

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání – Biologie se zaměřením na vzdělávání



**Jakub Vlach**

Zlaté potraviny – důvod vzniku, konstrukce a využití

"Golden' crops" – reason for their origin, construction, as well as use

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Olga Rothová, Ph.D.

Praha, 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2022

Jakub Vlach

## **Poděkování**

Mé velké díky patří RNDr. Olze Rothové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, přátelský přístup, zvláště pak vstřícnost a trpělivost při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval rodině a přátelům za opakovanou podporu v průběhu celého studia.

## **Abstrakt**

Deficience vitamínu A je dlouhodobým problémem ovlivňujícím populaci především nejchudších zemí světa. Pojí se s ní množství zdravotních problémů (kvalita zraku, náchylnost k infekcím). Vitamin A je přirozeně doplňován z potravy, v chudých oblastech je ovšem omezená možnost pestrého stravování, tedy chybí zdroje bohaté na mikroživiny. Místní populace je tak závislá na několika málo zemědělsky využívaných plodinách. Udržitelnou cestou ke zlepšení je pěstování biofortifikované rýže, kukuřice, batátu, banánu, čiroku nebo manioku. Tyto plodiny se souhrnně označují jako „zlaté potraviny“, neboť je pro ně typické žluté až oranžové zabarvení dužiny.

V předložené práci se nejprve detailněji věnuji popisu biosyntézy provitaminu A problematiky jeho deficience. Dále jsem na základě nastudované odborné literatury zpracoval současné znalosti týkající se konstrukcí zlaté rýže a dalších plodin, konzumovaných převážně v chudých oblastech světa. Pro každou z nich byla popsána metoda šlechtění mířící k vyššímu nahromadění  $\beta$ -karotenu v konzumovaných částech rostlin. Použité metody byly buď převážně konvenční a obohacená rostlina se získala tradičním šlechtěním (batát), nebo byly využity výhradně zásahy genového inženýrství, protože klasické metody byly nemožné či vysoce neefektivní (banán, rýže, maniok, čirok). Upravená kukuřice může vznikat vhodnou kombinací obou přístupů.

V závěru práce se dotýkám i kontroverze obklopující genové inženýrství a zpochybňující jeho užitečnost, včetně zmínky o konkrétních protestních akcích, a předkládám argumenty na podporu některých genetických zásahů.

## **Klíčová slova**

zlaté potraviny, GMO, vitaminy

## **Abstract**

Vitamin A deficiency is a long-term issue influencing mainly the population of poor countries. It causes a number of health problems (eyesight quality, susceptibility to infection diseases). Vitamin A is obtained naturally from food, however in poor countries there is a lack of varied diet rich in micronutrients. Local population is dependent on a few crop types actually planted and harvested in such regions. A sustainable way to improve this situation is growing of biofortified rice, maize, sweet potato, banana, sorghum, or cassava. These crops are called “golden crops” for their specific yellow to orange color.

In the thesis, I thoroughly describe the biosynthesis of Provitamin A and the issue of its deficiency. Based on studied literature, I have compiled the currently known information about the production of golden rice and other golden crops consumed mainly in poor countries. There is a breeding method aiming at increasing the level of  $\beta$ -carotene in consumed parts of plants described for each particular crop type. Described methods are either conventional when the enriched plants are obtained through traditional breeding (sweet potato), or processes of genetic engineering are applied because of the insufficiency or impossibility to use conventional methods (banana, rice, cassava, sorghum). Enriched maize can be produced by a combination of both.

In final part of the thesis, I address the controversy surrounding genetic engineering and putting in doubt of its beneficial effects. I also mention some specific protest actions and offer some arguments supporting some aspects of genetic interference.

## **Key words**

golden crops, GMO, vitamins

## Seznam zkratek

ABS	Africa Biofortified Sorghum
ACO	aminocyklopropankarboxylát oxidáza
BCH	$\beta$ -karotenhydroxyláza
CaMV	promotor viru mozaiky kvěťáku
CIMMYT	Mezinárodní centrum pro zlepšení kukuřice a pšenice
CRTB	bakteriální fytoensyntáza
CRTI	karotendesaturáza
CRTISO	karotenisomeráza
DMADP	dimethylallyldifosfát
DOXP	1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát
DXS	1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátsyntáza
Exp1	expanzin 1
GA-3-P	glyceraldehyd-3-fosfát
GGPP	geranylgeranyldifosfát
GUS	$\beta$ -glukuronidáza
GWAS	celogenomová asociační studie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IITA	Mezinárodní institut tropického zemědělství
IPI	isopentenylidifosfátizomeráza
IPP	isopentenylidifosfát
IU	mezinárodní jednotky vyjadřující množství karotenoidu přeměnitelného na ekvivalentní množství účinného retinolu
LCYB	lykopenbetacykláza
LCYE	lykopenepsiloncykláza
MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát
NK buňky	lymfocyty, z anglického natural killer
NXS	neoxanthinsyntáza

OFSP	batáty s oranžovou dužinou
<i>Or</i>	gen <i>Orange</i>
PDS	fytoendesaturáza
PSY	fytoensyntáza
QTL	lokus pro kvantitativní znak
RAE	ekvivalenty aktivity retinolu
RE	ekvivalenty retinolu
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SSR	jednoduché opakující se sekvence
T-DNA	transferová DNA
Ubi	polyubikvitin
VAD	nedostatek vitamínu A
VADD	poruchy v důsledky nedostatku vitamínu A
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZDS	ζ-karotendesaturáza
ZEP	zeaxanthinepoxidáza
Z-ISO	5-cis-ζ-karotenizomeráza

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Vitamin A v metabolismu člověka a jeho biosyntéza .....	3
2.1	Nedostatek vitamínu A .....	5
2.2	Syntéza provitaminů A v rostlinách .....	6
3	Konstrukce zlaté rýže ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	9
4	Další příklady zlatých potravin .....	13
4.1	Povijnice batátová ( <i>Ipomoea batatas</i> L.) .....	14
4.2	Banánovník ( <i>Musa</i> spp.) .....	15
4.3	Maniok jedlý ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) .....	18
4.4	Čirok obecný [ <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] .....	19
4.5	Kukuřice ( <i>Zea mays</i> L.) .....	21
5	Bojkot GMO rostlin – zlatá rýže .....	26
6	Diskuze Možnosti uplatnění tématu ve výuce .....	28
7	Závěr .....	29
	Seznam použité literatury .....	30



# 1 Úvod

Podle dat z roku 2020 se v potravinové nejistotě nacházelo až 1,25 miliardy lidí, z toho přímo hladem trpělo 690 milionů (FAO a kol., 2020). Celosvětovým zájmem je bojovat proti chronické (tělu chybí některé makroživiny) i skryté (tělu chybí některé mikroživiny) podobě hladu (Gödecke a kol., 2018). Chybějící mikroživiny v podobě vitaminů a minerálních látek představují zdravotní riziko zejména pro děti předškolního věku a těhotné matky, které vyžadují jejich zvýšený příjem (Bouis a Saltzman, 2017). Snížený příjem vede jak k podvýživě, tak i obezitě a s nimi spojeným patologickým jevům, jako jsou oslabená imunita, větší náchylnost k chorobám, úbytek tělesné hmotnosti, opožděný tělesný a/nebo mentální vývoj (FAO a kol., 2020).

Nejčastěji chybějícími mikronutrienty jsou jód a železo. Jejich nedostatkem trpí až 2 miliardy lidí. Následují zinek, vitamin A, většina vitaminů skupiny B, vitaminy C a D, vápník, selen a fluor (Tulchinsky, 2010). V této práci se zaměřuji na nedostatek vitamínu A, který je dlouhodobě přetrvávající zejména v různorodé skupině rozvojových zemí, pro něž chybí jednotící definice, nicméně obecně se literatura shoduje na označení chudé (kde hlavními faktory jsou faktory ekonomické, dále průměrná délka života, přístup ke zdravotní péči, kvalita stravy nebo gramotnost obyvatelstva). Podle dat Organizace spojených národů se velká část zemí spadajících do této skupiny nachází na africkém kontinentě. Jsou však i v Asii, Oceánii a Latinské Americe (Traeger a kol., 2020).

Zdroji živin v těchto chudých zemích jsou obiloviny, kořeny, hlízy, banány a další potraviny uspokojující nezákladnější nutriční požadavky. Potraviny živočišného původu tvoří necelých 11 % stravy obyvatel tamějších oblastí (FAO a kol., 2020). Navýšení jejich podílu by přispělo k vyvážené stravě. Ovšem realizace této ideje vyžaduje nemalé investice, a to jak ze strany států, tak ze strany obyvatel, zvláště zemědělců. Možným řešením v boji s podvýživou jsou biotechnologie v čele s geneticky modifikovanými organizmy (Bouis, 2007).

Dalším faktorem, který negativně přispívá k nepoměru mezi deficiencí vitamínu A a nedostatečností humanitární pomoci, jsou klimatické změny. Zvyšující se frekvence extrémních klimatických jevů vede ke zhoršení životní úrovně obyvatel chudých zemí. Horka, nedostatek vody i povodně znesnadňují provedení běžné hygieny a napomáhají v šíření nemocí (malárie, horečka dengue, cholera a další závažná průjmová onemocnění). Zvyšuje se významně riziko podvýživy (Hales a kol., 2003).

Využití biotechnologií se nabízí i proto, že nabídka humanitární pomoci je v současné době stále nedostačující a pro množství lidí i nedostupná. V současné době je nejčastějším řešením vitaminové deficience podávání obohacených potravin a kapslí s vitamínem rozpuštěným v oleji. To je ale dlouhodobě neudržitelné, suplement má pouze časově omezený účinek a mnohonásobně opakované podávání je pro množství těch, kteří jsou rizikovou skupinou, z hlediska organizace neuskutečnitelné. Navíc humanitární organizace nejsou aktuálně schopné zajistit přístup k těmto suplementům všem dotčeným (UNICEF, 2020).

To, že finanční stránka z hlediska nákupu pestré stravy hraje zásadní roli, potvrzují i výzkumy, podle nichž se v roce 2017 pod mezinárodních hranicí chudoby (1,90 USD/den) nacházelo 689 milionů lidí. Kvůli pandemii COVID-19 je předpokládán nárůst o 88-150 milionů. Do roku 2030 se tak pravděpodobně nepodaří snížit hranici pod 3 % světové populace (World Bank, 2020).

Motivací k sepsání této práce byl primárně můj zájem o vybrané téma, dále absence česky psané přehledné publikace současně pojednávající o nedostatku retinolu a možnostech jeho doplnění za pomoci vyšlechtěných geneticky upravených rostlin. Svou roli hrála i kontroverze, která téma provází, a touha jí blíže porozumět.

Cílem předkládané práce je vypracovat literární rešerši a zpracovat přehled nejdůležitějších plodin obohacených o provitamin A včetně cest jejich přípravy a možností využití v praxi. Součástí práce je i zamyšlení nad využitím zvoleného tématu ve školní výuce.

## 2 Vitamin A v metabolismu člověka a jeho biosyntéza

Vitaminy tvoří heterogenní skupinu látek potřebnou pro správnou výživu heterotrofních organismů. Protože si je organismy neumí syntetizovat, musejí být přijímány z potravy zpravidla ve stopových množstvích buď v hotové formě, či jako provitaminy. Z tohoto důvodu jsou považovány za esenciální mikroživiny. Jako kofaktory enzymů jsou nezbytné pro správný průběh mnoha biochemických reakcí. Rozdělují se na vitaminy rozpustné ve vodě (vitamin C a skupina vitaminů B) a vitaminy rozpustné v tucích (vitaminy A, D, E, K). U většiny vitaminů je nadbytečně přijaté množství obvykle vyloučeno močí, nicméně u vitaminů A a D se vitamin hromadí a projevují se následky hypervitaminózy. V této práci se budu zabývat především pojmy hypovitaminóza (snížený příjem vitamínu) a avitaminóza (naprostá absence vitamínu v těle) (Kodíček a kol., 2018; Bernášková a Rokyta, 2016).

Vitamin A spadá do skupiny tzv. retinoidů, což je zastřešující pojem pro syntetické i přirozeně se vyskytující látky. Všechny jsou odvozeny od diterpenu, jehož stavební izoprenové jednotky jsou spojeny motivem hlava k ocasu. Výsledná struktura obsahuje cyklickou a acyklickou část zakončenou funkční skupinou měnící se podle konkrétní sloučeniny. Mezi uhlíkovými atomy se nachází pět dvojných vazeb. Samotný vitamin A vymezuje skupinu látek vykazující podobnou biologickou aktivitu jako retinol s triviálním označením vitamin A<sub>1</sub> (IUPAC-IUB, 1967). Jakákoli změna ve struktuře retinolu mimo poslední uhlíkový atom výrazně snižuje jeho účinnost v organismu (Plack, 1965).

Mezi zdroje tzv. preformovaného vitamínu A (retinolu a jeho esterů) patří játra, vejce, mléko, sýry a máslo. Významná část vitamínu A se dostává do těla v podobě provitaminů – karotenoidů – obsažených v rostlinné stravě. Zdrojem je kromě charakteristicky zabarvených plodů (mango, mrkev) i listová zelenina (špenát) (Block a kol., 1985). Mezi látky, z nichž vzniká retinol, patří  $\beta$ -kryptoxanthin a karoteny se svými deriváty. Ostatní karotenoidy se na tvorbě vitamínu A nepodílí – např. lykopen (Castenmiller a West, 1998). Bohatým zdrojem provitaminů A je i červený palmový olej (Lietz a kol., 2001), jenž se ukazuje jako atraktivní v boji s VAD (nedostatkem vitamínu A) v rozvojových zemích (Dong a kol., 2017).

Mezi základní a nejdéle známé funkce vitamínu A v organismu patří jeho podíl na růstu, vliv na kvalitu zraku, udržení celistvosti pletiv a jejich diferenciaci. Podstatnou roli plní během těhotenství a laktace. Nezbytný je pro správný vývoj dítěte (WHO, 2009).

Klíčovou roli v procesu embryogeneze hraje oxidovaná forma retinolu – kyselina retinová. Je to důležitá signální molekula regulující transkripci genů a působící mimo jiné jako morfogen (Blomhoff a Blomhoff, 2006). Její nadbytek může způsobit poškození plodu. Podílí se na správném vývoji srdce, centrální nervové soustavy, očí, uší nebo končetin (Lammer a kol., 1985). Dále podporuje některé složky imunity – např. činnost NK buněk (typ lymfocytů z anglického natural killer) (Hall a kol., 2011). Představuje o něco účinnější formu vitamínu A (Thompson a Pitt, 1960).

Preformovaný vitamin A se vstřebává do těla v tenkém střevě převážně v podobě retinylesterů jako retinylpalmitát a retinylstearát. Oba estery se stávají součástí chylomikronů, s nimiž jsou transportovány dále do těla (Goodman a kol., 1966). Více než 90 % takto přijatého vitamínu se uskládá v játrech (Trumbo a kol., 2001). Z hlediska této práce je podstatná i koncentrace retinolu v krvi, o které pojednávám níže.

Při vstřebávání provitaminů se z celkového dodaného množství většina konvertuje na vstřebatelnou formu a jen malé množství se vstřebává bez úpravy (Goodman a kol., 1966). Vstřebané provitaminy, odlišující se zdrojem svého původu a svým chemickým složením, se následně v různých nestejných poměrech konvertují na účinný retinol. Z těchto poměrů lze číselně vyjádřit ekvivalentní množství provitaminu A potřebné k získání účinného retinolu. Veličinami, které kvantifikují zmíněné množství, jsou např. mezinárodní jednotky (IU), ekvivalenty retinolu (RE) nebo ekvivalenty aktivity retinolu (RAE). Hodnoty každé z nich jsou mezi sebou vzájemně převeditelné. RAE je hojně využívanou veličinou uváděnou nejčastěji v mikrogramech – 1 µg RAE je ekvivalentní 1 µg čistého retinolu (Grune a kol., 2010).

Nejefektivněji je přeměňován čistý β-karoten rozpuštěný v oleji, který se využívá jako suplement. V potravě obsažený β-karoten se zpravidla konvertuje podle RAE v poměru 12:1 (Trumbo a kol., 2001), čili 12 µg β-karotenu je ekvivalentních 1 µg retinolu. Stejný poměr uvádí i Světová zdravotnická organizace (WHO, 2009). U ostatních konverze schopných karotenoidů musí být příjem z potravy přibližně dvojnásobný. Doporučený denní příjem vitamínu A pro dospělého muže či ženu se pohybuje okolo 700 µg RAE/den. Za maximální hraniční denní příjem se považuje 3000 µg RAE/den (Grune a kol., 2010; Trumbo a kol., 2001).

Při vysokých přísunech vitamínu A se mohou objevit patologie typické pro hypervitaminózu. Některá znaky uvádí Thompson a Pitt (1960) z experimentu na laboratorních myších. Zvířata přestala růst, krvácela okolo čumáku a očí. V důsledku řídnutí kostí se jim objevovaly zlomeniny dlouhých kostí.

## 2.1 Nedostatek vitamínu A

Nedostatek vitamínu A představuje problém veřejného zdraví obzvláště v oblastech s nízkými příjmy, které jsou hlavně v Africe, jihovýchodní Asii a Jižní Americe. Nejvíce ohroženy bývají těhotné i kojící ženy a děti od 6 do 59 měsíců věku. U novorozenců jsou potřebné látky získávány z mateřského mléka. Z dat WHO sbíraných mezi léty 1995 až 2005 vyplývá, že v tehdejší populaci trpělo mezní hladinou retinolu v krevní plazmě ( $<0,70 \mu\text{mol/l}$ ) pro VAD odhadem 190 milionů dětí předškolního věku a přibližně 19 milionů těhotných žen. Nízká hladina retinolu v krvi vede k mnoha patologickým změnám nesoucím souhrnné označení VADD (poruchy v důsledku nedostatku vitamínu A). Příkladem VADD je šeroslepost, kterou podle výše uvedených údajů trpělo 5 milionů dětí do 5 let a téměř 10 milionů těhotných žen. O možných cestách vedoucích ke snížení nedostatku mikroživin pojednávám výše. Nabízí se zlepšení složení stravy cílové populace, dodávání čistého vitamínu A v kriticky zasažených zemích, přidávání vitamínu A do již hotových potravinářských produktů (fortifikace) či využití šlechtitelských metod (biofortifikace) (WHO, 2009).

