěr	121
6	REZISTENCE K HMYZÍM ŠKŮDCŮM (M. Ondřej)	123
6.1	Transgen pro δ -endotoxin <i>Bacillus thuringiensis</i>	123
6.1.1	Expresce neupravených transgenů pro Bt-toxin v chloroplastech	127
6.1.2	Zkušební s transgenními odrůdami	127
6.2	Geny rostlinného původu	128
6.2.1	Inhibitory proteáz	129
6.2.2	Inhibitory amyláz	129
6.2.3	Lektiny	129
6.2.4	Chitinázy a tryptofandekarboxylázy	130

6.3 Geny jiného než rostlinného původu	130
6.4 Nové insekticidní geny	130
6.5 Rezistence k hádátkům	131
6.6 Zvládnutí mutací na rezistenci škůdců k transgenním rezistentním rostlinám	133
6.7 Aktivity antibiototechnologických hnutí	134
6.7.1 Případ motýla <i>Danaus plexipus</i>	137
6.7.2 Přenos Bt-toxinu do půdy	137
Závěr	137
7 TRANSGENY PRO REZISTENCI K VIRŮM (M. Ondřej)	141
7.1 Typy rostlinných virů	141
7.2 Agroinfekce	143
7.3 Mechanizmy rezistence prostřednictvím transgenoz	143
7.3.1 Transgeny virového genomu	143
7.3.1.1 Virus tabákové mozaiky (TMV)	143
7.3.1.2 Virus zlaté mozaiky rajčete (TGMV)	144
7.3.1.3 Virus žilkové mozaiky kvěťáku (CaMV)	145
7.4 Strategie vnášení rezistence k rostlinným virům transgenozí	146
7.4.1 Rezistence zprostředkovaná genem pro plášťový protein	146
7.4.2 Rezistence k proteinu pro přenos z buňky do buňky	147
7.4.3 Rezistence založená na transgenu pro replikázu	147
7.4.4 Rezistence podmíněná nukleovými kyselinami	147
7.4.5 Další strategie	148
7.4.6 Mechanizmy založené na potlačování exprese genů	148
7.4.7 Ochrana zprostředkovaná antisense RNA	149
7.4.8 Rezistence založené na dalších transgenech	149
7.4.8.1 Rostlinné transgeny	149
7.4.8.1.1 Transgeny pro rostlinné antivirové proteiny	150
7.4.8.2 Bakteriální transgeny	150
7.4.8.3 Živočišné transgeny	150
7.5 Komponenty virového genomu jako nástroje pro transgenozu rostlin	151
7.6 Transgenní kulturní rostliny rezistentní k virům	151
7.7 Virové vektory	152
7.8 Předpokládaná rizika transgenních rostlin rezistentních k virům	152
7.8.1 Transenkapsidace	152
7.8.2 Rekombinace	153
7.9 Transgeny pro rezistenci k viroidům	154
Závěr	154
8 DALŠÍ TRANSGENY VYUŽÍVANÉ V SOUČASNÝCH TRANSGENNÍCH ODRŮDÁCH (M. Ondřej)	158
8.1 Transgenoz pro změněný obsah lipidů v semenech	158
8.1.1 Biosyntéza rostlinných olejů	158
8.1.2 Význam rostlinných olejů v zemědělské produkci	158
8.1.3 Složení zásobních olejů semen	160
8.1.4 Olejodárné rostliny v rostlinné produkci	160
8.1.5 Transgeny pro změny biosyntézy rostlinných olejů	161
8.2 Zásobní proteiny	162
8.2.1 Genové manipulace biosyntézy nedostatkových aminokyselin	163
8.2.2 Včleňování genů pro zásobní proteiny semen do genomu	163

