



# SVĚT BIOTECHNOLOGIÍ

Toto speciální číslo **bulletinu SVĚT BIOTECHNOLOGIÍ** vzniklo ve spolupráci členů BIOTRINU, z.s. a pracovníků Vysoké školy chemicko-technologické v Praze k příležitosti konání mezinárodní konference „**Nové techniky šlechtění (NBT) – naděje pro zemědělství a potravinový řetězec**“ v Praze dne 13. září 2018.

## OBSAH

Stanovisko BIOTRINU k NBT ..... str. 1	Tabák ..... str. 10
Úvod ..... str. 2	Jablka a banány ..... str. 11
Kukuřice ..... str. 3	Nehnědnoucí žampion ..... str. 12
Rýže ..... str. 4	Rozdílný postoj EU a USA k NBT ..... str. 13
Brambory ..... str. 5	Pohled na NOVÉ techniky šlechtění ..... str. 13
Pšenice a ječmen ..... str. 7	Kolik dalších vítězství ještě přežije naše příroda? ..... str. 15
Rajče ..... str. 8	

## Stanovisko BIOTRINU k novým technikám šlechtění (NBT)

BIOTRIN z.s. považuje nové techniky šlechtění (NBT) za neocenitelný nástroj šlechtitelů v dnešní době. Jsme přesvědčeni, že aplikace produktů NBT je nezbytným předpokladem moderního zemědělství, založeného na nižších vstupech, zjednodušených a bezpečnějších pracovních postupech, zdravějších produktech a šetrnějším přístupu k životnímu prostředí. BIOTRIN jednoznačně podporuje praktické využití produktů NBT v zemědělství a navazujících oblastech.

Z tohoto pohledu proto nemůžeme podpořit nedávné rozhodnutí Evropského soudního dvora (ESD), které produktům NBT přisuzuje stejně přísný, dnes již rigidní až nefunkční, schvalovací proces jako u geneticky modifikovaných organismů (GMO). Právě naopak, rozhodnutí ESD odmítáme a považujeme jej za špatné.

Jedinou možností do budoucna je tak, dle našeho názoru, změna celého konceptu regulace GMO v EU. Evropští zákonodárci by měli reflektovat vědecké i praktické poznatky získané za dvě dekády, kdy jsou současné GMO široce používané. Nový koncept by se měl více zaměřit na nové vlastnosti a nikoliv na použitou techniku, protože z dosavadního vývoje je zcela zřejmé, že technika nemá pro bezpečnost nijak zásadní vliv a navíc se techniky stále vyvíjejí a mění. Změna legislativy je v zájmu evropských pěstitelů, ochránců přírody, akademických pracovišť, malých i velkých šlechtitelských organizací, ale i spotřebitelů.

Domníváme se, že nyní nastal čas na radikální změnu v přístupu k moderním biotechnologiím, pokud Evropa nechce sama sebe chytit do pasti a stát se zcela závislou na dodávkách potravin a krmiv ze třetích zemí!

## Úvod

Lidská populace každým rokem vzrůstá, což se projevuje mimo jiné i zvýšenými nároky na objem i kvalitu potravin. Spektrum kulturních rostlin, které jsou jedním z pilířů zemědělství, je klasickým šlechtěním po staletí obohacováno o nové kultivary plodin či o plodiny zcela nové. Od konce minulého století je navíc rozšiřováno i o geneticky modifikované (GM) plodiny.

Příprava mutantů plodin pomocí fyzikálních veličin nebo chemických genotoxinů má poměrně dlouhou tradici. Tyto faktory přimějí buňky k opravě poškození DNA chybným způsobem. V případě mutace radiací se v genomu náhodně indukují zlomy řetězců DNA, což ve velmi vzácných případech vede k žádoucímu fenotypu.

Použití moderních genetických metod - syntetických, místně řízených nukleas (SDN), jako jsou systém CRISPR/Cas9, zinkové prsty a TALENy, umožnilo vědcům používat přesně tytéž přirozeně se vyskytující mechanismy reparace DNA pro řízenou indukci opravy na předem vybraných místech genomů.

To se týká oprav indukovaných zlomů a zahrnuje opravu nehomologickým spojením konců (NHEJ) a homologní rekombinací (HR).

Při NHEJ mohou být řetězce spojeny nepřesně, může tedy nastat mutace v podobě inserce nebo delece báze (indel), čímž dojde k posunu čtecího rámce, jehož výsledkem je vyřazení genu z funkce (tzn. *knock out* či umlčení genu). HR vyžaduje přítomnost homologních sekvencí a umožňuje nejen delecii či inserci několika párů bází, ale také přenosy větších úseků (např. celý gen) do místa zlomu a opravy podle opravného templátu. Ke změně většího úseku cílové DNA dochází jen v případě, že opravný templát obsahuje homologní i vkládanou sekvenci.

Změny v genomu hostitele tedy nemusí nutně souviset s trvalou integrací cizí DNA, hlavně při úpravách krátkých úseků, tzn. editaci. Přesný zásah docílený použitím SDN, např. bodová mutace, nemusí být odlišitelný od mutace přirozené.

Kromě SDN jsou mezi nové techniky šlechtění (NBT) řazeny také cisgenozé/intragenozé; agroinfiltrace např. metodou Floral dip, což je ponoření květenství s poupaty do suspenze bakterie *Agrobacterium*; epigenetické změny

metylací DNA prostřednictvím malých RNA (RdDM); grafting např. roubování non-GM roubů na GM podnože; reverzní křížení, tedy eliminace crossing-overů v průběhu meiózy vybraných heterozygotů; cílená mutagenese pomocí oligonukleotidů (ODM) a syntetická genomika. Některé z technik, které nevkládají do genomu hostitelské buňky cizorodou DNA, bývají označovány jako "transgene-free".

Cílená editace genomů prostřednictvím člověkem vytvořených nukleas SDN má potenciál urychlit základní výzkum i šlechtění rostlin, protože poskytuje prostředky na rychlou, přesnou a očekávanou (predikovanou) změnu. Technika CRISPR/Cas známá od roku 2012 je navíc relativně levná, a tedy dostupná i pro menší laboratoře a firmy.

Rozdíl mezi použitím NBT metod je jako řízení auta s nebo bez GPS navigace. Použití ve šlechtění rostlin má potenciál vytvořit nové plodiny, např. odolné vůči stresu (např. suchu), se sníženými dopady na životní prostředí, jelikož bude potřeba menšího množství přírodních zdrojů a pesticidů.

### Přehled nových technik šlechtění rostlin

editace genomu (CRISPR/Cas9, zinkové prsty, TALENy)
cisgenozé/intragenozé
agroinfiltrace
grafting (např. roubování non-GM roubů na GM podnože)
epigenetické změny metylací DNA prostřednictvím malých RNA (RdDM)
reverzní křížení
cílená mutagenese pomocí oligonukleotidů
syntetická genomika

Aktuální číslo časopisu Svět biotechnologií je zaměřeno na problematiku nových technik šlechtění (NBT). Shrnuje současné výsledky analýz rostlinných genomů upravovaných prostřednictvím těchto technik, diskutuje možné aplikace při pěstování rostlin a zvažuje další potenciální vývoj a benefity NBT nejen v zemědělství.

Úvodní článek a články k jednotlivým plodinám připravily **Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D.** a **Ing. Simona Lencová**, odbornice z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze a členky BIOTRINU, z.s.

## Kukuřice

Kukuřice (*Zea L.*) je jednou z nejčastěji pěstovaných zemědělských plodin na světě. Je používána jako krmivo pro hospodářská zvířata, k lidské obživě, pro výrobu biopaliv a také jako důležitá průmyslová surovina, kdy škrob z ní je využíván v papírenství, stavebnictví nebo farmaceutickém průmyslu.

V rámci obchodu je klasifikována do pěti kategorií – kukuřice dent (slouží k výrobě potravin, krmiv a průmyslových výrobků), flint (tvrdá kukuřice používaná ke stejným účelům jako kukuřice dent), kukuřice cukrová (vhodná ke kuchyňskému zpracování, konzumuje se čerstvá, konzervovaná nebo zmrazená), popcorn (má zrna s tvrdým endospermem, který při zahřátí na vysokou teplotu puká) a kukuřice moučná (měkká kukuřice, slouží k výrobě tortil, chipsů a specializovaných pekařských výrobků).

Vzhledem k tomu, že kukuřice patří mezi základní plodiny, šlechtitelé jí věnují velkou pozornost. Nejdříve zaznamenala úspěchy jako geneticky modifikovaná plodina, zejména svojí odolností vůči zavíječi kukuřičnému nebo tolerancí k neselektivním herbicidům.

Nyní se prosazuje i v oblasti nových technik šlechtění. Její výtěžnost závisí na rovnováze v zásobování a transportu sacharózy z listů do semen, která je ovlivněna tzv. SWEETS – regulující skupinou cukrů.

Role genů kódujících tyto cukry byla prokázána v německé studii publikované tohoto roku v časopise *New Phytologist*, v níž vědci některé z těchto genů vyřadili z provozu pomocí metody CRISPR/Cas9. Narušením metabolismu cukrů dokázali, že dochází ke změnám agronomických vlastností rostlin.

