

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0294-11**

Nekonvenčný prístup prípravy obilnín so zvýšeným hospodárskym potenciálom

Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Daniel Mihálik, PhD.**

Príjemca **Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany
2. Fakulta chemickej s potravinárskej technológie, STU, Bratislava
- 3.
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

1. prototyp jačmeňa siateho produkujúci esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny - kyselinu gamalinolénovú a kyselinu stearidonovú
2. prototyp hexaploidnej pšenice produkujúci esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny - kyselinu gamalinolénovú a kyselinu stearidonovú
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Čertík, M., Adamechová, Z., Guothová, L.: Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations. Journal of Biotechnology, 168, 2013, 130-134 (IF – 3.183)
2. Čertík, M., Klemková, T., Guothová, L., Mihálik, D., Kraic, J.: Biotechnology for the functional improvement of cereal-based materials enriched with polyunsaturated fatty acids and pigments. European Journal of Lipid Science and Technology, 115(11), 2013, 1247-1256 (IF = 2.266)

3. Klemppova, T., Basil, E., Kubatova, A., Certik, M.: Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta-carotene by Zygomycetes fungi. *Biotechnology Journal*, 8, 2013, 794-800 (IF – 3.446)
4. 5. Transgenic barley producing essential polyunsaturated fatty acids / Daniel Mihálik, Marcela Gubišová, T. Klemppová, M. Čertík, Katarína Ondreičková, Martina Hudcovicová, Lenka Klčová, Jozef Gubiš, Ivana Dukupilová, L. Ohnoutková, Ján Kraic.
In: *Biologia Plantarum*. - ISSN 0006-3134. - Roč.58, č.2 (2014), s. 348-354., IF=1,74
5. Mihálik, D., Klčová, L., Ondreičková, K., Hudcovicová, M., Gubišová, M., Klemppová, T., Čertík, M., Pauk, J., Kraic, J. Biosynthesis of essential polyunsaturated fatty acids in wheat triggered by expression of artificial gene. *International Journal of Molecular Sciences Volume 16, Issue 12, 16 December 2015, Pages 30046-30060*

