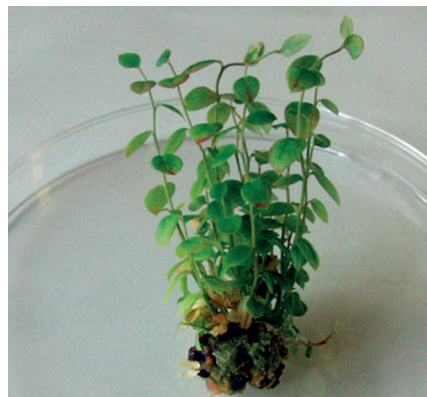
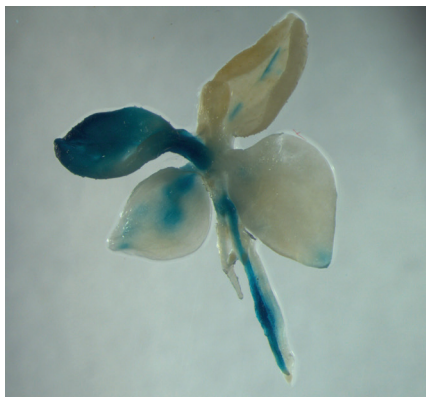


Biotechnológie v rastlinnej produkcii

Želmíra Balážová, Zdenka Gálová, Katarína Ražná,
Jana Moravčíková, Jana Libantová,
Andrea Hricová, Martin Vivodík



Nitra 2021

Názov:

Biotechnológie v rastlinnej produkcii

Autorky:

doc. Mgr. Želmíra Balážová, PhD. (3,8 AH)

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
FBP, Katedra biochémie a biotechnológie

prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc. (1 AH)

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
FBP, Katedra biochémie a biotechnológie

prof. Ing. Katarína Ražná, PhD. (1 AH)

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
FAPZ, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín

doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD. (1,25 AH)

Univerzita Cyrila a Metoda v Trnave
FPV, Katedra biotechnológií

Ing. Jana Libantová, CSc. (2 AH)

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín,
Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV v Nitre

Ing. Andrea Hricová, PhD. (2 AH)

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín,
Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV v Nitre

Ing. Martin Vivodík, PhD. (2,2 AH)

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
FBP, Katedra biochémie a biotechnológie

Recenzenti:

prof. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD.

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc.

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín,
Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV v Nitre

Vydanie učebnice bolo podporené projektom KEGA 025SPU-4/2018.

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 17. 2. 2021
ako vysokoškolskú učebnicu pre študentov SPU.

ISBN 978-80-552-2308-7

Obsah



Predslov	7
----------------	---

Úvod do štúdia predmetu „biotechnológie v rastlinnej produkcii“	9
---	---

1 Pletivové kultúry rastlín	13
1.1 História pletivových kultúr	13
1.2 Rozdelenie pletivových kultúr	14
1.3 Kultivačné podmienky	15
1.4 Rastové regulátory a ich pôsobenie	17
1.4.1 Stimulátory rastu a vývinu	18
1.4.2 Inhibítory rastu a vývinu	19
1.5 Typy pletivových kultúr	20
1.5.1 Kalusová kultúra	20
1.5.2 Bunková suspenzná kultúra	23
1.5.3 Protoplastová kultúra a fúzia protoplastov (somatická hybridizácia)	24
1.5.4 Kultúra izolovaných embryí (embryokultúra)	26
1.5.5 Kultúry vegetatívnych orgánov	26
1.5.5.1 Meristémová kultúra	26
1.5.5.2 Nodálna kultúra	27
1.5.5.3 Kultúra izolovaných koreňov	28
1.5.6 Kultúry generatívnych orgánov	28
1.5.6.1 Kultúra izolovaných mikrospór	28
1.5.6.2 Peľnicová kultúra	30
1.6 Morfogenéza rastlín	30
1.6.1 Embryogenéza	32
1.6.1.1 Zygotová embryogenéza	32
1.6.1.2 Somatická embryogenéza	33
1.6.2 Indukcia haploidných rastlín	36
1.6.2.1 Indukovaná androgenéza	36
1.6.2.2 Indukovaná gynogenéza	37
1.6.2.3 Indukcia dihaploidov z haploidných rastlín	38
1.7 Problémy spojené s kultiváciou v podmienkach <i>in vitro</i>	39
1.7.1 Variabilita v kultúrach <i>in vitro</i>	40
1.7.1.1 Genetická variabilita	40
1.7.1.2 Somaklonálna variabilita	41
1.8 Kryokonzervácia	43
2 Genetická transformácia rastlín	45
2.1 Priame metódy prenosu génov	46
2.1.1 Transformácia protoplastov	46

2.1.2	Biolistická transformácia.....	46
2.2	Nepriame metódy prenosu génov.....	48
2.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
2.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> a genetické inžinierstvo	51
2.2.3	Transformácia rastlín pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
3	Expresia transgénov v rastlinách a metódy ich detekcie.....	59
3.1	Základná charakteristika expresie génov a ich regulácie v eukaryotických bunkách...	59
3.2	Faktory ovplyvňujúce expresiu génov v rastlinách.....	60
3.3	Príprava transgénnych expresných jednotiek v klonovacích, prípadne kazetových vektoroch	64
3.4	Zavedenie transgénnych expresných jednotiek do rastlín pomocou transformačných vektorov	66
3.5	Analýza transgénnych rastlín	67
3.5.1	Selekčný test	67
3.5.2	PCR analýza	67
3.5.3	Southern hybridizácia.....	68
3.5.4	RT-PCR (PCR po reverznej transkripcii).....	70
3.5.5	Northern hybridizácia	70
3.5.6	<i>In situ</i> hybridizácia	71
3.5.7	Western blot analýza.....	71
3.5.8	Biochemické stanovenie aktivity transgénneho proteínu/enzýmu	72
3.6	Možné problémy spojené s prenosom transgénu do rastlín.....	73
4	Využitie transformácie rastlín na zlepšenie ich vlastností	78
4.1	Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči herbicídum	78
4.1.1	Rezistencia voči glyfosátu.....	78
4.1.2	Rezistencia voči iným herbicídum	80
4.1.3	Plodiny tolerantné voči herbicídum a ich uplatnenie v životnom prostredí.....	81
4.2	Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči škodlivému hmyzu	82
4.2.1	Insekticídne proteíny v rastlinách	83
4.3	Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči vírusom	84
4.4	Zlepšenie nutričnej kvality plodín	85
4.4.1	Zlatá ryža – Golden Rice	85
4.4.2	Repka olejná a sója so zvýšeným obsahom vitamínu E	86
4.4.3	Kávovník s bezkofeínovými bôbami.....	86
4.5	Zlepšenie kvalitatívnych vlastností plodín Rajčiak FlavrSavr s predĺženou skladovateľnosťou plodov.....	87
4.6	Ďalšie aplikácie transgenózy rastlín	88
5	Genomika, proteomika, metabolomika a bionformatika.....	89
5.1	Genomika.....	90
5.1.1	Metódy genomiky.....	94
5.1.1.1	Mapovanie genómu	94
5.1.1.2	Určenie poradia nukleotidov genómu.....	97
5.2	Proteomika.....	100
5.2.1	Metódy proteomiky.....	101