Deficience vitamínu A je dále doprovázena anémiemi a náchylností k infekcím. Lidé se snáze nakazí např. respiračním onemocněním, průjmem (Sommer a kol., 1984) nebo spalničkami. Zvyšuje se úmrtnost (WHO, 2009). S nedostačujícím příjmem vitamínu A, jeho nízkou koncentrací v krvi a téměř vyčerpanými jaterními zásobami se začne patologicky měnit stavba epitelů oka (WHO, 1976). Onemocnění se nazývá xeroftalmie a projevuje se nejčastěji vysycháním spojivky a rohovky. Spojivka ztrácí lesk, zvrásňuje se, hůře propouští světlo a objevuje se šeroslepost, rohovka se kalí apod. Mírnými, ale patrnými projevy hypovitaminózy jsou Bitotovy skvrny (McLaren a kol., 1966). V rohovce oka se objevují zpěněné, keratinizované útvary přibližně tvaru trojúhelníku. Všechny tyto příznaky lze léčit dodáním chybějícího vitamínu A (Chakraborty a Chandra, 2021). Při dlouhodobém nedostatku přichází nevratné změny vedoucí k trvalému oslepenutí. Oko prochází ulcerací. Tvoří se vřídky, povrchové epitely praskají a rozvíjí se keratomalacie (McLaren a kol., 1966). Je patrné, že xeroftalmie nabývá různých intenzit. Podle WHO (1976) jsou příznaky rozděleny na primární a sekundární. Jedná se o nejčastější příčinu dětské slepoty v chudých oblastech.

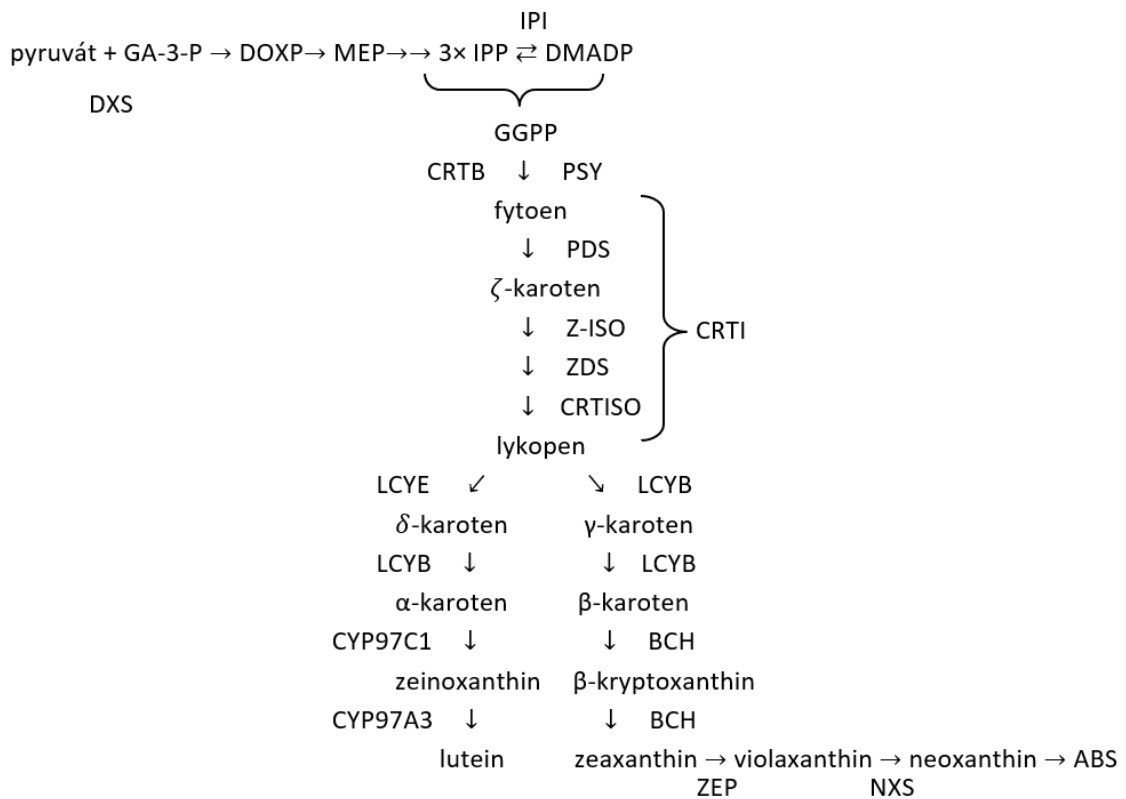
## 2.2 Syntéza provitaminů A v rostlinách

Vitamin A plní v lidském těle nezastupitelnou úlohu a jeho nedostatek se projeví fatálními důsledky, proto musí být dodáván z vnějších zdrojů, jak popisují výše. V tomto textu čtenáře blíže seznámím se syntézou karotenoidů prostřednictvím metabolické dráhy probíhající v rostlinných a prokaryotických buňkách. Seznámení s dráhou je potřebné pro pochopení genetických zásahů směřujících k biofortifikovaným plodinám.

Buňkou syntetizované karotenoidy se nerozpuštěné nacházejí v leukoplastech, amyloplastech, chloroplastech i chromoplastech. Akumulace stoupá od nezabarvených leukoplastů po chromoplasty, které jsou hlavní zásobní organelou karotenoidů (Sun a kol., 2022). Popisem vlastností krystalů, krystalitů, filament, globulí a dalších struktur představujících nerozpuštěné formy karotenoidů a jejich vlivem na vývoj chromoplastů se zabývali ve své práci např. Wen a kol. (2020). Značnou tendenci akumulovat karotenoidy mají amyloplasty. Ovšem enzymatická výbava amyloplastů v hlízách (např. bramboru) neumožňuje dostatečnou syntézu  $\beta$ -karotenu. Vhodnými zásahy by bylo možné amyloplasty využít při obohacování zásobních orgánů rostlin o provitamin A (Diretto a kol., 2007).

Při objevování složité biosyntetické dráhy sloužily často jako modelové organizmy rajčata (*Solanum lycopersium*) nebo huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Některé zásadních kroky biosyntézy byly dostatečně vysvětleny až v relativně nedávných letech, kdy se podařilo izolovat zbývající klíčové enzymy (Chen a kol., 2010).

Jak je zřejmé z Obrázku 1 uvedeného níže začíná syntéza karotenoidů v plastidech spojením glycerinaldehyd-3-fosfátu (GA-3-P) a pyruvátu (Lichtenthaler a kol., 1997). Jako produkt se uvolňuje 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát (DOXP). Krok je katalyzovaný DOXP syntázou (DXS) kódovanou genem *CLAI* (Estévez a kol., 2000). Následuje přeměna DOXP na MEP neboli 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát. Podle těchto prvních dvou produktů se dráha stručně označuje jako DOXP/MEP (Schwender a kol., 1999). Syntéza vede přes další meziprodukty, které ovšem nejsou pro tuto práci významné, a proto nejsou na Obrázku 1 zobrazeny, až ke dvěma zároveň vznikajícím stěžejním látkám isopentenylidifosfátu (IPP) a převažujícímu dimethylallyldifosfátu (DMADP) (Rohdich a kol., 2002). Izomerace mezi oběma látkami (IPP a DMADP) je závislá na činnosti enzymu IPI neboli isopentenylidifosfátizomeráze (Pankratov a kol., 2016). Vzájemnou reakcí jedné molekuly DMADP s třemi molekulami IPP vzniká geranylgeranylidifosfát (GGPP).



Obrázek 1: Přeřazeno a upraveno podle Schwandera a kol. (1999), Stanleyho a Yuana (2019) - Schéma syntézy karotenoidů v plastidech. Syntéza karotenoidů začíná v plastidech spojením pyruvátu a GA-3-P (glyceraldehyd-3-fosfát). Uvolňují se DOXP (1-deoxy-D-xydulóza-5-fosfát) a MEP (2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát). Syntéza vede až k zároveň vznikajícím látkám IPP (isopentenylidifosfát) a DMADP (dimethylallylidifosfát). Obě sloučeniny vzájemně přecházejí jedna v druhou, přičemž rovnováha je posunuta směrem k IPP. Izomeraci katalyzuje enzym IPI (isopentenylidifosfátizomeráza). Reakce tří molekul IPP s jednou molekulou DMADP poskytne jednu molekulu GGPP (geranylgeranylidifosfát). Přeměnu GGPP na fytoen zajišťuje fytoensyntéza – buď rostlinná PSY, nebo její bakteriální analog CRTB. U bakterií vzniká lykopen přímo z fytoenu reakcí katalyzovanou CRTI (karotendesaturáza). U rostlin se na přeměně podílí PDS (fytoendesaturáza), Z-ISO (5-cis- $\zeta$ -karotenizomeráza), ZDS ( $\zeta$ -karotendesaturáza) a CRTISO (karotenisomeráza). Od lykopenu se biosyntetická dráha větví. V jedné větví je lykopen přeměňován LCYE (lykopenepsilonykyláza) na  $\delta$ -karoten, LCYB (lykopenbetacykyláza) na  $\alpha$ -karoten, CYP97C1 na zeinoxanthin a CYP97A3 na lutein. V druhé větví je lykopen přeměňován LCYB na  $\gamma$ -karoten a následně na  $\beta$ -karoten, BCH ( $\beta$ -karotenhydroxyláza) na  $\beta$ -kryptoxanthin a v dalším kroku na zeaxanthin. Zeaxanthin přeměňuje enzym ZEP (zeaxanthinepoxidáza) na violaxanthin. NXS (neoxanthinsyntáza) katalyzuje přeměnu violaxanthinu na neoxanthin, z kterého vzniká ABS (kyselina abscisová).

Důležitým enzymem metabolické dráhy je fytoensyntáza (PSY), jejíž činnost je silně závislá na světle (Von Lintig a kol., 1997). U papriky (*Capsicum*) je součástí multi-enzymového komplexu, který se skládá ze tří dílčích enzymů – isopentenylpyrofosfátizomerázy, geranylgeranylpyrofosfátizomerázy a fytoensyntázy. Výsledkem reakcí komplexu enzymů s meziprodukty je přeměna GGPP na fytoen (Camara, 1993) – viz Obrázek 1. Přítomnost enzymu PSY je pro výrobu dalších prekurzorů karotenoidů klíčová. V případě umlčení exprese genu *PSY* se nevytvoří potřebný enzym katalyzující další kroky biosyntézy. U plodu rajčete s touto úpravou chybělo jasně červené zbarvení dané

lykopenem. Bobule byla nevýrazná, měla mdlé barvy v odstínech bílé a světle žluté (Fantini a kol., 2013).

K enzymu PSY je nutné dodat, že existuje více jeho izoform. V této práci uvádím tři fytoensyntázy. Geny *PSY1* a *PSY2* jsou paralogní. Jejich sekvence si jsou velmi podobné a odlišnosti se nachází zejména v oblasti intronů. Exprese genu *PSY1* je největší v barevných částech rostliny a plodech během dozrávání. Gen *PSY2* je exprimován jak v zelených částech rostliny a kořenech, tak v okvětních lístcích (Giorio a kol., 2008). Nicméně vliv enzymu PSY2 na zrání plodů je oproti enzymu PSY1 minimální, což dokazuje nezměněný fenotyp rajčete při jeho absenci. Celkové složení karotenoidů se mění zanedbatelně. Stejně účinky na fenotyp vykazuje i inaktivace třetí formy genu *PSY3* (Fantini a kol., 2013). Velké množství enzymu PSY3 se objevuje v kořenech lipnicovitých rostlin. Jeho zvýšení je spojováno s působením stresu na rostliny (Li a kol., 2008).

Kromě genů pro rostlinnou fytoensyntázu existuje i bakteriální verze kódovaná genem *CRTB*. Fraser a kol. (2002) učinili experiment, při kterém vložili *CRTB* do genomu rajčete. Výsledkem bylo zvýšení jeho nutriční hodnoty díky nahromadění karotenoidů. Příznivé výsledky experimentu započaly sérii dalších pokusů. Manipulace s plody rajčete pokračuje i nadále a nové výzkumy se zaměřují na speciálně geneticky upravené odrůdy rajčat (Lin a kol., 2021).

U vyšších rostlin bylo izolováno několik enzymů zodpovědných za přeměnu fytoenu na lykopen. Z Obrázku 1 je patrné, že první reakce je katalyzována enzymem fytoendesaturázou (PDS). Reakcí vzniká z fytoenu  $\zeta$ -karoten (Giuliano a kol., 1993). PDS je enzym izolovaný a charakterizovaný již v první polovině 90. let (Mann a kol., 1994). Stejně jako u enzymu PSY je funkce enzymu PDS závislá na světle (Giuliano a kol., 1993) a jeho absence se v plodu rajčete projeví snížením množství lykopenu oproti původnímu typu (Fantini a kol., 2013).

Přeměnu  $\zeta$ -karotenu zajišťuje 5-cis- $\zeta$ -karotenizomeráza (Z-ISO). U rajčat je rozlišována poměrně evolučně konzervovaná skupina těchto proteinů. Izolovány byly z různých barevných odrůd a své využití by mohly nalézt v taxonomii (Efremov a kol., 2021). Enzymy Z-ISO podporují pigmentaci plodů, tak jak uvádí např. Rodrigo a kol. (2019) na příkladu citrusů. Z přehledového schématu biosyntézy karotenoidů podle Breitenbacha a Sandmanna (2005) vyplývá, že Z-ISO byl posledním hledaným enzymem dráhy DOXP/MEP vedoucí od fytoenu k lykopenu. Tento krok vystihuje i schéma na Obrázku 1. Předposledním enzymem podílejícím se na přeměně  $\zeta$ -karotenu na lykopen je



$\zeta$ -karotendesaturáza (ZDS). Gen pro ni byl izolován např. z kukuřice (Matthews a kol., 2003). Za poslední přeměnou stojí enzym karotenisomeráza (CRTISO).

U prokaryotních organizmů probíhá přeměna fytoenu na lykopen snadněji. Například u fotosyntetizující purpurové bakterie *Rubrivivax gelatinosus* je přeměna řízena jediným enzymem, a to karotendesaturázou (CRTI) (Harada a kol., 2001). Přeměnu lze vidět výše na Obrázku 1.

Biosyntetická dráha se od lykopenu začíná větvit. Tento bod větvení je dobře patrný z Obrázku 1. Enzym lykopenepsilonycykláza (LCYE) převádí lykopen na  $\delta$ -karoten (Ronen a kol., 1999; Giorio a kol., 2013). Druhým směrem je dráha vedena lykopenbetacyklázou (LCYB), a to přes  $\gamma$ -karoten k  $\beta$ -karotenu. Enzym LCYB plní úlohu i v následné přeměně  $\delta$ -karotenu na  $\alpha$ -karoten (Giorio a kol., 2013).

Xantofyly vznikají hydroxylačními reakcemi z karotenů. Z  $\alpha$ -karotenu po reakci s enzymem CYP97C1 vznikne zeinoxanthin (Tian a kol., 2004), který je výchozí látkou pro enzym CYP97A3. Vzniká finální lutein (Kim a DellaPenna, 2006). Přeměna  $\beta$ -karotenu nejprve poskytne  $\beta$ -kryptoxanthin, který je následně přeměňován až na zeaxanthin, a to činností jediného enzymu BCH tedy  $\beta$ -karotenuhydroxylázou (Sun a kol., 1996). Zeaxanthin podléhá epoxidaci zeaxanthinepoxidázou (ZEP) na violaxanthin (Schwarz a kol., 2015). Violaxanthin při interakci s neoxanthinsyntázou (NXS) poskytne přímý prekurzor kyseliny abscisové (ABS) – neoxanthin (Bouvier a kol., 2000). ABS patří mezi rostlinné hormony plnicí významnou roli v rostlinné fyziologii stresu – zejména v adaptaci na sucho (Du a kol., 2010) a nadměrné ozáření (Demmig a kol., 1987).

### 3 Konstrukce zlaté rýže (*Oryza sativa* L.)

Rýže je jednou z nejvíce pěstovaných a konzumovaných plodin. Se světovou produkcí téměř 510 000 000 tun z období let 2021/2022 je po pšenici a kukuřici třetí nejpěstovanější obilovinou (Shahbandeh, 2022). Všechny vnější vrstvy (oplodí, slupka semene a aleuronová vrstva bohatá na oleje), obklopující škrobový endosperm, bývají před konzumací odstraněny mletím. Endosperm je tak hlavní konzumovanou částí rýže, a proto se biofortifikace zaměřují na jeho obohacování o chybějící mikronutrienty (Ye a kol., 2000; Lee a An, 2009).