Uplatnenie výsledkov projektu

V rámci projektu boli pripravené svetovo unikátne prototypy obilnín - jačmeňa siateho a hexploidnej pšenice, ktoré nesú vo svojom génóme artificálny gén kódujúci enzým delta-6-desaturázy, ktorý im umožňuje syntézu esenciálnych polynenasýtených mastných kyselín, kyseliny gamalinolénovej a kyseliny stearidonovej. Doposiaľ nebola pripravená obilnina, ktorá by dosiahla produkciu týchto mastných kyselín, či už pripravených cestou klasického šľachtenia, resp. procesom transgenózy. Takéto rastliny budú slúžiť v ďalšom šľachtiteľskom procese ako potencionálny zdroj génov. Existujú alternatívne prístupy produkcie obilnín obohatených o esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny, prvou cestou je tvorba biomasy polosuchými kultiváciami obilnín kultivovaných vláknitými hubami, avšak týmto procesom nijako nevieme ovplyvniť genóm rastliny, alternatívou cestou je príprava transgénnych obilnín ako prirodzených producentov esenciálnych polynenasýtených mastných kyselín. V procese transgenózy sme využili ako donorov génov vláknité huby, pričom ich genetický kód bol upravený smerom k zvýšenej využiteľnosti genetického kódu obilninami. Významným výsledkom projektu je aj určenie sekvencie génov delta-6-desaturáz pri vláknitých hubách originalita týchto výsledkov bola dosiahnutá deponovaním týchto sekvencií v databáze GenBank. Významným prínosom projektu bola aj účasť diplomantov a doktorandov pri riešení projektu a aj ich významným príspevom boli dosiahnuté výsledky publikované vo významných vedeckých časopisoch spadajúcich pod databázu WOS. Medzinárodný rozmer práce možno dokladovať aj vyzvanými prednáškami na vedeckých konferenciách svetového významu.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Obilniny nedokážu produkovať esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny, biotechnologickým prístupom sme pripravili transgénny jačmeň a pšenicu produkujúce kyselinu gamalinolénovú a stearidonovú. Takéto obilniny sú svetovým unikátom a ešte nikto nedokázal pripraviť takéto obilniny. Ako zdroj génov zahrnutých v biosyntéze esenciálnych polynenasýtených mastných kyselín sme použili vláknité huby. Tieto gény však mali upravený genetický kód (codon usage) v prospech obilnín. Navyše špecifická expresie do endospermu cereálneho zrna bola podporená využitím špecifického promotora. Významným prvkom v procese prípravy transgénnych cereálií bola selekcia vhodných genotypov na transformáciu a optimalizácia regeneračných procesov rastlinných pletív. Pravdepodobne transgénne rastliny boli analyzované na genomickej a transkriptomockej úrovni pomocou klasickej a aj kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie. Prítomnosť esenciálnych polynenasýtených mastných kyselín bola potvrdená analýzami GC-MS a GC-FID. Hladina expresie transgénu dosahovala pri jačmeni 0.141% GLA, resp. 0,294% zo všetkých polynenasýtených mastných kyselín v zrne. Prítomnosť GLA bola potvrdená aj v zreloch zrnách transgéennej pšenice v množstve 0,04 - 0,32% (v /v), z celkového množstva mastných kyselín, taktiež boli zistené obe mastné kyseliny - kyselina gamalinolénová a kyselina stearidonová v listoch, stonkách, koreňoch plevách a ostinách zreloch a nezreloch zrnách T1 generácie, rovnako ako aj v nezreloch a zreloch zrnách T2 generácie. Obsah kyseliny gamalinolénovej a kyseliny

stearidonovej sa pohyboval v rozmedzí 0 - 1,40% (v /v), resp. 0 až 1,53% (v / v) z celkového množstva mastných kyselín.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku

(max. 20 riadkov)

Cereals cannot produce essential polyunsaturated fatty acids, we have prepared a transgenic barley and wheat that are capable of producing essential polyunsaturated fatty acids (gamma linolenic, stearidonic acid) by biotechnological approach. Such cereals are unique in the world and so far such cereals have not been prepared. As a source of the genes involved in the biosynthesis of an essential polyunsaturated fatty acid, we used a filamentous fungus. However, these genes, had modified codon usage towards cereals. Moreover, specificity of transgene expression in the endosperm of cereal grains has been encouraged by the using of specific promoters. Important step in the process of preparation transgenic cereal was the selection of suitable genotypes for the transformation and optimization of plant tissue regenerative processes. Potentially transgenic plants were analyzed on the genomic and transcriptomic level by using a classical and semi-quantitative polymerase chain reaction. GC-MS and GC-FID methods were used for presence confirmation of essential fatty acids. Transformed barley produced up to 0.141 % of gamma linolenic acid (GLA) and 0.294 % of stearidonic acid (SDA) of the total amount of fatty acids in their grains. Desired product of the wheat genetic modification by artificial D6D gene was the γ -linolenic acid. Its presence was confirmed in mature grains of transgenic wheat plants in the amount 0.04 – 0.32% (v/v) of the total amount of fatty acids. Both newly synthesized γ -linolenic acid and stearidonic acid have been detected also in leaves, stems, roots, awns, paleas, rachillas, and immature grains of the T1 generation as well as in immature and mature grains of the T2 generation. Contents of γ -linolenic acid and stearidonic acid varied in range 0 – 1.40% (v/v) and 0 – 1.53% (v/v) of the total amount of fatty acids, respectively.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Mgr. Daniel Mihálik, PhD.

V Piešťanoch 25. 01. 2016

Štatutárny zástupca príjemcu

Prof. Ing. Štefan Mihina, PhD.

V Lužiankach 25. 01. 2016

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu