

Ćwiczenie 07

Przykłady GMO. Identyfikacja transgenów. Analiza zmian w genomach GMO. Analiza zagrożeń i korzyści.

Kornelia Polok

1. Organizmy modyfikowane genetycznie, GMO

1.1. Definicje biologiczne i prawne

- ➔ **Pojęcie GMO.** Organizm modyfikowany genetycznie może być mylące, gdyż wiele konwencjonalnych technik, w tym krzyżowanie, introgresji, mutageneza także prowadzą do modyfikacji genetycznych. **Dlatego właściwszym terminem byłoby określenie: organizm otrzymany w wyniku metod inżynierii genetycznej.** Niestety przestrzeń publiczna została zdominowana przez termin GMO, co powoduje, że definicje są pełne szczegółów. A te są różnie interpretowane przez prawników.
- Ustawa o mikroorganizmach i organizmach genetycznie modyfikowanych z dnia 22 czerwca 2001 r. z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2019, poz. 706; z 2020 r. poz 322).
 - ▶ **Dawca:** organizm, z którego pobiera się kwas nukleinowy.
 - ▶ **Biorca:** organizm, do którego wprowadza się kwas nukleinowy.
 - ▶ **Organizm:** każda jednostka biologiczna, komórkowa lub niekomórkowa, zdolna do replikacji lub przenoszenia materiału genetycznego. *(Uwaga: definicja nie odpowiada biologicznej definicji organizmu jako istoty żywej charakteryzującej się procesami, które tworzą funkcjonalną całość zdolną do samodzielnego życia. Celem ustawodawcy było włączenie wirusów, ale w efekcie prawnicy zaliczają do organizmów także wektory czy konstrukty mRNA, co nie jest zgodne z sensem biologicznym i sensem ustawy).*
 - ▶ **Organizm genetycznie zmodyfikowany:** organizm inny niż ludzki, w którym materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych.
 - ▶ **Wektor:** cząstka kwasu nukleinowego pozwalająca na wprowadzenie i stabilne utrzymanie cząstek kwasu nukleinowego biorcy. *(Uwaga: wektor to nie organizm, jednakże część prawników utożsamia wektor z organizmem, gdyż wektor przenosi materiał genetyczny. Dla biologa wektor i organizm to różne pojęcia).*

1.2. Przykłady GMO



1.2.1. Proszę wejść na stronę ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications): <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. Na podstawie zawartych informacji proszę podać.

The screenshot shows the ISAAA website interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'Contact', 'Purchase Publications', and a 'Go' button. The main header includes the ISAAA logo and the text 'INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS'. There is also a 'Join our Crop Biotech Update mailing list' button with a 'Join now!' call to action. Below the header is a menu with items: 'ISAAA in Brief', 'ISAAA Programs', 'Knowledge Center', 'Biotech Information Resources', 'GM Approval Database', 'ISAAA Blog', and 'Donate'. The 'GM Approval Database' section is highlighted. On the left, there is a list of 'GM Plants' including Alfalfa, Apple, Argentine Canola, Bean, Carnation, Chicory, Cotton, Cowpea, Creeping Bentgrass, Eggplant, Eucalyptus, Flax, Maize, Melon, and Papaya. The main content area is titled 'GM Approval Database' and contains introductory text about the database's purpose and scope. A 'Latest Update' box is highlighted in yellow, stating: 'January 14, 2020 The Philippines approved cotton GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 for food, feed, and processing.'

Rys. 1.2. Zrzut ekranu ze strony bazy danych zatwierdzonych GMO.

1.2.1. Proszę wejść na stronę ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications): <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>.

- A. Proszę podać najczęściej wprowadzane cechy komercyjne. **(2 punkty)**
- B. Proszę podać jakie zmiany dotyczące jakości owoców wprowadzono u *Malus x domestica* (jabłoń). Jakie geny wprowadzono i na czym polega istota manipulacji? Proszę podać handlowe nazwy odmian. **(3 punkty)**
- C. Proszę podać nazwy gatunkowe łacińskie i polskie dla roślin GMO zatwierdzonych w Unii Europejskiej. **(2 punkty)**