Člověk pěstuje mnoho vyšlechtěných odrůd rýže, přičemž jejich genetický základ vychází zejména ze dvou dobře diverzifikovaných poddruhů – *Oryza sativa japonica*

a *Oryza sativa indica*. Na základě studia mikrosatelitních jaderných SSR (jednoduchých opakujících se sekvencí) DNA a dvou fragmentů chloroplastové DNA (PS-ID a ORF-100) byly současné kultivary rýže rozlišeny do pěti velkých skupin – indická rýže, japonská rýže mírného pásma, japonská rýže tropického pásma, aromatická rýže a rýže aus (Garris a kol., 2005). Převážně pěstovanou rýží v chudých zemích je hůře modifikovatelný indický kultivar, který by v budoucnu mohl být nahrazen výživnější japonskou rýží (Uyeh a kol., 2021). V Africe došlo k domestikaci ještě dalšího druhu rýže – *Oryza glaberrima*. Křížení africké rýže s asijskou by mohlo přinést slibné a odolné odrůdy. Z hlediska řešení nedostatku vitamínu A v chudých zemích je však africká rýže nepodstatná, a proto nebude dále rozebírána (Linares, 2002).

Endosperm rýže je velmi bohatý na škrob a proteiny (Bechtel a Pomeranz, 1978), ale neobsahuje žádné karotenoidy. Absence se projevuje i na zbarvení zrn, která jsou díky tomu bílá. V pletivu endospermu se hromadí GGPP, ale chybí enzym PSY na jeho katalýzu. Na základě vnesení genetické informace pro enzym PSY do endospermu byla postavena první genetická modifikace vedoucí ke zvýšení nutriční hodnoty rýže odrůdy *Japonica*, neboť se v jejích buňkách jako produkt katalyzované přeměny GGPP hromadil fytoen. Gen *PSY* byl získán z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* a vložen do plazmidu pGt1PsyH (Burkhardt a kol., 1997), který byl do rýže náhodně vpraven bombardováním mikroprojektily podle Finera a kol. (1992) na částicích wolframu za částečného vakuu.

V dalším experimentu, kterým vznikla transgenní rýže, bylo využito inzerce do T-DNA (transferová DNA) plazmidů bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Pro kompletní syntézu od GGPP po  $\beta$ -karoten byly vytvořeny tři vektory – pB19hpc, pZPsC a pZLcyH, které pak byly vneseny do rýžových embryí. Všechny inzerce do T-DNA byly upraveny tak, aby nedocházelo k nežádoucím jevům. Zkoumány byly dvě nestejně velké sady embryí (Ye a kol., 2000).

S vektorem pB19hpc byla provedena jednoduchá transformace jedné sady embryí. Vektor obsahoval sekvenci genu *PSY* pocházející z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* a sekvenci genu *CRTI* získanou z bakterie *Erwinia uredovora*. Oba geny kódují proteiny klíčové jen pro syntézu lykopenu. Vektory pZPsC a pZLcyH byly zavedeny společně do druhé sady embryí. Vektor pZPsC měl stejné genové složení jako pB19hpc. Do pZLcyH byl vložen gen *LCYB* pro lykopen- $\beta$ -cyklázu rovněž z *N. pseudonarcissus*. Doplněn byl o glutelinový promotor a gen *aphIV* pro hygromycinfosfotransferázu kontrolovaný CaMV 35S (promotor viru mozaiky kvěťáku). V těchto rostlinách se měl, dle očekávání, hromadit  $\beta$ -karoten (Ye a kol., 2000).

Vložení obou genů – *PSY* a *CRTI* se ukázalo jako zásadní. *PSY* je v endospermu rýže exprimován minimálně a vyžaduje transformaci, zavedení genu *CRTI* se ukázalo rovněž jako vhodné, neboť nahrazuje činnost v rostlině sice exprimovaných, ale pravděpodobně neaktivních či málo exprimovaných genů desaturáz – *PDS* a *ZDS* (Schaub a kol., 2005). Z obou sad modifikovaných rostlin byla získána žlutě zbarvená semena. V obou případech byly detekovány látky žluté barvy –  $\beta$ -karoten i xantofyly lutein a zeaxanthin, a to přesto, že transgenní rýže s vektorem pB19hpc měla hromadit jen červeně zbarvený lykopen.

Z následujícího výzkumu Schaub a kol. (2005) vyplynulo, že skupina genů, pro enzymy cyklizující lineární lykopen na karotenoidy, je v endospermu rýže exprimována. Kotransformačně pozměněná semena dvěma vektory obsahovala různý podíl karotenů a xantofylů a byla využita pro vypěstování sazenic. Dospělé rostliny vykazovaly standardní fenotyp a byly plodné (Ye a kol., 2000).

Výše popsaný postup modifikace se stal odrazovým můstkem pro studium a další šlechtění. S myšlenkou vytvoření tzv. zlaté rýže přišel v 90. letech švýcarský vědec z tamějšího technického institutu prof. Ingo Potrykus se svojí skupinou. S financováním projektu napomáhaly Rockefellerova nadace a výzkumný program Evropského společenství. Šíření a rozvíjení myšlenky napomohla spolupráce se společností Syngenta či převedení části výzkumu na Filipíny (Beyer a kol., 2002), kde od samého počátku probíhalo šlechtění odrůd vyhovujících místním podmínkám (Hoa a kol., 2003). V roce 2021 se staly první zemí, kde bylo povoleno komerční pěstování (Reinke, 2021).

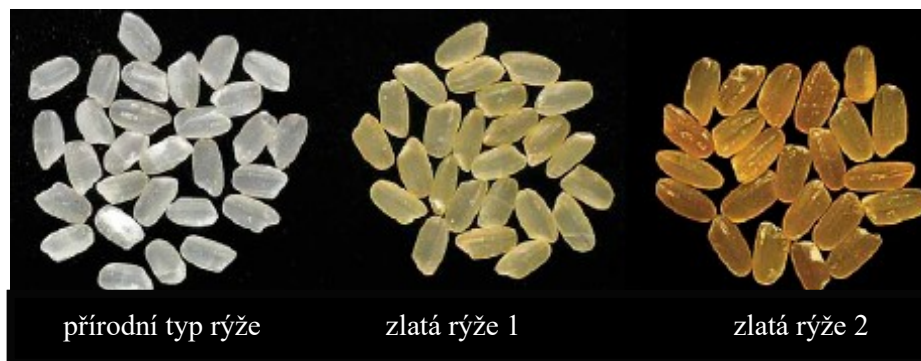
Prof. Potrykus se s kolegy zabýval i o obohacení endospermu rýže o železo. K transgenezi využil osvědčenou bakterii *A. tumefaciens*. Výzkum však neposkytl tak dobré výsledky jako v případě zrn rýže obohacených o provitamin A. Práce nicméně nastínila možnost zavedení obou úprav do jedné rostliny, a tak bojovat proti dvěma skrytým podobám hladu najednou. Výhodou je zvýšení biologické dostupnosti železa v přítomnosti provitaminů A (Lucca a kol., 2001). Jiné studie se zaměřují na obohacení rýže o další mikronutrienty jako je vitamin B9 (Storozhenko a kol., 2007) nebo zinek (Lee a An, 2009).

S cílem navýšení podílu karotenoidů v zrnech zlaté rýže přišli další vědci pod záštitou společnosti Syngenta. Obsah karotenoidů v zrnech rýže navržených prof. I. Potrykem činil 1,6  $\mu\text{g}$  na 1 g suchého rýžového endospermu. Anglicko-americkému týmu vědců se podařilo obsah karotenoidů zvýšit až do maximální hodnoty 37  $\mu\text{g/g}$  (z toho 31  $\mu\text{g/g}$  bylo tvořeno  $\beta$ -karotenem). Nová generace obohacené rýže dostala název zlatá

rýže 2. I v tomto případě byly rostliny vypěstované z upravených semen plodné a vykazovaly standardní fenotyp. Kvůli vyššímu obsahu karotenoidů získala zrna sytější žlutou barvu (Paine a kol., 2005). Porovnání zabarvení zrn obyčejné rýže, zlaté rýže a zlaté rýže 2, které souvisí s množstvím obsažených karotenoidů, je patrné z Obrázku 2.

Limitujícím faktorem v cestě za vyšším obsahem karotenoidů byl nevhodně zvolený gen *PSY* z narcisu. Ve srovnávacím experimentu s kukuřičnými kalusy se ukázal vůči jiným izolovaným genům *PSY* z různých rostlinných zdrojů jako nejméně účinný. Nahrazen byl výkonnějším analogem – genem *PSY* z kukuřice (Paine a kol., 2005). O čtyři roky později Tang a kol. (2009) ve své studii potvrdili, že upravený genetický konstrukt zlaté rýže podávaný jako součást stravy skutečně může významně pomoci v boji s VAD. Poměr konverze  $\beta$ -karotenu na retinol je pro upravenou zlatou rýži 3,8:1.

Vzhledem ke své finanční nenáročnosti představují biofortifikované potraviny udržitelný způsob, jak bojovat s nedostatkem přijímaných mikroživin v potravě u nejchudších vrstev obyvatelstva planety. Tento závěr podporují i Mayer a kol. (2008) ve svém zamyšlení.



Obrázek 2: Převzato a upraveno podle Painea a kol. (2005) - Porovnání zrn přírodního kultivaru rýže a transgenní zlaté rýže. Na obrázku vlevo jsou zrna nemodifikované rýže, která jsou díky absenci karotenoidů bílá. Geneticky upravená zlatá rýže 1 byla připravena vnesením genu *Psy* pro enzym fytoensyntázu z narcisu a genu *CRTI* pro karotendesaturázu z bakterie *Erwinia uredovora*. Zvýšené množství karotenoidů se projevilo na žlutavém zbarvení zrn. Fytoensyntáza z narcisu nebyla tak účinná jako její kukuřičný analog. Zlatá rýže 2 obsahovala až 23krát vyšší množství karotenoidů, jež se projevilo i na sytějším zabarvení zrn.

## 4 Další příklady zlatých potravin

Všechny plodiny uvedené v této práci byly biofortifikovány, tedy upraveny tak, aby u nich došlo k obohacení o mikroživiny, které vůbec nesyntetizují nebo jich pro lidskou výživu neobsahují dostatečné množství. Tuto skutečnost dokládám na konkrétních příkladech. K biofortifikaci jsou využívány metody konvenčního i nekonvenčního šlechtitelství a agronomické přístupy (Garg a kol., 2018).

Konvenční šlechtění směřující ke zlatým plodinám lze využít v případech, kdy spektroskopické a/nebo chromatografické metody potvrdí, že rostliny vykazují dostatečnou variabilitu v obsahu karotenoidů – např. pšenice (Abdeal-Aal a kol., 2007), kukuřice (Kurilich a Juvik, 1999) nebo batáty (Hagenimana a kol., 2001). Nové odrůdy takových plodin jsou získávány na základě opakovaného výběru jedinců s požadovanými vlastnostmi po několik generací, dokud se vzájemným hromadným křížením nezíská kultivar se stabilními vlastnostmi. S každým dalším křížením totiž dochází k upevňování požadovaného znaku (Menkir a kol., 2018).

Metoda šlechtění hromadným výběrem představuje časově náročný proces trvající několik let. Rychlé šlechtění, při kterém je prodloužena délka fotoperiody, dokáže zkrátit generační dobu dlouhodobní plodiny (pšenice, ječmen, cizrna) na polovinu (Watson a kol., 2018). U krátkodenních plodin (sója, rýže, amarant) je možné urychlit tvorbu semen systémem elektroluminiscenčních diod specificky modifikujících kvalitu světla (Jähne a kol., 2020). Odlišný postup zrychleného šlechtění byl použit u batátu. Převážná část výzkumu nových odrůd bohatých na provitaminy A probíhala přímo v terénu v odlišných částech Mozambiku s odlišnými klimatickými podmínkami (Andrade a kol., 2017). Z dalších konvenčních metod se využívají marker-asistované selekce a genetické mapování (Wong a kol., 2004).

Nekonvenční metody šlechtitelství zahrnují biotechnologické a molekulární metody. Nejčastěji je využíváno genetických transformací, kdy je různými cestami do těla plodiny vpraven cizorodý (ne)mutovaný gen (Ye a kol., 2000). Vnesením mutovaného genu byly obohaceny brambory o provitaminy A (Lopez a kol., 2008) či sója o vitamin E (Van Eenennaam a kol., 2003).

Agronomické přístupy zlepšují výživový stav rostlin zejména přidáním hnojiv obsahující mikroživiny, které v rostlině chybějí. Hnojením na listy je možné obohatit rýži o chybějící zinek, železo a selen (Fang a kol., 2008). Tento biofortifikační postup v práci dále nerozebírám, neboť je z hlediska chybějících provitaminů A nevýznamný.

#### 4.1 Povijnice batátová (*Ipomoea batatas* L.)

Největším producentem sladkých brambor neboli batátů je s velkým náskokem Čína. V průměru mezi léty 1994-2020 vyprodukovala více než 84 milionů tun této plodiny. S velkým odstupem následovaly chudé africké státy (Malawi, Nigérie, Uganda) a některé státy Asie (Indonésie, Vietnam, Indie a Japonsko). Celosvětovým trendem je pokles produkce batátů. V roce 2020 bylo vypěstováno necelých 89,5 milionů tun (Fao-stat, © 2022).

Na rozdíl od endospermu rýže kořenové hlízy batátů přirozeně obsahují provitaminy A (O'Connor a kol., 1946), nicméně jejich celkové množství se odvíjí od pěstované odrůdy. Kultivary s bílými nebo fialovými hlízami  $\beta$ -karoten ani žádné jiné karotenoidy neobsahují. Oranžové batáty jsou naopak bohatým zdrojem provitaminů A (Simonne a kol., 1993; Hagenimana a kol., 1998). V odborné literatuře se pro ně využívá zkratka OFSP (batáty s oranžovou dužinou).

O vysokém potenciálu batátů v boji s VAD a hladem obecně se začalo psát v 90. letech 20. století. Jako součást studií se objevovaly myšlenky na šíření konvenčně šlechtěných odrůd batátů bohatých na karotenoidy do chudých oblastí, kde tvoří základ místní stravy (Simonne a kol., 1993; Hagenimana a kol., 1998).

Jeden z prvních pokusů o nahrazení tradičně pěstovaných bělomasých plodin rostlinami s oranžovými hlízami se uskutečnil na polích vybraných keňských obyvatel v letech 1995-1997. Zvolenými odrůdami ke konzumaci byly OFSP batáty odrůd Simana, Pumpkin, Japanese, Kakamega 4 a Maria Angola odolné vůči suchu a poskytující vyšší výnos než místní odrůdy. Mezi obyvatelstvem se setkaly s příznivým ohlasem, ačkoliv některé hlízy měly odlišné chuťové vlastnosti (např. byly více vodnaté). Studie prokázala, že podávání OFSP batátů v uvedeném období dokázalo u vybrané skupiny jedinců zlepšit stav nedostatku vitamínu A (Hagenimana a kol., 2001).

Následující výzkumy podpořily myšlenku využití biofortifikovaných batátů v prevenci proti nedostatku vitamínu A. Například Van Jaarsveld a kol. (2005) využili ve své studii OFSP odrůdu Resisto se sytě oranžovou dužinou obsahující jako karotenoid výhradně  $\beta$ -karoten. Odrůda byla vyšlechtěna konvenčně v 70. letech v USA. Po šest generací docházelo díky opylovačům k náhodnému a hromadnému křížení rostlin kultivaru W-56 s rezistencemi proti různým chorobám, hmyzím parazitům a hlísticím. Původním cílem experimentu bylo získat odolnější odrůdu s vhodnými vlastnostmi pro úpravu před tím, než se bude hlíza konzumovat (Jones a kol., 1983). Účastníky experimentu byly

jihoafrické děti ve věku od 5 do 10 let pravidelně navštěvující jednu vybranou školu. Po dobu 53 školních dní byla dětem z odrůdy Resisto připravována kaše s hodnotou 1031 µg RAE/den přesahující doporučené denní množství vitamínu A pro dospělého muže či ženu. O úspěšném výsledku intervence bylo rozhodnuto na základě zvýšeného množství proteinu vázajícího retinol v krvi (Van Jaarsveld a kol. 2005).

Ačkoli se šlechtění batátů díky velkému rozptylu obsažených provitaminů A v hlízách ubírá zejména konvenčním směrem (Hagenimana a kol., 1998), byly připraveny i transgenní OFSP batáty, a to vnesením genu *Or* (orange) prostřednictvím *A. tumefaciens* z oranžových odrůd do bílých (Kim a kol., 2013) nebo fialových batátů (Park a kol., 2015). Gen *Or* kóduje protein asociovaný s proplastidy a napomáhá jejich přeměně na chromoplasty. První účinky genu *Or* pozorovali Crisp a kol. (1975), kdy jeho mutace vedla u kvěťáku k oranžovému zabarvení jinak bílého zdužnatělého květenství. U batátů se přítomnost exprese genu *Or* navíc projeví vyšší odolností vůči stresu způsobeného vyšší koncentrací chloridu sodného v prostředí (Kim a kol., 2013). Zvýšení obsahu karotenoidů i vyšší odolnost vůči stresu jsou dány chaperonovou funkcí proteinu Or chránící enzym PSY před nepříznivými vlivy prostředí (Park a kol., 2016). Obou výhodných vlastností způsobených expresí batátového genu *Or* je využíváno při biofortifikaci dalších plodin – například vojtěšky (Wang a kol., 2015) nebo brambor (Cho a kol., 2016).

Díky značné odolnosti OFSP batátů vůči suchu a dalším negativním vlivům prostředí je možné opět i tradičními metodami šlechtění připravit odrůdy do různých biogeografických podmínek. Studie v Peru je důkazem, že i na málo úrodných půdách je možné vypěstovat kultivar batátu (SR92.499-23) s vysokým výnosem (Grüneberg a kol., 2005). Zrychlené šlechtění batátů umožnilo přinést na mozambická pole až 15 variet vhodných k pěstování v rozličných přírodních podmínkách země (Andrade a kol., 2017).

## 4.2 Banánovník (*Musa* spp.)

Světová produkce banánů od 90. let vzrůstá. V roce 2020 bylo sklizeno necelých 120 milionů tun a lze předpokládat, že číslo bude stoupat i v následujících letech. Od roku 2011 přitom ubývá plochy pro pěstování banánů. Nejvýznamnějším producentem je Indie, ale i jiné asijské státy zaujímají významné postavení v jejich produkci – např. Čína, Filipíny a Indonésie. Oproti rýži a batátu se banán hojně pěstuje v Jižní a Střední Americe. Příkladem jsou státy Brazílie, Ekvádor, Kolumbie, Guatemala a Kostarika. V Africe se

vypěstuje až 16,5 % z celkové světové produkce. V Ugandě, Rwandě a Kamerunu připadá na hlavu za rok až 200 kg zkonsumovaných banánů (Faostat, © 2022).

U banánů se genetické zásahy týkají rostlin různých genotypů a od nich odvozených kultivarů. Klasifikací jedlých banánů vznikajících vnitrodruhovým křížením se již ke konci 40. let 20. století zabýval E. E. Cheesman. Zjistil, že většina jedlých, a tedy partenokarpních dezertních a zeleninových banánů, pochází z křížení dvou divokých diploidních druhů *Musa acuminata* a *Musa balbisiana*. Oba druhy mají dobře vyvinutá semena (Cheesman, 1947; Cheesman 1948). Domestikované druhy jsou bezsemenné a převážně triploidní (Heslop-Harrison a Schwarzacher, 2007).

Plody banánů se od sebe liší podle kultivaru množstvím obsažených provitaminů A, a tak i barvou dužiny. V jedné ze studií bylo podrobena analýze 171 vzorků zahrnující všechny genomické skupiny (diploidní až tetraploidní), včetně druhů, u kterých ještě není skupina bezpečně určena. Průměrný obsah karotenoidů v kultivarech činil na 100 g sušiny 1 636 µg, nicméně rozptyl naměřených hodnot byl velký. Ke stanovení byla využita spektrofotometrie a HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Z hlediska řešení otázky boje proti VAD je podstatné, že plody banánů až z 90 % obsahovaly v různých poměrech  $\alpha$ -karoten a  $\beta$ -karoten. Ostatní karotenoidy se vyskytovaly jen ve stopových množstvích, z nichž nejvíce zastoupený byl lutein (Davey a kol., 2009) typický pro ranou fázi vývoje plodů (Buah a kol., 2016).

Maximální hodnota 8 508 µg  $\beta$ -karotenu na 100 g sušiny byla stanovena pro kultivary ze skupiny Fe'i (genotyp ATT) rostoucí výhradně v Mikronésii (Englberger a kol., 2006). Banány Asupina, které do této skupiny patří, dokážou ve svých buňkách během zrání přetvářet bezbarvé amyloplasty na chromoplasty pro ukládání karotenoidů. U komerčně rozšířených banánů Cavendish (genotyp AAA) k přeměně nedochází. Během zrání je téměř veškerý lutein, převažující v rané fázi vývoje plodu, enzymaticky rozštěpen. Z hlediska zdroje provitaminů vitamínu A je tak bezvýznamný (Borges a kol., 2014; Buah a kol., 2016). Obecně je možné tvrdit, že tetraploidní dezertní a zeleninové banány jsou lepším zdrojem provitaminů než triploidní (Davey a kol., 2009).

Banány vykazují dostatečně velký stupeň genetické variability použitelný pro konvenční šlechtitelství (Borges a kol., 2014; Davey a kol., 2009), bohužel jeho aplikaci značně komplikuje polyploidie, nízká reprodukční schopnost banánovníků a jejich pomalé množení (Amah a kol., 2019). Z uvedených důvodů jsou v rámci projektu Banana21 kultivary nových ugandských banánů šlechtěny nekonvenčně. Využívají se komerčně



pěstované banány odrůdy Cavendish. Jeden z pokusů o vyšlechtění zlatých banánů učinil Paul a kol. (2017).

Tabulka 1 níže uvádí, že Paul a kol. (2017) k transgenezi banánu využili tři rozdílné geny vždy postupně pod kontrolou jednoho ze tří odlišných promotorů. Vytvořené konstrukty byly vloženy do embryogenních buněčných suspenzí banánu pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* buď samostatně, nebo ve dvojici, a to v různých vzájemných kombinacích. Použité geny *PSY1* a *CRTI* jsou exprimovány ve zlaté rýži 2. Gen *PSY2* byl izolován z banánového kultivaru Asupina s bohatým obsahem karotenoidů. Ukázalo se, že právě gen *PSY2* je k modifikaci banánu nejvíce vhodný, neboť pravděpodobnost vzniku nestandardního fenotypu banánovníku byla při jeho využití nejmenší. Aby bylo možné sledovat expresi zavedených genů, byl vždy k využitému promotoru v konstruktu připojen gen *uidA* kódující protein  $\beta$ -glukuronidázu (GUS).

Experimenty s transgenními banány Cavendish probíhaly na australských polích ve dvou fázích. Průběžně byly odebírány vzorky plodů a ty testovány na obsah provitaminů A. Nejvíce  $\beta$ -karotenu bylo stanoveno v odrůdách obsahující konstrukty *Ubi-PSY2a* a *ACO-PSY2a*. Obsažená množství  $\beta$ -karotenu v plodech jsou schopná pokrýt doporučený denní příjem vitamínu A. U všech testovaných rostlin byla zjištěna silná korelace mezi úrovní akumulovaného provitaminu A u plodů a počtu dní od založení trsu do jeho sklizně. Zásadní vliv na obsah provitaminů měla i teplota. Čím déle ovoce zrábalo a čím vyšší teplota působila, tím se zvyšoval obsah provitaminů (Paul a kol., 2017).

*Tabulka 1: Tabulka shrnující využité promotory, reportérové geny a transgeny při biofortifikaci banánu Cavendish o provitaminy A (Paul a kol., 2017). K modifikaci banánu byly využity tři odlišné geny zodpovědné za syntézu karotenoidů v organizmech, z kterých byly izolovány. Jednalo se o geny *PSY1* (fytoensyntáza 1), *CRTI* (lykopen-desaturáza) a *PSY2a* (fytoensyntáza 2a) izolované z kukuřice, bakterie *Erwinia uredovora* a banánu Asupina (v tomto pořadí). S každým genem byl postupně připraven konstrukt pod kontrolou jednoho z promotorů – *Ubi* (polyubikvitin) z kukuřice, *Exp1* (expanzin 1) a *ACO* (aminocyklopropan-karboxylát oxidáza) – oba z banánu. Expres vnesených genů do banánu byla sledována reportérovým genem *uidA* pro  $\beta$ -glukuronidázu (GUS).*

PROMOTOR	TRANSGEN	REPORTÉROVÝ GEN
Ubi z kukuřice	<i>PSY1</i> z kukuřice	<i>uidA</i>
Exp1 z banánu	<i>PSY2a</i> z banánu Fe'i (Asupina)	
ACO z banánu	<i>CRTI</i> z <i>Erwinia uredovora</i>	

### 4.3 Maniok jedlý (*Manihot esculenta* Crantz)

V roce 2020 byla největším producentem manioku na světě Nigérie, následována dalšími africkými zeměmi – např. Kongem, Ghanou, Kambodžou nebo Tanzanií. Ve všech zmíněných zemích je jednou z nejdůležitějších komodit a hlavní potravinou bohatou na škrob (Faostat, © 2022). Obohacení manioku o provitaminy A je založené výhradně na nekonvenčních metodách šlechtitelství, neboť variabilita ve znaku je malá (Failla a kol., 2012).

I při šlechtění nových odrůd manioku se ukazuje zásadní role enzymu PSY v metabolické dráze tvorby karotenoidů. U manioku byly nalezeny tři geny kódující enzym fytoensyntázu (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*). Pomocí RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí) bylo zjištěno, že v kořenech manioku dochází převážně k expresi genu *PSY2*, což do jisté míry souvisí s nižším obsahem karotenoidů v těchto konzumovaných částech rostliny oproti jiným, kde je exprimován gen *PSY1* (Arango a kol., 2010).

Welsch a kol. (2010) molekulárně popsali alelickou heterogenitu genu *PSY2* zodpovědnou za akumulaci karotenoidů v kořeni manioku. Alely *PSY2* jsou polymorfny. Liší se od sebe vždy v jednom nukleotidu – tzv. jednonukleotidový polymorfismus (SNP). Na určité jiné pozici genové sekvence alel dochází k nahrazení jedné báze druhou. Díky této záměně je do syntetizovaného polypeptidového řetězce enzymu PSY2 začleněna jiná aminokyselina. Dominantní alelou *PSY2-Y-2* je kódován protein, v jehož primární struktuře je jeden alanin vyměněn za asparagin. Syntetizovaný enzym je funkční a zodpovědný za akumulaci karotenoidů ve světle žlutých a oranžových kořenech manioku, a to kvůli vyšší katalytické aktivitě, než kterou vykazují enzymy syntetizované podle genetických sekvencí jiných alel.

Při biofortifikaci manioku našel uplatnění spíše bakteriální homolog rostlinné fytoensyntázy kódovaný genem *CRTB*. Do rostlin manioku byl zaveden prostřednictvím bakterie *A. tumefaciens* společně s genem *CLA1* kódujícím DOXP syntázu. Takto byla vytvořena varieta TMS 60444 úspěšně testovaná na keňských polích. K modifikaci byl vytvořen plazmid pCAMBIA sestávající z genu *CRTB* izolovaného z bakterie *Erwinia herbicola* a genu *CLA1* z *Arabidopsis thaliana*. Na 5' konec genu *CLA1* byl připojen chimerický selekční markerový gen *NPTII* z *Escherichia coli* kódující neomycinofototransferázu typu II pod kontrolou CaMV 35S. Na 3' konci genu *CLA1* se nacházel UTR polyadenylační signál pro nopalinsyntázu z *A. tumefaciens*. Aby došlo ke specifické expresi genů *CRTB* a *CLA1* v kořenu manioku, byl k nim připojen patatinový promotor izolovaný

z brambory (Telengech a kol., 2015). U takto připravených odrůd množství obsažených karotenoidů přesahovalo 50 µg/g sušiny, přičemž 85 až 90 % připadalo na β-karoten (Sayer a kol., 2011). Poměr konverze β-karotenu na retinol je pro maniok 4,2:1 (pokud je přidán olej) nebo 4,5:1 (pokud je přijímán bez oleje) (La Frano a kol., 2013).

Další manipulace genového inženýrství do manioku vnáší mutovaný gen *Or* izolovaný z kvěťáku. Takový postup byl využit i při biofortifikaci brambor, kde se gen *Or* nacházel pod kontrolou specifického promotoru GGBB (syntázy škrobu vázané na granule) (Lu a kol., 2006; Lopez a kol., 2008). Současné studie se snaží blíže pochopit funkce proteinu Or a jejich vztah k biosyntetické dráze karotenoidů (Jaramillo a kol., 2022). V roce 2011 byly v Nigérii povoleny k běžnému pěstování první tři kultivary transgenního manioku – NR07/0220, IITA-TMS-IBA070593 a IITA-TMS-IBA070539 (IITA, 2014).

#### 4.4 Čirok obecný [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

Čirok je obilovina tvořící významný zdroj potravy v chudých subsaharských státech Afriky (Nigérie, Čad, Súdán, Etiopie, Uganda a další), kde žíví miliony venkovských obyvatel. Hojně se pěstuje i v Severní a Jižní Americe a některých státech Asie (Indie a Čína) (Faostat, © 2022).

Podobně jako u kukuřice je možné rozlišit bílé a žlutozrné kultivary čiroku, které odrážejí množství akumulovaných karotenoidů. Bílá čiroková zrna nelze považovat za zdroj provitaminů vitamínu A, neboť karotenoidy jsou zastoupeny ve stopovém množství 0,016 µg/g sušiny. I v případě žlutých zrn je obsah karotenoidů pětikrát nižší než u nestransgenní žluté kukuřice (Kean a kol., 2007).

Čirok je špatným zdrojem nejen provitaminů A, ale i minerálů jako jsou zinek a železo (Gillooly a kol., 1984), esenciálních aminokyselin (lysin) a proteinů obecně (Da Silva a kol., 2011). Důvody jsou následující – karotenoidy během dozrávání obilky podléhají oxidaci. Jejich degradace pokračuje i ve sklizených a uskladněných zrnech všudypřítomným kyslíkem (Che a kol., 2016), navíc jsou pravděpodobně vzájemně spojeny se špatně stravitelnými bílkovinami, kafiriny, typickými pro čirok (Lipkie a kol., 2013). Potlačení exprese genů kódujících kafiriny přispívá ke zlepšení nutriční hodnoty čiroku. Zrna se stávají stravitelnějšími a obsahují vyšší množství pro člověka esenciálního lysinu (Da Silva a kol., 2011). Špatné vstřebávání železa a zinku je spojeno s vysokým zastoupením fytátů a polyfenolů (Gillooly a kol., 1984).

Převažujícími karotenoidy v čiroku jsou lutein a zeaxanthin, které tvoří až 71 % všech dostupných karotenoidů. Za nimi následuje  $\beta$ -karoten jako jediný syntetizovaný provitamin v čiroku (Lipkie a kol., 2013; Salas Fernandez a kol., 2008; Salas Fernandez a kol., 2009; Cruet-Burgos; 2020). Provitaminy  $\beta$ -kryptoxanthin a  $\alpha$ -karoten nebyly v zrna čiroku přítomny (Cruet-Burgos a kol., 2020; Kean a kol., 2007). Výsledky byly podpořeny i QTL (lokus pro kvantitativní znak) analýzou (Salas Fernandez a kol., 2008) a celogenomovou asociační studií (GWAS). Z GWAS studie dalo vyplynout, že přítomnost karotenoidů v zrnech čiroku je oligogenním znakem. Za jeho variaci je zodpovědný hlavně gen *ZEP* (Cruet-Burgos a kol., 2020).

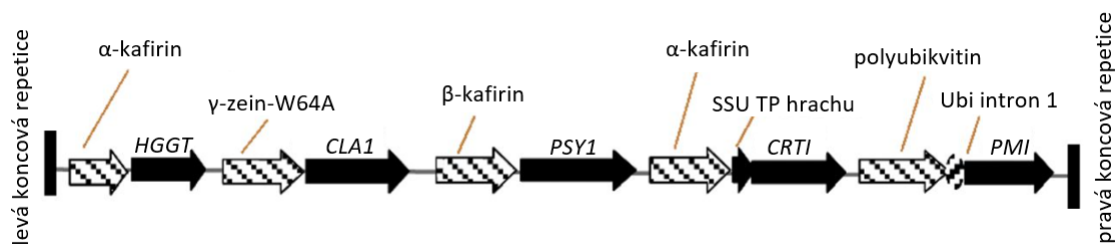
První studii, která se pokusila charakterizovat dostupnost karotenoidů z transgenických čiroků, uskutečnili Lipkie a kol. (2013). Ze tří konstruktů, které využili k modifikaci, byl nejvýznamnější ABS188. Zkratka ABS odkazuje na projekt Africa Biofortified Sorghum, který se snaží vyvinout takové odrůdy čiroku, které budou obsahovat chybějící či málo dostupné živiny. Vektor ABS188 obsahoval gen *PSY1* z kukuřice pod kontrolou čirokového  $\alpha$ -kafirinu a gen *CRTB* z *E. uredoovora* pod kontrolou čirokového  $\beta$ -kafirinu. Ač v endospermu došlo k vyššímu zastoupení karotenoidů, jejich biologická dostupnost byla nadále nízká, možná díky přítomnosti kafirinů, o kterých se zmiňuji výše. Pro řešení problémů spojených s VAD je zásadní výrazné zvýšení obsahu  $\beta$ -karotenu v čiroku HOMO188-A. Na 1 g sušiny tu připadalo 14  $\mu$ g  $\beta$ -karotenu.

Konstrukt ABS188 pro zvýšení dostupnosti železa a zinku ještě navíc obsahoval gen *LPA-1*, jehož exprese vedla k syntéze proteinu snižujícího obsah kyseliny fytové v rostlině (Lipkie a kol., 2013).

Che a kol. (2016) biofortifikovali čirok geny syntézy karotenoidů společně s klíčovým genem pro biosyntézu vitamínu E. Tato transformace byla provedena proto, že vitamin E je jakožto silný antioxidant odbouráván první, a tak chrání karotenoidy před degradací, jak v průběhu zrání semen, tak během jejich skladování.

Konstrukt ABS203 obsahoval geny *PSY1* z kukuřice, *CRT1* z *E. herbicola*, *CLA1* z *A. thaliana* a gen *HGGT* izolovaný z ječmene kódující homogentisátgeranylgeranyltransferázu pro syntézu vitamínu E (viz stavba T-DNA na Obrázku 3 níže). Takto upravený čirok akumuloval 7,3 – 12,3  $\mu$ g/g  $\beta$ -karotenu v sušině a hromadil převážně  $\gamma$ -tokoferol jako jednu z forem vitamínu E. Poměr konverze  $\beta$ -karotenu na retinol byl pro transgenický čirok ABS203-4 stanoven na 4,3:1 (Che a kol., 2016).

Další význam v biofortifikaci čiroku by mohlo sehrát i hlubší pochopení rodiny enzymů dioxygenáz, které se podílí na degradaci karotenoidů (Vallabhaneni, 2010).



Obrázek 3: Převzato a upraveno podle Chea a kol. (2016). Schéma uspořádání genů a promotorů ve vektoru ABS203 využitého k transgenezi čiroku. Do T-DNA určené k transformaci čiroku byly vloženy tři geny zodpovědné za syntézu karotenoidů – *CLA1* z *Arabidopsis thaliana* (pro DOXP syntázu), *PSY1* z kukuřice (pro fytoensytázu 1) a *CRTI* z *Erwinia herbicola* (pro fytoendesaturázu). Gen *CLA1* byl opatřen  $\gamma$ -zeino-vým-W64A promotorem z kukuřice. *PSY1* se nacházel pod kontrolou  $\beta$ -kafirinového promotoru z čiroku. Vzhledem ke skutečnosti, že *CRTI* je prokaryotickým genem, muselo dojít k jeho fúzi s rostlinným genem *SSU TP* z hrachu kódujícím malou podjednotku tranzitního peptidu chloroplastu. Celá struktura se nacházela pod kontrolou  $\alpha$ -kafirinového promotoru z čiroku. Stejným promotorem byl opatřen i gen *HGGT* kódující homogentisátgeranylgeranyltransferázu. Poslední gen začleněný do T-DNA je *PMI* z *Escherichia coli* kódující fosfomannoizomerázu. Činnost *PMI* byla řízena *Ubi* (polyubikvitin) intronem 1 a polyubikvitinovým promotorem.

#### 4.5 Kukuřice (*Zea mays* L.)

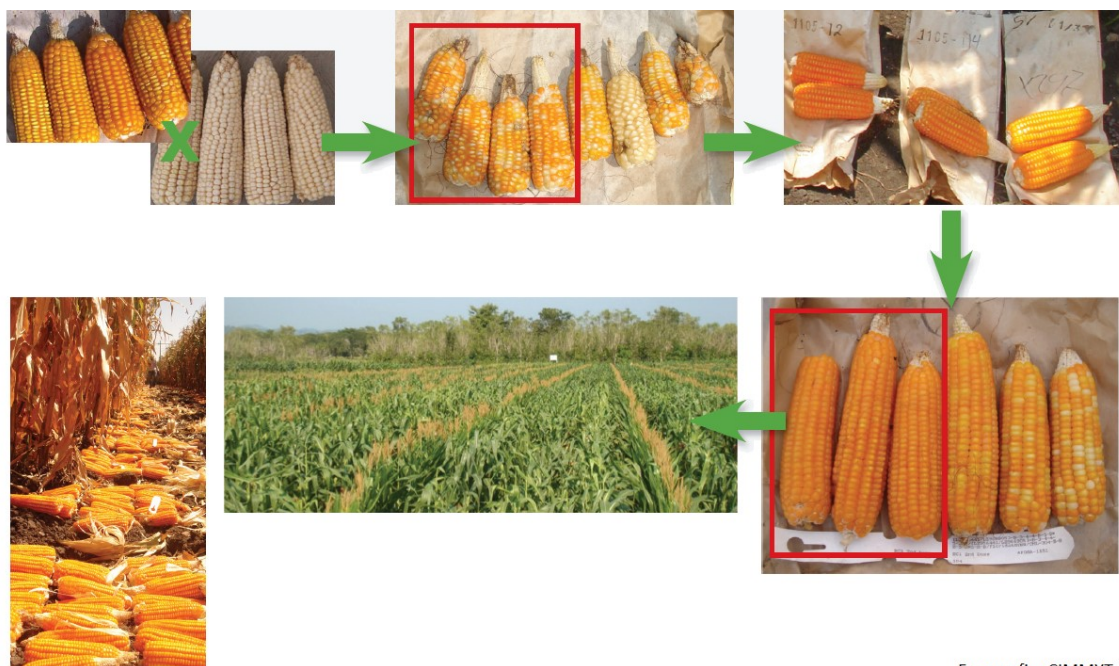
U výše uvedených rostlin – rýže, batátu, banánu, manioku a čiroku jsem popsal na základě studia odborné literatury typické šlechtitelské postupy, které se při biofortifikaci plodin využívají. V případě kukuřice se otevírá širší škála použitelných konvenčních a nekonvenčních metod, jež se vzájemně prolínají. Jejich komplexitu je možné vidět na Obrázku 5.

Kukuřice má v oblasti šlechtitelství značný potenciál. Kurilich a Juvik (1999) podrobili analýze 44 linií sladké a krmné kukuřice s proměnlivou barvou endospermu (od světle žluté až po tmavě oranžovou) a různým podílem cukrů a škrobu. Celková hmotnost všech karotenoidů, i hmotnost karotenoidů poskytujících konverzi vitamin A, byla proměnlivá. Ke stanovení byla využita HPLC. Množství  $\alpha$ -karotenu,  $\beta$ -karotenu a  $\beta$ -kryptoxanthinu zpravidla nepřekročilo 2  $\mu\text{g}$  na 1 g sušiny pro každý z nich. Výjimkou byla testovaná žlutá kukuřice C68 s obsahem  $\beta$ -karotenu 7,64  $\mu\text{g/g}$  sušiny. Rozptyl hodnot odkazuje na genetickou variabilitu ve znaku, kterou lze využít při konvenčních postupech. Kromě finančně nákladné HPLC se k analýze běžně využívá markerem asistovaná selekce (Harjes a kol. 2008; Babu a kol., 2013). Tato strategie napomáhá při šlechtění nových odrůd kukuřice obohacených o provitaminy A, jak je vidět i na Obrázku 5.

S měnícím se množstvím obsažených karotenoidů se mění i barva obilok, avšak přímá korelace mezi zbarvením a měnícím se složením chybí (Harjes a kol., 2008). Při

vzniku různých odstínů plní důležitou roli gen *PSY1*. Ten nerozhoduje jen o barvě, ale i o tom, jestli v plodině dojde k syntéze karotenoidů. Alely genu existují ve třech variantách majících odlišný vliv na fenotyp rostliny – dominantní (obilky se žlutým endospermem s karotenoidy, zelené listy), recesivní (obilky s bílým endospermem bez karotenoidů, zelené listy). Inzercí mobilního elementu v podobě Robertsonova mutátoru do dominantní alely získá kukuřice pastelový fenotyp. Obilky mají bílý nebo světle žlutý endosperm a bledé listy způsobené fotooxidací chlorofylu. Takto vzniklá teplotně senzitivní pastelová alela je recesivní (Buckner a kol., 1990; Buckner a kol., 1996).

Na vývoji biofortikované kukuřice obohacené o provitamin A nekonvenčními metodami se dosud významně podílely mezinárodní organizace – např. HarvestPlus s Mezinárodním institutem tropického zemědělství (IITA) či s Mezinárodním centrem pro zlepšení kukuřice a pšenice (CIMMYT). Při svém postupu šlechtění využívají znalostí o široké variabilitě obsahu provitaminů A v liniích kukuřice pěstovaných po celém světě (Menkir a kol., 2018). Postup šlechtění je popsán dále v textu a znázorněn na Obrázku 4.

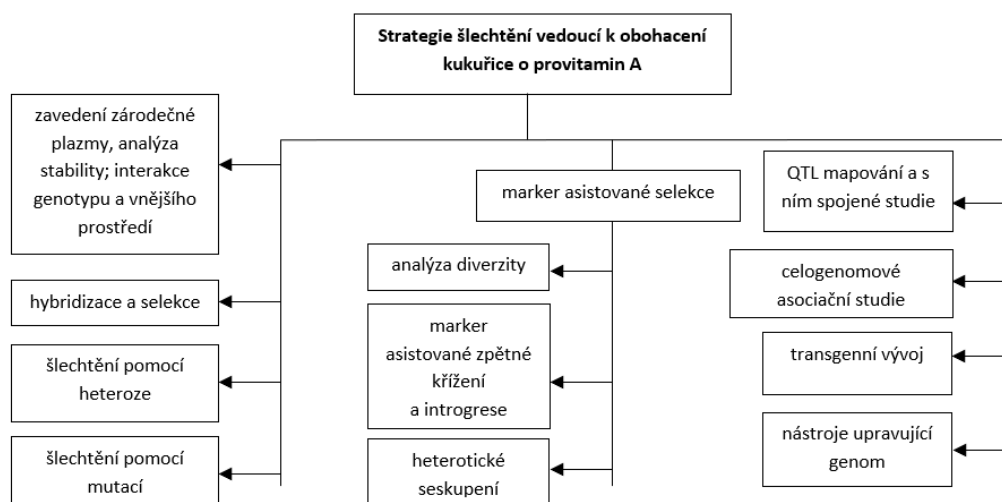


Fotografie: CIMMYT

Obrázek 4: Převzato a upraveno podle Menkiry a kol. (2018) – Schéma vývoje kukuřice obohacené o provitamin A nekonvenčními metodami. Výšlechtění nové odrůdy začínám křížením plodiny bohaté na  $\beta$ -karoten (žlutozrná kukuřice) s odrůdou odolnou vůči chorobám, suchu apod. (bílá kukuřice). U potomků je využito zpětného křížení pro fixaci znaku zvýšeného množství  $\beta$ -karotenu v zrnech. Z hromadného výběru jsou získány linie s nejlepšími kvalitami všech očekávaných znaků. Zrna vyšlechtěných kultivarů jsou následně předána zemědělcům a vysazena na polích, kde poskytnou nutričně bohatší úrodu.

Pro křížení jsou vybírány kultivary bohaté na provitaminy A (žlutozrné kukuřice) a odrůdy s vhodnými vlastnostmi pro pěstitelství (bílé kukuřice odolné např. vůči

chorobám a suchu, zdroj proteinů). Z hybridizace vzejdou jedinci fenotypově lepší, než byli rodiče (heteroze). Pro upevnění požadovaných znaků je využito zpětného křížení. Rostliny jsou volně opylovány a po několik generací se na základě fenotypu vybírají nejlepší potomci (Dhliwayo a kol., 2014). Než dojde k uvolnění nového kultivaru kukuřice, a tak k předání semen zemědělcům, sehraje klíčovou roli interakce genotypu a vnějšího prostředí. Jenom takové kultivary, které jsou ve zvoleném prostředí dostatečně výnosné, mohou být schváleny k volnému pěstování (Agyeman a Ewool, 2021). Takové odrůdy se dnes pěstují na polích obyčejných zemědělců Afriky (Nigérie, Malawi, Zambie, Kamerun) i Jižní Ameriky (Brazílie) (Menkir a kol., 2018). Zde popsané strategie jsou součástí schématu na Obrázku 5 níže.



Obrázek 5: Převzato a upraveno podle Maqboola a kol. (2018) – Strategie šlechtění vedoucí k obohacení kukuřice o provitamin A. Diagram přehledně vystihuje pestrou škálu strategií využitelných při biofortifikaci kukuřice o provitamin A. Ke šlechtění jsou využívány konvenční (sloupec vlevo) a nekonvenční (sloupec vpravo) metody. Markerem asistované selekce jsou na pomezí obou metod a vzájemně se s nimi prolínají. Patří sem jak konvenční (analýza diverzity, heterotické seskupení), tak i nekonvenční (markerem asistované zpětné křížení a introgrese) strategie; QTL – lokus pro kvantitativní znak.

Aluru a kol. (2008) jako první obohatili kukuřici o provitaminy A prostřednictvím genového inženýrství (viz transgenní vývoj na Obrázku 5). Touto cestou upravená kukuřice akumulovala v endospermu až 34krát více  $\beta$ -karotenu než původní druh. Práce navíc potvrdila, že vysoký obsah  $\beta$ -karotenu je v kukuřici dědičný. K modifikaci kalusu bílé kukuřice Hi-II byly použity čtyři zkonstruované plazmidy – pRB, pRI, pRBS a pRIS. Do T-DNA konstruktů pRB a pRBS byl vložen bakteriální gen *CRTB* (z *E. herbicola*) pod kontrolou  $\gamma$ -zeinového a super- $\gamma$ -zeinového promotoru (v tomto pořadí) specifických pro endosperm. Stejně promotory obsahovaly i plazmidy pRI a pRIS se začleněným genem *CRTI* (z *E. herbicola*). Kombinace plazmidů pRI + pRB a pRIS + pRBS byly do

rostlinného pletiva vstřeleny na povrchu mikroprojektilů. Konstrukty obsahující super- $\gamma$ -zeinový promotor se ukázaly jako výkonnější. Stanovení množství syntetizovaných karotenoidů, přítomných kopií transgenů a transkriptů bylo provedeno pomocí HPLC, Southern blot a RT-PCR analýzy. Ukázalo se, že nadměrná exprese jak *CRTB*, tak *CRTI* je potřebná pro celkové navýšení provitaminů A v zrnech kukuřice.

Další manipulace se zaměřují na snížení konverze  $\beta$ -karotenu na jiné, méně účinné či nevýznamné zdroje vitamínu A. Cíleno je na enzymy hydroxylační kaskády CYP97C1, CYP97A3, BCH [dle Yan a kol. (2010) jsou všechny souhrnně řazeny do rodiny  $\beta$ -karotenhydroxyláz kódovaných společným genem *CRTRB1*] a LCYE. V genu *CRTRB1* lze na základě přítomných polymorfizmů rozlišit několik alel. Alela 2, způsobená 25 párů bází dlouhou inzercí na 5' konci genové sekvence *CRTRB1*, je významně zodpovědná za navýšení množství  $\beta$ -karotenu (6,50  $\mu\text{g/g}$  sušiny) v endospermu zrn kukuřice. Alela kóduje enzym, který vykazuje oproti jiným kódovaným enzymům sníženou katalytickou aktivitu. V populaci je alela přítomná pouze u temperátních linií, a to s malou četností (Yan a kol., 2010).

V Zimbabwe, tak jak uvádí Muzhingi a kol. (2011), byl hydroponicky pěstován hybrid kukuřice DEexp  $\times$  C17 s vysokým obsahem  $\beta$ -karotenu. Navýšení bylo způsobeno přítomností alely 2 genu *CRTRB1*. Po třicet šest dnů trvající studie byla osmi dobrovolně zúčastněným mužům podávána 300g porce kukuřičné kaše. Vzhledem k dobré konverzi obsaženého  $\beta$ -karotenu byl experiment úspěšný. Poměr konverze  $\beta$ -karotenu na retinol je pro upravenou kukuřici 6:1 (Li a kol., 2010). Zásadní roli genu *CRTRB1* v akumulaci provitaminů A dále potvrdili Babu a kol. (2013).

Polymorfizmus v genu *LCYE* se rovněž podílí na proměnlivosti obsažených karotenoidů a jejich akumulaci (Harjes, 2008), tak jak již bylo potvrzeno dříve např. pro *Arabidopsis thaliana* (Pogson a kol., 1996). Informace o alelické variabilitě genu *LCYE* byly získány na základě GWAS analýzy a QTL mapování (oboje i pro gen *CRTRB1*) a mutagenese způsobené ethanmethylsulfonátem (Harjes a kol., 2008; Yan a kol., 2010). Účinek koexprimovaných výhodných alel genů *CRTRB1* a *LCYE* je aditivní (Yan a kol., 2010).

Introgresi vhodné alely genu *LCYE* do linií sladké kukuřice chudých na provitaminy A učinili Yang a kol. (2018). Bylo využito zpětného křížení za pomoci molekulárních markerů. Mezi použitými markery byly i SSR, které se využívají při predikci očekávaného hybridního výnosu po křížení dvou inbredních linií. Ovšem ne vždy bylo možné hybridní heterózu přesně předpovědět, jak potvrzují Xu a kol. (2004). QTL mapování,



GWAS analýza, mutageneze, šlechtění a odhalování heterozy s pomocí markerů představují další strategie šlechtění biofortifikované kukuřice uvedené na Obrázku 5 výše.

V předcházejících částech této práce uvádím příklady několika modifikací, kdy došlo k biofortifikaci jedné plodiny o dvě mikroživiny najednou (např. rýže a čirok). Multivitaminová kukuřice s vyšším obsahem  $\beta$ -karotenu, vitamínu C a vitamínu B9 (folát) je plodinou, u které došlo k upravení tří zcela odlišných metabolických drah zároveň. V Tabulce 2 níže jsou přehledně uvedeny použité geny a promotory k modifikaci bílé kukuřice M37W. Konstrukty byly vpraveny do kukuřičného kalusu bombardováním na povrchu kovových částic. Výsledky byly příznivé, neboť stanovený obsah  $\beta$ -karotenu byl téměř dvojnásobný oproti zlaté rýži 2 a činil 59,32  $\mu\text{g/g}$ . Množství vitamínu C se oproti původní kukuřici zvýšilo šestkrát na 110  $\mu\text{g/g}$  a folátu se v kukuřice nacházelo dvakrát více (1,94  $\mu\text{g/g}$ ) (Nagvi a kol., 2009). Nutričně komplexní plodina, kterou multivitaminová kukuřice představuje, může významně pomoci v boji se skrytými podobami hladu tam, kde není možné zajistit dostatečně pestrou stravu.

*Tabulka 2: Tabulka shrnující použité geny a promotory u multivitaminové kukuřice. Multivitaminová kukuřice je první biofortifikovanou kukuřicí obohacenou o více mikroživin se zcela odlišnými metabolickými dráhami. Do kalusů odrůdy kukuřice M37W byly na povrchu kovových částic vpraveny konstrukty s geny pro syntézu  $\beta$ -karotenu (PSY1 pro fytoensyntázu z kukuřice, CRT1 pro karotendesaturázu z E. uredovora), vitamínu C (DHAR pro dehydroaskorbátoreduktázu) a vitamínu B9 (FOLE pro GTP-cyklohydrolázu). Geny CRT1, DHAR a FOLE se nacházely pod kontrolou D-hordeinového promotoru z ječmene, PSY1 byl řízen LMW gluteninovým promotorem z pšenice. Samostatný konstrukt, kterým byl kalus bombardován byl tvořen selekčním markerem bar (Nagvi a kol., 2009).*

<b>(PRO)VITAMIN</b>	<b>VLOŽENÝ GEN</b>	<b>PROMOTOR</b>	<b>SELEKČNÍ MARKER</b>
$\beta$ -karoten	<i>PSY1</i>	LMW glutenin	<i>bar</i>
	<i>CRT1</i>	D-hordein	
C	<i>DHAR</i>		
B9	<i>FOLE</i>		

Jak uvádím v nadcházející kapitole, geneticky modifikované organizmy (GMO), nejsou společností obecně dobře přijímány, zvláště pak ty, které obsahují cizorodou DNA. Nástroje upravující vlastní genom kukuřice s cílem zvýšit její nutriční stav (viz Obrázek 5), by mohly být vhodnou strategií a možnou alternativou. Molekulární nůžky v podobě CRISPR/Cas9 již byly využity k získání mutantů bílé kukuřice Hi-II (Lee a kol., 2019).

## 5 Bojkot GMO rostlin – zlatá rýže

Geneticky modifikované organizmy jsou ožehavým a kontroverzním tématem vyvolávajícím silné emoce, jak mezi příznivci, tak odpůrci. V této práci se zabývám zlatými potravinami – plodinami obohacenými o provitaminy A. Některé byly získány metodami tradičního šlechtění a/nebo vyžadovaly zásah do své genetické informace metodami genetického inženýrství. Na základě předchozích kapitol by bylo možné získat dojem, že cesta je pro zlaté plodiny otevřená a bez překážek. Jenže např. OFSP batáty slaví úspěch a jsou pěstovány v několika zemích světa. Proč jsou neustále produkovány jejich nové odrůdy a o zlaté rýži se vedou mnoholeté spory?

Ingo Potrykus při rozhovoru (podle Coghlan, 2013) řekl, proč se domnívá, že batáty jsou úspěšnější než rýže. Důvodem je množství přirozeně se vyskytujícího  $\beta$ -karotenu. Při modifikaci rýže se bez genetických manipulací není možné obejít. To následně vyvolává odezvy od organizací jako je Greenpeace. Batáty lze naopak šlechtit konvenčními metodami. S názorem se ztotožňuji a uvědomuji si, že pro ostatní plodiny a jejich odrůdy je problematika obdobná.

Oficiální stanovisko Greenpeace je vůči zlaté rýži silně ofenzivní. Tvrdě se ohrazuje proti její existenci a vývoji, stejně jako u jiných GMO. Hlavním argumentem je obava z chování takového organismu mimo laboratoř ve volném prostředí. Podle odpůrců GMO může představovat potenciální riziko pro člověka i pro životní prostředí, jehož ochrana je pro Greenpeace prioritní. Samotné zlaté rýži touto organizací není přisuzován význam. Je považována za velmi drahý rozmar, zlatou iluzi, jejíž dlouhý 20 let trvající vývoj nepřinesl prokazatelné výsledky v boji s VAD (Greenpeace Southeast Asia, 2013; Greenpeace International, 2013). Několik nešťastných událostí následně vedlo k podpoře těchto tvrzení a narušení důvěryhodnosti projektu.

Jak jsem již psal dříve, v roce 2009 vědkyně z Tufts University Guangwen Tang potvrdila, že zlatá rýže 2 může být cenným zdrojem vitamínu A (Tang a kol., 2009). O tři roky později její další výzkum přinesl dlouho očekávaný výsledek. Podávání geneticky modifikované rýže zvýšilo čínským dětem hladinu retinolu v krvi. Ale právě ze strany Greenpeace se objevilo závažné obvinění týkající se průběhu experimentu. Důkladný průzkum potvrdil porušování předpisů, nedostatky v administrativě a informovanosti zákonných zástupců dětí. Možná kvůli malé pečlivosti, možná kvůli nedostatečné kontrole práce, možná důsledek špatné komunikace. Souhra všeho nakonec vedla ke stažení práce

a zapadnutí tak podstatného zjištění. Všechny výsledky byly totiž správné a vědecky platné (Enserink, 2013).

Bollinedy a kol. (2017) experimentovali s transgenním vektorem pro obohacení indické rýže Swarna. Schéma experimentu bylo stejné jako při tvorbě zlaté rýže 2. Ovšem transgenní rostliny vykazovaly pozměněný fenotyp oproti původnímu typu. Jednalo se o méně výnosné malé rostliny se světlými listy a celkově delšími kořeny s větším objemem. Pro rostlinu byla charakteristická nerovnováha fytohormonů způsobena inzercí vneseného transgenu do genu pro influxový přenašeč auxinu *OsAux1*. Navíc, navzdory specifickému glutelinovému promotoru pro endosperm, došlo k jeho expresi i v jiných tkáních – např. listech.

Výše uvedené skutečnosti vyžadují při svých interpretacích opatrnost. Hrábek (2018) ve svém příspěvku „Zlatá rýže je jen chiméra“ uvedl, že genetické modifikace rýže jsou vhodné pouze pro poddruh *Oryza sativa japonica*, který není tolik rozšířený v chudých oblastech trpících VAD jako indická rýže. Touto otázkou se jako první zabývali Hoa a kol. (2003). Původní koncept byl upraven na míru hůře modifikovatelné, ale z hlediska VAD více konzumované rýži *Indica*. V konstruktu byl gen *aphIV* nahrazen regulačně vhodnějším genem *PMI* kódujícím enzym fosfomannoizomerázu. Studií byla získána obohacená odrůda IR64, která je i nyní velmi často pěstovaná.

Proti pěstování zlaté rýže v asijských zemích bojuje i sdružení Stop Golden Rice Network. Jejich články se objevily v časopise *The Ecologist* nebo na stránkách *Grain* a *Independent Science News*. Jedna z iniciativ se týkala zastavení výsadby v Bangladéši. Pokud by plán skutečně vyšel, předstihl by svým prvenstvím Filipíny (Stokstad, 2019; Stop Golden Rice Network, 2019). Jenže ani Filipíny neměly cestu ke schválení jednoduchou. Desítky členů aktivistických anti-GMO skupin pošlapaly a vytrhaly stébla rýže na experimentálním poli v oblasti Bicol těsně před sklizní úrody a vrátily práci výzkumníkům zase o sezonu dozadu (Kupferschmidt, 2013).

Odpor vůči GMO, a zvláště pak proti zlaté rýži, vyústil 26. června 2016 v sepsání otevřeného dopisu laureáty Nobelovy ceny. Adresovali ho Greenpeace, Organizaci spojených národů a všem vládám světa, v němž vyzývali k zastavení a odmítání kampaně proti zlaté rýži ze strany Greenpeace založené výhradně na emocích a dogmatech. Seznam čítá 159 signatářů (nobelistů) podporujících pěstování GMO rostlin (Support Precision Agriculture, 2016).

## 6 Diskuze

### Možnosti uplatnění tématu ve výuce

Vzhledem ke svému pedagogickému zaměření vnímám potenciální využití tématu ve vzdělávacím programu pro základní školy a gymnázia. Očekávanou vzdělávací oblastí pro začlenění je Člověk a příroda, pod ní spadající vzdělávací obor biologie/přírodopis a učivo věnované genetice. Biologie je zde značně propojena s chemií, neboť je řešeno téma vitaminů, hormonů a biosyntetických drah. U geografie hraje důležitou roli pochopení situace zemí, kde VAD tvoří rozsáhlé riziko.

Předchozí kapitola byla věnována jen některým problémům, jimž GMO čelí. Reakce na jejich existenci jsou silné. Příznivé i ofenzivní. Oblast Jazyk a jazyková komunikace společně s mediální výchovou mohou žákům pomoci vytvořit si vlastní názor, umět si ho obhájit a zároveň nepodléhat dezinformacím. Ruku v ruce se s nimi prolínají osobnostní a sociální výchova, výchova k myšlení v evropských a globálních souvislostech, multikulturní výchova a výchova demokratického občana. Téma může pomoci žákům s citem a respektem chápat problémy jiných lidí, pomáhat si navzájem a vnímat své odlišnosti či spolupracovat...

Ve studiích je zpracováno značné množství dat. V oblasti Matematika a její aplikace mohou žáci zpracovávat data z tabulek do grafů a logicky vyvozovat z nich plynoucí závěry. Zajímavé by mohlo být zpracování z hlediska vzdělávací oblasti Umění a kultura – ať již jakýmkoli uměleckým vyjádřením se pokusit přiblížit náročné téma nebo se zaměřit na kulturní odlišnosti vedoucí k obavám z neznámého.

Výše uvedené příklady ukazují, jak je téma komplexní a směřuje k rozvíjení klíčových kompetencí. Další by bylo možné odvodit. Uvědomuji si, že jedinou aktivitou není možné postihnout všechny oblasti. K lepšímu pochopení a sžití se s tématem se nabízí použití projektové nebo badatelsky orientované výuky. Ač by bylo přínosné a zajímavé pozorovat genetické modifikace na vlastní oči např. u bakterií, tak uskutečnění takových laboratorních cvičení není možné. V naší republice je složité podle zákona č. 78/2005 Sb. – Zákon o nakládání s geneticky modifikovanými organizmy a genetickými produkty – získat pro školu povolení k práci s GMO. Nicméně lze názornost částečně nahradit prostřednictvím filmů a audiovizuálních pomůcek.

## 7 Závěr

Hlad je aktuálním problémem i pro 21. století. Jen zahnání pocitu hladu bohužel nezajistí tělu správnou výživu, pokud strava není různorodá a je chudá na některé živiny. V takovém případě se objevují patologické stavy, jež odráží jejich nedostatek. Lidské tělo si neumí vitamin A vyrobit a musí ho přijímat společně s potravou nejlépe v podobě přeměnitelných karotenoidů –  $\alpha$ -karotenu,  $\beta$ -karotenu a  $\beta$ -kryptoxanthinu. Rostliny, které jsou hlavní potravou v chudých oblastech světa (rýže, kukuřice, banány apod.) mají většinou těchto látek velmi málo.

Cílem překládané práce bylo vypracovat literární rešerši a zpracovat přehled nejdůležitějších plodin obohacených o provitamin A včetně cest jejich přípravy a možností využití v praxi. Součástí práce bylo i zamyšlení nad využitím zvoleného tématu ve školní výuce.

Hlavní smysl a význam připravených rostlin se projeví až po jejich schválení k běžnému využití k výživě obyvatel. Chudí lidé z těchto oblastí získávají stabilní příděl vitamínu A jako součást denní stravy. Z tohoto důvodu se u každé plodiny objevuje informace o vyšlechtěných odrůdách připravených k výsadbě. Reálnému použití někdy předchází snahy o sabotáž a ukončení dalšího vývoje zejména ze strany aktivistických skupin. Geneticky modifikované organizmy nicméně mají v současné době dobrou oporu ve vědecké společnosti.

Tato práce se zabývá tématem s velkým mezioborovým přesahem ve výuce. Kromě zasazení v přírodních vědách by ji mohly dále rozvíjet i vědy sociální a humanitní. Tato interdisciplinarita se hodí pro rozvíjení osobností žáků a studentů. Nabízí možnost pro vytváření vlastních názorů a vedení smysluplné diskuze.

## Seznam použité literatury

- ABDEL-AAL, E. S. M., J. C., Young, I., Rabalski, P., Hucl, J., Fregeau-Reid, 2007. Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**(3), 787-794. doi: 10.1021/jf062764p
- AGYEMAN, A., M., Ewool, 2021. Genotype by environment interaction analysis of grain yield and yield components in provitamin A maize. *Journal of Crop Improvement*, **36**(1), 1-24. doi: 10.1080/15427528.2021.1895402
- ALURU, M., Y., Xu, R., Guo, Z., Wang, S., Li, W., White, K., Wang, S. Rodermel, 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *Journal of experimental Botany*, **59**(13), 3551-3562. doi: 10.1093/jxb/ern212
- AMAH, D., A., van Biljon, A., Brown, P., Perkins-Veazie, R., Swennen, M., Labuschagne, 2019. Recent advances in banana (*Musa* spp.) biofortification to alleviate vitamin A deficiency. *Critical reviews in food science and nutrition*, **59**(21), 3498-3510. doi: 10.1080/10408398.2018.1495175
- ANDRADE, M. I., J., Ricardo, A., Naico, A., Alvaro, G. S., Makunde, J., Low, R., Ortiz, W., Grüneberg, 2017. Release of orange-fleshed sweetpotato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) cultivars in Mozambique through an accelerated breeding scheme. *The Journal of Agricultural Science*, **155**(6), 919-929. doi: 10.1017/S002185961600099X
- ARANGO, J., F., Wüst, P., Beyer, R., Welsch, 2010. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta*, **232**(5), 1251-1262. doi: 10.1007/s00425-010-1250-6
- BABU, R., N. P., Rojas, S., Gao, J., Yan, K., Pixley, 2013. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theoretical and Applied Genetics*, **126**(2), 389-399. doi: 10.1007/s00122-012-1987-3
- BECHTEL, D. B., Y., Pomeranz, 1978. Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) carposp. The starchy endosperm. *American Journal of Botany*, **65**(6), 684-691. doi: 10.1002/j.1537-2197.1978.tb06126.x
- BERNÁŠKOVÁ, K., R., Rokyta, 2016. Fyziologie výživy, vitaminů a minerálů. In: ROKYTA, R., K., Bernášková, M., Franěk, P., Kučera, I., Matějovská, K., Nohejlová, T., Paul, I., Pekárková, M., Pometlová, V., Rokytová, R., Šlamberová, A., Yamamotoová. *Fyziologie*. 173-177. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-238-1
- BEYER, P., S., Al-Babili, X., Ye, P., Lucca, P., Schaub, R., Welsch, I., Potrykus, 2002. Golden rice: introducing the  $\beta$ -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *The Journal of nutrition*, **132**(3), 506S-510S. doi: 10.1093/jn/132.3.506S
- BLOCK, G., C. M., Dresser, A. M., Hartman, M. D., Carroll, 1985. Nutrient sources in the American diet: quantitative data from the NHANES II survey: I. Vitamins and minerals. *American Journal of Epidemiology*, **122**(1), 13-26. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114072
- BLOMHOFF, R., H. K., Blomhoff, 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of neurobiology*, **66**(7), 606-630. doi: 10.1002/neu.20242
- BOLLINEDI, H., K. V., Prabhu, N. K., Singh, S., Mishra, J. P., Khurana, A. K., Singh, 2017. Molecular and functional characterization of GR2-R1 event based backcross derived lines of Golden Rice in the genetic background of a mega rice variety Swarna. *PloS one*, **12**(1), 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0169600
- BORGES, C. V., V. B., de Oliveira Amorim, F., Ramlov, C. A., da Silva Ledo, M., Donato, M., Maraschin, E. P., Amorim, 2014. Characterisation of metabolic profile of banana genotypes, aiming at biofortified *Musa* spp. cultivars. *Food chemistry*, **145**, 496-504. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.041

- BOUIS, H. E., 2007. The potential of genetically modified food crops to improve human nutrition in developing countries. *The Journal of Development Studies*, **43**(1), 79-96. doi: 10.1080/00220380601055585
- BOUIS, H. E., A., Saltzman, 2017. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global food security*, **12**, 49-58. doi: 10.1016/j.gfs.2017.01.009
- BOUVIER, F., A., D'Harlingue, R. A., Backhaus, M. H., Kumagai, B., Camara, 2000. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *European Journal of Biochemistry*, **267**(21), 6346-6352. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01722.x
- BREITENBACH, J., G., Sandmann, 2005.  $\zeta$ -Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta*, **220**(5), 785-793. doi: 10.1007/s00425-004-1395-2
- BUAH, S., B., Mlalazi, H., Khanna, J. L., Dale, C. L., Mortimer, 2016. The quest for golden bananas: investigating carotenoid regulation in a Fe'i group Musa cultivar. *Journal of agricultural and food chemistry*, **64**(16), 3176-3185. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05740
- BUCKNER, B., P. S., Miguel, D., Janick-Buckner, J. L., Bennetzen, 1996. The y1 gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics*, **143**(1), 479-488. doi: 10.1093/genetics/143.1.479
- BUCKNER, B., T. L., Kelson, D. S., Robertson, 1990. Cloning of the y1 Locus of Maize, a Gene Involved in the Biosynthesis of Carotenoids. *The Plant Cell*, **2**(9), 867-876. doi: 10.1105/tpc.2.9.867
- BURKHARDT, P. K., P., Beyer, J., Wünn, A., Klöti, G. A., Armstrong, M., Schledz, J., von Lintig, I., Potrykus, 1997. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *The Plant Journal*, **11**(5), 1071-1078. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051071.x
- CAMARA, B., 1993. Plant phytoene synthase complex: component enzymes, immunology, and biogenesis. *Methods in enzymology*, **214**, 352-365. doi: 10.1016/0076-6879(93)14079-X
- CASTENMILLER, J. J., C. E. West, 1998. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual review of nutrition*, **18**(1), 19-38. doi: 10.1146/annurev.nutr.18.1.19
- CHAKRABORTY, U., A., Chandra, 2021. Bitot's spots, dry eyes, and night blindness indicate vitamin A deficiency. *The Lancet*, **397**(10270), e2. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00041-6
- CHE, P., Z. Y., Zhao, K., Glassman, D., Dolde, T. X., Hu, T. J., Jones, D. F., Gruis, S., Obukosia, F., Wambugu, M. C., Albertsen, 2016. Elevated vitamin E content improves all-trans  $\beta$ -carotene accumulation and stability in biofortified sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**(39), 11040-11045. doi: 10.1073/pnas.1605689113
- CHEESMAN, E. E., 1947. Classification of the bananas: the genus *Musa* L. *Kew Bulletin*, **2**(2), 106-117. doi: 10.2307/4109207
- CHEESMAN, E. E., 1948. Classification of the bananas. *Kew bulletin*, **3**(1), 17-28. doi: 10.2307/4118909
- CHEN, Y., F., Li, E. T., Wurtzel, 2010. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, **153**(1), 66-79. doi: 10.1104/pp.110.153916
- CHO, K. S., E. H., Han, S. S., Kwak, J. H., Cho, J. S., Im, S. Y., Hong, H. B., Sohn, Y. H., Kim, S. W., Lee, 2016. Expressing the sweet potato orange gene in transgenic potato improves drought tolerance and marketable tuber production. *Comptes rendus biologiques*, **339**(5-6), 207-213. doi: 10.1016/j.crv.2016.04.010
- COGHLAN, A., 2013. Golden Rice creator wants to live to see it save lives. *New Scientist*. **220**(2941), 30-31. doi: 10.1016/S0262-4079(13)62588-9
- CRISP, P. W. D. G., D. G. A., Walkey, E., Bellman, E., Roberts, 1975. A mutation affecting curd colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis DC). *Euphytica*, **24**(1), 173-176. doi: 10.1007/BF00147182

