UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN

Praktické využití geneticky modifikovaných rostlin
Bakalářská práce

Barbora Říhová

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci Praktické využití geneticky modifikovaných rostlin vypracovala sama s použitím citované literatury a konzultací se školitelem, RNDr. Lukášem Fischerem, PhD, kterému tímto děkuji za trpělivou pomoc. Dále děkuji rodičům za podporu při studiu, zejména v období nemoci.

Praha 2010 Barbora Říhová

1. **Abstrakt** 5
2. **Úvod** 7
3. **Literární přehled** 8
3.1. Definice geneticky modifikovaných rostlin 8
3.2. Postup při transformaci 9
3.2.1. Transformace 9
3.2.2. Selekce 9
3.2.3. Organogeneze a somatická embryogeneze 10
3.3. Způsoby vnášení DNA do rostlinných buněk 11
3.3.1. Agrobacterium tumefaciens 11
3.3.2. Balistická metoda 12
3.3.3. Transformace protoplastů 13
3.3.4. Transformace chloroplastů 13
3.4. Umlčování exprese transgenu 14
3.5. Možné využití GM rostlin v praxi a jeho výhody 14
3.5.1. Plodiny s výhodnými vlastnostmi pro pěstitele 14
3.5.2. Herbicid tolerantní plodiny 14
3.5.3. Plodiny rezistentní k biotickému stresu 15
3.5.3.1. Plodiny rezistentní ke hmyzím škůdcům 15
3.5.3.1.1. Bt plodiny 16
3.5.1.2.2. Plodiny rezistentní k virům 17
3.5.1.2.3. Plodiny rezistentní houbám a plísním 17
3.5.1.2.4. Plodiny s kombinovanou rezistencí 18
3.5.1.3. Plodiny rezistentní k abiotickému stresu 18
3.5.2. Plodiny s vylepšenými vlastnostmi pro konzumenty 20
3.5.2.1. Zlatá rýže 20
3.5.2.2. Plodiny pěstované pro produkci olejů 20
3.5.3. Plodiny s výhodnými vlastnostmi pro distributory 21
3.5.3.1. Rajče FlavrSavr 21

3.5.4. Produkce proteinů pro využití ve výzkumu 21
3.5.5. Produkce proteinů pro využití v lékařství 22
3.5.5.1. Vakcíny 22
3.5.5.2. Protilátky 23
3.5.5.3. Další proteiny a enzymy 24
3.5.6. Plodiny s výhodnými vlastnostmi pro technické účely 24
3.5.7. Fytoremediace 25
3.6. Rizika 25
3.6.1. Pro životní prostředí 25
3.6.1.1. Kontaminace rostlin netransgenních 25
3.6.1.2. Vznik agresivních plevelů rezistentních k herbicidům 26
3.6.1.3. Narušení potravních řetězců 27
3.6.1.4. Vznik rezistentních škůdců 27
3.6.1.5. Horizontální přenos genů 28
3.6.2. Pro lidské zdraví 28
3.6.2.1. Alergie 28
4. **Závěr a diskuze** 29
5. **Seznam použité literatury** 30

1. Abstrakt

Genetické inženýrství (GI) rostlin je téma velice aktuální, a stále více kontroverzní, neboť se stává neodmyslitelnou součástí života nás všech. GI má, kromě jiného, velký potenciál pomoci vyřešit aktuální otázku hladu a podvýživy v určitých částech světa. Tato práce má za cíl objasnit, co jsou geneticky modifikované (GM) rostliny, představit možnosti praktického využití GM rostlin, způsoby přípravy a zvážit jejich výhody a případná rizika. GM rostlinou rozumíme rostlinu, které byla cíleně změněna genetická informace vnesením či vyjmutím části genetické informace (úseku DNA, zpravidla genu). Nejvíce používané metody transformace jsou transformace pomocí *Agrobacteria tumefaciens* a balistickou metodou. GM rostliny se mohou využívat pro produkci potravin a krmiv v lepší kvalitě a větší kvantitě, díky navozené vyšší odolnosti, ať už vůči stresu biotickému (vůči napadení škůdcem, virem, bakterií..), tak vůči abiotickému (sucho, salinita, toxické látky v půdě,..). Zejména odolnost vůči abiotickému stresu je aktuální problém, neboť díky měnícím se klimatickým podmínkám některé regiony stále více trpí nedostatkem srážek a následným suchem. Některé GM rostliny pěstované pro produkci potravin také mají lepší nutriční vlastnosti, což může pomoci vyřešit problém s nedostatkem určitých složek potravy v zemích třetího světa. Dále se využívají GM rostliny pro produkci různých proteinů a enzymů pro lékařství a technický průmysl. Jako možná rizika jsou uváděna například přenos genů mezi transgenními a netransgenními rostlinami stejného nebo jiného druhu, narušení potravních řetězců, vznik agresivních plevelů a mohou se objevit nové alergeny či toxiny.

Klíčová slova: genetické inženýrství, geneticky modifikované rostliny, *Agrobacterium tumefaciens*, balistická metoda

Abstract

Genetic engineering (GI) of plants is a very current topic, and more and more controversial, since it is becoming an inseparable part of our lives. GI has, among other things, a great potential to help solve the current problem of hunger and malnutrition in certain parts of the world. The goal of this project is to clarify what genetically modified (GM) plants are, to present the possibilities of their practical use, to explain methods of preparation and to consider their advantages and eventual risks. By GM plant we understand a plant whose genetic information has been changed by introducing or removing part of the genetic information (a section of DNA, generally a gene). The most frequently used methods of transformation are the transformation by *Agrobacterium tumefaciens* and the balistic method. GM plants can be used for production of food or feed in better quality and greater quantity, thanks to an introduction of higher resistance, whether it is to biotic stress (pest, virus or bacterial resistance) or to abiotic stress (drought, salinity, toxic substance in the ground..). In particular, the resistance to abiotic stress is an important issue these days, since through the climate changes some regions suffer more and more from insufficient precipitation and consequent drought. Some of the GM plants grown for the production of food have better nutrition qualities which can help solve the problem of insufficiency of some food components in the third world countries. Further, GM plants are used for the production of various proteins and enzymes for medicide and in technical industry. The possible risks of cultivating GM plants are for example the transfer of genes between transgenic and non-transgenic plants of the same or different species, food chain disturbance and the possibility of the emergence of new allergens and toxins.

Keywords: genetic engineering, genetically modified plants, *Agrobacterium tumefaciens*, balistic method

2. Úvod

Lidé začali šlechtit plodiny již před několika tisíci lety pomocí nejjednoduššího způsobu šlechtění – podle vzhledu, vůně, chuti a úrody vybírali nejvhodnější jedince, jejichž semena použili pro výsev v dalším roce (Kraus 2010).

Později se člověk naučil mutační rychlost a počet mutací zvyšovat vysokoenergetickým zářením nebo chemickými látkami. Takto vznikly například růžové bezjaderné grapefruity.

V 60.letech 20.století proběhla tzv. Zelená revoluce, která se vyznačovala velkým nárůstem zemědělské produkce díky nových technologickým postupům a díky použití trpasličích odrůd pšenice, rýže a kukuřice s vysokým podílem výnosu. Tato revoluce pomohla některým zemím vyřešit problém s nedostatkem potravy a stát se potravně soběstačnými. Lidská populace však stále roste a nedostatečné zdroje potravy se opět stávají stále závažnějším problémem. Díky GI bychom mohli docílit dalšího takového nárůstu v produkci a pomoci tím uspokojit poptávku (Slater *et al.* 2008).

Za zrod GI, jak ho chápeme dnes, můžeme považovat rok 1973, kdy vědci Cohen a Boyer úspěšně vnesli gen z žáby do bakterie (Bera 2009). Pro rostliny se GI začalo používat až v roce 1983 v souvislosti s bližším poznáním mechanizmu transformace rostlinných buněk pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Van Haute *et al.* 1983; Klee *et al.* 1983).

Při použití technik GI, na rozdíl od technik klasického zemědělství, můžeme analyzovat, jaké nové proteiny vznikají, a jsou tedy takovéto techniky daleko průhlednější. Přesto jsou právě techniky GI veřejností často striktně odmítány.

3. Literární přehled

3.1. Definice geneticky modifikovaných rostlin

„Podle zákona č.78/2004 Sb.o nakládání s geneticky modifikovanými GMO a genetickými produkty za GM neboli transgenní organizmy jsou považovány takové, kterým byla cíleně změněna genetická výbava vnesením genu z jiného organismu nebo odebráním vlastního genu, a to jedním z následujících technických postupů:

a) techniky rekombinantní nukleové kyseliny vytvářející nové kombinace dědičného materiálu vložením úseku nukleové kyseliny připravené jakýmkoli způsobem mimo organismus do jakéhokoliv viru, bakteriálního plasmidu nebo jiného vektorového systému a jeho následným začleněním do organismu příjemce, ve kterém se normálně nevyskytuje, ale ve kterém je schopen dalšího množení.
b) techniky zavádějící dědičný materiál připravený jakýmkoli způsobem mimo organismus přímo do organismu příjemce, zahrnující mikroinjekce, makroinjekce, biolistické metody, mikroenkapsulace a umělé chromosomy, nebo
c) techniky buněčné fúze, včetně fúze protoplastů, nebo hybridizace buněk, při nichž jsou fúzí dvou nebo několika buněk vytvářeny životaschopné buňky s novou kombinací dědičného materiálu, a to metodami nebo prostředky, které se nevyskytují přirozeně.

Za GM organizmy dále podle tohoto zákona nejsou považovány takové, k jejichž vzniku byly použity následující techniky: oplození *in vitro*, bakteriální konjugace, transformace, transdukce a podobné přirozené procesy, indukce polyploidie a haploidie“ (Zákon č.78/2004 Sb.o nakládání s GMO a genetickými produkty).