8.3 Ovlivnění životnosti květů a zrání plodů transgenozí	164
8.3.1 Rajčata s prodlouženým dozráváním (protismyslová konstrukce genu pro polygalakturonázu)	164
8.3.2 Transformace protismyslovými konstrukcemi genu pro 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu	165
8.3.3 Transgeny pro prodloužení životnosti řezaných květů	166
8.3.4 Perspektiva prevence měknutí rajčat vnesením protismyslové konstrukce genu pro expansin	166
8.4 Produkce avidinu transgenními rostlinami pro laboratoře genového inženýrství	167
Závěr	167
9 DALŠÍ ŠLECHTITELSKY PERSPEKTIVNÍ TRANSGENY (M. Ondřej)	170
9.1 Transgeny pro protilátky	170
9.1.1 Vývoj transgenních rostlin, kterým transgeny pro fragmenty protilátek dodávají rezistenci k patogenům	172
9.1.2 Vývoj transgenních rostlin, kterým transgeny pro fragmenty protilátek dodávají nové vlastnosti	172
9.1.3 Vývoj transgenních rostlin pro velkokapacitní produkci rekombinovaných fragmentů protilátek	173
9.2 Rostlinné vakcíny	174
9.3 Produkce farmakologicky využitelných vzácných proteinů transgenními rostlinami	175
9.3.1 Transgeny pro farmakologicky významné proteiny, které podporují srážlivost krve	175
9.4 Využití transgenního okřehku pro produkci farmakologicky významných látek	177
9.5 Transgeny pro průmyslově nebo zemědělsky významné enzymy	177
9.5.1 Exprese transgenů pro fytázu	177
9.5.2 Exprese transgenů pro xylanázu	177
9.5.3 Produkce glukonázy transgenními rostlinami	178
9.5.4 Produkce α -amylázy transgenními rostlinami	178
9.5.5 Produkce polymerů fruktózy transgenními rostlinami	178
9.5.6 Produkce biodegradovatelných polyesterů transgenními rostlinami	179
9.6 Transgenní rostliny využitelné pro fytoremediaci	180
9.7 Využití dalších protismyslových konstrukcí transgenů	180
9.8 Transgenní rostliny tolerantní k stresům	181
9.8.1 Tolerance k zasolení půdy a k nízkým teplotám	182
9.8.2 Ochrana před zasolením půdy a suchem	182
9.8.3 Ochrana před chladem	183
9.8.4 Ochrana před mrazem	184
9.8.5 Ochrana před aktivními molekulami kyslíku	184
9.8.6 Ochrana před zaplavením půdy	184
9.8.7 Tolerance k chemickým stresům: sirovodík v atmosféře	185
9.8.8 Další vyhlídky	186
9.9 Rezistence k houbovým a bakteriálním onemocněním	186
9.9.1 Transgeny, které mají vztah k patogenезi	187
9.9.2 Specifické rostlinné geny pro rezistenci	187
9.9.2.1 Genové manipulace biosyntézy fytoalexinů	188
9.9.3 Transgeny pro rezistenci k bakteriálním chorobám	188
9.10 Modifikace fyziologického vývoje rostlin	189

9.10.1 Zlatá rýže	189
9.10.1.1 Vnesení transgenů pro syntézu β -karotenu do genomu řepky	190
9.10.1.2 Námitky antibiotechnologických aktivistů proti vývoji odrůd zlaté rýže	190
9.10.1.3 Zvýšení obsahu lykopenu v plodech rajčat vyvolané transgenozí	191
9.10.1.4 Rostliny s transgenem pro feritin	191
9.10.2 Genové inženýrství pro produkci ligninů	192
9.10.3 Genové inženýrství pro produkci škrobu	193
9.11 Modifikace vývoje rostlin	194
9.11.1 Modulační buněčného cyklu jako nástroj řízení vývoje a architektury rostlin	194
9.11.2 Možnosti využití mutovaného genu pro protein, který zprostředkovává odpověď na gibereliny	195
9.12 Modifikace barvy květů	196
9.13 Aktivace latentních transgenů pomocí hybridního transkripčního faktoru	196
9.14 Terminátorový systém a systém T-GURT	197
9.15 Nevyužití možnosti	199
9.15.1 Původní představa o včleňování genů bakterií fixujících dusík do rostlinného genomu ...	199
9.15.2 Další příklady	200
Závěr	201
10 TOXICKÉ PROTEINY, ENZYMY S TOXICKÝMI PRODUKTY A PYLOVÁ STERILITA (M. Ondřej)	206
10.1 Transgeny pro toxické proteiny	206
10.1.1 Transgen pro toxin cholery	206
10.1.2 Transgen pro toxin záškrtu A	207
10.2 Geny pro enzymy, které mění netoxické substráty na toxické proteiny	207
10.2.1 Gen pro tymidinkinázu viru herpes simplex	207
10.2.2 Gen pro cysteindeaminázu	207
10.2.3 Gen <i>aux2 (iaaH)</i>	208
10.3 Pylová sterilita	208
10.3.1 Systém barnáza–barstar	209
Závěr	209
11 INZERČNÍ MUTAGENEZE (M. Ondřej)	211
11.1 Základní strategie	211
11.1.1 Past na zesilovače	213
11.1.2 Past na promotory	214
11.1.3 Past na geny	214
11.2 Aktivační mutageneze	215
11.3 Vektory pro inzerční mutagenezi	215
11.3.1 Vektory s využitím T-DNA	215
11.3.2 Vektory s využitím transpozonů	217
11.4 Využití souboru inzerčních mutovaných linií	217
11.5 Sekvencování genomu <i>Arabidopsis thaliana</i>	219
11.6 Inzerční mutageneze a sekvencování genomu rýže	220
Závěr	221
12 ZTRÁTY AKTIVITY TRANSGENŮ (M. Ondřej)	223
12.1 Základní rozdělení	224
12.1.1 Transkripční inaktivace genů	224
12.1.2 Posttranskripční inaktivace genů	225