- CRUET-BURGOS, C., S., Cox, B. P., Ioerger, R., Perumal, Z., Hu, T. J., Herald, S. R., Bean, D. H., Rhodes, 2020. Advancing provitamin A biofortification in sorghum: Genome-wide association studies of grain carotenoids in global germplasm. *The Plant Genome*, **13**(1), 1-14. doi: 10.1002/tpg2.20013
- DA SILVA, L. S., R., Jung, Z. Y., Zhao, K., Glassman, J., Taylor, J. R. N., Taylor, 2011. Effect of suppressing the synthesis of different kafirin sub-classes on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. *Journal of cereal science*, **54**(1), 160-167. doi: 10.1016/j.jcs.2011.04.009
- DAVEY, M. W., I., Van den Bergh, R., Markham, R., Swennen, J., Keulemans, 2009. Genetic variability in Musa fruit provitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutrient contents. *Food Chemistry*, **115**(3), 806-813. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.088
- DEMMIG, B., K., Winter, A., Krüger, F. C., Czygan, 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant physiology*, **84**(2), 218-224. doi: 10.1104/pp.84.2.218
- DHLIWAYO, T., N., Palacios-Rojas, J., Crossa, K. V., Pixley, 2014. Effects of S1 recurrent selection for provitamin A carotenoid content for three open-pollinated maize cultivars. *Crop Science*, **54**(6), 2449-2460. doi: 10.2135/cropsci2013.11.0764
- DIRETTO, G., R., Welsch, R., Tavazza, F., Mourgues, D., Pizzichini, P., Beyer, G., Giuliano, 2007. Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biology*, **7**(1), 1-8. doi: 10.1186/1471-2229-7-11
- DONG, S., H., Xia, F., Wang, G., Sun, 2017. The effect of red palm oil on vitamin A deficiency: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, **9**(12), 1281-1288. doi: 10.3390/nu9121281
- DU, H., N., Wang, F., Cui, X., Li, J., Xiao, L., Xiong, 2010. Characterization of the  $\beta$ -carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. *Plant physiology*, **154**(3), 1304-1318. doi: 10.1104/pp.110.163741
- EFREMOV, G. I., A. V., Shchennikova, E. Z., Kochieva, 2021. Characterization of 15-cis- $\zeta$ -Carotene Isomerase Z-ISO in Cultivated and Wild Tomato Species Differing in Ripe Fruit Pigmentation. *Plants*, **10**(11), 2365, 1-19. doi: 10.3390/plants10112365
- ENGLBERGER, L., J., Schierle, W., Aalbersberg, P., Hofmann, J., Humphries, A., Huang, A., Lorens, A., Levendusky, J., Daniells, G. C., Marks, M. H., Fitzgerald, 2006. Carotenoid and vitamin content of Karat and other Micronesian banana cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **57**(5-6), 399-418. doi: 10.1080/09637480600872010
- ESTÉVEZ, J. M., A., Cantero, C., Romero, H., Kawaide, L. F., Jiménez, T., Kuzuyama, H., Seto, Y., Kamiya, P., León, 2000. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant physiology*, **124**(1), 95-104. doi: 10.1104/pp.124.1.95
- FAILLA, M. L., C., Chitchumroonchokchai, D., Siritunga, F. F., De Moura, M., Fregene, M. J., Manary, R. T., Sayre, 2012. Retention during processing and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in high  $\beta$ -carotene transgenic cassava root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(15), 3861-3866. doi: 10.1021/jf204958w
- FANG, Y., L., Wang, Z., Xin, L., Zhao, X., An, Q., Hu, 2008. Effect of foliar application of zinc, selenium, and iron fertilizers on nutrients concentration and yield of rice grain in China. *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**(6), 2079-2084. doi: 10.1021/jf800150z
- FANTINI, E., G., Falcone, S., Frusciante, L., Giliberto, G., Giuliano, 2013. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant physiology*, **163**(2), 986-998. doi: 10.1104/pp.113.224733
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2020. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2020. Transforming food system for affordable healthy diets*. 3-5, 212. Řim: FAO. ISBN 978-92-5-132901-6



- FINER, J. J., P., Vain, M. W., Jones, M. D., McMullen, 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports*, **11**(7), 323-328. doi: 10.1007/BF00233358
- FRASER, P. D., S., Romer, C. A., Shipton, P. B., Mills, J. W., Kiano, N., Misawa, R. G., Drake, W., Schuch, P. M., Bramley, 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of sciences*, **99**(2), 1092-1097. doi: 10.1073/pnas.241374598
- GARG, M., N., Sharma, S., Sharma, P., Kapoor, A., Kumar, V., Chunduri, P., Arora, 2018. Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world. *Frontiers in Nutrition*, **5**(12), 1-33. doi: 10.3389/fnut.2018.00012
- GARRIS, A. J., T. H., Tai, J., Coburn, S., Kresovich, S., McCouch, 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, **169**(3), 1631-1638. doi: 10.1534/genetics.104.035642
- GILLOOLY, M., T. H., Bothwell, R. W., Charlton, J. D., Torrance, W. R., Bezwoda, A. P., MacPhail, D. P., Derman, L., Novelli, P., Morrall, F., Mayet, 1984. Factors affecting the absorption of iron from cereals. *British Journal of Nutrition*, **51**(1), 37-46. doi: 10.1079/BJN19840007
- GIORIO, G., A. L., Stigliani, C., D'Ambrosio, 2008. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanumlycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *The FEBS Journal*, **275**(3), 527-535. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x
- GIORIO, G., A., Yildirim, A. L., Stigliani, C., D'Ambrosio, 2013. Elevation of lutein content in tomato: a biochemical tug-of-war between lycopene cyclases. *Metabolic Engineering*, **20**, 167-176. doi: 10.1016/j.ymben.2013.10.007
- GIULIANO, G., G. E., Bartley, P. A., Scolnik, 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell*, **5**(4), 379-387. doi: 10.1105/tpc.5.4.379
- GÖDECKE, T., A. J., Stein, M., Qaim, 2018. The global burden of chronic and hidden hunger: Trends and determinants. *Global Food Security*, **17**, 21-29. doi: 10.1016/j.gfs.2018.03.004
- GOODMAN, D. S., R., Blomstrand, B., Werner, H. S., Huang, T., Shiratori, 1966. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *The Journal of clinical investigation*, **45**(10), 1615-1623. doi: 10.1172/JCI105468
- GRUNE, T., G., Lietz, A., Palou, A. C., Ross, W., Stahl, G., Tang, D., Thurnham, Y., Shi-an, H. K., Biesalski, 2010.  $\beta$ -Carotene is an important vitamin A source for humans. *The Journal of nutrition*, **140**(12), 2268S-2285S. doi: 10.3945/jn.109.119024
- GRÜNEBERG, W. J., K., Manrique, D., Zhang, M., Hermann, 2005. Genotype  $\times$  environment interactions for a diverse set of sweetpotato clones evaluated across varying ecogeographic conditions in Peru. *Crop Science*, **45**(6), 2160-2171. doi: 10.2135/cropsci2003.0533
- HAGENIMANA, V., E. E., Carey, S. T., Gichuki, M. A., Oyunga, J. K., Imungi, 1998. Carotenoid contents in fresh, dried and processed sweetpotato products. *Ecology of Food and Nutrition*, **37**(5), 455-473. doi: 10.1080/03670244.1998.9991560
- HAGENIMANA, V., J., Low, M., Anyango, K., Kurz, S. T., Gichuki, J., Kabira, 2001. Enhancing vitamin A intake in young children in western Kenya: Orange-fleshed sweet potatoes and women farmers can serve as key entry points. *Food and Nutrition Bulletin*, **22**(4), 376-387. doi: 10.1177/156482650102200407
- HALES, S., S. J., Edwards, R. S., Kovats, 2003. Impacts on health of climate extremes. In: MCMICHAELE, A. J., D. H., Campbell-Lendrum, C. F., Corvalán, K. L., Ebi, A., Githeko, J. D., Scheraga, A., Woodward. *Climate change and human health: risks and responses*. 79-96. Geneva: WHO. ISBN 92 4 156248 X
- HALL, J. A., J. R., Grainger, S. P., Spencer, Y., Belkaid, 2011. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity*, **35**(1), 13-22. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.002

- HARADA, J., K. V. P., Nagashima, S., Takaichi, N., Misawa, K., Matsuura, K., Shimada, 2001. Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene. *Plant and Cell Physiology*, **42**(10), 1112-1118. doi: 10.1093/pcp/pce140
- HARJES, C. E., T. R., Rocheford, L., Bai, T. P., Brutnell, C. B., Kandianis, S. G., Sowinski, A. E., Stapleton, R., Vallabhaneni, M., Williams, E. T., Wurtzel, J., Yan, E. S., Buckler, 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, **319**(5861), 330-333. doi: 10.1126/science.1150255
- HESLOP-HARRISON, J. S., T., Schwarzacher, 2007. Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of botany*, **100**(5), 1073-1084. doi: 10.1093/aob/mcm191
- HOA, T. T. C., S., Al-Babili, P., Schaub, I., Potrykus, P., Beyer, 2003. Golden Indica and Japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant physiology*, **133**(1), 161-169. doi: 10.1104/pp.103.023457
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1967. Nomenclature of vitamins, coenzymes and related compounds. *European Journal of Biochemistry*, **2**, 1-8. doi: 10.1111/j.1432-1033.1967.tb00097.x
- JÄHNE, F., V., Hahn, T., Würschum, W. L., Leiser, 2020. Speed breeding short-day crops by LED-controlled light schemes. *Theoretical and Applied Genetics*, **133**(8), 2335-2342. doi: 10.1007/s00122-020-03601-4
- JARAMILLO, A. M., S., Sierra, P., Chavarriaga-Aguirre, D. K., Castillo, A., Gkanogiannis, L. A. B., López-Lavalle, J. P., Arciniegas, T., Sun, L., Li, R., Welsch, E., Boy, D., Álvarez, 2022. Characterization of cassava ORANGE proteins and their capability to increase provitamin A carotenoids accumulation. *PLoS one*, **17**(1), 1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0262412
- JONES, A., P. D., Dukes, J. M., Schalk, M. G., Hamilton, M. A., Mullen, R. A., Baumgardner, D. R., Peterson, T. E., Boswell, 1983. 'Resisto'sweet potato. *HortScience*, **18**(2), 251-252.
- KEAN, E. G., G., Ejeta, B. R., Hamaker, M. G., Ferruzzi, 2007. Characterization of carotenoid pigments in mature and developing kernels of selected yellow-endosperm sorghum varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(7), 2619-2626. doi: 10.1021/jf062939v
- KIM, J., D., DellaPenna, 2006. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid  $\beta$ -ring hydroxylase CYP97A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(9), 3474-3479. doi: 10.1073/pnas.0511207103
- KIM, S. H., Y. O., Ahn, M. J., Ahn, J. C., Jeong, H. S., Lee, S. S., Kwak, 2013. Cloning and characterization of an Orange gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweetpotato cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, **70**, 445-454. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.06.011
- KODÍČEK, M., O., Valentová, R., Hynek, 2018. Enzymy. In: *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 101-112. Praha: VŠCHT. ISBN 978-80-7592-013-3
- KURILICH, A. C., J. A., Juvik, 1999. Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(5), 1948-1955. doi: 10.1021/jf981029d
- LA FRANO, M. R., L. R., Woodhouse, D. J., Burnett, B. J., Burri, 2013. Biofortified cassava increases  $\beta$ -carotene and vitamin A concentrations in the TAG-rich plasma layer of American women. *British Journal of Nutrition*, **110**(2), 310-320. doi: 10.1017/S0007114512005004
- LAMMER, E. J., D. T., Chen, R. M., Hoar, N. D., Agnish, P. J., Benke, J. T., Braun, C. J., Curry, P. M., Fernhoff, A. W., Grix, I. T., Lott, J. M., Richard, S. C., Sun, 1985. Retinoic acid embryopathy. *New England Journal of Medicine*, **313**(14), 837-841. doi: 10.1056/NEJM198510033131401
- LEE, K., H., Zhu, B., Yang, K., Wang, 2019. An *Agrobacterium*-Mediated CRISPR/Cas9 Platform for Genome Editing in Maize. In: *Plant Genome Editing with CRISPR Systems. Methods in Molecular Biology*. 121-143. New York, NY: Humana Press. ISBN 978-1-4939-8991-1

- LEE, S., G., An, 2009. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant, Cell & Environment*, **32**(4), 408-416. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01935.x
- LI, F., R., Vallabhaneni, E. T., Wurtzel, 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*, **146**(3), 1333-1345. doi: 10.1104/pp.107.111120
- LI, S., A., Nugroho, T., Rocheford, W. S., White, 2010. Vitamin A equivalence of the  $\beta$ -carotene in  $\beta$ -carotene-biofortified maize porridge consumed by women. *The American journal of clinical nutrition*, **92**(5), 1105-1112. doi: 10.3945/ajcn.2010.29802
- LICHTENTHALER, H. K., J., Schwender, A., Disch, M., Rohmer, 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS letters*, **400**(3), 271-274. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01404-4
- LIETZ, G., C. J. K., Henry, G., Mulokozi, J. K., Mugyabuso, A., Ballart, G. D., Ndossi, W., Lorri, A., Tomkins, 2001. Comparison of the effects of supplemental red palm oil and sunflower oil on maternal vitamin A status. *The American journal of clinical nutrition*, **74**(4), 501-509. doi: 10.1093/ajcn/74.4.501
- LIN, Y., M., He, J., Wang, J., Huang, 2021. Fruit-Specific Expression of crtB, HpBHY, CrBKT and SILCYB in a Special Tomato Landrace Triggers Hyper Production of Carotenoids in the Fruit. *Journal of Plant Biology*, **64**(5), 447-459. doi: 10.1007/s12374-021-09316-3
- LINARES, O. F., 2002. African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(25), 16360-16365. doi: 10.1073/pnas.252604599
- LIPKIE, T. E., F. F., De Moura, Z. Y., Zhao, M. C., Albertsen, P., Che, K., Glassman, M. G., Ferruzzi, 2013. Bioaccessibility of carotenoids from transgenic provitamin A biofortified sorghum. *Journal of agricultural and food chemistry*, **61**(24), 5764-5771. doi: 10.1021/jf305361s
- LOPEZ, A. B., J., Van Eck, B. J., Conlin, D. J., Paolillo, J., O'Neill, L., Li, 2008. Effect of the cauliflower Or transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers. *Journal of experimental botany*, **59**(2), 213-223. doi: 10.1093/jxb/erm299
- LU, S., J., Van Eck, X., Zhou, A. B., Lopez, D. M., O'Halloran, K. M., Cosman, B. J., Conlin, D. J., Paolillo, D. F., Garvin, J., Vrebalov, L. V., Kochian, H., Küpper, E. D., Earle, J., Cao, L., Li, 2006. The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of  $\beta$ -carotene accumulation. *The Plant Cell*, **18**(12), 3594-3605. doi: 10.1105/tpc.106.046417
- LUCCA, P., R., Hurrell, I., Potrykus, 2001. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**(2), 392-397. doi: 10.1007/s001220051659
- MANN, V., I., Pecker, J., Hirschberg, 1994. Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (Pds) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant molecular biology*, **24**(3), 429-434. doi: 10.1007/BF00024111
- MAQBOOL, M. A., M., Aslam, A., Beshir, M. S., Khan, 2018. Breeding for provitamin A biofortification of maize (*Zea mays* L.). *Plant breeding*, **137**(4), 451-469. doi: 10.1111/pbr.12618
- MATTHEWS, P. D., R., Luo, E. T., Wurtzel, 2003. Maize phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany*, **54**(391), 2215-2230. doi: 10.1093/jxb/erg235
- MAYER, J. E., W. H., Pfeiffer, P., Beyer, 2008. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current opinion in plant biology*, **11**(2), 166-170. doi: 10.1016/j.pbi.2008.01.007
- MCLAREN, D. S., H. A. P. C., Oomen, H., Escapini, 1966. Ocular manifestations of vitamin-A deficiency in man. *Bulletin of the World Health Organization*, **34**(3), 357-361.