V poslední době se začal vyčleňovat pojem cisgenní rostliny, jako pojem odlišný od pojmu transgenní rostliny. Za cisgenní jsou považovány rostliny, do jejichž dědičné informace byl přenesen jeden nebo více genů z druhů, z kterých by rostliny mohly získat tentýž gen samovolně v přírodě nebo tradičním šlechtěním. Cisgeneze (tvorba cisgenních rostlin) se jeví jako zvláště výhodná u rostlin, jejichž kultivary a odrůdy vděčí za své vlastnosti vysoké míře heterozygotnosti, jež je udržována vegetativním množením, např. brambor, jabloň nebo banánovník. Tradiční křížení by u těchto rostlin vedlo k „rozbourání“ cenné heterozygotní konstalace (Schouten *et al.* 2006).

Naproti tomu za transgenní v užším slova smyslu jsou považovány rostliny, do kterých byl přenesen jeden nebo více genů z organizmů, které by tradičním křížením přeneseny být nemohly, případně genů uměle vyrobených či chimérických (Chawla 2009). Kromě Kanady však zatím současná legislativa žádné země mezi cisgenními a transgenními rostlinami nerozlišuje (Schouten *et al.* 2006).

3.2. Postup při transformaci

3.2.1. Transformace

Transformaci (vnesení cizorodé DNA) rostlinných buněk lze provádět především pomocí *A. tumefaciens,* balistickou metodou nebo transformací protoplastů, či obměnami těchto metod (*in planta* transformace a transformace pomocí transkripčních faktorů, detaily viz kap. 3.3., Finer 2010).

Transformace může být dočasná nebo trvalá. Při dočasné transformaci nedochází k integraci vnesené DNA do genomu buňky, čili nedochází k replikaci vneseného genu. Dochází zpravidla jen k jeho přepisu a posléze ke vzniku proteinu, ale jen po určitou dobu. Dočasná transformace se používá při testování exprese genu a její stability nebo pro geny letální, které např. zasahují do buněčného cyklu. Při stabilní transformaci dochází k integraci vnesené DNA do genomu buňky, tedy do jaderné DNA nebo do DNA plastidu nebo mitochondrie (Chawla 2009).

3.2.2. Selekce

Transgenní rostliny se získávají vždy z jedné transformované buňky, která se selektuje a namnoží na selekčním médiu. Selekce se provádí zpravidla pomocí rezistence k antibiotikům (kanamycin – selekční gen *nptII*, hydromycin, spektinomycin, bleomycin) nebo k herbicidům (Roundup® - glyfosát, Liberty® - glufosinát, Slater *et al.* 2008; Kraus 2010).

Antibiotika působí na chloroplasty nerezistentních rostlinných buněk inhibicí syntézy proteinů díky podobnosti ribozomů chloroplastů s ribozomy bakteriálními (Ellis 1970; Goldstein *et al.* 2003).

Použití genů pro rezistenci k antibiotikům je kritizováno veřejností, a proto se hledaly jiné možnosti. Pro selekci byly úspěšně použity geny z bakterie, které umožňují využití uhlíku z karbohydrátů, z kterých netransformovaná rostlina energii využít nedokáže, např. využití manózy u kukuřice (Joersbo *et al.* 1998) nebo cukrové řepy (Wang *et al.* 2000).

Časté je použití reportérových genů, které vizuálně označí pletiva, ve kterých se vnesený gen vyjadřuje (např. green fluorescent protein - GFP – gen *gfp*, β-glukoronidáza – gen *uidA* nebo *gus*, luciferáza – gen *lux* a *lus*). Reportérové geny se používají při analýze exprese genu a standardizaci parametrů pro úspěšný přenos genů při určité technice. GFP je často užívaný, jeho použití je snadné a nedestruktivní. Použití luciferázy je vhodné pro detekci genů, které se vyjadřují v malém množství (Slater *et al.* 2008).

Selekční geny lze odstranit, což zvyšuje pravděpodobnost pozitivního přijetí na trhu, protože nehrozí riziko přenesení tohoto genu do životního prostředí. Také je to výhodné při další transformaci jednou již transformované odrůdy, protože můžeme použít stejný selekční gen (Sreekala *et al.* 2005).

Získat transgenní rostliny bez selekčního genu lze lze pomocí kotransformace, při níž jsou transgen a selekční gen vpraveny dvěma různými metodami, integrují se na jiné místo v genomu a poté se odstraní křížením a segregací vloh v pozdějších generacích (Akhond & Machray 2009), nebo systémy rozpoznávající specifická místa v DNA: Cre-*lox* rekombinačním systémem bakteriofága P1 (Gilbertson 2003) nebo systémem Flp-*frt* (Radhakrishnan & Srivastava 2004). Cre a Flp jsou tyrozin rekombinázy, a *lox* a *frt* jsou místa s repetetivními sekvencemi, kam se rekombinázy váží a homologií rekombinací repetetivních sekvencí vyjmou selekční gen (Gilbertson 2003).

3.2.3. Organogeneze a somatická embryogeneze

Z jednotlivých transformovaných buněk či dediferencovaných buněk kalusu se připravují celistvé transformované rostliny nejčastěji organogenezí prýtu nebo somatickou embryogenezí (Mujib & Šamaj 2006; Doerner. 2000).

Organogenezi prýtu předchází dediferenciace, která je zachována u mnoha rostlinných buněk. Dediferenciaci lze indukovat na médiu s převahou auxinu a posléze lze na jiném médiu s převahou cytokininů navodit diferenciaci prýtu (Cary et al. 2002).

Somatická embryogeneze je vznik embrya asexuální cestou ze somatických buněk. Při nepřímé somatické embryogenezi se nejdříve vytvoří z explantátu kalus, a až poté embryo.

Daleko méně častá je přímá somatická embryogeneze, při které vznikají embrya přímo ze somatických buněk (Cary *et al.* 2002; Gaj 2004).

3.3. Způsoby vnášení DNA do rostlinných buněk

3.3.1. Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens je gram-negativní bakterie patřící do rodiny *Rhizobiceae* způsobující nádory dvouděložných, nahosemenných a některých jednoděložných rostlin. *A. tumefaciens* je přitahováno cukry a fenolickými látkami, které vylučuje rostlina při poranění. Z Ti (tumour-inducing) plazmidu se vyštěpí T-DNA (transfer-DNA), která se včlení do genomu napadené rostlinné buňky, kde se přepisuje a indukuje syntézu opinů, cytokininů a auxinu. Auxiny a cytokininy způsobují proliferaci buněk a tím tvorbu nádorů. Opiny (jako deriváty aminokyselin a ketokyselin či cukrů) slouží *A. tumefaciens* jako zdroj uhlíku, dusíku a energie. Produkované opiny jsou oktopin a nopalin (Hansen *et al.* 1994, Hammond-Kosack & Jones 2000).

Transformace pomocí *A. tumefaciens* v roce 1983 byla historicky první úspěšná transformace rostliny. V GI se využívá pouze schopnosti *A. tumefaciens* přenášet a integrovat část Ti plazmidu nazývanou T-DNA (transferová DNA). T-DNA je ohraničena malými (25 bp) opakujícími se sekvencemi, které zajišťují její vyštěpení a následný transport do jádra rostlinné buňky (Zupan & Zambryski 1995). Geny způsobující nádor jsou vyjmuty a na jejich místo je vložena část DNA, kterou chceme do rostliny integrovat (Hammond-Kosack & Jones 2000).

Vlastní přenos T-DNA zajišťují produkty *vir* regionů, které jsou součástí Ti plazmidu. *Vir* (virulence) region je oblast nejméně devíti *vir* genů situován přibližně 40kb od vlastní T-DNA (Slater *et al.* 2008). Každý z *vir* genů má jinou funkci a společně zajišťují napadení rostliny a přenos T-DNA (Hansen *et al.* 1994). Zahájení transkripce regionu vir kontrolují dva geny: *VirA* a *VirG*. Transmembránový protein VirA zachytí chemické signály produkované poraněnou rostlinou (Winans *et al.* 1989) a fosforylací aktivuje *VirG* (Jin *et al.* 1990a). Tento se fyzicky váže na promotory genů ve vir regionu a indukuje jejich transkripci (Jin *et al.* 1990b): VirD1 a VirD2 zajišťují produkci, ochranu a export jednovláknové T-DNA: VirD2 se s ní spojí. VirB kóduje membránové proteiny, které zajišťují přenos T-DNA z buňky *A. tumefaciens* do buňky rostliny (Slater *et al.* 2008). VirD2 s T-DNA se spolu s VirE2 přenese

přes tyto membránové proteiny (Christie 1997). V rostlinné buňce je T-DNA obalena VirE2 proteinem, který ji chrání před rostlinnými nukleázami. Určité rostlinné proteiny interagují s VirE2 a VirD2 a vytvoří se komplex VirE2+VirD2+T-DNA+rostlinné proteiny, který putuje do jádra jaderným pórem. Když je T-DNA již v jádře, jsou proteiny odbourány a T-DNA je včleněna do genomu nehomologní rekombinací, při které neexistují shody v nukleotidové sekvenci a kterou zprostředkovávají téměř výhradně proteiny opravného aparátu (Slater *et al.* 2008).

Jako výhody transformace *A. tumefaciens* se uvádí poměrně vysoká frekvence stabilní transformace, možnost přenosu delších úseků DNA a menší počet kopií (než například při biobalistice, kdy se zpravidla začleňuje větší počet kopií na jednu buňku) a tím pádem je při využití *A. tumefaciens* menší riziko umlčení exprese (Slater *et al.* 2008).

Pro získání celých rostlin je nutná regenerace z transformovaných buněk, přičemž tato schopnost se velmi liší mezi druhy, genotypy i různými pletivy odebranými z téže rostliny. Pokud není transformovaný druh přirozeným hostitelem pro *A. tumefaciens*, je navíc zpravidla nutné aktivovat vir geny externě dodaným acetosyringonem (Finer 2010).

In planta transformace je úspěšně používána při transformaci *Arabidopsis thaliana*. Poupata *Arabidopsis* jsou namočena do suspenze *A. tumefaciens* s cukrózou a surfaktantem. Semena vytvořená z takto infiltrovaných rostlin jsou s vysokou frekvencí transformovaná (0,3-5%). Selekce transformantů probíhá ve stádiu semenáčků. Velkou výhodou této metody je, že není nutná práce *in vitro* a odpadá stádium dediferenciace a regenerace prýtu (Clough & Bent 1998).