Technika CRISPR/Cas9 byla uplatněna i ve studii zaměřené na porozumění přizpůsobení kukuřice různým zeměpisným podmínkám. Vědci z Čínské zemědělské univerzity se zaměřili na dobu květu, která je klíčovým faktorem adaptace plodin na místní prostředí, a objasnili, jak se kukuřice přizpůsobuje různým zeměpisným šířkám. Metodou CRISPR/Cas9 vyřadili gen *ZmCCT9*, který reguluje kvetení a umožňuje tak kukuřici přizpůsobit se dané oblasti, a analýzou získaných mutantů odhalili jeho přímý vliv na kvetení rostlin, tedy i na adaptaci v rozdílném prostředí.

Přestože technika CRISPR/Cas9 je zřejmě nejčastěji zmiňovanou novou technikou šlechtění, ve spojitosti s kukuřicí se objevují i jiné metody. Technika zinkových prstů, založená na principu specifické vazby zinkových prstů na řetězec DNA, a mutageneze řízená oligonukleotidy, umožňující zavést mutaci přímo do požadované oblasti sekvence DNA, jsou metody využívané např. k získání tolerance kukuřice k herbicidům.

Další významnou oblastí výzkumu šlechtění kukuřice je samčí sterilita této plodiny. Za tímto účelem je uplatňována zejména metoda RNA-dependentní DNA metylace využívaná dále i při šlechtění osiva rýže, bavlníku nebo některých druhů zeleniny. Jedná se o epigenetický proces, tedy proces ovlivňující fenotyp, ale nepodmiňující změny genotypu. Princip metody je založen na inaktivaci genů prostřednictvím zabránění transkripce DNA.

Samčí sterilita je u plodin významná zejména z hlediska křížení odrůd a lze díky ní získat velké množství kříženců s často vyššími výnosy, než mají jejich rodičovské odrůdy.

Z tohoto stručného výčtu aplikací nových technik šlechtění do výzkumu kukuřice je patrné, že kukuřice je pro vědce velmi atraktivní plodinou. Velkou výzvou do budoucna bude jistě např. i problematika stravování, v němž je kukuřice dominantním zdrojem živin. Vzhledem k nízké kvalitě proteinů v ní obsažených totiž může docházet k podvýživě a rozvoji pellagry – systémového onemocnění vyvolaného nedostatkem vitamínu B3. Nové techniky šlechtění jsou však velkou nadějí, že i tento problém bude jednou vyřešen.

Zdroje:

<https://www.britannica.com/plant/corn-plant>

<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nph.15021>

Cheng Huang et al.: *ZmCCT9 enhances maize adaptation to higher latitudes*; *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jan 2018, 115 (2) E334-E341; DOI: 10.1073/pnas.1718058115

<https://www.cabi.org/agbiotechnews/19454>

## Rýže

Rýže (*Oryza*) je jednou ze základních potravin, které zná lidstvo od nepaměti. Z území dnešního Thajska, kde se pravděpodobně začala několik tisíc let před naším letopočtem pěstovat, se postupně rozšířila do Číny a Indie. Dnes ji už všichni známe jako jednu z nejpěstovanějších a nejdostupnějších potravin po celém světě. Běžně konzumujeme nejen rýži surovou, ale i velké množství výrobků z ní jako rýžový chléb, nudle nebo japonské víno saké.

Rýže je důležitou plodinou zejména pro rozvojové země, kde v mnoha případech představuje jediný zdroj energie a obživy pro obyvatele. I z toho důvodu se stala předmětem zájmu mnoha šlechtitelských projektů, které se jí snaží obohatit o různé, zdraví prospěšné látky. Je základní potravinou pro stále se rozšiřující světovou populaci a zároveň se stala klíčovým modelem studia genomiky agroekosystémů.

Tato dvojrole rýži staví do centra dění současné největší výzvy, jíž čelí zemědělství: jak efektivně využívat genomiku pro účel produkce dostatečného množství potravin, které by nasýtily rozrůstající se populaci. Rýže a změny její genetické informace jsou tak předmětem zájmu mnoha výzkumných týmů po celém světě.

V minulých letech se do popředí zájmu odborníků, laiků i médií dostala tzv. zlatá rýže. Žádná z geneticky modifikovaných plodin neprošla dosud tak dlouhým schvalovacím procesem jako právě zlatá rýže obohacená o provitamin A. Během celé doby od vývoje zlaté rýže až po její schválení se stala pomyslným symbolem soupeření mezi zastánci a odpůrci GM plodin i přesto, že se jí nedalo morálně téměř nic vytknout.

Dalším významným příkladem výzkumu rýže může být tzv. Green super rice (GSR), tedy zelená super-rýže. Jedná se o klimaticky odolné odrůdy rýže s vysokými a stabilními výnosy, které jsou zároveň méně náročné na vstupní podmínky pro růst, jako jsou dostatek vody, hnojiva a pesticidy, díky čemuž přispívají i k ochraně životního prostředí.

Tento typ rýže je jedním z hlavních konceptů Global Rice Science Partnership (GRISP) – plánu na zlepšení mezinárodních partnerství v oblasti výzkumu rýže, jejich dodávkách a

zajištění pěstování rýže ekologicky udržitelným způsobem. Za poslední roky, kdy byla výzkumu GSR věnována značná pozornost, byly vyvinuty a vysázeny kultivary s požadovanými vlastnostmi (např. odolnost proti suchu a chorobám nebo účinnější využívání dusíku) v rozsáhlých oblastech Číny a v dalších asijských zemích a do získání větších výnosů potravy s nižšími náklady je vkládána velká naděje.

Zlatá rýže a zelená super-rýže jsou jen příklady z mnoha výzkumů rýže za poslední dobu, a to i díky tomu, že mnoho studií o nových technologiích, tedy i nových technikách šlechtění, pochází z vědeckých institucí v Asii, kde je právě rýže dominantní plodinou.

Vědci se zaměřili zejména na využití metody CRISPR-Cas9 při výzkumu např. odolnosti rýže vůči patogenům, tvorby pylu u rýže nebo snížení hladiny toxického arsenu, který se akumuluje v rýži a představuje tak značné zdravotní riziko pro spotřebitele.

Dalším příkladem využití techniky CRISPR-Cas9 je zlepšení příjmu dusíku, fosforu a draslíku, díky čemuž lze snížit používání hnojiv, která jinak zabezpečují výživu rýže těmito esenciálními látkami.

Metodou CRISPR byla také odhalena role kyseliny abscisové u rýže odolné vůči chorobám. Mutanty lézí vykazují spontánní buněčnou smrt, a je tedy možné je studovat s cílem porozumění mechanismu buněčné smrti a odolnosti vůči nemocem. Tyto mutanty byly již u rýže charakterizovány, avšak vztah mezi jejich tvorbou a kyselinou abscisovou (ABA) dosud objasněn nebyl.

Vědci ze Zemědělské univerzity Sichuan v Číně metodou CRISPR/Cas9 vyřadili gen OsABA2 nezbytný pro syntézu ABA a odhalili, že při nedostatku kyseliny abscisové dochází k úmrtí buněk. Ve studii zároveň poskytli důležité poznatky o roli ABA v rezistenci rýže vůči chorobám.

Tým vědců z Čínské akademie věd se zaměřil na využití metody CRISPR-Cas9 při vývoji "lepkavé rýže" - druhu rýže se sníženým obsahem amylozy a zvýšenou lepkavostí, která je mezi zákazníky v jihovýchodní a východní Asii velmi žádaná.

Vědci využili faktu, že v rýži je obsah amylozy regulován pouze jedním dominantním voskovitým genem (*waxy* gene). Technikou CRISPR/Cas9 tento gen vyřadili ve dvou



rozšířených odrůdách rýže a dosáhli tak redukce amylózy v obou odrůdách bez jakýchkoliv nežádoucích vedlejších efektů. Podařilo se jim tak vyvinout efektivní a relativně snadnou strategii zlepšení lepkavosti rýže.

Dalším zajímavým příkladem je využití editace genomu při výzkumu rýže, která by byla odolnější vůči nepříznivým podmínkám růstu, a to nedostatku vody a vyššímu obsahu soli v půdě.

Vědci se ve výzkumu zaměřili na enzym 1-pyrrolin-5-karboxylát syntetázu (P5CS), který má klíčovou roli v cyklu biosyntézy prolinů, vztahující se k odezvě rostlin na vyšší zátěž a slanost prostředí. Tato úspěšná studie vietnamských vědců tak položila základy pro vývoj odrůd rýže, jež by dosahovaly vysokých výnosů i v suchu a v půdě s vysokou salinitou.

Vědci mimo jiné dokázali také ovlivnit výšku rostlin a obsah škrobu technikou zinkových prstů, díky níž je možné cíleně a přesně zasáhnout do dědičné informace rostlin a vystříhnout vybraný gen nebo jej nahradit upravenou kopií.