5.2.1.1	Dvojrozmerná elektroforéza bielkovín	101
5.2.1.2	Hmotnostná spektrometria.....	102
5.2.1.3	Proteínový čip	103
5.2.1.4	Počítačové analýzy <i>in silico</i>	103
5.3	Metabolomika.....	104
5.4	Bioinformatika	105
5.4.1	Biologické databázy.....	106
5.4.2	Nástroje bioinformatiky	108
6	Identifikácia genotypov rastlín pomocou genetických markerov	113
6.1	Molekulárne markery a ich využitie	115
6.2	Bielkoviny ako molekulárne markery	116
6.2.1	Charakteristika bielkovín zrna pšenice, jačmeňa, raže, ovsu a pohánky z hľadiska kvality z hľadiska kvality	117
6.2.2	Využitie HMW glutenínových podjednotiek pri identifikácii genotypov pšenice	120
6.2.3	Genetické markery jačmeňa	125
6.3	DNA ako molekulárny marker.....	128
6.4	Hybridizačné techniky vyhľadávania polymorfizmu DNA.....	131
6.4.1	RFLP technika.....	131
6.4.2	DNA fingerprinting.....	133
6.5	Amplifikačné techniky vyhľadávania polymorfizmu – PCR markery.....	134
6.5.1	Vizualizácia amplifikovaných DNA fragmentov.....	137
6.5.2	RAPD technika.....	138
6.5.3	AFLP technika	139
6.5.4	STMS technika.....	141
6.5.5	SCoT technika	142
6.5.6	IRAP technika	143
6.5.7	SNP technika	144
6.6	Mapovanie genómov rastlín pomocou molekulárnych markerov	144
6.7	MAS metóda – selekcia pomocou markera.....	146
6.7.1	NIL (nearly isogenic line) – blízke izogénne línie	148
6.7.2	BSA (bulk segregant analysis) – analýzy štiepiacich skupín.....	149
6.7.3	QTL (quantitative trait loci) – lokusy kvantitatívnych znakov	149
6.7.4	Využitie MAS metódy.....	149
7	Legislatíva	151
8	Terminologický slovník	157
9	Zoznam použitej literatúry.....	169
O	autoroch.....	174

Predslov



Biotechnológie v súčasnom období patria medzi hlavné trendy výskumu 21. storočia. Sú v centre pozornosti významných vedeckovýskumných a vzdelávacích inštitúcií na celom svete. Klasické biotechnológie, pod ktorými treba chápať využitie živých organizmov na produkciu potravín či iných užitočných látok pre potreby človeka, sa v 70. rokoch minulého storočia objavením restriktčných endonukleáz, reverznej transkriptázy a skonštruovaním prvej rekombinantnej DNA, pretransformovali na molekulárnu úroveň a položili základ novej vednej disciplíny – molekulárnej biotechnológii. Moderné biotechnológie sa študujú ako na mikrobiálnej úrovni, tak aj na úrovni rastlín a živočíchov.

Biotechnológie v rastlinnej produkcii sa zameriavajú na využitie rastlín pre potreby človeka s aplikáciou poznatkov molekulárnej biológie, metód a techník génového inžinierstva.

Učebná pomôcka je určená predovšetkým pre študentov a doktorandov FBP, FAPZ, FZKI SPU v Nitre a študentov iných fakúlt, ktorí majú vo svojich študijných programoch predmet molekulárna biológia, molekulárna genetika, genetické inžinierstvo, biotechnológie, biochemické technológie, geneticky modifikované potraviny a ďalšie príbuzné predmety.

Autori



O AUTOROCH

doc. Mgr. Želmíra Balážová, PhD.

Pôsobí na Katedre biochémie a biotechnológie Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre ako vedecko-pedagogická pracovníčka, pričom sa venuje rozvoju rastlinných biotechnológií. V oblasti vedy sa orientuje na detegovanie genetických markerov hlavne na úrovni polymorfizmu DNA, pričom aplikuje širokú škálu PCR analýz pre identifikáciu a charakteristiku jednotlivých genotypov obilnín (pšenice, jačmeňa, raže, tritikale, ovsa a kukurice), ale aj pseudoobilnín (pohánka) s cieľom určenia ich vzájomných genetických vzťahov a diverzity na úrovni genomiky a ich následného využitia v procese šľachtenia.

prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

Pôsobí na Katedre biochémie a biotechnológie Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre ako vedecko-pedagogická pracovníčka. V rámci vedeckej profilácie sa zameriava na detekciu genetickej biodiverzity pomocou molekulárnych markerov na úrovni polymorfizmu bielkovín a DNA poľnohospodársky významných druhov plodín (obilniny, pseudoobilniny, olejniny, strukoviny). Ďalej sa tiež orientuje na detekciu, charakteristiku a objasnenie mechanizmu pôsobenia celiakálne aktívnych bielkovín v obilninách a vo vzťahu k bezlepkovej diéte. Jej výskum je zameraný aj na detekciu dôležitých znakov a vlastností zrna významných potravinových zdrojov rastlín z hľadiska prípravy zdravých a bezpečných potravín. Venuje sa aj molekulárnej diagnostike vybraných vírusových fytopatogénov rôznych rastlinných druhov.

prof. Ing. Katarína Ražná, PhD.