3.3.2. Balistická metoda

Balistická metoda (gene gun, particle gun, biolistika, biobalistika) je metoda transformace při které se částice (kuličky netoxických kovů, např. wolfram nebo zlato, obalené DNA) nastřelují na buněčnou kulturu, rostlinný orgán či celou rostlinu. Částice proniknou buněčnou stěnou, DNA se uvolní z kuliček a zabuduje se do jádra (Yamashita *et al.* 1991). Přístroje BioRad a PIG (Particle Inflow Gun) jsou nejvíce používané. BioRad používá stlačené hélium a částice ze zlata obalené DNA. Makrodisk je vystřelen pomocí hélia, narazí na síť, která ho zastaví, avšak částice pokračují dál do cílového pletiva. PIG funguje na principu stlačeného hélia kombinovaného s částečným vakuem, hélium vystřelí částice z wolframu obalené DNA do proudu hélia (Finer *et al.* 1992).

Výhody této metody spočívají v univerzálnosti, metoda se může použít na široké spektrum buněk a pletiv bez jakéhokoli omezení (Southgate *et al.* 1995).

Nevýhoda spočívá stejně jako u *A.tumefaciens* v tom, že musí proběhnout regenerace pletiva z transformovaných buněk (Akhond & Machray 2009).

3.3.3. Transformace protoplastů

Protoplasty se transformují elektroporací nebo pomocí PEG (polyetylen glykolu). Protoplast je buňka zbavená buněčné stěny inkubací v roztoku celuláz a pektináza, takže vnášená DNA poté musí překonat pouze plazmatickou membránu. Elektroporace spočívá v aplikaci elektrického pulzu o vysokém napětí na suspenzi protoplastů s DNA. Druhá metoda spočívá v aplikaci PEG a dvojmocných kationů (většinou vápníku) na protoplasty, které vedou k internalizaci DNA patrně endocytózou (Slater *et al.* 2008).

3.3.4. Transformace chloroplastů

Při transformaci chloroplastů musí DNA překonat několik fyzických bariér: buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, a dvojitou membránu chloroplastu. Jako velmi efektivní metoda se ukazuje biolostika. Oey *et al.* (2009) tak s úspěšností 70% transformoval chloroplast tabáku pro produkci fágového lytického proteinu působícího proti streptokoku A a B. Chloroplasty se dále úspěšně transformovaly například v bavlníku, mrkvi a rýži (Lee & Natesan 2006).

Výhody transformace chloroplastů spočívají ve velkém množství syntézy vloženého proteinu, nepřítomnosti epigenetických efektů (např. umlčování genů) a časté absenci transgenu v pylu (Ruf *et al.* 2001), což minimalizuje možnost přenesení transgenu na volně rostoucí odrůdu (Lee & Natesan 2006).

Nevýhody spočívají většinou v nízké expresi transgenu v nezelených částech rostliny, tedy v plodech, což je problém např.v případě výroby jedlých vakcín (Ruf *et al.* 2001).

3.4. Umlčování exprese transgenu

Umlčení vneseného genu může nastat, pokud se jedna nebo více kopií vneseného genu zařadí do hypermetylovaného úseku DNA nebo vedle něj – v tom případě se může hypermetylace rozšířit i na transgen – jedná se o tzv. transkripční umlčení. Takto může také nastat i umlčení genu sousedícího s transgenem (Vaucheret e*t al.* 1998).

Posttranskripční umlčování je vyvoláno dvouvláknovými molekulami RNA, které jsou rozštěpeny na úseky dlouhé 21-26 nukleotidů a slouží k rozpoznání a rozštěpení komplementární jednořetězcové RNA, což je nejčastější mechanizmus RNA interferace (RNAi; Müller 2010). Umlčování exprese cíleně indukované transgenem můžeme také využít, (viz kapitola o rezistenci proti virům).

3.5. Možné využití GM rostlin v praxi a jeho výhody

3.5.1. Plodiny s výhodnými vlastnostmi pro pěstitele

3.5.1.1. Herbicid tolerantní plodiny

Plevele jsou nežádoucí zejména proto, že soutěží s plodinou o živiny, světlo a prostor, a navíc se mohou podílet i na šíření různých chorob a škůdců (Slater *et al.* 2008).

Herbicidy hubí rostliny zpravidla blokováním syntézy aminokyselin nebo bílkovin, tvorby, transportu či funkce růstových hormonů, nebo inhibicí fotosyntézy (Malkin & Niyogi 2000; Crawford *et al.* 2000).

Rezistence sama o sobě může být použita i pro selekci transformovaných buněk. Tolerance k některým herbicidům se však může objevit i samovolně spontánní mutagenezí (Slater *et al.* 2008).

Rezistence může být navozena vnesením upraveného genu pro cílový protein, který není citlivý na herbicid, či vnesením genu, jehož produkt aktivně přeměňuje herbicid na netoxickou látku, popř. lze rezistenci navodit zvýšením přirozené detoxifikační schopnosti rostliny (Slater *et al.* 2008).

Glyfosát, původně izolovaný z plísně *Neurospora crassa* (N-fosfometylglycin, komerční produkt Roudup-Ready®), je širokospektrý, postemergentní herbicid (používá se po

vzejití rostliny). Funguje jako inhibitor syntézy šikimátu. Cílový enzym je 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát (EPSP) syntáza. Přirozený rostlinný inhibitor EPSP syntázy je fosfoenolpyruvát (PEP). Glyfosát jako kompetitivní inhibitor soutěží s PEP o navázání na EPSP syntázu (Boocock & Coggins 1983), avšak uvolňování glyfosátu z receptorů je 2300krát pomalejší (Slater *et al.* 2008). Inhibicí syntézy šikimátu zabraňuje tvorbě aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrozinu a tryptofanu (Boocock & Coggins 1983). Tím nejen zabraňuje růstu rostliny, ale také zastaví přísun aromatických komponentů pro syntézu dalších látek, např. ligninu, alkaloidů, flavonoidů a auxinu (Slater *et al.* 2008).

Glyfosát rezistentní rostliny díky vnesenému mutovanému genu z rostliny či genu z bakterie tvoří EPSP syntázu necitlivou ke glyfosátu (Boocock & Coggins 1983). Plodiny rezistentní ke glyfosátu na trhu jsou sója, kukuřice, řepka, bavlník (Owen & Zelaya 2005), dále cukrová řepa a vojtěška (Owen 2010).

Glufosinát (fosfinotricin, (4-hydroxy-(metylfosfinoyl)-D,L-homoalanin)), komerční produkty Liberty-Link®, Basta®, Finale®, Radicale) je totální herbicid inhibující glutaminsyntázu, která fixuje a tím i detoxifikuje amoniak za vzniku glutaminu. Důsledkem inhibice je nedostatek aminokyselin pro syntézu proteinů, hromadění amoniaku v rostlině, intoxikace, rozpad plastidů a blokáda fotosyntézy. Glufosinát rezistentní rostliny mají díky bakteriálním genům *pat* (Phosphinotricin-N-acetyltransferáza) nebo *bar* (Basta-rezistant) schopnost degradovat glufosinát na inaktivní formu (Quirasco *et al.* 2008).

3.5.1.2. Plodiny rezistentní k biotickému stresu

Biotický stres je vyvolán interakcí rostliny s jinými organizmy a jejich produkty. Mohou to být herbivorní živočichové nebo patogenní organizmy i jiné rostliny (viz předchozí kapitola).

3.5.1.2.1. Plodiny rezistentní ke hmyzím škůdcům

Napadení rostliny škůdcem nemá za následek pouze ztrátu biomasy, ale také se tím otevírá cesta pro sekundární infekce a hmyzí škůdci také slouží jako aktivní přenašeči některých, např. virových onemocnění. Výhoda pěstovány plodiny rezistentní ke hmyzím škůdcům spočívá v nižším množství aplikovaného insekticidu, ve snížení či eliminaci

napadení rostliny sekundárními patogeny a vyšších výnosech (Buchanan *et al.* 2000). Všechny plodiny rezistentní ke hmyzím škůdcům, které jsou momentálně na trhu, mají minimálně jeden gen z *Bacillus thuringiensis* (Sehnal 2009).

3.5.1.2.1.1. Bt plodiny

Bakterie *Bacillus thuringiensis* je gram-positivní bakterie žijící běžně v půdě. Různé kmeny bacila produkují vysoce specifické Bt toxiny (de Maagd *et al.* 2001). Bakteriální suspenze se proto používají již několik desetiletí jako alternativní bioinsekticid (Pray *et al.* 2002).

Bt plodiny, transformované genem z *Bacillus thuringiensis*, tvoří ve svých pletivech prekurzor Bt toxinu (prototoxin). Existují dva typy toxinů: Cytolyzíny (Cyt), které jsou specifické pro brouky (*Coleoptera*) a dvoukřídlé (*Diptera*), a krystalické δ-endotoxiny (Cry), které jsou specifické pro motýly (*Lepidoptera,* kam patří např. i zavíječ kukuřičný - *Ostrinia nubilalis*) a hlístice (*Nematoda,* Schnepf *et al.* 1998).

Cry prototoxin se v trávicím ústrojí hmyzu aktivuje proteázami na toxin, který se naváže na receptory v buňkách epitelu trávicí trubice a způsobí tvorbu pórů, osmotickou nerovnováhu buněk, jejich rozpad a následnou smrt hmyzu. Mechanizmus specificity spočívá v hodnotě pH v trávicí trubici (*Lepidoptera* a *Diptera* mají pH vysoce zásadité, de Maagd *et al.* 2001) , v různých druzích proteáz u každého řádu hmyzu a především v receptorech přítomných ve stěně trávicí trubice (Hofmann *et al.* 1988).

Jako výhody uvádějí pěstitelé ochranu před zavíječem, nižší mechanické poškození rostlin díky snížení vstupů do porostů, vyšší výnos a kvalitu produktu vzhledem k nižší kontaminaci plísněmi (MZ 2009). Právě houba rodu *Fusarium*, která napadá kukuřici po napadení Zavíječem kukuřičným, má velký negativní dopad na celkovou kvalitu sklizně. Produkuje jako sekundární metabolity mykotoxiny (aflatoxin a fumonisin), které jsou karcinogení a toxické pro živočichy. V Bt kukuřici je hladina těchto mykotoxinů výrazně snížena (Wu 2006).

Jako Bt-plodiny se pěstuje především kukuřice, dále rýže, bavlník, brambor, sója a cukrová řepa (Thurau *et al.* 2010). Bt-kukuřice byla první GM plodina, která dostala povolení pro pěstování v EU a tedy i v ČR, a to roku 1998 (MZ 2009). Po čtyřletém pěstování Bt-kukuřice v České republice se neprokázalo snížení biodiverzity a snížila se potřeba mechanizace. Bt-kukuřice se v ČR pěstuje jako krmivo (MZ 2009).

3.5.1.2.2. Plodiny rezistentní k virům

Přirozená obranná reakce rostliny, tzv. „cross-protection“, je založena na tom, že infekce jedním virem může sloužit jako imunizace rostliny proti jinému, příbuznému viru. Strategie založená na tomto poznatku byla poprvé použita v roce 1986. Rostliny, které prodělaly infekci TMV byly odolné vůči příbuzným virům (Abel *et al.* 1986). Tabák modifikovaný pro produkci obalového proteinu viru mozaiky tabáku vykazoval vysokou míru odolnosti vůči virům příbuzným TMV a nižší míru odolnosti vůči tobamovirům (Nejidat & Beachy 1990).

GI používá především transgeny kódující obalové proteiny. Rezistence rostliny k viru je založena na tom, že do rostliny je vložena genetická informace jeho obalových proteinů, a díky následné expresi těchto obalových proteinů v rostlinné buňce vir není schopen se rozbalit a pomnožit (Beachy 1997; Hammond Kosack & Parker 2003).

Nedávno byla úspěšně provedena transformace papáje pomocí *A. tumefaciens* k rezistenci vůči virům PRSV (Papaya Ringspot Virus) a PLDMV (Papaya Leaf-Distortion Mosaic Virus) díky vneseným genům pro obalové proteiny těchto virů (Kung *et al.* 2010). Rezistence pomocí transgenních obalových proteinů bylo dále dosaženo u celé řady produktů, které jsou na trhu, např. lilku (Pang *et al.* 2010).

Také se vyvíjí techniky využívající RNA interferenci (RNAi; vedoucí k degradaci virových RNA) či satelitní RNA. RNAi bylo využito např. při transformaci tabáku pro odolnost ke viru BGMV (Bean golden mosaic virus; Bonfim *et al.* 2007). Satelitní RNA jsou malé molekuly RNA schopné rozmnožovat se v hostitelské buňce pouze v přítomnosti svého speficického pomocného viru, přičemž mají schopnosti zmírňovat příznaky virového onemocnění (Slater *et al.* 2008). Této techniky bylo použito např. u tabáku pro indukci rezistence k viru okurkové mozaiky (Liao *et al.* 2007).

3.5.1.2.3. Plodiny rezistentní k houbám a plísním

Často je plísňové onemocnění zavlečeno do rostliny jako sekundární infekce po napadení jiným zpravidla hmyzím škůdcem. Proto jsou plodiny rezistentní ke hmyzím škůdcům i nepřímo odolnější i k plísňovým onemocněním (Wu 2006).

V přímých strategiích GI se používá exprese fungitoxického proteinu (Broglie *et al.* 1991), nebo strategie hypersenzitivní odpovědi (Keller et al. 1999).

Byl transformován například tabák pro zvýšenou produkci chitinu, fungicidního hydrolytického proteinu, který rostliny přirozeně produkují při ochraně proti patogenům (Broglie *et al.* 1991).

V rámci strategie hypersenzitivní odpovědi byl vnesen do genomu tabáku gen pro kryptogein, který se vyjadřovat v případě, že rostlinu napadl její houbový patogen (Keller et al. 1999).

3.5.1.2.4. Plodiny s kombinovanou rezistencí

Plodiny s kombinovanou rezistencí je mnoho, patří mezi ně především Bt kukuřice a sója s rezistencí vůči glyfosátu, dále brambora, banánovník a dýně rezistentní k virům, houbovým onemocněním a háďátkům, rajčata – zlepšená barva a vůně, snížené měknutí plodů, odolnost k virovým chorobám, (www.gmo-compass.cz), NewLeaf brambor má Bt-rezistenci a rezistenci k některým virům (PLRV – vir svinutky bramboru a PVY-virus Y bramboru; Slater *et al.* 2008).

3.5.1.3. Plodiny rezistentní k abiotickému stresu

Změny klimatu mají za následek rozšiřování regionů trpících suchem. Sucho je spojeno se zvýšeným zasolením, nízkým pH a extrémními teplotami, a z toho vyplývajícím snížením růstu a produktivity. Vzhledem ke stále rostoucí lidské populaci je to problém. Díky technikám GI můžeme pěstovat plodiny odolnější vůči těmto měnícím se podmínkám a můžeme snadněji uspokojit poptávku po zdrojích (Zhang *et al.* 1999; Buchanan *et al.* 2000).

Získávání rezistence k abiotickému stresu je téma velice obsáhlé a různorodé, proto uvádím jen několik příkladů. Nejpoužívanější způsoby získávání rezistence k biotickému stresu jsou ovlivňování CDPK (kalcium-dependent protein kinase) a MAPK (mitogen-activated protein dinase; Mehlmer *et al.* 2010). Dále můžeme regulovat osmotickou rovnováhu buňky, expresi ABA (kyseliny abscisové), DRE (dehydration responsive elements), LEA (late embryogenesis abundant) genů, anexinu a IPT (izopentenyltransferázy).

Poprvé bylo úspěchu při transformaci MAK kinázy pro toleranci k mrazu dosaženo u kukuřice, tedy plodiny původně tropické. MAP kináza kinázy kinázy tabáku (MAPKKK, gen *NPK1*), která je na začátku kaskády proteinových kináz, byla transformována pomocí *A. tumefaciens* do kukuřice. *NPK1* aktivuje signální cestu oxidativního stresu (Shou *et al.* 2004).

V nedávném experiment bylo zjištěno, že overexprese genu pro CDPK *CPK3* v *Arabidopsis*, transformované pomocí transformace chloroplastů, vede ke zvýšené rezistenci k salinitě u protoplastů, a že CPK3 a dvě MAPK nejvíce spojené se stresem vyvolaným salinitou (MPK4 a MPK6) jsou úzce propojené při stresové odpovědi (Mehlmer *et al.* 2010).

Rostlinná buňka reguluje koncentraci Na^+ iontů a tím svoji osmotickou rovnováhu v buňkách pomocí Na^+/H^+ antiportu odčerpáváním Na^+ iontů do vakuoly nebo ven z buňky (Buchanan *et al.* 2000). SOS1 (salt overly sensitive 1) je protein plazmatické membrány zajišťující Na^+/H^+ antiport a je ovlivňován signální cestou SOS. Byla provedena transformace pomocí *A. tumefaciens* a po porovnání výsledků šesti různých transformantů byla zjištěna tolerance k salinitě především v konstruktech vyjadřujících geny *sos1* nebo *sos3* (Yang *et al.* 2009).

Rostliny mají stejné mechanizmy regulace stresových odpovědí na sucho a na nízké teploty, v obou případech rostliny odpovídají stejnými signály, např. pomocí ABA nebo DRE. Na DRE se váže *trans*-faktror CBF (C-repeat-binding factor, neboli DREBP - dehydration-responsive element binding protein) Liu *et al.* (1998) transformovali *Arabidopsis* pomocí *A. tumefaciens* vnesením genů *DREB1A* a *DREB2A* kódující *trans*-faktory specificky interagující s DRE sekvencí genu, jehož funkce je spojená s odpovědí na dehydrataci, vysoké zasolení a nízkou teplotou. Na tabáku a *Arabidopsis* ukázali, že DRE sekvence je nezbytná pro transkripci tohoto genu (Liu *et al.* 1998). Konstitutivní exprese genu *CBF1* z *Arabidopsis* v rajčeti měla za následek zvýšenou toleranci rajčete k mrazu (Hsieh *et al.* 2002).

Přemíra exprese genu *LEA* (late embryogenesis abundant) se již dlouho používá k indukci tolerance k suchu, např. transformace genu z ječmene pro HVA1 protein, patřící do skupiny LEA3, do rýže, kde způsobovala tolerance k suchu i k salinitě (Xu *et al.* 1996).

Dále bylo zjištěno např. že zvýšená exprese anexínu v transformantech *Arabidopsis* pomocí *A. tumefaciens* zajistila jejich zvýšenou rezistenci vůči suchu (Konopka-Postupolska *et al.* 2009).

3.5.2. Plodiny s vylepšenými vlastnostmi pro konzumenty

3.5.2.1. Zlatá rýže

Rýže je nejdůležitější hospodářská plodina na světě, zajišťuje obživu 3,8 miliónu lidí a v některých regionech tvoří hlavní složku potravy. V těchto regionech je velkým problémem nedostatek vitamínu A ve stravě, způsobující kromě jiného slepotu u dětí. Jelikož je β-karoten (provitamín A) barvivo účastnící se fotosyntézy, je produkován v listech, ne však v endospermu. Nezralá rýže v endospermu syntetizuje geranylgeranyldifosfát (GGPP), jeden z meziproduktů biosyntézy β-karotenu (Bukhardt *et al.* 1997). Aby byla rýže schopna dokončit jeho biosyntézu, je třeba dodat tři enzymy, a proto byly do genomu rýže pomocí *A. tumefaciens* vneseny tři geny: *psy* z narcisu pro fytoen desaturázu, gen *crt1* z bakterie pro ζ-karoten desaturázu a gen *lyc* z narcisu pro lykopen-β-cyklázu (Ye *et al.* 2000). Díky β-karotenu získala zrníčka rýže zlatavou barvu a tím si vysloužila daný název.

V roce 2005 byla také pomocí *A .tumefaciens* vytvořena Golden Rice 2, která má jiné zdroje genů, a hlavně několikanásobně vyšší obsah karotenoidů (zbarvena je žlutooranžově). Obsahuje gen *psy* pro fytoen syntázu z kukuřice a gen *crt1* pro karoten desaturázu z Golden Rice 1 (Paine et al. 2005).