Zdroje:

<https://www.britannica.com/plant/rice>

WING, R. A. et al. 2018. The rice genome revolution: from an ancient grain to Green Super Rice. *Nature Reviews Genetics*, 19, 505-517.

<http://irri.org/news/media-releases/green-super-rice-is-coming>

<https://doi.org/10.1093/jxb/erx458>

<https://doi.org/10.1007/s00299-018-2265>

Ye Y, Li P, Xu T, et al. OsPT4 Contributes to Arsenate Uptake and Transport in Rice. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:2197. doi:10.3389/fpls.2017.02197.

[http://etheses.whiterose.ac.uk/20489/1/Nahed%20Mohammed\\_Final%20Thesis\\_18.05.18.pdf](http://etheses.whiterose.ac.uk/20489/1/Nahed%20Mohammed_Final%20Thesis_18.05.18.pdf).

Liao Y et al. (2018) Mutation in Rice Abscisic Acid2 Results in Cell Death, Enhanced Disease-Resistance, Altered Seed Dormancy and Development. *Front. Plant Sci.* 9:405. doi: 10.3389/fpls.2018.00405

[http://www.tapchikhoahocnongnghiep.vn/uploads/news/2017\\_11/3\\_1.pdf](http://www.tapchikhoahocnongnghiep.vn/uploads/news/2017_11/3_1.pdf)

<https://doi.org/10.1007/s12257-017-0420-9>

Zhang J et al. (2018) Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. *J Integr Plant Biol* 60: 369–375

## Brambory

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) je jednou z nejdůležitějších zemědělských plodin. V České republice je pěstováno asi deset osvědčených zemědělských odrůd. Celkem je však známých více než 1000 odrůd a převážná většina z nich je tetraploidních. Brambor byl šlechtěn klasickými metodami, prostřednictvím metod transgenozy byly připraveny GM brambory s insekticidními vlastnostmi, odolné vůči virům nebo se změněným obsahem škrobů (např. zvýšení obsahu amylopektinu).

Cisgenní brambor odolný proti plísni bramborové (*Phytophthora infestans*), která může při napadení způsobit až 90% ztráty úrody, byl připraven vložením několika přirozených genů rezistence s různými spektry účinku.

V práci výzkumníků z centra ve Wageningenu (WUR) byly do tří kultivarů bramboru vloženy dva širokospektrální geny rezistence v různých kombinacích, Rpi-sto1 a Rpi-vnt1.1 z křížitelných druhů *Solanum stoloniferum* a *Solanum venturii* použitím agrobakteriální transformace. Bylo selektováno osm rostlin rezistentních k plísni bramborové, které neobsahovaly gen rezistence k antibiotiku (tzn. marker-free).

V roce 2015 Wang s kolegy použili systém CRISPR/Cas9 k úspěšnému vyřazení činnosti genu kódujícího phytoen desaturasu (PDS) bramboru, práce poskytla vynikající protokol pro jednoduchou editaci genomu umožňující studium funkce genů bramboru.

Ve své práci použili bramborový promotor U6 (StU6P) pro expresi naváděcí sgrRNA s cílovou sekvencí dlouhou 20-bp uvnitř genu kódujícího PDS tabáku, upravenou kódující sekvencí SpCas9 rýže řízenou CaMV 35S promotorem v binárním plasmidu.

Prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens* knockoutovali gen PDS v tabáku bez prokázaných necílových zásahů, čímž potvrdili vhodnost bramborového U6 promotoru jako řídicí sekvence pro transkripci naváděcí sgrRNA v tabáku *N. benthamiana*.

Poté testovali, zda se knockout podaří i v bramborách, kde si jako cílový úsek vybraly 2. exon *StIAA2* genu kódujícího Aux/IAA protein. Získaly 12 rostlin, Cas9 byl transkribován ve všech těchto rostlinách. Šest

roślin dále testovali a potvrdili delece 2 až 18-bp dlouhých úseků v cíleném místě zlomu bez necílových mutací.

Systém CRISPR/Cas9 byl tedy použit jako účinný nástroj pro funkční studie necharakterizovaných genů bramboru.

Aplikační použití SDN na sebe nenechalo dlouho čekat, v roce 2017 byl publikován článek japonských vědců, kteří použili techniku CRISPR/Cas9 ke knockoutu genu *CYP88B1*.

Gen *CYP88B1* se podílí na pozdějším kroku biosyntézy steroidních glykoalkaloidů. Steroidní glykoalkaloidy (SGA) jsou toxické metabolity, které se vyskytují u rostlin z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Jedním z nich je i solanin, který se přirozeně vyskytuje v bramborách či rajčatech. Upravené brambory nevykazovaly akumulaci SGA, což ocení nejen pěstitelé, ale i spotřebitelé.

Pomocí NBT mohou být úspěšně potlačeny i jiné nežádoucí vlastnosti u rostlin, například enzymové hnědnutí brambor způsobené oxidací v přítomnosti vzdušného kyslíku, které trápí nejen zpracovatele brambor.

Hnědnutí rostlin se snažili v minulosti řešit zemědělci tradičními způsoby šlechtění, například šlechtění odrůd s nižším obsahem fenolů. Pomocí CRISPR/Cas9 byl úspěšně knockoutován gen kódující polyfenol oxidasu (PPO), výsledkem byly „nehnědnoucí“ hlízy.

Prostřednictvím CRISPR/Cas9 v roce 2017 švédští a italské vědci úspěšně editovali protoplasty tetraploidního bramboru ve všech čtyřech alelách v jediné transfekci ve dvou procentech regenerovaných linií. Jako cílové místo pro zlom vytvořený SDN byly vybrány tři odlišné oblasti genu kódujícího enzym GBSS (synthasa škrobu vázaná na granule).

Většina mutací vedla k malým indelům v rozmezí délky 1 až 10 bp, ale v některých analyzovaných liniích byly nalezeny delší inserce vektorové DNA (34 až 366 bp). Nebyly však nalezeny žádné mutace v alele lišící se jen v jedné jediné bázi od použité cílové sekvence, ke které byla vytvořena naváděcí sekvence RNA použité SDN.

Takto specifické štěpení ve vybraném cílovém místě genomu bylo dosaženo i v jiných rostlinách, což potvrzuje, že je nezbytná vysoká homologie mezi naváděcí sekvencí SDN a cílovou sekvencí, nutná je rovněž i blízkost krátkého sekvencního motivu PAM.

Úplné potlačení enzymové aktivity GBSS bylo docíleno při mutaci všech čtyř alel, což bylo potvrzeno genomovou analýzou i fenotypovými studiemi složení škrobu. Jedna původní alela divokého typu (WT) byla prokázána jako dostatečná pro udržení enzymové aktivity GBSS vedoucí k produkci významného množství amylozy.

Jin Ma s kolegy použili *Agrobacterium* pro účinnou aplikaci dvou TALENů pro editaci dvou vegetativně rozmnožených kultivarů bramboru. TALENy byly cíleny na dvě sekvence, a to větvičí enzym (tvorba amylopektinu) a invertasu.

Infiltrované listy byly analyzovány pomocí testu ztráty restričního místa v cílové sekvenci a sekvenováním. Sekvenování tetraploidních kultivarů bylo také provedeno pro kontrolu zygoty cílových chromozomálních lokusů. Oba TALENy byly úspěšně agrofiltrovány a indukovaly mutace v obou cílových místech.

V letošním roce byly publikovány výsledky výzkumu Mariette Andersson a kolegů ze Švédské univerzity, kteří provedli editaci genomu protoplastů brambor bez použití DNA.

K editaci použili komplex ribonukleoproteinů CRISPR/Cas9 (RNP), který byl cílen na gen kódující enzym GBSS, což je enzym nutný pro syntézu amylozy. Jeho vyřazení z funkce má za následek vznik škrobových zrn složených pouze z amylopektinu. Metoda RNP byla provedena pomocí dříve vyvinutých protokolů izolace, transfekce a regenerace protoplastů bez dalších úprav, použit byl komplex proteinu Cas9 s RNA produkovanou synteticky nebo *in vitro* transkripcí.

Při použití RNP se synteticky produkovanými RNA (cr-RNP) byly indukovány indely s frekvencí až 9 %, přičemž všechny mutované linie byly bez transgenu (transgene-free). Při použití RNP s *in vitro* transkribovanou RNA bylo dosaženo vyšší frekvence zásahů (25 %). Avšak více než 80 % výhonů s potvrzenými mutacemi mělo nezamýšlené inserce DNA v místě zlomu, které pocházely jak z DNA zbytků templátu z *in vitro* transkripce, tak z chromozomální DNA bramboru. U 2-3 % regenerovaných výhonků z experimentů používajících RNP byly indukovány mutace ve všech čtyřech alelách, což vedlo k úplnému vyřazení enzymové aktivity GBSS.

Představa bramboru odolnějšího vůči plísni bramborové či jiným chorobám, se sníženým obsahem solaninu či prodlouženou trvanlivostí je jistě lákavá. Metodiky NBT umožňují vylepšení bramboru bez vložení cizorodé DNA a to přesnějším, rychlejším a účinnějším způsobem, není však jisté, zda by se takové brambory dočkaly přijetí spotřebiteli v EU.

Zdroje:

<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/14/50>

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-015-1816-7>

[https://doi.org/10.18978/jsrnp.52.2\\_92](https://doi.org/10.18978/jsrnp.52.2_92)

<https://inta.gob.ar/noticias/modifican-el-gen-que-provoca-que-la-papa-se-ponga-negra>

<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>

<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11816-017-0448-5>

<https://doi.org/10.1111/ppl.12731>

## Pšenice a ječmen

V České republice jsou obiloviny pěstovány na více než 50 % osevní plochy, dvě nejvýznamnější obiloviny jsou pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmen (*Hordeum vulgare* L.). Pšenice obsadila první příčku v žebříčku nejrozšířenějších zemědělských plodin na světě, ječmen je na čtvrté příčce za rýží a kukuřicí.

Obě tyto obiloviny mají v lidské výživě nezastupitelnou roli. Pšenice, jakožto jedna z nejstarších kulturních rostlin, má široké možnosti využití, je oproti jiným obilovinám snadno skladovatelná a má poměrně dlouhou trvanlivost. Co je však u pšenice nejvíce podstatné, je její vysoká nutriční hodnota. Pšenice tak v Evropě postupně vytěsnila konzumaci ječmene, jež u nás slouží primárně jako krmivo hospodářských zvířat a k získání sladu pro výrobu piva.

Rozluštění genomu pšenice i ječmene bylo pro vědce tvrdým oříškem. Obě tyto plodiny mají dlouhý genom, ječmen téměř 5 miliard bází, pšenice obsahuje dokonce téměř 17 miliard bází. Proto, i v dnešní době, kdy jsou sekvenace ve výzkumných i aplikačních laboratořích používány rutinně, trvalo čtení primární sekvenace genomu několik let.

Kompletní primární sekvenace ječmene byla zveřejněna v prestižním vědeckém časopise

Nature v roce 2017, v roce 2018 byla po třinácti letech výzkumu v časopise Science publikována sekvenace genomu pšenice seté.

Na sekvenacích se podílelo mnoho významných laboratoří, jednou z nich byla i výzkumná laboratoř olomouckých vědců z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR. Rozluštění celé dědičné informace bude mít velký význam pro moderní šlechtění obilovin.

Znalost primární sekvenace bude velmi užitečná zejména pro šlechtitele, jimž by mohla pomoci urychlit vývoj „vylepšených“ odrůd. Díky znalosti genomu je možné snáze určit funkci jednotlivých genů, a tedy také identifikovat geny zodpovědné za ovlivnění výše výnosu, kvality zrna, odolnosti rostlin vůči suchu, chorobám a škůdcům.

Kromě benefitů pro zemědělce může mít velký přínos i v medicíně, kde může pomoci s léčbou celiakie nebo některých alergií způsobených přítomností zásobních proteinů v pšenici. Vědci již během výzkumu identifikovali přes 300 genů, které jsou odpovědné za syntézu takových proteinů. Díky tomu tak odhalili množství potenciálně škodlivých proteinů v pšenici a mohou šlechtit takové odrůdy, v nichž se tyto proteiny budou vyskytovat v menší míře.

Funkce mnohých genů obilovin jsou známy již dlouho, přestože primární sekvenace celého genomu byly přečteny nedávno. Některé z těchto genů byly cílem odborníků, kteří ve svých laboratořích již NBT používají. Systém CRISPR/Cas9 byl úspěšně použit v práci Upadhyay a kol. (2013) pro editaci genu kódujícího inositoloxigenasu (*inox*) a phytoen desaturasu (*pds*) za použití buněčné suspenzní kultury pšenice a v genu *pds* v listech tabáku (*Nicotiana benthamiana*).

Nové techniky šlechtění byly v posledních letech uplatněny i v mnoha dalších výzkumech zaměřených na pšenici a ječmen. V roce 2014 byl publikován protokol pro výběr cílových míst, jakož i návrh, konstrukce, ověření a použití naváděcí RNA pro sekvenčně specifickou CRISPR/Cas zprostředkovanou mutagenezi a cílenou editaci genů rýže a pšenice.

Tento protokol popisuje rychlou metodiku editace, kdy modifikované rostlinné protoplasty mohou být získány v průběhu

jednoho až dvou týdnů, regenerované rostliny pak v průběhu 13-17 týdnů.

Velice citovaná je studie publikovaná v témže roce v časopise *Nature Biotechnology*, popisující metodiky CRISPR i TALEN pro úpravy polyploidních plodin, mezi které patří řada hospodářsky významných rostlin, jako jsou obiloviny, bavlník, tabák, vajtěška či banánovník.

Ve studii byly CRISPR a TALEN použity pro modifikaci tří homoallelů, které kódují proteiny tzv. Mildew-resistance lokusu (MLO) v genomu hexaploidní pšenice. Modifikace měla vést k odolnosti k plísním, která se nevyskytuje v přirozené populaci. Indukovaná modifikace všech tří úseků byla provedena metodou TALEN a přinesla dědičnou širokospektrální odolnost proti plísním.

Protokol popisující knockout cílových genů prostřednictvím CRISPR/Cas9 v ječmeni byl publikovaný v roce 2015. Autoři studie cílili na vícekopiové geny, konkrétně v ječmeni na dvě kopie HvPM19 a pozorovali mutace indukované v první i dalších generacích, které se projevovaly změnou fenotypu a to tak, že modifikované rostliny byly zakrnělé.

Optimalizace publikovaných protokolů stále probíhají. V roce 2017 byla v časopise *Nature Communication* publikována efektivní metodika předcházející integraci transgenů (transgene-free pšenice) a redukující množství necílových zásahů.

V letošním roce byla publikovaná práce výzkumného týmu z Kansaské státní univerzity, který aplikoval konstrukci MGE vytvořenou kombinací tandemově uspořádaných jednotek tRNA-gRNA pro generování dědičných mutací ve třech genech genomu hexaploidní pšenice. Konkrétně se jednalo o geny TaGW2, TaLpx-1 a TaMLO a mutace vedly k podstatnému zvětšení semen. Výsledky studie ukazují, že transgenerační genová editační aktivita může sloužit jako zdroj nových změn v potomstvu rostlin exprimujících CRISPR/Cas9 a naznačuje, že zlepšení plodiny může být dosaženo křížením cílových rostlin s rostlinami exprimujícími konstrukty pro editaci genomu.

Ve výčtu aplikací NBT ve výzkumu obilovin by bylo možné pokračovat, avšak pro představu je z tohoto přehledu patrné, jak velká pozornost vědců z celého světa je na ně zaměřena. Vzhledem k tomu, že se jedná o

plodiny s klíčovým významem pro obživu lidstva, dá se očekávat, že ani v příštích letech se zájem výzkumných týmů nebude snižovat.

Zdroje:

<https://www.nature.com/articles/sdata201744>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122057>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232936>  
<https://www.nature.com/articles/nbt.2969>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26616834>  
<https://doi.org/10.1038/ncomms14261>  
<https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>

## Rajče

Rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.) se pěstuje téměř ve všech zemích světa. Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je devátou nejvíce pěstovanou plodinou, ročně jsou ve světě sklizeny milióny tun rajčat a největším pěstitelem je Čína s 30 % světové produkce.

Rajče je ideálním kandidátem pro ověřování efektivity i vylepšování pracovních postupů metodiky CRISPR/Cas v krytosemenné plodině, a to díky několika faktorům, kterými jsou dostupnost efektivní metody transformace, diploidní genom, známá primární sekvence genomu (Tomato Genome Consortium, 2012) a také pro jeho ekonomický význam zahrnující použití čerstvých i zpracovaných plodů.

V roce 2014 popsali Brooks s kolegy editaci genomu rajčete prostřednictvím CRISPR/Cas9 *Agrobacterium tumefaciens* zprostředkovanou transformací. Jako cílový úsek si zvolili 2. exon rajčatového homologu genu huseníčku ARGONAUTE7 (SIAGO7), který je vyžadován pro tvorbu malých krátkých interferenčních RNA (tasiRNA) regulujících polaritu orgánů post-transkripčním umlčením faktoru ARF. Argonaut je označení pro proteiny, které jsou součástí ribonukleoproteinu RISC eliminujícího translaci cílové molekuly mRNA.

Mutace vedoucí ke ztrátě funkce tohoto genu jsou recesivní a způsobují změnu tvaru listů, které se protahují tak, že připomínají jehly nebo drátek. To vede k tomu, že první mutantní rostliny mají listy bez řapíků, později vytvořené listy postrádají čepele. Tyto charakteristické fenotypy umožňují okamžitou identifikaci rostlin, ve kterých byly mutovány alely SIAGO7.



Brooks s kolegy infiltrovali 29 rostlin (T0), 14 (48 procent) z nich mělo charakteristické znaky změny listů. U sedmi z nich, které byly dále analyzovány, byly prokázány delece. Jedna rostlina byla homozygotní s delecí úseku dlouhého 90-bp, dvě další rostliny byly chimerické s různě dlouhými delecemi, jedna rostlina byla bialeická se dvěma delecemi neočekávaných délek. Ve studii byla rovněž studována dědičnost navozené delece do dalších generací rostlin, a bylo potvrzeno, že CRISPR/Cas9 indukovaná mutace v rajčeti byla stabilně přenášena zárodečnou linií.