Pracuje na Katedre genetiky a šľachtenia rastlín Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre ako vedecko-pedagogická pracovníčka. V rámci vedeckovýskumnej činnosti sa venuje genomickým analýzám rastlín, aplikácii pletivových kultúr pre účely identifikácie pridanej hodnoty rastlinných potravinových zdrojov a štúdiu stres-senzitívnych markérov na báze sekvencií mikroRNA. Hlavnou plodinou výskumu je ľan siaty, ale venuje sa aj ďalším druhom, pestrec mariánsky, jačmeň siaty a ginko dvojlaločné.

doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.

Pôsobí ako vedecko-pedagogická pracovníčka na Katedre biotechnológií Fakulty prírodných vied Univerzity Cyrila a Metoda v Trnave. Jej výskum sa zameriava na oblasť rastlinných biotechnológií, molekulárnej biológie a fyziológie rastlín. Má dlhoročné skúsenosti s transgenózou rastlín. Výskum zameraný na štúdium procesov prebiehajúcich v rastlinách v podmienkach environmentálneho stresu pomocou systému transgénnych rastlín.

Ing. Jana Libantová, CSc.

Pracuje ako vedecká pracovníčka Ústavu genetiky a biotechnológií v Centre biológie rastlín a biodiverzity SAV v Nitre. Vo svojej výskumnej činnosti sa venuje izolácii a charakterizácii génov pre hydrolytické enzýmy z málo preskúmaných rastlinných druhov mäsožravých rastlín s možnosťou ich využitia v rastlinných biotechnológiách. Výskum ďalej zahŕňa biochemickú charakterizáciu príslušných hydroláz (chitináz a β -1,3-glukanáz) po ich over-expressii v bakteriálnom expresnom systéme, izolácii a purifikácii. Súčasťou experimentálnej práce je aj testovanie možného využitia týchto génov pri posilňovaní obrany voči fytopatogénom, čo sa v prvej fáze výskumu uskutočňuje po ich zavedení a expresii v geneticky modifikovaných rastlinách modelového druhu – tabaku. V rámci výskumu sa pozornosť venuje aj problematike bio-bezpečnosti transgénnych rastlín.

Ing. Andrea Hricová, PhD.

Pracuje ako vedecká pracovníčka Ústavu genetiky a biotechnológií v Centre biológie rastlín a biodiverzity SAV v Nitre v oblasti genetiky, funkčnej genomiky a ich využitia v biotechnológiách. Objektom výskumu je najmä laskavec (*Amaranthus* spp.), ako menej známy rastlinný druh s vysokým podielom nutrične dôležitých, ako aj biologicky aktívnych látok s pozitívnym vplyvom na ľudský organizmus, využiteľný v produkcii a vývoji nutrične kvalitných, bezpečných a inovatívnych potravín. Súčasné výskumné aktivity sú zamerané aj na molekulárne a ekofyziologické aspekty abiotického stresu v rastlinách laskavca.

Ing. Martin Vivodík, PhD.

Pracuje ako vedecko-pedagogický pracovník na Katedre biochémie a biotechnológie Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre. V rámci vedeckovýskumnej činnosti sa venuje štúdiu polymorfizmu a genetickej príbuznosti rôznych druhov obilnín, strukovín a olejnín ako sú kukurica siata, ricín, sója, fazuľa a ďalšie. Dané plodiny analyzuje na úrovni DNA pomocou rôznych amplifikačných techník založených na PCR reakcii (RAPD, SCoT, SSR) a tiež pomocou bielkovinových markerov.



Biotechnológie v rastlinnej produkcii

Želmíra Balážová, Zdenka Gálová, Katarína Ražná,
Jana Moravčíková, Jana Libantová,
Andrea Hricová, Martin Vivodík

Vydala: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vydanie: prvé

Náklad: 150 ks

Počet strán: 175

Rok vydania: 2021

Jazyková korektúra: Katarína Drábiková

Grafická úprava: Tatiana Šmehilová

Foto: autori

Tlač: Tlačiareň P + M, s. r. o., Turany

AH-VH: 13,25-13,52

ISBN 978-80-552-2308-7