12.2	Mutace, které ovlivňují inaktivace transgenů	228
12.3	Polohový efekt a požadavek stabilní exprese transgenů	229
12.4	Inaktivace transgenů v souvislosti s ochranou před infekcí viry a viroidy	229
12.5	Přenos RNA v rostlině a inhibice aktivity transgenů	232
	Závěr	232
13	IZOLACE TRANSGENNÍCH ROSTLIN OD PROSTŘEDÍ (M. Ondřej)	235
13.1	Typy izolace	235
13.2	Zvláštnosti práce s transgenními rostlinami	236
13.3	Základní obecná pravidla práce s transgenními rostlinami	237
13.3.1	Laboratoř a kultivační místnost	237
13.3.2	Izolační skleníky	239
13.3.3	Malé polní pokusy	239
13.3.4	Předběžné polní testování transgenních rostlin	240
13.4	Pociťovaná a skutečná rizika transgenních rostlin	241
13.4.1	Vliv na biocenózy	241
13.5	Krátkodobé a dlouhodobé ekologické vlivy transgenních rostlin z hlediska možných rizik	241
13.6	Šíření transgenů	243
13.6.1	Šíření transgenů pylem	243
13.6.1.1	Šíření transgenů na netransgenní odrůdy řepky	243
13.6.1.2	Přenos transgenů z řepky do příbuzných planých druhů	244
13.6.1.3	Vliv transgenních rostlin na včely a med	245
13.6.2	Horizontální přenos transgenů	245
13.7	Toxicita a alergennost	246
	Závěr	247
14	REGULACE NAKLÁDÁNÍ S GENETICKY MODIFIKOVANÝMI ORGANIZMY VE SVĚTĚ (J. Drobník)	249
14.1	Regulace v nelékařské a molekulární genetice	249
14.1.1	První regulace zavedli molekulární biologové	249
14.1.2	Regulace v USA	250
14.1.3	Regulace ve Spojeném království	251
14.1.4	Iniciativa OECD	253
14.1.5	Účast OSN v oblasti regulací geneticky modifikovaných organismů	255
14.1.6	Pravidla Světové obchodní organizace (WTO) týkající se problematiky GMO	256
14.1.7	Legislativa Evropského společenství	259
14.1.7.1	Směrnice 90/219/EEC	264
14.1.7.2	Směrnice 98/81/EEC	265
14.1.7.3	Směrnice 90/220/EEC	266
14.1.7.4	Standardy a normy	271
14.2	Molekulární genetika a veřejnost	271
	Závěr	279
15	ČESKÝ ZÁKON O NAKLÁDÁNÍ S GENETICKY MODIFIKOVANÝMI ORGANIZMY (M. Ondřej, J. Drobník)	280
15.1	Zákon o GMO a vyhlášky	280
15.2	Komentář k zákonu o GMO	281
15.2.1	Koho se zákon č. 153/2000 Sb. bezprostředně týká?	283
15.2.2	Registrace uživatelů	283

15.2.3 Uzavřené nakládání s geneticky modifikovanými vyššími rostlinami	284
15.2.4 Uvádění do životního prostředí	286
15.2.5 Uvádění do oběhu	287
15.2.6 Registrace	287
15.2.7 Odborný poradce	288
15.2.8 Provozní řád pracoviště	289
15.2.9 Dokumentace	289
15.2.10 Hodnocení rizika	290
15.2.11 Havarijný plán	290
15.2.12 Sankce	290
15.2.13 Komise pro nakládání s geneticky modifikovanými organizmy a produkty	292
15.2.14 Informování veřejnosti	292
Závěr	292
16 TRANSGENNÍ ODRŮDY A POTRAVINY (M. Ondřej)	294
16.1 Transgenní odrůdy	294
16.2 Transgenní sója	294
16.3 Detekce transgenů v potravinách a surovinách	298
16.3.1 Kvantitativní hodnocení příměsí transgenů v rostlinném materiálu	300
Závěr	300
17 SLOVNÍČEK POJMŮ (M. Ondřej)	302
Rejstřík	312