V roce 2015 japonští vědci editovali gen RIN, který kóduje faktor transkripce MADS-box regulující zrání plodů. Výzkumníci cílili naváděcí RNA na tři oblasti RIN genu, vzniklé mutace obsahovaly buď inzerci jedné báze nebo deleci více než tří bází v místech štěpení SDN Cas9 v regenerovaných rostlinách T0.

Mutanty s defektním proteinem RIN produkovaly nezralé plody, méně červené než plody původních rostlin (divoký typ). Heterologní mutanty exprimující (alespoň částečně) RIN protein dosáhly plné zralosti a červené barvy, potvrzující důležitou roli RIN proteinu ve zrání plodů. Mutace generované ve všech třech nezávislých cílových místech, byly zděděny do T1 potomstva, což potvrdilo použitelnost tohoto systému pro modifikace rajčat.

Z vědeckých databází SCOPUS a Web of science (WOS) je patrné, že od roku 2016 jsou publikovány články o použití SDN pro modifikace genomu rajčat převážně čínskými vědeckými týmy.

V roce 2016 byla publikována studie, v níž je popsána cílená mutagenese dvou genů rajčat, *SIP4* a *SIPDS*, metodu transformace zprostředkovanou *A. tumefaciens*. Gen *SIP4* kóduje transkripční faktor PIF4, *SIPDS* pak phytoen desaturasu (PDS), klíčový enzym biosyntézy karotenoidů a chlorofylu, umlčováním genu *SIPDS* způsobí vybělování (fotobleaching) nebo vznik albino fenotypu.

Byla pozorována vysoká frekvence mutací (průměr 84 %), většina detekovaných mutací byla delece jednoho až tří nukleotidů, následovaná insercí jedné báze, mutace v necílových místech nebyly prokázány, cílové mutace v liniích T0 byly stabilně přenášeny na generace T1 a T2 bez nových změn.

Četné studie se soustředí na přípravu rajčat se zvýšenou akumulací lykopenu, tj. rajčat, která by byla zdravější a červenější. Čínští vědci si při přípravě takovýchto plodů zvolili strategii využívající modifikace podporující biosyntézu lykopenu společně s inhibicí přeměny lykopenu na karoteny.

Lykopen je červené barvivo rostlin s antioxidačním účinkem, snižuje hladinu cholesterolu, výskyt kardiovaskulárních a vznik nádorových onemocnění, podporuje imunitní systém a chrání kůži před vlivem škodlivého UV záření.

Akumulace lykopenu bylo docíleno knockoutem genů spojených s karotenoidovou metabolickou cestou. Byla využita transformace prostřednictvím *Agrobacterium*, CRISPR/Cas9 editoval pět cílových úseků, čímž se podařilo zvýšit obsah lykopenu přibližně 5,1krát. Homozygotní mutace byly stabilně přenášeny do následujících generací.

Výsledky ukázaly, že systém CRISPR/Cas9 může být použit pro významné zvýšení obsahu lykopenu v plodech rajčat, a to s vysokou účinností, minimálním výskytem mutací v necílových místech SDN i stabilní dědičností do dalších generací rostlin.

V tomto roce byla zveřejněna studie vědců z Čínské akademie věd, která naopak použila CRISPR/Cas9 pro mutaci genu *SIMYB12*. Umlčení tohoto genu vede k růžovému zbarvení plodů, způsobené absencí žlutého flavonoidu naringenin-chalkonu ve slupce. Ve srovnání s tradičním křížením, využití NBT techniky vyžaduje méně času, během jednoho roku lze získat růžové rostliny bez transgení DNA (tzn. transgene-free).

Na Zemědělské univerzitě v Číně se mimo jiné zabývají i výzkumem dlouhých nekódujících RNA (long non-coding RNAs (lncRNAs)), což jsou transkripty delší než 200 nukleotidů, které nejsou překládány do proteinu. Poslední výzkumy ukazují, že lncRNA hrají důležitou roli v různých biologických procesech, nicméně biologické funkce většiny rostlinných lncRNA jsou stále neznámé.

Pomocí CRISPR/Cas9 byla studována role vybraných lncRNA ve zrání rajčat. Tým se zaměřil konkrétně na lncRNA1459. Ve srovnání s plody divokého typu byl proces zrání rajčat významně omezen mutanty lncRNA1459, produkce ethylenu a akumulace lykopenu byly v genomech s knockoutovaným

lncRNA1459 potlačeny. Kromě toho byla u mutantů lncRNA1459 výrazně snížena exprese genů související s biosyntézou ethylenu, karotenoidů i genů souvisejících s dozráváním plodů.

Tyto výsledky by mohly v budoucnu usnadnit produkci rajčat i v zemích, které nemají vhodné podmínky pro jejich dozrávání.

NBT přístupy mohou být použity při šlechtění plodin, stejně jako při biologickém výzkumu. SDN mohou být použity k indukci mutací ve specifické části genomu, místně řízené nukleasy fungují v různých organizmech, včetně rajčat.

Doufejme, že v budoucnu se dočkáme více zajímavých publikací o použití NBT při šlechtění rajčat i od týmů z evropských laboratoří, nejen z těch asijských.

#### Zdroje:

<https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988368>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225186>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408904>  
<https://www.nature.com/articles/srep24765>  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00559>  
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.10.002>  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13872>

#### Tabák

Tabák (*Nicotiana*) je rostlinným rodem z čeledi lilkovitých pocházející z Ameriky. Častěji je však název tabák užíván pro populární produkt z listů této rostliny, v nichž je obsažen pyridinový alkaloid nikotin. Tabáková pole najdeme dnes už po celém světě, hlavními producenty jsou Brazílie a Kolumbie.

Z hospodářského hlediska se jedná o důležitou průmyslovou surovinu, z níž jsou využívány nejen listy, ale i květy, semena a stvol. Kromě úlohy hlavní suroviny tabákového průmyslu a výroby alkaloidů nikotinu a anabasinu, jsou listy využívány k výrobě kyseliny jablečné a kyseliny citronové. Tabákové květy jsou vzhledem k obsahu vonných látek využívány zejména kosmetickým průmyslem, semena tabáku slouží k výrobě oleje pro následnou výrobu laků a fermeží (a s případnou patřičnou úpravou oleje i pro konzumaci), zbytky z lisování tabákových semen jsou využívány jako krmiva pro hospodářská zvířata a stvol je surovinou pro výrobu celulózy.

Tato rostlina je ale zajímavá i z hlediska genového inženýrství, kde se stala modelovým organismem pro genetické modifikace. Vědci z Kanady např. objevili, že tabák je vhodným producentem amylas odolných vůči vysokým teplotám. Dále byl tabák geneticky modifikován za účelem úpravy fotosyntézy, a díky tomuto experimentu se poprvé podařilo zvýšit výnosy rostliny v polních podmínkách. Neméně zajímavým příkladem genetických modifikací tabáku může být jeho využití v medicíně pro účely levnější produkce léků proti rakovině.

Tabák se ale stal vyhledávaným organismem i v oblasti nových technik šlechtění. Metodou zinkových prstů byla zvýšena odolnost tabáku vůči herbicidům. Rostliny tabáku upravené pomocí nových metod jsou využívány k produkci glykoproteinů pro vývoj protilátek a vakcín ve farmacii.

Příkladem může být výzkum španělských vědců z Cellular Plant Biology Institute (IBMCP), Universitat Politècnica de València, kteří si dali za cíl vytvořit odrůdy tabáku obsahující vysoce hodnotné látky pro účely farmaceutického a kosmetického průmyslu. Hlavními biologickými a zdravotními faktory, na něž se vědci zaměřují, jsou protizánětlivé látky, protilátky, vakcíny a látky proti stárnutí. Hlavní technikou, kterou vědci v projektu NEWCOTIANA využívají, je metoda CRISPR.

Účinnost této metody jako vhodného nástroje pro editaci genomu tabáku byla prokázána mimo jiné studií čínských vědců publikovanou roku 2014 v časopisu Plant Molecular Biology. Vědci se ve studii zaměřili na dva geny, NtPDS a NtPDR6, jež využili pro cílenou mutagenézi. Nejprve zkoumali přechodnou genomovou editační aktivitu tohoto systému v protoplastech tabáku a sledovali frekvence delecí a inzerce po transfekci naváděcí RNA (guide RNA, gRNA) a nukleasy Cas9 v protoplastech tabáku. Dále získali transgenní tabákové rostliny s mutacemi obou zmíněných genů vyvolanými Cas9/gRNA a prokázali, že ve všech případech došlo k vysoce účinným bialelickým mutacím. Zároveň nebyly tímto postupem získány žádné významné mutace v necílových místech. Tyto slibné výsledky ukázaly na vysokou účinnost CRISPR/Cas9 pro cílenou mutagenézi genomu tabáku.

Technika CRISPR byla využita také při výzkumu viru žluté kadeřavosti listů rajčete (angl.

Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), jehož je tabák přirozeným hostitelem. Vědci se snažili o vývoj rezistence tabáku na TYLCV prostřednictvím úprav sekvencí tohoto viru a po rozsáhlých experimentech dokázali vyvinout transgenní rostliny se sníženými příznaky infekce.

Tento výčet studií zabývajících se výzkumem tabáku je jen příkladem vědeckého využití této jinak veřejností zatracované plodiny a ukazuje, že tabák je nejen zdravím škodlivým rostlinným produktem, se kterým si jej většina lidí automaticky spojuje, ale i významnou hospodářskou plodinou a organismem, který může podstatně přispět k rozvoji nových metod šlechtění.

Zdroje:

<https://www.britannica.com/plant/common-tobacco>

<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-017-0372-3>

Úroda č. 1/2017

LAU, W. & SATTELY, E. S. 2015. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science*, 349, 1224-1228.

<http://www.osel.cz/4389-zinkove-prsty-sahaji-do-dna.html>

<https://www.scitecheuropa.eu/using-new-breeding-techniques/85196/>

GAO, J. et al. 2014. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*.

First Report of Tobacco as a Natural Host of Tomato yellow leaf curl virus in Spain; M. I. Font, C. Córdoba, A. García, R. Santiago, and C. Jordá; *Plant Disease* 2005 89:8, 910-910

Schindele, P., Wolter, F. and Puchta, H. (2018), Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS Lett*, 592: 1954-1967. doi:10.1002/1873-3468.13073

## Jablka a banány

Banány jsou nejdůležitějším pěstovaným ovocným druhem, druhým jsou pak jablka a třetím hrozny. Výzkumy aplikací NBT jsou zaměřeny i na tyto významné druhy ovoce. Jabloně (*Malus*) jsou pěstovány na všech kontinentech a jsou velmi významnými ovocnými stromy. Genomy jablek jsou vysoce heterogenní, jen v ČR je v Seznamu odrůd pro rok 2017 uvedeno 99 registrovaných odrůd

jablek a 76 odrůd révy plus 24 klonů registrovaných odrůd.

Cisgenozé je nejčastěji využívána u druhů, jejichž kultivary jsou udržované vegetativním množením, jako jsou právě banány, jablka či brambory. Například do odrůdy Gala byl vložen gen HcrVf2 pro rezistenci proti strupovitosti jablek, která je způsobena parazitující houbou *Venturia inaequalis*. Cisgenozí byly připraveny i jabloně s plody s červenou dužinou a velmi dobrou chutí, a to přenosem genu MdMYB10 ovlivňujícím biosyntézu barviv anthokyanů. Mlalazi s kolegy použili cisgenozí pro vložení dvou genů kódujících fytoen synthasu (PSY), která je klíčovým enzymem biosyntetické dráhy provitaminů A a hraje ústřední roli při regulaci jejich akumulace v jedlé části kulturních rostlin.

V současné době jsou studovány možnosti editace genomu jabloní, první studie uveřejněná v roce 2016 popisuje indukci cílené mutace v genu endogenní fytoen desaturasu (PDS) pomocí systému CRISPR/Cas9. PDS je enzym z biosyntetické dráhy karotenoidů a chlorofylu, výsledkem mutace je tzv. fenotyp albino.

Po vytvoření dvojřetězového zlomu v exonu PDS došlo k opravě nejčastěji nehomologickým spojením konců (NHEJ) vedoucím k posunu čtecího rámce, jehož výsledkem bylo vyřazení genu z funkce (knockout). Docházelo i k homologní rekombinaci (HR), která umožnila delecii či inzerci několika párů bází.

V práci Nishitaniho a kolegů byly testovány tři naváděcí gRNA o délce 20 bp a jedna zkrácená (18 bp), která byla přidána na základě zjištění, že zkrácené gRNA mohou ojedinele indukovat mutace v necílových místech savčích buněk. Konstrukty obsahovaly kromě gRNA a Cas9 endonukleasy i zelený fluorescenční reportérový protein (GFP) a selekční geny rezistence k antibiotikům blasticidinu a kanamycinu, konstrukty byly vloženy za promotory 2x P-35S CaMV (Cas9, selekční a reportérové geny) a za AtU6-1 pro gRNA, kousky listů byly transformovány pomocí agrobakteria.

Celkem 13,6 % transformantů vykazovalo albino fenotyp (homozygotní mutace), byly pozorovány i rozmanité krátké inserce a delece (heterozygotní stav) a i zkrácená

naváděcí gRNA indukovala mutace v cílovém místě jablečné PDS. Celý proces editace trval osm měsíců, což je značně kratší než při tradičním mutačním šlechtění.

Komplex ribonukleoproteinů CRISPR/Cas9 (RNP) byl úspěšně použit i pro editaci protoplastů odrůdy vinné révy Chardonnay a odrůdy jabloně Golden Delicious. Cílovým úsekem byl ve vinné révě gen MLO-7, pro zvýšení odolnosti proti plísním (Padlí révové), a geny DIPM-1, DIPM-2 a DIPM-4 jabloně, pro zvýšení odolnosti vůči bakteriální spále růžovitých. Dalšími vhodnými úseky pro editaci genomu jablek by mohl být třeba enzym polyfenoloxidas (PPO), vyřazení tohoto enzymu by na vzduchu bránilo hnědnutí dužiny jablek. Taková jablka připravená prostřednictvím GM technik (Arctic® Apples) jsou prodávána v USA.

Banánovník (*Musa*) je základní potravou pro více než 400 milionů lidí, více než 40 % světové produkce a prakticky veškerý vývoz je založen na kultivaru Cavendish. O editaci banánovníku metodikou CRISPR se objevují ve vědecké literatuře články až v roce 2018, a to konkrétně použití CRISPR/Cas9 pro editaci genu kódujícího phytoen desaturasu (PDS) v kultivarech Rasthali a Cavendish.

DNA sekvenování 13 editovaných rostlin kultivaru Rasthali potvrdilo indely s 59% frekvencí mutací v PDS, což naznačuje opravu NHEJ. Většina mutací byla buď inserce (1-5) nebo delece (1-4) nukleotidů v blízkosti přilehlého krátkého sekvenčního motivu PAM, tyto mutace vytvořily stop kodony.

Snížený obsah chlorofylu a celkového množství karotenoidů byl detekován v mutovaných liniích, u regenerovaných rostlin byl pozorován kompletní albino i smíšený fenotyp, čímž bylo potvrzeno funkční narušení cílových genů.

Kultivar Cavendish "Williams" tvoří přibližně 47 % světové produkce banánů, je triploid typu genomu AAA a je v podstatě sterilní, tzn. genetická úprava je jediná dostupná cesta ke zlepšení vlastností tohoto kultivaru. Naváděcí sekvence CRISPR/Cas9 použité k editaci PDS tohoto kultivaru byly cíleny k exonu 1.

Bylo analyzováno 19 upravených rostlin, všechny měly indely s insercí jedné až 105 bp či deleci jedné až 55 bp v předpokládaném místě štěpení SDN. Albinismus a trpasličí fenotyp byly pozorovány u 63 % rostlin, což

svědčilo o tri-alelický indelech. Světle zelené (16 %) a přirozeně zelené (21 %) fenotypy korelovaly s indely alespoň v jedné ze tří alel PDS. Účinnost editace byla závislá jak na výběru cílového místa, tak na množství enzymu Cas9.

Banánovník Cavendish je ohrožen virulentní houbou, *Fusarium oxysporum* f. sp. TR4, rezistence nejenom vůči této plísňové chorobě by mohla být v budoucnosti připravená právě pomocí editace genomu.

Zdroje:

[http://eagri.cz/public/web/file/408615/\\_32017.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/408615/_32017.pdf)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663775>  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00286/full>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843244>  
<https://www.nature.com/articles/srep31481>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463574>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28066464>  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10142-017-0577-5>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29987710>

## Nehnědnoucí žampion

Dle rozhodnutí amerického ministerstva zemědělství (USDA) z roku 2016 nebude editovaný nehnědnoucí žampion (*Agaricus*) potřebovat povolení USDA, čili nebude na americkém trhu regulován jako GMO.

Žampion s vyřazeným genem způsobujícím hnědnutí byl připravený rostlinným patologem Yinongem Yangem z Pensylvánské Státní univerzity tak, že editačním nástrojem CRISPR/Cas9 posunul čtecí rámec v jednom ze šesti genů kódujících polyfenoloxidasu (PPO), čímž redukoval aktivitu o 30 procent.

Takto upravená houba neobsahuje žádnou cizorodou DNA, tzn., jedná se „transgene-free“ plodinu, protože došlo k deleci velice krátkého úseku DNA konkrétního genu. Editovaná houba může být pěstována a prodávána bez posuzování rizika, tzn. procházení regulačního procesu, což z ní učinilo první plodinu editovanou metodou NBT, která od americké vlády obdržela zelenou pro pěstování i prodej.