- MUZHINGI, T., T. H., Gadaga, A. H., Siwela, M. A., Grusak, R. M., Russell, G., Tang, 2011. Yellow maize with high  $\beta$ -carotene is an effective source of vitamin A in healthy Zimbabwean men. *The American journal of clinical nutrition*, **94**(2), 510-519. doi: 10.3945/ajcn.110.006486
- NAQVI, S., C., Zhu, G., Farre, K., Ramessar, L., Bassie, J., Breitenbach, D., Perez Conesa, G., Ros, G., Sandmann, T., Capell, P., Christou, 2009. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(19), 7762-7767. doi: 10.1073/pnas.0901412106
- O'CONNOR, R. T., D. C., Heinzelman, M. E., Jefferson, 1946. Determination of Total Beta-Carotene in Sweet Potatoes and Sweet Potato Products. An Improved Method. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, **18**(9), 557-562. doi: 10.1021/i560157a012
- PAINE, J. A., C. A., Shipton, S., Chaggar, R. M., Howells, M. J., Kennedy, G., Vernon, S. Y., Wright, E., Hinchliffe, J. L., Adams, A. L., Silverstone, R., Drake, 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature biotechnology*, **23**(4), 482-487. doi: 10.1038/nbt1082
- PANKRATOV, I., R., McQuinn, J., Schwartz, E., Bar, Z., Fei, E., Lewinsohn, D., Zamir, J. J., Giovannoni, J., Hirschberg, 2016. Fruit carotenoid-deficient mutants in tomato reveal a function of the plastidial isopentenyl diphosphate isomerase (IDI 1) in carotenoid biosynthesis. *The Plant Journal*, **88**(1), 82-94. doi: 10.1111/tbj.13232
- PARK, S. C., S. H., Kim, S., Park, H. U., Lee, J. S., Lee, W. S., Park, M. J., Ahn, Y. H., Kim, J. C., Jeong, H. S., Lee, S. S., Kwak, 2015. Enhanced accumulation of carotenoids in sweetpotato plants over-expressing IbOr-Ins gene in purple-fleshed sweetpotato cultivar. *Plant Physiology and Biochemistry*, **86**, 82-90. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.11.017
- PARK, S., H. S., Kim, Y. J., Jung, S. H., Kim, C. Y., Ji, Z., Wang, J. C., Jeong, H. S., Lee, S. Y., Lee, S. S., Kwak, 2016. Orange protein has a role in phytoene synthase stabilization in sweetpotato. *Scientific reports*, **6**(1), 1-12. doi: 10.1038/srep33563
- PAUL, J. Y., H., Khanna, J., Kleidon, P., Hoang, J., Geijskes, J., Daniells, E., Zaplin, Y., Rosenberg, A., James, B., Mlalazi, P., Deo, G., Arinaitwe, P., Namanya, D., Becker, J., Tindamanyire, W., Tushemreirwe, R., Harding, J. Dale, 2017. Golden bananas in the field: elevated fruit pro-vitamin A from the expression of a single banana transgene. *Plant Biotechnology Journal*, **15**(4), 520-532. doi: 10.1111/pbi.12650
- PLACK, P. A., 1965. Occurrence, absorption and distribution of vitamin A. *Proceedings of the Nutrition Society*, **24**(2), 146-152. doi: 10.1079/PNS19650027
- POGSON, B., K. A., McDonald, M., Truong, G., Britton, D., DellaPenna, 1996. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell*, **8**(9), 1627-1639. doi: 10.1105/tpc.8.9.1627
- RODRIGO, M. J., J., Lado, E., Alós, B., Alquézar, O., Dery, J., Hirschberg, L., Zacarías, 2019. A mutant allele of  $\zeta$ -carotene isomerase (Z-ISO) is associated with the yellow pigmentation of the "Pinalate" sweet orange mutant and reveals new insights into its role in fruit carotenogenesis. *BMC plant biology*, **19**(1), 1-16. doi: 10.1186/s12870-019-2078-2
- ROHDICH, F., S., Hecht, K., Gärtner, P., Adam, C., Krieger, S., Amslinger, D., Arigoni, A., Bacher, W., Eisenreich, 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(3), 1158-1163. doi: 10.1073/pnas.032658999
- RONEN, G., M., Cohen, D., Zamir, J., Hirschberg, 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal*, **17**(4), 341-351. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00381.x

- SALAS FERNANDEZ, M. G., I., Kapran, S., Souley, M., Abdou, I. H., Maiga, C. B., Acharya, M. T., Hamblin, S., Kresovich, 2009. Collection and characterization of yellow endosperm sorghums from West Africa for biofortification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56**(7), 991-1000. doi: 10.1007/s10722-009-9417-3
- SALAS FERNANDEZ, M. G., M. T., Hamblin, L., Li, W. L., Rooney, M. R., Tuinstra, S., Kresovich, 2008. Quantitative trait loci analysis of endosperm color and carotenoid content in sorghum grain. *Crop science*, **48**(5), 1732-1743. doi: 10.2135/cropsci2007.12.0684
- SAYRE, R., J. R., Beeching, E. B., Cahoon, C., Egesi, C., Fauquet, J., Fellman, M., Fregene, W., Gruissem, S., Mallowa, M., Manary, B., Maziya-Dixon, A., Mbanaso, D. P., Schachtman, D., Siritunga, N., Taylor, H., Vanderschuren, P., Zhang, 2011. The BioCassava plus program: biofortification of cassava for sub-Saharan Africa. *Annual review of plant biology*, **62**(1), 251-272. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103751
- SCHAUB, P., S., Al-Babili, R., Drake, P., Beyer, 2005. Why is golden rice golden (yellow) instead of red?. *Plant Physiology*, **138**(1), 441-450. doi: 10.1104/pp.104.057927
- SCHWARZ, N., U., Armbruster, T., Iven, L., Brückle, M., Melzer, I., Feussner, P., Jahns, 2015. Tissue-specific accumulation and regulation of zeaxanthin epoxidase in Arabidopsis reflect the multiple functions of the enzyme in plastids. *Plant and Cell Physiology*, **56**(2), 346-357. doi: 10.1093/pcp/pcu167
- SCHWENDER, J., C., Müller, J., Zeidler, H. K., Lichtenthaler, 1999. Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of Arabidopsis thaliana 1. *FEBS letters*, **455**(1-2), 140-144. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00849-2
- SIMONNE, A. H., S. J., Kays, P. E., Koehler, R. R., Eitenmiller, 1993. Assessment of  $\beta$ -carotene content in sweetpotato breeding lines in relation to dietary requirements. *Journal of food composition and analysis*, **6**(4), 336-345. doi: 10.1006/jfca.1993.1037
- SOMMER, A., J., Katz, I., Tarwotjo, 1984. Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. *The American journal of clinical nutrition*, **40**(5), 1090-1095. doi: 10.1093/ajcn/40.5.1090
- STANLEY, L., Y. W., Yuan, 2019. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus. *Frontiers in Plant science*, **10**(1017), 1-17. doi: 10.3389/fpls.2019.01017
- STOROZHENKO, S., V., De Brouwer, M., Volckaert, O., Navarrete, D., Blancquaert, G. F., Zhang, W., Lambert, D., Van Der Straeten, 2007. Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nature biotechnology*, **25**(11), 1277-1279. doi: 10.1038/nbt1351
- SUN, T., S., Rao, X., Zhou, L., Li, 2022. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, **2**(1), 1-21. doi: 10.1186/s43897-022-00023-2
- SUN, Z., E., Gantt, F. X., Cunningham, 1996. Cloning and functional analysis of the  $\beta$ -carotene hydroxylase of Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(40), 24349-24352. doi: 10.1074/jbc.271.40.24349
- TANG, G., J., Qin, G. G., Dolnikowski, R. M., Russell, M. A., Grusak, 2009. Golden Rice is an effective source of vitamin A. *The American journal of clinical nutrition*, **89**(6), 1776-1783. doi: 10.3945/ajcn.2008.27119
- TELENGECH, P. K., J. N., Maling'a, A. B., Nyende, S. T., Gichuki, B. W., Wanjala, 2015. Gene expression of beta carotene genes in transgenic biofortified cassava. *3 Biotech*, **5**(4), 465-472. doi: 10.1007/s13205-014-0243-8
- THOMPSON, J. N., G. A. J., Pitt, 1960. Vitamin A acid and hypervitaminosis A. *Nature*, **188**(4751), 672-673. doi: 10.1038/188672b0

- TIAN, L., V., Musetti, J., Kim, M., Magallanes-Lundback, D., DellaPenna, 2004. The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid  $\epsilon$ -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(1), 402-407. doi: 10.1073/pnas.223723710
- TRAEGER, R., B. M., Banda, M., Riba, G., Valensisi, UNCTAD, 2020. What are the least developed countries?. In: *The least developed countries report. 2020 productive capacities for the new decade*. x-xii. Geneva: United Nations. ISBN 9789210053846
- TRUMBO, P., A. A., Yates, S., Schlicker, M., Poos, 2001. Dietary reference intakes. *Journal of the American Dietetic Association*, **101**(3), 294-301. doi: 10.1016/S0002-8223(01)00078-5
- TULCHINSKY, T. H., 2010. Micronutrient deficiency conditions: global health issues. *Public health reviews*, **32**(1), 243-255. doi: 10.1007/BF03391600
- UNICEF, 2020. *Estimates of Vitamin A Supplementation Coverage in Preschool-Age Children: Methods and Processes for the UNICEF Global Database*. 2-19. New York: UNICEF.
- UYEH, D. D., S., Asem-Hiablie, T., Park, K., Kim, A., Mikhaylov, S., Woo, Y., Ha, 2021. Could japonica Rice be an alternative variety for increased global food security and climate change mitigation?. *Foods*, **10**(1869), 1-21. doi: 10.3390/foods10081869
- VALLABHANENI, R., L. M., Bradbury, E. T., Wurtzel, 2010. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice. *Archives of biochemistry and biophysics*, **504**(1), 104-111. doi: 10.1016/j.abb.2010.07.019
- VAN EENENNAAM, A. L., K., Lincoln, T. P., Durrett, H. E., Valentin, C. K., Shewmaker, G. M., Thorne, J., Jiang, S. R., Baszis, C. K., Levering, E. D., Aasen, M., Hao, J. C., Stein, S. R., Norris, R. L., Last, 2003. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *The Plant Cell*, **15**(12), 3007-3019. doi: 10.1105/tpc.015875
- VAN JAARSVELD, P. J., M., Faber, S. A., Tanumihardjo, P., Nestel, C. J., Lombard, A. J. S., Benadé, 2005.  $\beta$ -Carotene-rich orange-fleshed sweet potato improves the vitamin A status of primary school children assessed with the modified-relative-dose-response test. *The American journal of clinical nutrition*, **81**(5), 1080-1087. doi: 10.1093/ajcn/81.5.1080
- VON LINTIG, J., R., Welsch, M., Bonk, G., Giuliano, A., Batschauer, H., Kleinig, 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Journal*, **12**(3), 625-634. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.d01-16.x
- WANG, Z., Q., Ke, M. D., Kim, S. H., Kim, C. Y., Ji, J. C., Jeong, H. S., Lee, W. S., Park, M. J., Ahn, H., Li, B., Xu, X., Deng, S. H., Lee, Y. P., Lim, S. S., Kwak, 2015. Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato Orange gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance. *PLoS One*, **10**(5), 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0126050
- WATSON, A., S., Ghosh, M. J., Williams, W. S., Cuddy, J., Simmonds, M. D., Rey, M. A., Md. Hatta, A., Hinchliffe, A., Steed, D., Reynolds, N. M., Adamski, A., Breakspear, A., Korolev, T., Rayner, L. E., Dixon, A., Riaz, W., Martin, M., Ryan, D., Edwards, J., Batley, H., Raman, J., Carter, C., Rogers, C., Domoney, G., Moore, W., Harwood, P., Nicholson, M. J., Dieters, I. H., DeLacy, J., Zhou, C., Uauy, S. A., Boden, R. F., Park, B. B. H., Wulff, L. T., Hickey, 2018. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nature plants*, **4**(1), 23-29. doi: 10.1038/s41477-017-0083-8
- WELSCH, R., J., Arango, C., Bär, B., Salazar, S., Al-Babili, J., Beltrán, P., Chavarriaga, H., Ceballos, J., Tohme, P., Beyer, 2010. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *The Plant Cell*, **22**(10), 3348-3356. doi: 10.1105/tpc.110.077560
- WEN, X., A., Heller, K., Wang, Q., Han, Y., Ni, R., Carle, R., Schweiggert, 2020. Carotenogenesis and chromoplast development during ripening of yellow, orange and red colored *Physalis* fruit. *Planta*, **251**(5), 1-14. doi: 10.1007/s00425-020-03383-5

WONG, J. C., R. J., Lambert, E. T., Wurtzel, T. R., Rocheford, 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and  $\zeta$ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**(2), 349-359. doi: 10.1007/s00122-003-1436-4

WORLD BANK, 2020. Monitoring global poverty. In: *Poverty and Shared Prosperity 2020: Reversals of Fortune*. 27-68. Washington, DC: World Bank. ISBN 978-1-4648-1603-1

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976. Vitamin A deficiency and xerophthalmia: Report of a joint WHO/USAID meeting. In: *Vitamin a deficiency and xerophthalmia: report of a joint WHO/USAID meeting*. 32-40. Geneva: WHO. ISBN 9241205903

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009. Methods. In: *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency*. 4-8. Geneva: WHO. ISBN 978-92-4-159801-9

XU, S. X., J. I. E., Liu, G. S., Liu, 2004. The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize. *Hereditas*, **141**(3), 207-215. doi: 10.1111/j.1601-5223.2004.01865.x

YAN, J., C. B., Kandianis, C. E., Harjes, L., Bai, E. H., Kim, X., Yang, D. J., Skinner, Z. Fu, S., Mitchell, Q., Li, M. G., Salas Fernandez, M., Zaharieva, R., Babu, Y., Fu, N., Palacios, J., Li, D., DellaPenna, T., Brutnell, E. S., Buckler, M. L., Warburton, T., Rocheford, 2010. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases  $\beta$ -carotene in maize grain. *Nature genetics*, **42**(4), 322-327. doi: 10.1038/ng.551

YANG, R., Z., Yan, Q., Wang, X., Li, F., Feng, 2018. Marker-assisted backcrossing of *lcyE* for enhancement of *proA* in sweet corn. *Euphytica*, **214**(8), 1-12. doi: 10.1007/s10681-018-2212-5

YE, X., S., Al-Babili, A., Kloti, J., Zhang, P., Lucca, P., Beyer, I., Potrykus, 2000. Engineering the pro-vitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, **287**(5451), 303-305. doi: 10.1126/science.287.5451.303

## Internetové zdroje

ENESRINK, M., 2013, 19. září. Golden Rice Not So Golden for Tufts [online]. In: *Science*. [cit. 1.7.2022]. Dostupné z: <https://www.science.org/content/article/golden-rice-not-so-golden-tufts>.

FAOSTAT, © 2022. Crops and livestock products [online]. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [cit. 10.7.2022]. Dostupné z: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

GREENPEACE INTERNATIONAL, 2013, 17. října. Golden Illusion [online]. In: *Greenpeace*. [cit. 1.7.2022]. Dostupné z: <https://www.greenpeace.org/international/publication/7136/golden-illusion/>

GREENPEACE SOUTHEAST ASIA, 2013, 1. března. Golden Rice [online]. In: *Greenpeace*. [cit. 1.7.2022]. Dostupné z: <https://www.greenpeace.org/southeastasia/publication/1073/golden-rice/>

HRÁBEK, L., 2018, 12. října. Zlatá rýže je jen chiméra [online]. In: *Greenpeace*. [cit. 2.7.2022]. Dostupné z: <https://www.greenpeace.org/czech/clanek/2334/zlata-ryze-je-chimera/>

IITA, 2014, 6. července. Nigeria releases more cassava with higher pro-vitamin A to fight micronutrient deficiency [online]. In: *IITA: Transforming African Agriculture*. [cit. 15.7.2022]. Dostupné z: <https://www.iita.org/news-item/nigeria-releases-cassava-higher-pro-vitamin-fight-micronutrient-deficiency/>

KUPFERSCHMIDT, Kai, 2013, 13. srpna. Activists Destroy 'Golden Rice' Field Trial [online]. In: *Science*. [cit. 3.7.2022]. Dostupné z: <https://grain.org/en/article/6354-stop-golden-rice-in-bangladesh>.

MENKIR, A., N., Palacios-Rojas, O., Alamu, M. C., Dias Paes, T., Dhliwayo, B., Maziya-Dixon, W., Mengesha, T., Ndhlela, P. E., Oliveira Guimarães, K., Pixley, T., Rocheford, 2018, 19. února. Vitamin A-Biofortified Maize: Exploiting Native Genetic Variation for Nutrient Enrichment [online]. In: *Crop Trust*. [cit. 6.7.2022]. Dostupné z: <https://www.croptrust.org/news-events/news/vitamin-a-biofortified-maize-exploiting-native-genetic-variation-for-nutrient-enrichment/>

REINKE, R., 2021, 23. července. Philippines becomes first country to approve nutrient-enriched “Golden Rice” for planting [online]. In: *International Rice Research Institute*. [cit. 30.6.2022]. Dostupné z: <https://www.irri.org/news-and-events/news/philippines-becomes-first-country-approve-nutrient-enriched-golden-rice>

SHAHBANDEH, M., 2022, 2. března. Rice - statistics & facts [online]. In: *Statista*. [cit. 30.6.2022]. Dostupné z: [https://www.statista.com/topics/1443/rice/#topicHeader\\_\\_wrapper](https://www.statista.com/topics/1443/rice/#topicHeader__wrapper)

STOKSTAD, E., 2019, 20. listopadu. Bangladesh could be the first to cultivate Golden Rice, genetically altered to fight blindness [online]. In: *Science*. [cit. 2.7.2022]. Dostupné z: <https://www.science.org/content/article/bangladesh-could-be-first-cultivate-golden-rice-genetically-altered-fight-blindness>

STOP GOLDEN RICE NETWORK, 2019, 15. listopadu. Stop Golden Rice in Bangladesh! [online]. In: *Grain*. [cit. 3.7.2022]. Dostupné z: <https://grain.org/en/article/6354-stop-golden-rice-in-bangladesh>

SUPPORT PRECISION AGRICULTURE, 2016, 29. června. Laureates Letter Supporting Precision Agriculture (GMOs) [online]. In: *Support Precision Agriculture*. [cit. 3.7.2022]. Dostupné z: [https://supportprecisionagriculture.org/nobel-laureate-gmo-letter\\_rjr.html](https://supportprecisionagriculture.org/nobel-laureate-gmo-letter_rjr.html)