Czas wykonania: 15 minut

2. Identyfikacja transgenów

➔ 2.1. Pojęcia

- 🔴 **Transformacja:** proces, który prowadzi do wprowadzenia obcego materiału genetycznego najczęściej na skutek pokonania bariery błony komórkowej. Transformacja może zachodzić naturalnie, np. za pomocą niektórych bakterii, wirusów. Stanowi ona główny mechanizm horyzontalnego transferu genów. W laboratoriach wykorzystuje się na potrzeby inżynierii genetycznej.
- 🔴 **Transformat (organizm transformowany):** organizm, do którego wprowadzono obcy materiał genetyczny, ale nie potwierdzono jego dziedziczenia.
- 🔴 **Organizm transgeniczny:** organizm, do którego wprowadzono obcy materiał genetyczny oraz potwierdzono jego dziedziczenie zgodnie z prawami Mendla.
- 🔴 **Transgen:** gen, który wprowadzono metodami inżynierii genetycznej.
- 🔴 **Marker selekcyjny:** geny wykorzystywane w inżynierii genetycznej, które pozwalają wyselekcjonować organizm, u których zaszła transformacja. Najczęściej są to geny odporności na antybiotyki lub herbicydy.
- 🔴 **Gen reporterowi:** gen, który pozwala śledzić ekspresję wprowadzonego genu, np. gen lucyferazy.

2.2. Identyfikacja transgenu metodami molekularnymi


➔ 2.2.1. Identyfikacja transgenu poprzez hybrydyzację Southern.

Hybrydyzacja: jest to proces łączenia się zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowych struktur. Hybrydyzacja Southern zachodzi między niciami DNA.


Sonda DNA to znakowany jednoniciowy DNA, który może być wykorzystany do identyfikacji komplementarnych cząsteczek.

Hybrydyzacja

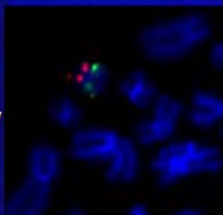
- Jest to zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowych struktur na skutek parowania komplementarnych zasad.
- Różnice w stabilności wykorzystywane są w hybrydyzacji kwasów nukleinowych.
- Hybrydyzacja umożliwia wykrywanie sekwencji komplementarnych do sondy w materiale biologicznym.



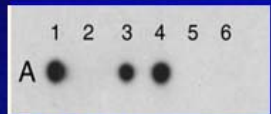
Jeżeli nici nie są komplementarne to cząsteczka mieszańcowa jest niestabilna.



Jeżeli nici są komplementarne to cząsteczka mieszańcowa jest stabilna.

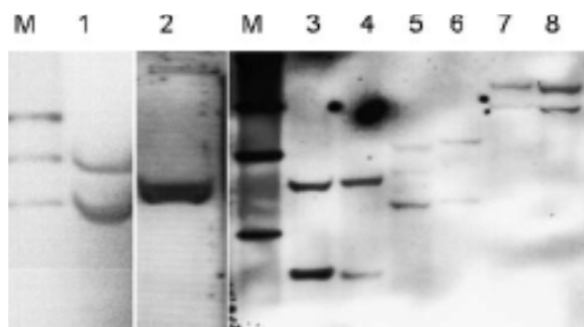


Sonda znakowana fluorescencyjnie umożliwia lokalizację komplementarnych sekwencji na chromosomach.



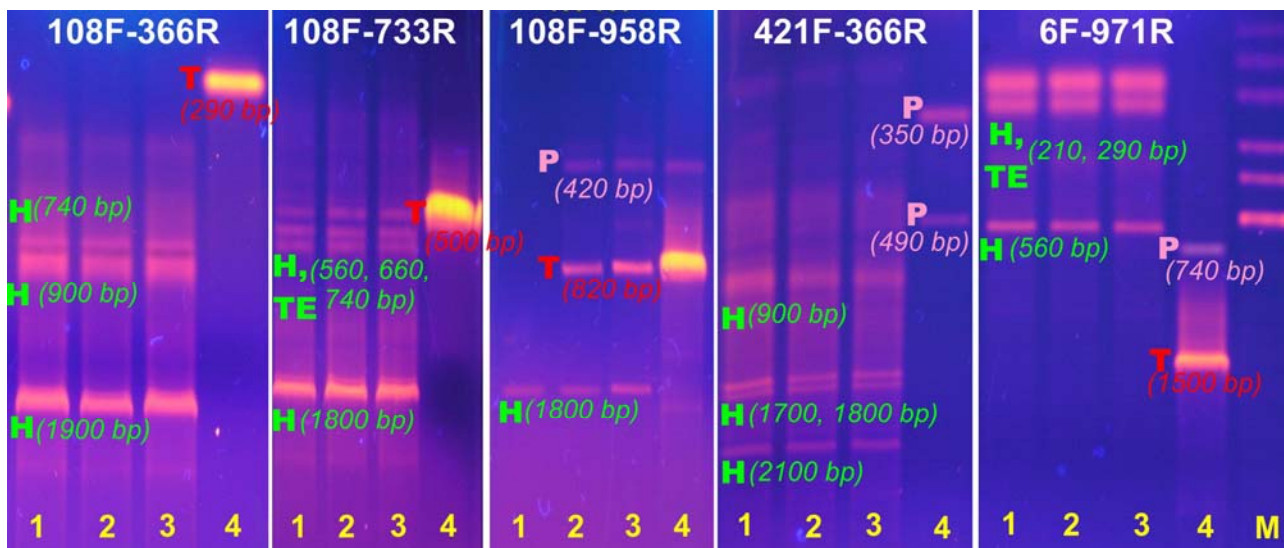
Sonda rDNA wykorzystywana do identyfikacji gatunków glonów.

Hybrydyzacja DNA-DNA (Southern) jest często wykorzystywana do identyfikacji transgenów ze względu na jej wyższą wiarygodność niż metoda PCR. Polega ona na hybrydyzacji genomowego DNA organizmu transgenicznego z sondą, która odpowiada transgenowi. Metoda ta nie ustala lokalizacji w genomie transgeny, ale pozwala ocenić liczbę kopii transgeny. Przykładowo na rys. 2.2.1. pokazano linie transgeniczne grochu zawierające gen *Vst1* z winorośli. Zawierają one jedną (nr 1) lub dwie kopie transgeny (nr 2). Na tym samym rysunku pokazano linie transgeniczne grochu z genem *pgip1* z maliny (3-8). Pozycje 3-4 oraz 7-8 pokazują dwie kopie transgeny (dwa prążki), a pozycja 5 – 3 kopie transgeny. Gen *pgip1* jest inhibitorem polylakturonaz grzybiczych. Obecność tego genu nadaje odporność na choroby grzybowe.



Rys. 2.2.1. Hybrydyzacja Southern linii transgenicznych grochu zawierających gen *Vst1* z winorośli (linia 1 i 2) oraz gen *pgip1* z maliny (linie 3-8). M oznacza marker masowy.

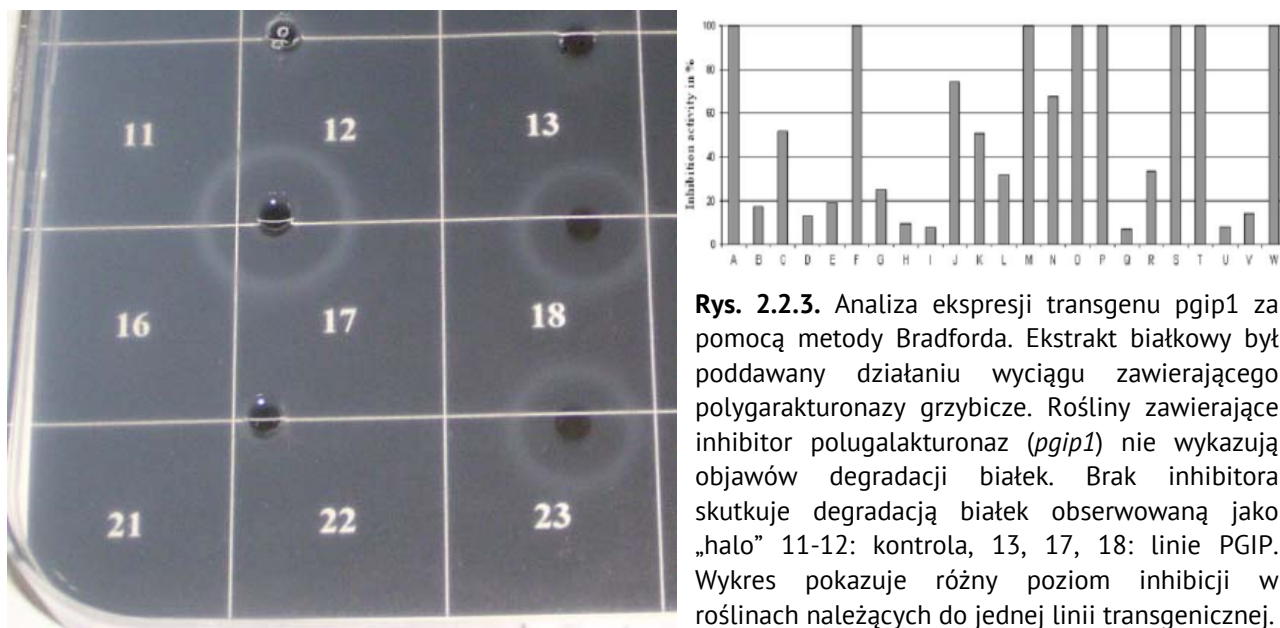
2.2.2. Identyfikacja transgeny metodą PCR.



Rys. 2.2.2. Analiza genu *pgip1* w liniach transgenicznych grochu. 1. Kontrola, 2. Linia PGIP. 3. Linia PGIP x VST. 4. Plazmid z gen *pgip1*. Gen *pgip1* został podzielony na fragmenty, do których zaprojektowani startery. Numery u góry pokazują zakres genu objęte starterami forward i reverse. T oznacza transgen, H oznacza homolog. Większość starterów specyficznych dla genu *pgip1* wykrywa homologii genu zamiast transgeny. Transgen jest prawidłowo wykrywany w plazmidzie co oznacza prawidłowo przeprowadzoną reakcję PCR.

Identyfikacja transgeny metodą PCR nastęrcza trudności wynikające z faktu, że sekwencje podobne (homologiczne) do transgeny znajdują się w genomie gospodarza (grochu). Wszystkie startery z wyjątkiem pary 421F-366R wykrywają transgen w plazmidzie. Reakcja jest specyficzna. Natomiast w roślinach transgenicznych transgen jest wykrywany tylko przez parę 108F-958R. Prążek o długości 820 bp występuje u obu linii transgenicznych, ale brakuje go w kontroli. Jednakże nawet ta para wykrywa dodatkowy prążek u wszystkich roślin, włącznie z kontrolą, który odpowiada homologom (długość 1800 bp). Pozostałe pary starterów wykrywają tylko homologii. Brak prążka odpowiadającego transgenowi u roślin transgenicznych może świadczyć o rearanzacji genu *pgip1* u roślin transgenicznych.

2.2.3. Analiza ekspresji transgenów



Rys. 2.2.3. Analiza ekspresji transgenu *pgip1* za pomocą metody Bradforda. Ekstrakt białkowy był poddawany działaniu wyciągu zawierającego polygakturonazy grzybicze. Rośliny zawierające inhibitor polugakturonaz (*pgip1*) nie wykazują objawów degradacji białek. Brak inhibitora skutkuje degradacją białek obserwowaną jako „halo” 11-12: kontrola, 13, 17, 18: linie PGIP. Wykres pokazuje różny poziom inhibicji w roślinach należących do jednej linii transgenicznej.

Analiza ekspresji transgenów nie zawsze potwierdza ich prawidłowe działanie. Tylko u części roślin należących do linii transgenicznych grochu z genem *pgip1*, gen ten był aktywny i wykazał zdolność do inhibicji polugakturonaz grzybowych. Znaczną zmienność w aktywności transgenu obserwuje się wśród roślin należących do jednej linii.



2.2.4. Analiza dziedziczenia transgenu

W pewnym laboratorium otrzymano groch transgeniczny ze wstawionym genem *altB*, który pochodzi od owsa szorstkiego i jest odpowiedzialny za wydzielanie kwasu cytrynowego przez korzenie, co nadaje roślinie zdolność do tolerowania wysokich dawek aluminium w glebie. Linie transgeniczną grochu odporną na aluminium skrzyżowano z nietransgeniczną odmianą grochu, Piast. Z jaką częstością wystąpią rośliny odporne na aluminium w pokoleniu F_2 tej krzyżówki. Proszę podać genotypy roślin odpornych na aluminium. Proszę uzasadnić odpowiedź. **(3 punkty)**