3.5.2.2. Plodiny pěstované pro produkci olejů

Vícenenanasycené mastné kyseliny, omega-3 a omega-6 mastné kyseliny jsou prospěšné pro lidské zdraví, například jako prevence kardiovaskulárních onemocnění. Bylo dosaženo produkce vyššího množství nasycených kyselin v olejích sóji a řepky olejky. Do genomu tabáku a lnu setého byla vnesena cDNA kódující acyl-desaturázy a elongázy mastných kyselin z různých organizmů pod promotorem specifickým pro semena. Semena transformovaných rostlin měla vysoký obsah vyšších mastných kyselin (MK), hlavně kyseliny arachidonové (ω-6 MK) a eikosapentaenové (ω-3 MK), které patří mezi nutričně nejdůležitější vyšší mastné kyseliny (Abbadi *et al.* 2004).

Také je výhodné zvýšení množství kyseliny stearové protože při vysokém obsahu této kyseliny není potřeba oleje pro další použití v potravinovém průmyslu upravovat hydrogenací, která zvyšuje podíl nasycených MK. (Thelen & Ohlrogge 2002). Tato aplikace se týká především řepky (Knutzon *et al.* 1992).

3.5.3. Plodiny s výhodnými vlastnostmi pro distributory

3.5.3.1. Rajče FlavrSavr

Vůbec prvním GM rostlinným produktem na trhu bylo rajče „Flavr Savr“ s prodlouženou dobou trvanlivosti. Do jeho geonomu byl pomocí T-DNA vnesen gen pro polygalakturonázu (PG) v antisence orientaci. PG je enzym štěpící řetězce kyseliny polygalakturonové, jejíž jednotky tvoří pektin lamely buněčné stěny, která drží sousední buňky pevně u sebe. Antisence RNA vtváří s mRNA genu pro PG dvouvláknovou RNA a dochází k RNA interferenci a zabránění tvorbě PG. Tento přístup se poté použil i na další druhy ovoce, například mango, broskev a hrušku (Slater *et al.* 2008).

3.5.4. Produkce proteinů pro využití ve výzkumu

Produkce proteinů v transgenních rostlinách, která má nahradit dosud používané systémy má mnoho výhod, např. nízké náklady, snadnější kultivace (nevyžadují speciální média ani toxické látky) a zpracování, absence rizika kontaminace viry a priony. (Joshi & Lopez 2005; Stoger *et al.* 2005).

Avidin, glykoprotein nacházející se přirozeně ve vejcích ptáků, plazů a obojživelníků, se používá jako antimikrobiální agens a také k vizualizaci různých biochemických interakcí, protože má schopnost vázat se na biotin (Hiller *et al.* 1987). Avidin z kuřecích vajec byl produkován kukuřicí transformovanou balistickou metodou (Hood *et al.* 1997).

Kukuřice byla také použita pro transformaci genem pro β-glukuronidázu z bakterie *Escherichia coli*. Witcher (1998) jako první docílil exprese na takové úrovni, že mohla být metoda použita pro komerční účely.

β-glukuronidáza tedy spolu s avidinem patří k produktům, které jsou již řadu let na trhu (Stoger *et al.* 2005).

3.5.5. Produkce proteinů pro využití v lékařství

3.5.5.1. Vakcíny

Většina organizmů poprvé vnikne do těla přes sliznici, což vzhledem k velikosti jejího povrchu a neustálým kontaktem s vnějším prostředím není překvapivé. Slizniční imunizace je založena na přijmutí antigenu shluky specializovaných buněk na sliznici dýchacího či zažívacího ústrojí. Imunizaci můžeme navodit dvěma způsoby. Prvním je podání vakcíny obsahující oslabené či mrtvé patogeny nebo jejich části, při níž si tělo samo vytvoří protilátky většinou bez příznaků onemocnění. Nazývá se proto aktivní imunizace. Druhým je podání hotových protilátek, neboli pasivní imunizace. Imunizaci můžeme provádět buď injekčně nebo orálně (Hořejší & Bartůňková 2009).

Orální podání vakcíny je snadnější než injekční podání, což je výhodné zejména u podání dětem (Kim & Yang 2010). Při orálním podání vakcíny imunizace nastává na Peyerových plátech v tenkém střevě. Peyerovy pláty pomocí antigenů senzibilizují B-lymfocyty, a ty se přemění jednak na plazmatické buňky uvolňující specifické protilátky, a jednak na paměťové buňky, které zajišťují rozeznání a likvidaci antigenu v případě dalšího kontaktu, neboli SIgA, tedy zajišťují samotnou imunizaci (Iijima *et al.* 2001)

Výroba vakcín pomocí transgenních rostlin je způsob velice ekonomický, což je výhodné pro plošné očkování v zemích třetího světa (Ma *et al.* 2005) I přes obrovské výhody někteří autoři vidí výrobu jedlých vakcín nerealizovatelnou, kvůli mnoha praktickým a etickým problémům. Například potřeba přístě kontrolovat množství vakcíny v rostlině by znemožnila produkovat vakcínu přímo na místě jejího použití. Při podání většího množství vakcíny by mohlo dojít k tolerance imunitním systémem, a to by přirozeně negovalo celou snahu o vakcinaci (Rybicki 2010).

Produkce vakcín je možná v listech, plodech, hlízách nebo semenech (Rybicki 2010). Někteří autoři uvádějí produkci v listech jako pomalou a neúčinnou, a naopak produkci v semenech jako zvláště výhodnou (Frigerio *et al.* 2000), neboť zde je protein akumulován v malém objemu a ve stabilních podmínkách, a také je vhodná pro extrakci a následné zpracování. Také je v semenech oproti listům velmi nízká hladina fenolických látek a alkaloidů, které mohou negativně ovlivnit proces dalšího zpracování (Stoger *et al.* 2005).

Z plodů jsou velmi využívaná rajčata, např pomocí *A. tumefaciens* bylo rajče transformováno pro produkci antigenů glykoproteidu G viru vztekliny (McGavey *et al.* 1995),

nebo pro produkci obalového proteinu Env a GAG epitopů viru HIV-1 spolu s povrchovými antigeny viru žloutenky typu B, následně imunizující myši (Shchelkunov *et al.* 2006). Úspěchu také bylo dosaženo u vakcíny proti žloutence typu E (Ma *et al.* 2003). Obalové proteiny Norovirusu (původně Norwalkský virus, způsobující průjmová onemocnění) byly v rajčeti také úspěšně produkovány a imunizovaly myši i lidi (Zhang *et al.* 2006). Pro slizniční imunizaci myši proti Noroviru byla použita také brambora (Mason *et al.* 1995).

Produkce vakcín v listech byla provedena u špenátu, kde antigeny viry vztekliny imunizovala myši (Modelska *et al.* 1998), a myši také imunizovat salát produkující hemaglutinin viru spalniček (Webster *et al.* 2006).

Virům podobné částice viru chřipky H1N1 produkované tabákem imunizovaly myši. Při podání letální dávky viru vyvolalo v myších obrannou imunitní odpověď (D´Aoust *et al.* 2008).

Bylo také dosaženo úspěchu v léčbě alergií. V klinické studii byla vyvinuta alergen-specifická imunoterapie pro léčbu březové alergie. Vakcinovalo se geneticky modifikovanými hypoalergenními deriváty „Bet v 1“, hlavního alergenu břízy. U vakcinovaných jedinců se zmírnily příznaky alergie, a především klesla hladina IgE protilátek (Niederberger *et al.* 2004). Nedávný experiment zaznamenal další úspěch na tomto poli. Bylo zjištěno, že orálním podání GM lupiny úzkolisté produkující potenciální alergen (albumin vyskytující se v semenech slunečnice) lze potlačit vznik alergického astmatu u myší (Smart *et al.* 2010).

Momentálně žádné jedlé vakcíny produkované rostlinami na trhu nejsou, všechny jsou ve stádiu klinických studií (Rybicki 2010).

Pro produkci vakcín v semenech jsou velmi populární kukuřice a rýže, neboť dosahují velké sklizně a technologie zpracování semen je velice rozvinutá (Rybicki 2010). Navíc výhoda spočívá především v samoopylení, které minimalizuje riziko zkřížení s netransgenními plodinami. Jako recentní příklad uvádím vakcínu obsahující podjednotky A i B toxinu cholery, která indukovala sekreci protilátek toxinu B, ne však protilátek toxinu B (Zuki *et al.* 2009).

3.5.5.2. Protilátky

Protilátky jsou bioaktivní molekuly s využitím především ve výzkumu a k získávání rezistence k patogenům (Stoger *et al.* 2002). Transformací rostlin pro produkci protilátek (imunoglobulinů, většina je typu A - IgA a sekreční IgA - SIgA) bylo učiněno několik desítek.

Byla vyvinuta monoklonální protilátka („Guy´s 13“), která zabraňuje kolonizaci ústní dutiny lidí mikroorganizmem *Streptococcus mutant* způsobujícím zubní kazy (Drake *et al.* 2002).

Do genomu kukuřice byl balistickou metodou vnesen gen *2G12* pro tvorbu protilátky viru HIV. Protein 2G12 se váže se na obalový protein viru Env a brání mu tak navázat se na receptory potenciální hostitelské buňky. Experiment je ve fázi klinických studií (Ramesar *et al.* 2008).

3.5.5.3. Další proteiny a enzymy

Na trhu je dostupný lidský vnitřní faktor, který zajišťuje vstřebávání vitamínu B12. Úsek cDNA kódující lidský vnitřní faktor byl pomocí *A. tumefaciens* vnesen do genomu *Arabidopsis* (Fedosov *et al.* 2003).

Rehydratační přípravkev podávaný dětem s akutním průjmem v Peru obsahoval lidský laktoferrin a lyzozym, každý připravený z jiné odrůdy transgenní rýže (Zavaleta *et al.* 2007). Lyzozym je baktericidní, kromě mateřského mléka je obsažen v slzách a slinách (Huang *et al.* 2002). Lactoferrin je obsažen v lidském mléce a kromě jiného má obrannou funkci vůči patogenům, podílí se na absorpci železa a reguluje imunitní systém (Nanadi *et al.* 2002). V obou případech byla transgenní rýže připravena balistickou metodou a míra exprese proteinů byla vysoká (Huang *et al.* 2002; Nanadi *et al.* 2002).

3.5.6. Plodiny s výhodnými vlastnostmi pro technické účely

V červenci letošního roku (2010) bylo schváleno pěstování druhé GM plodiny na území EU, odrůdy bramboru Amflora, pro technické účely a pro použití vedlejších škrobových produktů této odrůdy jako krmivo (**http://www.basf.com/group/pressrelease/P-10-179**). Škrob v hlízách Amflory obsahuje z 98% amylopektin. Bylo toho dosaženo vnesením genu pro enzym GBSS (Granule Bound Starch Synthase) v antisence orientaci pomocí *A. tumefaciens* (Wandelt 2007).

3.5.7. Fytoremediace

Fytoremediace je proces, při kterém jsou rostliny používány k hromadění a odstranění látek znečišťujících prostředí nebo ke zmenšení jejich množství (Cunningham *et al.* 1995). Pro odstranění radioaktivních látek a těžkých kovů jsou využívány nadzemníí časti rostlin, které se odstraní a následně recyklují nebo uloží (Meagher 2000).

Již v roce 1989 byl úspěšně transformován tabák pomocí *A. tumefaciens* vložením genu pro chelatační protein metallothionein. Transformované rostliny byly více tolerantní ke kadmiu než netransformované (Maiti *et al.* 1989).

Většina látek znečišťujících životní prostředí jsou však pesticidy, ftaláty, alkylfenoly, polychlorované bifenyly, bisfenol A, dioxiny a steroidní hormony (Drake et al. 2002).V 80.letech 20.století se na našem území ve velkém množství používaly polychlorované bifenyly (PCB) pro různé účely v průmyslu Některé PCB jsou vysoce toxické a přetrvávají v životním prostředí. Rostliny jsou schopny přeměnit PCB na mono- a dihydroxylované chlór deriváty (Rezek *et al.* 2007). Byl transformován například tabák bakteriálním genem *bphC* pro enzym dihydroxybifenyldioxygenázu, která tyto deriváty štěpí (Nováková *et al.* 2008).

3.6. Rizika

3.6.1. Pro životní prostředí

3.6.1.1. Kontaminace rostlin netransgenních

Výměna genů mezi transgenní a netransgenní populací příbuzných rostlin existuje. Pravděpodobnost, s jakou se transgen ustálí v netransgenní populaci, závisí na míře toku genetické informace a na biologické zdatnosti příslušného transgenu v populaci příbuzných rostlin (Lee & Natesan 2006).

V případě transgenních plodin, které nemají v místě pěstování volně žijící příbuzné druhy (např. bavlna, kukuřice a sója v USA), není třeba se kontaminace obávat. V případě, že tomu tak je, je třeba riziko zhodnotit individuálně (Lee & Natesan 2006).

Jeden ze způsobů, jak riziku kontaminace předejít, je transformace chloroplastů (viz kap.3.3.4., Lee & Natesan 2006). Další způsob spočívá v těsném spojení transgenu s výhodnou vlastností s dalším transgenem, který snižuje biologickou zdatnost transformovaného jedince. Tím se zajistí, že transgenní a netransgenní populace budou mít stejnou hodnotu biologické zdatnosti, a minimalizuje se riziko ustálení transgenu v netransgenní populaci (Gressel 1999). Tento způsob byl aplikován a analyzován např. při transformaci tabáku spojením genu pro zmenšený vzrůst s genem pro rezistenci k herbicidu (Al-Ahmad *et al.* 2004).

Matematické modely a empirické experimenty ukázaly, že používaná opatření mají potenciál efektivně zabránit transgenům přenést se do volně rostoucích odrůd a ustálit se v populacích, které nejsou vzájemně reprodukčně izolované, je však třeba zajímat se o problematiku detailněji (Lee & Natesan 2006).

3.6.1.2. Vznik agresivních plevelů rezistentních k herbicidům

Rezistence vůči herbicidům vznikala vždy v klasickém zemědělství, vzniká tedy i při pěstování herbicid rezistentních plodin, není pro ně však nijak specifická. Můžeme se ale ptát, zda velkoplošné pěstování herbicid tolerantních plodin neurychlí či jinak nezmění vznik rezistencí u plevelů. Rezistence může vzniknout přirozeně mutací a následným selekčním tlakem nebo opylením příbuzné rostliny pylem transgenní rostliny (Lee & Natesan 2006).

Herbicid rezistentní kukuřice, sója a bavlna nemají ve státech, ve kterých se jejich geneticky modifikované odrůdy pěstují (USA a Kanada), žádné divoce rostoucí příbuzné druhy, takže k vertikálnímu přenosu genů pro rezistenci k herbicidům u nich dojít nemůže. Pšenice, Brukev řepka a Cukrová řepa mají příbuzné druhy v okolí, ale pouze Brukev řepka a Cukrová řepa jsou alogamické. Experimenty prokázaly, že v jejich případě k přenosu rezistence dochází, ale zřídka. Studie Řepky olejky odhalila, že její pyl může cestovat na o hodně větší vzdálenosti než je uvedeno zákonem, avšak že výměna genů mezi transgení a netransgení populací je minimální (Lee & Natesan 2006).

Spontánní vznik rezistence ke glyfosátu nebyl u plevelů pozorován, kromě svízele (Baerson *et al.* 2002), plevele, u kterého se schopnost přirozeně získávat rezistenci k herbicidům ukázala jako závažný problém (Marshall *et al.* 1994).

3.6.1.3. Narušení potravních řetězců

Toto riziko se týká rostlin rezistentních ke hmyzím škůdcům. Potravní řetězec může být narušen eliminací či redukcí populace rostlinného škůdce, na kterém je závislý jeho predátor a může tak dojít k řetězové reakci v potravním řetězci.

Teoreticky může také dojít k negativnímu ovlivnění predátora rostlinného škůdce, ke kterému je rostlina rezistentní. Byl studován možný vliv Cry toxinu na Zlatoočku obecnou (*Chrysoperla carnea*). Larvy Zlatoočky byly krmeny larvami Černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*), kterým byl s potravou podávám Cry toxin. V paralelním experimentu byl Cry toxin podáván s potravou přímo Zlatoočce. Nebyl pozorován žádný negativní účinek na biologickou zdatnost Zlatoočky. Toxin byl nalezen v trávicí trubici Černopásky, avšak ne u Zlatoočky. Z toho vyplývá, že Zlatoočku, jako necílový organizmus, Bt-toxin neovlivňuje ani při pozření přímo, ani při pozření toxinem zabité kořisti (Rodrigo-Simón 2006).

V roce 1999 experiment Losey *et al.* prokázal, že krmení larev Monarcha stěhovavého pylem z Bt kukuřice má na larvy výrazně škodlivý účinek a tento výsledek byl často používán odpůrci genetických modifikací. Následné vyčerpávající důkazy o neškodnosti GM plodin jimi byly ignorovány (Sehnal 2009).

Nedávný experiment na Bt bavlníku, kukuřici a bramboře zkoumal rozdíly v populacích hmyzích škůdců, herbivorů, parazitů a parazitoidů mezi poli s Bt plodinami a poli s netransgenními plodinami a neshledal žádný, ani negativní, ani pozitivní efekt (Wolfenbarger *et al.* 2008).

3.6.1.4. Vznik rezistentních škůdců

Vzniku rezistentních škůdců má zamezit strategie refugií. Pole s Bt plodinou je ohraničeno pásy netransgenní plodiny, buď stejného druhu jako BT plodina, nebo jiného druhu, kterým se cílový škůdce živí. Bt plodina produkuje velké množství Bt proteinu, což zajišťuje, že pouze dominantní homozygoti pro rezistenci dokáží přežít na poli s Bt plodinou, a při rozmnožení se škůdci z pásů s netransgenní plodinou se tato dominantní homozygotní kombinaci rozpadne (Slater *et al.* 2008).

3.6.1.5. Horizontální přenos genů

Odpůrci GMO rozšiřují obavy z přenosu transgenu zajišťujícího rezistenci k antibiotiku z transgenních rostlin na bakterie. Současné poznatky ukazují, že obecně přenos genu z rostliny na bakterii je vysoce nepravděpodobný (**EFSA 2007**) a navíc geny pro rezistenci rostlin k antibiotikům jsou získávány ze samotných bakterií, takže bakterie by nezískaly nic nového, proto je tato obava neopodstatněná.

3.6.2. Pro lidské zdraví

Pro zjištění případné alergenicity a toxicity mohou být proteiny, jejichž geny jsou vnášeny do rostlinného genomu porovnávány na základě sekvence aminokyselin s již známými proteinovými toxiny a alergeny. Vlastnosti těchto známých proteinů mohou posloužit k posouzení případné toxicity nově vzniklého proteinu. Také se může testovat štěpitelnost nově vzniklých proteinů proteolytickými enzymy *in vitro*, která nám prozradí pravděpodobnost, s jakou tento protein projde trávicím ústrojím v nezměněné formě. Také se mohou provádět testy toxicity krmením laboratorních zvířat čistým proteinem. Dále lze alergenicitu testovat přímo za použití séra z citlivých osob (Kletter & Kok 2010).

3.6.2.1. Alergie

Alergie na potravu vyvolávají proteiny běžně se vyskytující v potravě, je proto nutné posoudit případnou alergenicitu zejména u proteinů pocházejících z organizmů s alergenním potenciálem a nově vytvořených proteinů (Ladics & Selgrade 2009).

Alergii vyvolané odpovědí IS předchází tzv. senzibilizace: při prvním či opakovaném kontaktu s alergenem dojde k nárůstu množství imunoglobulinů E (IgE). Při samotné alergii se vytvořené IgE váží na povrch tkáňových žírných buněk a krevních bazofilů, z nichž se následně uvolní mediátory vyvolávající alergii, hlavně histamin, které způsobují samotné příznaky alergie (Helm & Burks 2000; Ladics & Selgrade 2009).

Jelikož dochází k přenosu genů mezi druhy, může dojít k přenesení genu pro alergenický protein (Ladics & Selgrade 2009).