Nejenom výzkumník Yang, ale i celá řada vědců tvrdí, že není žádný vědecký důvod, proč by měly být geneticky editované žampiony regulovány jako GMO. Zdálo se, že



experimentátor Yang vyčistil cestu houby na trh. Po publikaci zprávy o nehnědnoucích žampionech a rozhodnutí USDA o akceptování tohoto organismu v Nature News byl Yang kontaktován americkým Úřadem pro kontrolu léčiv (FDA) s žádostí o možnost kontroly editovaného žampionu. Yang s touto kontrolou souhlasil, dle jeho slov s ohledem na klid spotřebitelů.

Skoro po dvou letech, přesně 28. března 2018 vydalo USDA stanovisko, ve kterém uvádí, že nebude dohlížet na používání upravených rostlin, které by mohly být vyvíjeny rovněž pomocí tradičních způsobů šlechtění, jako je křížení nebo výběr plodin požadovaných vlastností.

Zdroj: <https://www.nature.com/news/gen-edited-crispr-mushroom-escapes-us-regulation-1.19754>

### Rozdílný postoj USA a EU k NBT

Dle USDA editace genomu umožňuje šlechtitelům přesněji a rychleji vyvíjet nové odrůdy. Tímto přístupem se USDA snaží umožnit inovace, které nemají prokázané riziko. Inovace v oblasti šlechtění rostlin mají obrovský potenciál, protože pomáhají chránit plodiny proti suchu, nemocem, zvyšují nutriční hodnotu či odstraňují alergeny.

Regulace zůstává v platnosti pro transgenní rostliny, které obsahují uměle vložené geny jiných druhů.

Pohled (legislativa) Američanů a Evropanů je velmi rozdílný. Soudní dvůr Evropské unie se 25. července 2018 vyjádřil k otázce aplikace předpisů o GMO (především Směrnice 2001/18/ES) na zemědělské plodiny získané mutagenezí a rozhodl tak, že organismy získané novými technikami mutageneze (editace genů) mohou představovat obdobné riziko jako použití transgenoz. Výsledné editované organismy tudíž v EU spadají pod předpisy o GMO. Soudní dvůr je nejvyšší instancí ve výkladu práva EU, vydané rozhodnutí bude mít dalekosáhlý dopad na výzkum i zemědělství EU.

Zdroj: <https://www.usda.gov/media/press-releases/2018/03/28/secretary-perdue-issues-usda-statement-plant-breeding-innovation>

### Pohled na NOVÉ techniky šlechtění

(Autor: prof. RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc., emeritní profesor Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze)

Šlechtění. Záměrné vylepšování užitkových vlastností rostlin a živočichů pro lidského spotřebitele. Proces, jehož intuitivní počátky technik i cílů můžeme datovat tak deset tisíc let zpátky. Vycházející ze spontánní mutageneze a selekce, později i záměrného křížení. Vědecká příprava rostlinných „bastardů“, abychom použili termín Moravana Johana Řehoře Mendela, se dobrala svých vědeckých základů až díky němu a jeho znovuoobjevitelům i následovníkům.

Počátky záměrné ač nahodilé přípravy mutantů můžeme datovat do dvacátých let minulého století coby důsledek poznání podstaty a účinků radiace. Na její praktické využití pak navázala celá řada mutagenů chemických.

Pozdější snaha nejen prakticky, ale zejména ideologicky využít či obejít podstatu přírodních, „přirozených“ dějů vedla ke vzniku nové, „stalinsko-lysenkovské“ biologie, s extrémně směšnými, tu lidsky tragickými. Zahrnující na jedné straně popření existence samotných genů – na druhé pak přisouzení jejich unikátní role kdejaké složce živých buněk. Včetně vzniku buněčného života *de novo* z nebuněčných homogenátů. Budeme ji snad někdy považovat za prazáklad „syntetické biologie“? Standardní roubování mělo otevřít cestu ke vzniku velmi vzdálených somatických hybridů. Žel výsledkem byly – zřejmě – jen zase chiméry, alespoň dle pozdějších cytologicko-karyologických analýz. Nicméně vývoj nejen vědy postupuje po spirále. Původně strohá genetika byla doplněna epigenetikou. A pár desítek let po Trofimovi Denisovičovi propadl svět euforii z realizace prvních skutečných somatických hybridů, překonávajících i mezidruhové bariéry (pomato či tomoffel G. Melcherse). Na straně druhé – vyjma speciálních případů (cybridizace, parasexuální přenos mimojaderných genů) se tyto šlechtitelské techniky nestaly výraznou konkurencí těch klasických. A považovány i laickou veřejností za spíše zajímavou pěstitelskou výjimku nevyvolaly žádné větší vášně ideologické.

To se povedlo až jiným metodám „parasexuálního genového přenosu“, tedy „genovým modifikacím“ (transformacím), jejich naprosto zásadním až převratným praktickým dosahem. Až kvůli nim bylo třeba vytvořit patřičnou, ochrannou až restriktivní legislativu, v Evropě ztělesněnou směrnicí 2001/18/ES o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí.

Vymezující, co je – či není – geneticky modifikovaný subjekt (organismus) a k jakému použití bude tu či jinde připuštěn. Žel s ohledem nikoliv na jeho vlastnosti („dobré“ či „špatné“), ale na metodu získání – dle jejich odpůrců nepřírozenou, ergo člověka či Přírodu ohrožující.

A to navzdory postupným poznatkům, že tzv. horizontální genový transfer byl u rostlin nejen standardní součástí jejich dávné evoluce, ale přetrvává i v současnosti. A že třeba vznik kulturních odrůd sladkého bramboru (povijnice, *Ipomea batatas*) byl provázen mj. přirozeným vstupem částí Ti plasmidu *A.tumefaciens*. Tedy „cejchu“, jímž jsou dle výše zmíněné legislativy poznamenány právě ony „umělé“ GM plodiny.

Faktologie oficiální „vědy založené na důkazech“ však pro její odpůrce není patřičným argumentem, zejména má-li své ekonomické důsledky. Průvodním jevem se tak i ve sféře jak základního či aplikovaného výzkumu a návazné praxe, stal vznik speciálních nik typu „GM-free“ či „Green Breeding“.

Jenže k jejich směle vědecký pokrok v oblasti molekulární biologie a genetiky jim přinášel další a další problémy. Množily se případy šlechtitelských postupů obtížně zařaditelných. Klíčová právní otázka: „Co tedy je a co není GMO?“ se stávala více a více zásadní.

Z těchto důvodů tak byl před více než šesti lety na zakázku Evropské komise vypracován materiál věnovaný NOVÝM šlechtitelským technikám (New Breeding Techniques, NBT). Sdružujícím jednak postupy již dříve známé, leč různě kombinované – kupř. komerční přípravu roubovanců, tvořených „normálním“ roubem na „GM podnoži“, jednak zásadně metodicky vylepšené.

Už sám výchozí seznam těch zhruba osmi NOVÝCH technik je ovšem z pohledu biologa – odborníka zřetelným příkladem bezradnosti

legislativců, propojujících účelově jablka s hruškami, stavějících opět metodický aspekt nad sám biologický důsledek a demonstrující neschopnost posuzovatelů oprostít se od prvotního ideologického či jinak účelového pohledu.

Zcela zásadně z nich však vyčnívají techniky tzv. genového editingu, tedy molekulární mutagenese, vycházející z principu bakteriální ochrany před virovým napadením. Zasahující cílový gen nikoliv nahodile, jako v případě dávných zubních rentgenů a gamapolí, či jen s jistou mírou pravděpodobnosti jako u technik „zinkových prstů“ či TALEN - ale s přesností až 95%. A schopné takto naráz mutovat nikoliv gen jediný, ale třebaš jejich desítky.

Díky aktivitám zejména dvou klíčových týmů, z nichž v jednom byl prvoautorem zásadní vědecké publikace molekulární biochemik Martin Jínek (opět moravského původu), se tak dávno známá technika mutagenese dostala na zásadně vyšší úroveň. A pojmy CRISPR/Cas 9 či „krisprovaní“ se staly známými i čtenářům, posluchačům či divákům standardních masmédií.

Tento stav není prost ani do značné míry absurdních situací. Klasické GM techniky jsou, jak známo, nepřijatelné pro „bio/organické zemědělce“. Ne tak – alespoň donedávna – techniky genového editingu. Naopak, ty náhle začaly představovat schůdnou cestu znovuzískání potřebných resistencí u různých bioplodin. A tedy alternativy k aplikacím různých pesticidů. Krisprovaní tak uvítal kupř. známý guru biozemědělců, švýcarský profesor Urs Niggli. Se zlou se ovšem potázal již ve svém vlastním táboře.

Neboť – dle legislativců či různých aktivistů – není mutagenese jako mutagenese. To věru není, leč věda se na to kouká opačně než její oponenti. Postoj konservativní Evropy je nejnověji formulován ve výnosu Evropského soudního dvora ze dne 25. července 2018, jenž vymezuje současnou legislativní – ale tím i komerční či dokonce vědeckou – přijatelnost editačních technik. Ty objevené před oním anti-GMO zákonem jsou dle něj nadále přijatelné. Ty pozdější nikoliv. Pokud vás lékař bude operovat pomocí pazourkového či bronzového skalpelu, je to v pořádku. Laser či gama-nůž však v Evropě použit nesmí. Tedy zatím...

Jakákoliv legislativa ji totiž nedokáže ochránit před důsledky současných zásadních klimatických změn. Na extrémní sucha, teploty, nové typy škůdců či jiné stresové faktory klasické šlechtění dostatečně rychle reagovat nedokáže. Genová editace u klíčových plodin je nesporně nejúčinnější cestou.

Vraťme se do třetice na Moravu. O jeden z nedávných světových vědeckých úspěchů, přečtení mimořádně složitého genomu pšenice, se zásadním způsobem zasloužil olomoucký tým profesora Jaroslava Doležela, tvůrce unikátních metod chromozomálního sortingu. Znalost konkrétních genů dává šanci je cíleně modifikovat. A ovlivnit tak vlastnosti stávajících odrůd. První na řadě mají být různé geny resistance – ale také třeba vernalizace/jarovizace. Upravené technikami genové editace. Pazourkový nůž si ponechme jen jako historický artefakt.

### **Kolik dalších vítězství ještě přežije naše příroda?**

(Autor: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D., Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i.)

#### **Co je to mutagenese?**

Náhodné dědičné mutace genetického kódu byly, jsou a budou jedním ze základních nástrojů šlechtitele. Po tisíciletí byli šlechtitelé odkázáni na šťastnou náhodu, kdy díky přirozené míře mutací v populaci vznikne nová výhodná vlastnost. Většina náhodných mutací však nemá efekt žádný nebo dokonce negativní.

V posledním století šlechtitelé vypomáhají šťastné náhodě působením ionizačního záření nebo chemických mutagenů. Neutrálních a negativních mutací vzniká sice stále nepoměrně více než těch výhodných, ale celý proces je o několik řádů urychlen. Pravděpodobnost získání vyhrávajícího losu zůstává stejná, ale šlechtitelé dostali možnost získat najednou mnohem více losů. Pokud tedy šlechtitel ví, co hledá, najde to mnohem rychleji. Přesto mu zůstává velmi náročná práce mnoha generacemi zpětného křížení oddělit stovky a tisíce nevýhodných mutací od těch několika pozitivních.

Techniky genové editace (spolu s našimi exponenciálně rostoucími znalostmi o složení a funkci rostlinných genomů) daly šlechtitelům do ruky další mocný nástroj. Šlechtitelé mají dnes možnost rovnou si vytisknout los, který zaručeně vyhrává. Není nutné čekat, až dojde k mutaci v konkrétním genu a poté není nutné se zpětným křížením po mnoho generací zbavovat nežádoucích mutací v jiných genech. Vzhledem k tomu, že molekulární opravné mechanismy, které vedou ke vzniku mutace po poškození DNA dvoušroubovice, jsou ve všech případech stejné, jsou svoji podstatou stejné i vzniklé mutace.

Cílená editace genomu tak může být v principu použita ke stejným cílům jako tradiční způsoby mutagenese, pouze rychleji a snadněji. Jsou to zejména: změna složení výsledné plodiny – snížení množství alergenů, antinutričních látek nebo toxinů, naopak zvýšení podílu prospěšných látek jako některých mastných kyselin v oleji, vitaminů, aromatických látek a podobně.

Metoda cílené mutagenese bude zřejmě i široce používána pro zvýšení rezistence plodin k chorobám, škůdcům, suchu a podobně, což je nutnou podmínkou pro snižování naší závislosti na pesticidech a dalších fosilních vstupech do zemědělství.

Na rozdíl od klasických transgenních organismů není do genomu konečné plodiny vložen žádný nový gen. Díky tomu ale nejde z vyšlechtěné plodiny poznat, zda vznikla povolenou nebo nepovolenou technikou. To jistě v budoucnu způsobí mnoho vrásek na čelech regulátorů, zejména proto, že svět se vydává jiným směrem a techniky mutagenese zřejmě mezi sebou rozlišovat nebude (zatím se takto vyjádřili v USA, Kanadě, Japonsku). V nedaleké budoucnosti může dojít k paradoxním situacím, kdy konvenční farmáři v USA budou používat méně pesticidů a šetrnější postupy než biofarmáři v EU.

#### **Není mutagenese jako mutagenese**

Letos v červenci oznámil Evropský soudní dvůr (ECJ) po několika letech jednání konečný verdikt ohledně sporu, zda některými novými technikami mutagenese vznikají rostliny a zvířata označovaná jako GMO nebo nikoliv. Šalamounské rozhodnutí soudu bylo některými evropskými politiky a zejména environmentálně zaměřenými organizacemi

oslavováno jako vítězství nad průmyslovým zemědělstvím a nadnárodními korporacemi. Rozhodující krok, který přinese mír a klid do našich luhů a hájů.

ECJ rozhodl, že záměrem zákonodárců před dvěma dekádami bylo zahrnout všechny organismy vzniklé mutagenezí mezi GMO, tedy takové, na které se vztahuje povinnost podrobného testování před uvedením na trh a dále povinnost být po celou cestu z pole do regálu v samoobsluze zpracovány odděleně a náležitě označeny. Zároveň jsou ale ty techniky mutagenese, které byly dlouho známé a v EU po několik desetiletí široce používané, vyjmuty ze všech povinností a omezení, které zákon pro GMO ukládá. Spor se vedl o to, zda se tato výjimka vztahuje na všechny techniky mutagenese, nebo jen na použití ionizačního záření a chemických mutagenů.

Soud moudře udělil výjimku z výjimky a rozhodl, že ne každá mutagenese má právo na speciální zacházení, a k novým technikám mutagenese je třeba přistupovat s celou tvrdostí a nesmlouvavostí zákona. Dovolil bych si v tomto textu odhadnout, jaké budou skutečné dopady tohoto rozhodnutí na naše zemědělce a přírodu.

### **Ale ty korporace!**

Evropská parlamentní frakce zelených jakož i některé lobbistické tzv. environmentální organizace považují rozhodnutí ECJ za vítězství nad zájmy nadnárodních korporací, zabývajících se výrobou osiv a pesticidů, a namítají, že použití těchto technik není zakázáno, ale jen pečlivě regulováno. Zapomínají však dodat, že povinnosti vyplývající ze současné regulace zdražují vývoj každé nové plodiny o desítky milionů eur a prodlužují jej o desítky let. Tím zcela odřezávají přístup k těmto technikám malým šlechtitelům a akademickým pracovištím.

Tato regulace rovněž omezuje okruh plodin a vlastností, pro které se ještě vyplatí ji použít. Zcela znemožněno je využití nových technik pro neziskové a humanitární účely veřejného zájmu. V minulém desetiletí EU uvolnila přibližně 100 milionů EUR na výzkumné projekty zaměřené na to, zjistit, jaká rizika při šlechtění obecně vznikají a jak je včas odhalit. Nepřekvapivým závěrem bylo, že

v současnosti požadované testy nijak k bezpečnosti potravin nepřispívají.

### **Zelená budoucnost**

Rozhodnutí ECJ tak, podle mého, neprospěje ani farmářům, ani přírodě, a dokonce ani malým evropským šlechtitelům. Navíc i jeho implementace bude velmi problematická a může znesnadnit život i těm evropským šlechtitelům, které molekulární techniky nepoužívají a používat neplánují. Je velkým neštěstím EU, že některá témata a jejich řešení nejsou předmětem diskuse, a jsou zmonopolizovány politickými hnutími, která sledují vlastní politické cíle.

Otázkou zůstává, proč je hodnocení environmentálních dopadů tak rozdílné. Jednou z možností je rozhodovat se na základě etických a hodnotových kritérií (respektování celistvosti rostlinného genomu a nedotknutelnosti buňky, IFOAM 2017), jinou možností je hodnotit alternativní systémy na základě technokratických a kvantifikovatelných parametrů jako je produkce CO<sub>2</sub>, množství a toxicita použitých pesticidů, podílu organického uhlíku v půdě, odolnosti k erozi a podobně.

Nemusím zdůrazňovat, že podkladem pro formování všeobecné veřejné politiky by měl být především přístup druhý, přičemž by mělo být v přiměřené míře umožněno i příznivcům přístupu prvního zformovat si vlastní pravidla a potraviny podle nich vyrobené dodávat podobně smýšlejícím zákazníkům.

Zdroje:

Compatibility of Breeding Techniques<sup>1 2</sup> in Organic Systems, IFOAM 2017.

[https://www.ifoam.bio/sites/default/files/breeding\\_techniques\\_position\\_paper\\_part\\_1.pdf](https://www.ifoam.bio/sites/default/files/breeding_techniques_position_paper_part_1.pdf)

**Další informace o biotechnologiích najdete na [www.biotrin.cz](http://www.biotrin.cz).**

**Zasílání pravidelných novinek z oblasti biotechnologií je možné přihlásit na [info@biotrin.cz](mailto:info@biotrin.cz).**