Czas wykonania: 15 minut

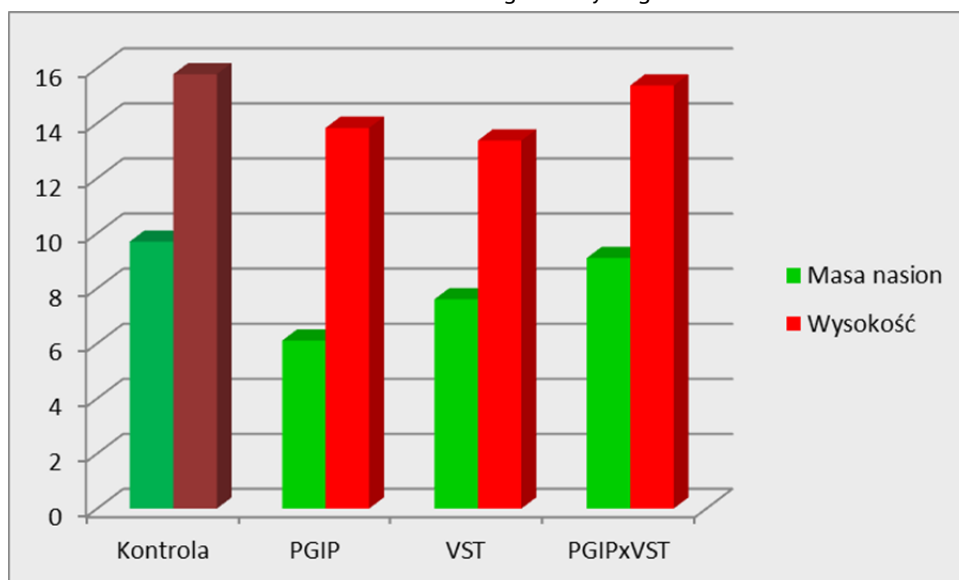
3. Analiza zmian w genomach GMO

3.1. Zmienność morfologiczna

➔ Rośliny transgeniczne często wykazują znacznie większą zmienność morfologiczną niż odmiana wyjściowa, z której je otrzymano. Ponadto często mają gorsze parametry plonu. Linie transgeniczne grochu z wprowadzonymi genami *pgip1* i *Vst1* charakteryzowały się zróżnicowaną morfologią nasion (Rys. 3. 1a).



Rys. 3.1a. Zmienność morfologiczna nasion w liniach transgenicznych grochu.

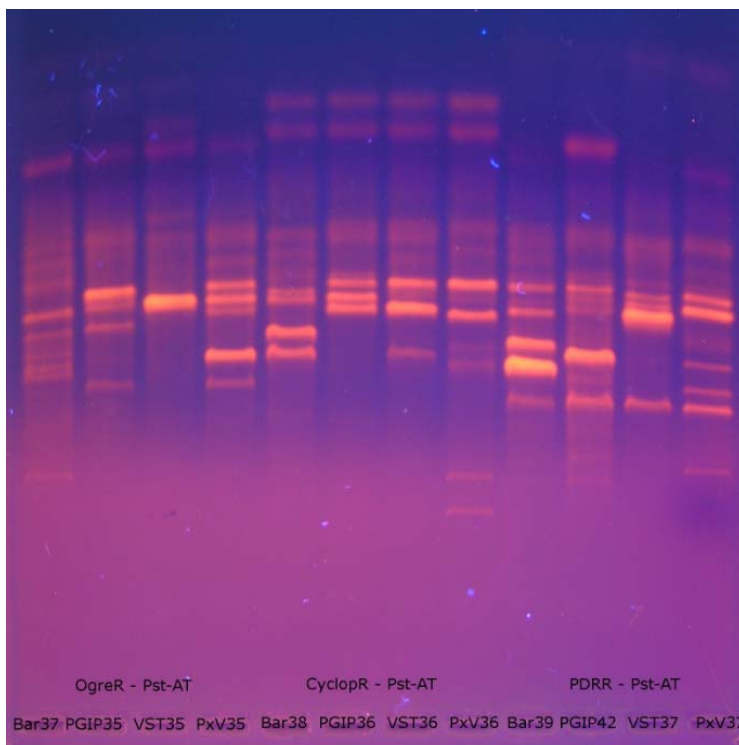


Rys. 3.1b. Porównanie plonowania i wysokości roślin transgenicznych względem kontroli.