4. Závěr a diskuze

Jako s každým novým vědeckým pokrokem, i s GI přichází jak příznivci, tak odpůrci. Mezi odpůrce se řadí ekologické organizace jako Greenpeace nebo Friends of the Earth. Ty vidí neslučitelnost mezi ekologickým chováním a genetickými modifikacemi. Většinou se protesty týkají plodin, které se mohou dostat do potravního řetězce, tedy buď sloužit jako krmiva, nebo přímo jako potravina pro lidi. Neochota přijmout GM potraviny samozřejmě může vycházet z přesvědčení, a v takovém případě má mít každý na výběr, zda si zvolí potraviny GM nebo nemodifikované. Může ale však také vycházet z nevědomosti a z ochoty nechat se zmanipulovat a slepě následovat tyto organizace. Je proto důležité snažit se být objektivní a kritičtí.

Existuje celá řada opatření, které mají zajistit bezpečnost pěstování a nakládání s GM rostlinami. Například ustanovení ke Codex Alimentarius z roku 2003, opatření, které mají zajistit ochranu životního prostředí, nebo Kartegenský protokol z téhož roku, který má zajistit ochranu a bezpečnost při přepravování, užívání a nakládání s GM organizmy na celosvětové úrovni. Biologickou bezpečností se rozumí rámec opatření na různé úrovni zahrnující politické a strategické dokumenty, právní normy, administrativní postupy při schvalování GMO, včetně odhadů rizik, a systém kontroly využívání GMO neopomíjející informování veřejnosti a vzdělávání. Protokol je vzhledem k nedostatečným zkušenostem s GMO a chybějícím vědeckým důkazům založen na „principu předběžné opatrnosti“, který vyžaduje analýzy a odhady rizik, posuzování vlivů na životní prostředí. (MŽP 2008)

EU věnuje velkou pozornost bezpečnosti genetických modifikací, zejména pokud se týkají potravin a krmiv zcela nebo částečně vyrobených z GMO. Nejčastěji se jedná o sóju, kukuřici, řepku či bavlníková semena.

Tato práce měla představit možné využití pěstování GM rostlin, jeho výhody a případná rizika. Možností využití je mnoho, proto v některých případech z důvodu omezeného obsahu této práce uvádím pouze příklady. Výhody ani rizika pěstování GM rostlin nelze paušalizovat, nelze je ani předem přesně odhadnout. Existují obecná i konkrétní rizika, která jsem popsala, avšak je třeba si uvědomit, že se mohou objevit důsledky, které jsme nečekali. Jelikož existuje velká různorodost geneticky modifikovaných rostlin a systémů, do kterých mají být zasazeny, je potřeba vyhodnocovat potenciální rizika individuálně u každého případu zvlášť, a určitě je na místě objektivnost a opatrnost.

5. Seznam použité literatury

Abbadi A; Domergue F; Bauer J, Napies JA; Welti R; Zähringer U; Cirpus P; Heinz E. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds : Constraints on their accumulation, *Plant Cell*, 2004, 16, 2734-2748.

Abel PP; Nelson RS; De B; Hoffmann N; Rogers SG; Fraley RT; Beachy RN. Delay of desease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic-virus coat protein gene, *Science*, 1986, 232, 738-743, Ex: Beachy 1986: Beachy RN. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8, 215-220.

Akhond MAY; Machray GC; Biotech crops. Technologies, achievements and prospects. *Euphytica*, 2009, 166, 47-59.

Al-Ahmad H; Galili S; Gresses J. Tandem constructs to mitigate transgene persistence : tobacco as a model. *Molecular Ecology*, 2004, 13, 697-710.

Arencibia A; Vázquez RI; Prieto D; Téllez P; Carmona ER; Coego A; Hernández L; De la Riva GA; Selman-Housein G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*, 1997, 3, 247-255.

Baerson SR; Rodriguez DJ; Tran M; Feng Y; Biest NA; Dill GM. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, *Plant Physiology*. 2002, 129,1265-1275.

Beachy RN. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8, 215-220.

Berra RK. The story of the Cohen-Boyer patents. *Current Science*, 2009, 96, 760-731.

Bonfim K; Faria JC; Nogueira EOPL; Mendes ÉA; Aragao FJL. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20, 717-726.

Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Broglie R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. 1991, 254, 1194-1197.

Bruinsma M; Kowalchuk GA; van Veen JA. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37, 329-337.

Buchanan BB; Gruissem W; Jones RL. Biochemistry & Molecular biology of plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2000.

Cangelosi GA; Ankenbauer RG; Nester EW. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding-protein and a transmembrame signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990, 87, 6708-6712.

Cary AJ; Che P; Howell SH. Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis* thaliana. *The Plant Journal*. 2002, 32, 867-877.

Chawla H.S. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 2009.

Christie PJ. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus : A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179, 3085-3094.

Clough SJ; Bent AF. Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 1998, 16, 735-743.

Crawford et al. 2000: Crawford NM; Kahn ML, Leustek T, Long SR. Nitrogen and Sulfur. Citováno z: Buchanan; Gruissem; Jones. Biochemistry & Molecular biology of plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2000, 786-849.

Cunningham SD; Berti WR; Huang JW. Phytoremediation of contamined soils. *Trends in Biotechnology*, 1995, 13, 393-397.

D´Aoust MA; Lavoie PO; Couture MMJ; Trépanier S; Guay JM; Dargis M; Mongrand S; Landry N; Ward BJ; Vézina LP. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6, 930-940.

De Maagd RA; Bravo A; Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 2001, 17, 193-199.

Doerner P. Cell Division Regulation. 2000. Citováno z: Buchanan; Gruissem; Jones, eds. Biochemistry & Molecular biology of plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2000, 528-534.

Drake PMV; Chargelegue D; Vine ND; Van Dolleweerd CJ; Obregon P; Ma JKC. Transgenic plants expressing antibodies : a model for phytoremediation. *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2002, 16, 1855-1860.

EFSA 2007: Statement of the scientific panel on genetically modified organisms on the safe use of the *npt*II antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Statement/gmo_statement_nptII_.pdf

Ellis RJ. Further similarities between chloroplasts and bacterial ribosomes. *Proceedings of the Biochemical Society*, 1970, 91, 329.

Finer JJ. Plant Nuclear Transformation. 2010. Citováno z: Kempkem, Jung, eds. Genetic Modification of Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 3-21.

Frigerio L; Vine ND; Pedrazzini E; Hein MB; Wang F; Ma JKC; Vitale A. Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobuline in plants. *Plant Physiology*, 2000, 123, 1483-1494.

Gaj MD. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 2004, 43, 27-47.

Gan SS; Amasino RM. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 1995, 270, 1986-1988.

Gilbertson L. Cre-*lox* recombination : Cre-ative tools for plant biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21, 550-555.

Goldstein DA; Tinland B; Gilbertson LA; Staub JM; Bannon GA; Goodman RE; McCoy RL; Silvanovich A. Human safety and genetically modified plants : a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99, 7-23.

Gressel J. Tandem constructs : preventing the rise of superweeds. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17, 361-366.

Hammond-Kosack K; Jones JDG. 2000. Responses to Plant Pathogens. Citováno z: Buchanan BB; Gruissem W; Jones RL; eds. Biochemistry & Molecular biology of plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2000, 1102-1130.

Hammond-Kosack K; Parker JE. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspective for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14, 177-193.

Hansen G; Das A; Chilton MD. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Plant Biology*, 91, 7603-7607.

Helm RM; Burks AW. Mechanisms of food allergy. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 12, 647-653.

Hiller Y; Gershoni JM; Bayer EA; Wilchek M. Biotin binding to avidin – oligosaccharide side-chain nor required for ligand association. *The Biochemical Journal*, 1987, 248,167-171.

Hofmann C; Vanderburggen H; Hofte H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* sigma-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding-sites in the brush-border membrane of target insect midgets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988, 85, 7844-7848.

Hood EE; Witcher DR; Maddock S; Meyer T; Baszczynski C; Bailey M; Flynn P; Register J; Marshall L; Bond D; Kulisek E; Kusnadi A; Evangelista R; Nikolov Z; Wooge C; Mehigh RJ; Hernan R; Kappel WK; Ritland D; Li CP; Howard JA. Commercial production of avidin from transgenic maize : characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*. 1997, 3, 291-306.

Hořejší V, Bartůňková J. Základy imunologie, Triton, Praha, 2009.

http://www.basf.com/group/pressrelease/P-10-179

http://www.gmo-compass.org/eng/database/plants/

Huang J; Nandi S; Wu L; Yalda D; Bartley G; Rodriguez R; Lonnerdal B; Huang N. Expression of natural antimicrobial human lysozyme in rice grains. *Molecular Breeding*, 2002, 10, 83-94.

Iijima H; Takahashi I; Kiyono H. Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 2001, 11, 117-133.

Ikeda M; Kamada H. Comparison of molecular mechanisms of somatic and zygotic embryogenesis, 2005. Citováno z: Mujib, Šamaj, eds. Somatic embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

Jin SG; Prusti RK; Roitsch T; Ankenbauer RG; Nestler EW; Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein – essential role in biological activity of VirG. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172, 4945-4950.

Jin SG; Roitsch T; Christie PJ; Nestler EW. The regulatory VirG protein specifically binds to a *cis*-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of Agrobacterium tumefaciens virulence genes. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172, 531-537.

Jorsebo M; Donaldson I; Kreiberg J; Petersen SG; Brunstedt J; Okkels FT. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding*, 1998, 4, 111-117.

Joshi L; Lopez LC. Bioprospecting in plants for engineered proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8, 223-226.

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D, Ricci P. Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, 1999, 11, 223-235.

Kempken F; Jung Ch. Genetic Modification of Plants – Agriculture, Horticulture and Forestry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

Kim TG, Yang MS. Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15, 61-65

Klee HJ; White FF; Iyer VN; Gordon MP; Nester EW. Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of bacteriology*, 1983, 153, 878-883.

Kletter GA; Kok EJ. Safety assessment of biotechnology used in animal production, including genetically modified (GM) feed and GM animals – a rewiew. *Animal Science Papers and Reports*, 2010, 28, 105-114.