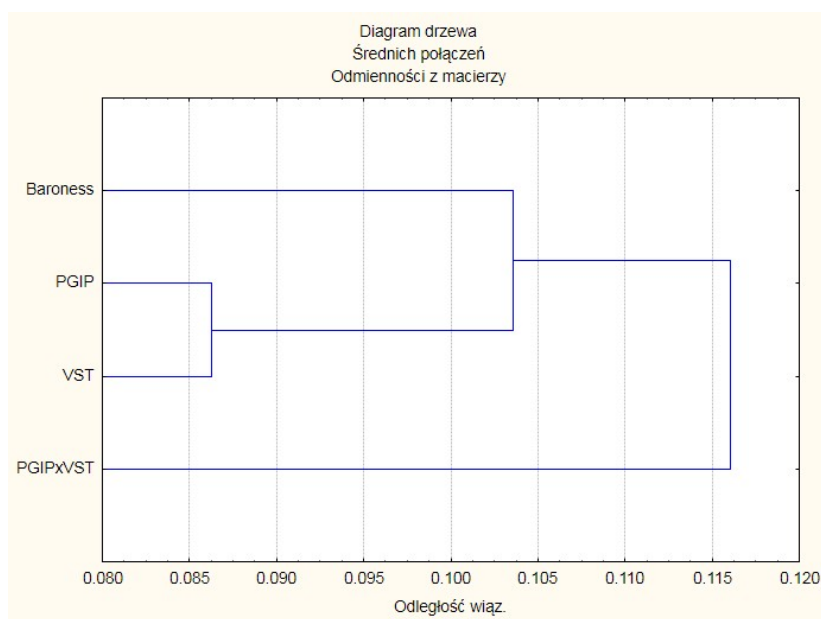
U roślin transgenicznych, w liniach PGIP i VST obserwowano niższy plon (Rys. 3.1b). Natomiast plon mieszańca pomiędzy liniami transgenicznymi był porównywalny z kontrolą. Może to wynikać z komplementacji genów warunkujących plon w obu liniach transgenicznych. Zjawisko takie jest również obserwowane u indukowanych mutantów, które mają niższy plon niż odmiana wyjściowa, ale po skrzyżowaniu wykazują efekt heterozji czyli wzrost plonu względem form rodzicielskich. Przyczyną tego zjawiska jest występowanie mutacji tła u indukowanych mutantów czyli licznych mutacji w genach warunkujących cechy ilościowe. Po skrzyżowaniu z innym mutantem dochodzi do komplementacji zmutowanych genów czego efektem jest przywrócenie plonu co najmniej do poziomu odmiany wyjściowej. Obserwowanie podobnego efektu heterozji w liniach transgenicznych wskazuje, że wprowadzenie transgeny wywołało wiele mutacji w genomie.

3.2. Remobilizacja transpozonów w roślinach transgenicznym

➔ Wstawienie transgenu może być związane z remobilizacją transpozonów. U grochu rośliny transgeniczne charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem miejsc insercji transpozonów jak również zmieniał się wzór metylacji. W efekcie różnice między liniami transgenicznymi a odmianą wyjściową były znaczne, co odzwierciedlała wartość współczynnika podobieństwa genetycznego Nei'a wynosząca 0,87-0,9 co wskazuje na początkowy etap dywergencji.



Rys. 3.2a. Zróżnicowanie miejsc insercji transpozonów u roślin transgenicznym (IRAP).



Rys. 3.2b. UPGMA dendrogram linii transgenicznym grochu otrzymany na podstawie miejsc insercji transpozonów.

4. Analiza zagrożeń i korzyści

4.1. Kontrowersje wokół organizmów GMO

➡ Organizmy modyfikowane genetycznie mogą być wykorzystane w medycynie (np. produkcja insuliny), w kosmetyce, a także w rolnictwie. Szczególne kontrowersje związane są z GMO stosowanymi w rolnictwie i wykorzystywanymi do produkcji żywności. Zarzuty dotyczą większej alergenicności, nieznanego wpływu GMO. Jednakże wydaje się, że zagrożenia w większym stopniu związane są z aspektami ekonomicznymi, w tym zubożeniem podstawy diety, dominacją małej liczby odmian, uprzedmiotowieniem rolników. Obecnie zwraca się uwagę także na duży ślad węglowy związane z znaczną odległością pomiędzy producentem a konsumentem. Wreszcie, odmiany GM są licencjonowane, co ogranicza prawo ich wykorzystania na własny użytek. Kolejnym aspektem są zagrożenia środowiskowe wynikające z nadmiernego stosowania środków ochrony roślin.

4.2. Opis korzyści i zagrożeń dla wybranego gatunku



Proszę wybrać gatunek rośliny transgenicznej i opisać modyfikację genetyczną (jaki gen wprowadzono i jaką cechę dzięki temu uzyskano). Proszę podać korzyści z zastosowania wybranej rośliny transgenicznej oraz zagrożenia. Tekst nie powinien przekraczać 2 stron A4 napisanych w edytorze tekstu (Word, Libre Office etc.).

Samodzielne wykonanie: 5 punktów

Termin: 22.01.2021. 23:59

polokkornelia@gmail.com

1. Organizmy modyfikowane genetycznie

1.2. Przykłady GMO

1.2.1. Proszę wejść na stronę ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications): <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp>.

A. Proszę podać najczęściej wprowadzane cechy komercyjne. (2 punkty)

- Tolerancja na stresy abiotyczne
- Poprawa wzrostu lub plonu
- Odporność na choroby
- Odporność na herbicydy
- Odporność na szkodniki (owady)
- Modyfikacja jakości produktu
- System kontroli zapylenia.

B. Proszę podać jakie zmiany dotyczące jakości owoców wprowadzono u *Malus x domestica* (jabłoń). Jakie geny wprowadzono i na czym polega istota manipulacji? Proszę podać handlowe nazwy odmian. (3 punkty)

- Zmiana dotyczy fenotypu owoców, które nie brązowieją podczas przechowywania.
- Do jabłoni wprowadzono dwa geny:
 - ▶ *PEGAS PPO*, gen supresorowy – transkrypt genu to ds. RNA, który jest przekształcany w siRNA. siRNA trawi mRNA genu PPO, co prowadzi do jego supresji i zahamowania brunatnienia owoców.
 - ▶ *nptII* z *E. coli*, odpowiada za rozkład neomycyny i kanamycyny, w efekcie rośliny są odporne na antybiotyki, gen służy do selekcji transformantów.
- Arctic „Golden Delicious”; Arctic, Arctic Fuji

C. Proszę podać nazwy gatunkowe łacińskie i polskie dla roślin GMO zatwierdzonych w Unii Europejskiej. (2 punkty)

- *Brassica napus*, kapusta rzepek
- *Dianthus caryophyllus*, goździk ogrodowy
- *Gossypium hirsutum*, bawełna kosmata
- *Zea mays*, kukurydza
- *Solanum tuberosum*, ziemniak
- *Glycine max*, soja warzywna
- *Beta vulgaris*, burak zwyczajny
- *Nicotiana tabaccum*, tytoń szlachetny

2. Identyfikacja transgenów

2.2. Identyfikacja transgenów

2.2.4. Analiza dziedziczenia transgenu

W pewnym laboratorium otrzymano groch transgeniczny ze wstawionym genem *altB*, który pochodzi od owsa szorstkiego i jest odpowiedzialny za wydzielanie kwasu cytrynowego przez korzenie, co nadaje roślinie zdolność do tolerowania wysokich dawek aluminium w glebie. Linię transgeniczną grochu odporną na aluminium skrzyżowano z nietransgeniczną odmianą grochu, Piast. Z jaką częstością wystąpią rośliny odporne na aluminium w pokoleniu F_2 tej krzyżówki. Proszę podać genotypy roślin odpornych na aluminium. Proszę uzasadnić odpowiedź. **(3 punkty)**

- Wprowadzony transgen dziedziczy się dominująco, gdyż nie ma odpowiedniego genu u roślin nietransgenicznych. Oznaczamy transgen jako A, brak transgenu jako a.
- Rośliny transgeniczne były liniami czystymi o genotypie AA, odmiana Piast to także linia czysta o genotypie aa.
- Po ich skrzyżowaniu otrzymujemy pokolenia F_1 o genotypie Aa, które jest odporne na aluminium.
- Pokolenie F_2 to krzyżowanie dwóch heterozygot Aa. W pokoleniu F_2 otrzymujemy 3 rośliny odporne na aluminium i jedną wrażliwą. Zatem rośliny odporne wystąpią z częstością $3/4$ (75%).
- Genotypy roślin odpornych to AA ($1/4$), Aa ($2/4 = 1/2$). Rośliny wrażliwe będą miały genotyp aa.