Konopka-Postupolska D; Clark G; Goch G; Debski J; Floras K; Cantero A; Fijolek B; Roux S; Hennig J. The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2009, 150, 1394-1410.

Kraus J. 2010, Concepts of marker genes for plants. Citováno z: Kempkem; Jung, eds. Genetic Modification of Plants, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2010, 39-54.

Kung Y-J; Yu T-A; Huang Ch-H; Wang H-Ch; Wang S-L; Yeh S-D. Generation of hermaphrodite transgenic papaya lines with virus resistance via transformation os somatic embryos derived from adventitious roots of in vitro shoots. *Transgenic Research*, 2010, 19, 621-635.

Ladics GS; Selgrade MK. Identidying foor proteins with allergenic potential: Evolution of approaches to safety assessment and research to provide additional tools. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 54, S2-S6.

Lange M; Vincze E; Møller MG; Holm PB; Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 25, 815-820.

Lee D; Natesan E. Evaluating genetic containment strategie for transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24, 109-114.

Liao Q; Zhu L; Du Z; Zeng R; Feng J; Chen J. Virus-resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic-virus satellite. *Nature*. 1987, 328, 799-802.

Losey JE; Rayor LS; Carter ME. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*. 1999, 399, 214.

Lutz KA; Knapp JE; Maliga P. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistence. *Plant Physiology*, 2001, 125, 1585-1590.

Ma JKC; Drake PMW; Chargelegue D; Obregon P; Prada A. Molecular farming for new drugs and vaccines - Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *European Molecular Biology Organization Reports*. 2005, 6, 593-599.

Ma Y; Lin SQ; Gao Y; Li M; Luo WX; Zhang J; Xia NS. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World Journal of Gastroenterology*. 2003, 9, 2211-2215.

Maiti IB; Wagner GJ; Yeargan R; Hunt AG. Inheritance and expression of the mouse metallothiomein gene in Tobacco – impact on Cd tolerance and tissue Cd distribution in seedings. *Plant Physiology*. 1989, 91, 1020-1024.

Malkin R; Niyogi K. Photosynthesis. 2000. Citováno z: Buchanan; Gruissem; Jones, eds. Biochemistry & Molecular biology of plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2000, 568-628.

Marshall G; Kirkwood RC; Leach GE. Comparative studies on graminicide-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica*. *Weed Research*, 1994, 34, 177-185.

Mason HS; Ball JM; Shi JJ; Jiang X; Estes MK; Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93, 5335-534.

McGarvey PB; Hammond J; Dienelt MM; Hooper DG; Fu ZF; Dietzschold B; Koprowski H; Michaels FH. Expression of the rabies virus glycoprotein in tomatoes. *Biotechnology*, 1995, 13, 1484-1487.

Meagher RB. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3, 153-162.

Modelska A; Dietzschold B; Sleysh N; Fu ZF; Steplewski K; Hooper C; Koprowski H; Yusibov V. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95, 2481-2485.

MZ, Dosavadní zkušenosti s pěstováním geneticky modifikované Bt kukuřice v ČR 2005-2009, Ministerstvo Zemědělství, 2009.

MŽP, Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika, příručka, Ministerstvo Životního Prostředí, 2008.

Nandi S; Suzuki YA; Huang J; Yalda D; Pham P; Wu L; Bartley G; Huang N; Lonnerdal B. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science*. 2002, 163, 713-722.

Nejidat A; Beachy RN. Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other Tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1990, 3, 247-251.

Nováková M; Macková M; Chrastilová Z; Viktorová J; Szekeres M; Demnerová K; Macek T. Cloning the bacterial *bphC* gene Into *Nicotiana tabacum* to improve the efficiency of PCB-phytoremediation. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102, 29-37.

Oey M; Lohse M; Kreikemeyer B; Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant Journal*, 2009, 57, 436–445.

Pang SZ; Jan FJ; Tricoli DM; Russell PF; Carney KJ; Hu JS; Fuchs M; Quemada HD; Gonsalves D. Resistance to squash mosaic comovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. *Molecular Breeding*, 2000, 6, 87-93.

Pray CE; Huang JK; Hu RF, Rozelle S. Five years of Bt cotton in China - the benefits continue. *The Plant Journal*, 2002, 31, 423-430.

Quirasco M; Schoel B; Chhalliyil P; Fagan J; Gálvez A. Real-time and conventional PCR detection of Liberty Link (R) rice varieties and transgenic soy in rice sampled in the Mexican and American retail markets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392, 395-404.

Radhakrishnan P; Srivastava V. Utility of the FLP-*FRT* recombination system for genetic manipulation of rice. *Plant Cell Reports*, 2005, 23, 10-721-726.

Ramessar K; Rademacher T; Sack M; Stadlmann J; Platis D; Labrou N; Altmann F; Ma J; Stoger E; Capell T; Christou P. Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105, 3727-3732.

Rezek J; Macek T; Mackova M; Triska J. Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade *Solanum nigrum* SNC-90. *Chemosphere*. 2007, 69, 1221-1227.

Rivero RM; Kojima M; Gepstein A; Sakakibara H; Mittler R; Gepstein S; Blumwald E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104, 19631-19636.

Rodrigo-Simón A; de Maagd RA; Avilla C; Bakker PL; Molthoff J; Gonzáles-Zamora JE; Ferré J. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea* : a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 1595-1603.

Ruf S; Hermann M; Berger IJ; Carrer H; Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 2001, 19, 870-875.

Rybicki EP. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8, 620-637.

Scheller J; Conrad U. Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8, 188-196.

Schouten HJ; Krens FA & Jacobsen E; Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants, *European Molecular Biology Organization Reports*, 7, 750-753.

Sehnal F. White book – genetically modified crops. Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, 2009.

Shchelkunov SN; Salyaev RK; Pozdnyakov SG; Rekoslavskaya NI; Nesterov AE; Ryzhova TS; Sumtsova VM; Pakova NV; Mishutina UO; Kopytina TV; Hammond RW. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnology Letters*, 2006, 28, 959-967.

Shou H; Bordallo P; Fan JB; Yeakley JM; Bibikova M; Sheen J; Wang K. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101, 3298-3303.

Slater A; Scott NW; Fowler MR. Plant Biotechnology - the genetic manipulation of plants, second edition, Oxford University Press, 2008.

Smart V; Foster PS; Rothenberg ME; Higgins TJV; Hogan SP. A plant-based allergy vaccine suppresses experimental asthma via an IFN-gamma and CD4(+) CD45RB(low) T cell-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 2003, 171, 2116-2126.

Sreekala C; Wu L; Gu K; Wang D; Tien D; Yin Z; Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/*loxP* system. *Plant Cell Reports*, 2005, 24, 86-94.

Stoger E; Ma JK-C; Fischer R; Christou P. Sowing the seeds of success : pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16, 167-173.

Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998, 10, 1391-1406.

V; Horak F; Vrtala S; Spitzauer S; Krauth M-T; Valent P; Reisinger J; Hayek B; Kronqvist M; Gafvelin G; Grönlund H; Purohit A; Suck R; Fiebig H; Cromwell O; Pauli G. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101, 14677-14682.

Van Haute E; Joos H; Maes M; Warren G; Van Montagu M; Schell J. Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pbr322 – a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1983, 2, 411-417.

Vaucheret H; Béclin Ch; Elmayan T; Feuerbach F; Gordon Ch; Morel J-B; Mourrain P; Palauqui J-Ch; Vernhettes S. Transgene-induced gene silencing in plants. *The plant Journal*, 1998, 16, 651-659.

Wandelt C. Implementation of general surveillance for Amflora potato cultivation – data management, *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2007, 1, 70-71.

Wang AS; Evans RA; Altendorf PR; Hanten JA; Doyle MC; Rosichan JL. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. *Plant Cell Reports*. 2000, 19, 654-660.

Webster DE; Smith SD; Pickering RJ; Strugnell RA; Dry IB; Wesselingh. Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine*. 2006, 24, 3538-3544.

Winans SC; Kerstetter RA; Ward JE; Nester EW. A protein required for transcriptional regulation of *Agrobacterium* virulence genes spans the cytoplasmic membrane. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171, 1616-1622.

Witcher DR; Hood EE; Peterson D; Bailey M; Bond D; Kusnadi A; Evangelista R; Nikolov Z; Wooge C; Mehigh R; Kappel W; Register J; Howard JA. Commercial production of beta-glucuronidase (GUS) : a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding*. 1998, 4, 301-312.

Wolfenbarger LR; Naranjo SE; G.Lundgren JG; Bitzer RJ; Watrud LS. Bt crop effects on functional guilds of non-target Arthropods : A meta-analysis. *Public Library of Science*, 2008, 3, 2118.

Wu F. Mycotoxin reduction in Bt corn : Potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research*. 2006, 15, 277-289.

Xu D; Duan X; Wang B; Hong B; Ho THD; Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 1996, 110, 249-257.

Yamashita T; Lida A; Morikawa H. Evidence that more than 90-percent of beta-glucoronidase-expressing cells after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. *Plant Physiology*. 1991, 97, 829-831.

Yang Q; Chen ZZ; Zhou XF; Yin HB; Li X; Xin XF; Hong XH; Zhu JK; Gong Z. Overexpression of *SOS* (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2009, 2, 22-31.

Ye X; AlBabili S; Klöti A; Zhang J; Lucca P; Beyer P; Potrykus I. Engineering the Provitamin A (β-carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm, *Science*, 287, 303-305.

You SJ; Liau CH; Huang HE; Feng TY; Prasad V; Hsiao HH; Lu JC; Chan MT. Sweet pepper ferredoxin-like protein (*pflp*) gene as a novel selection marker for orchid transformation. *Planta*. 2003, 217, 60-65.

Yuki Y; Tokuhuara D; Nochi T; Yasuda H; Mejima M; Kurokawa S; Takahashi Y; Kataoka N; Nakanishi U; Hagiwara Y; Fujihashi K; Takaiwa F; Kiyono H. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine*, 2009, 27, 5982-5988.

Zákon č.78/2004 Sb. o nakládání s GMO a genetickými produkty.

Zavaleta N; Figueroa D; Rivera J; Sánchez J; Alfaro S; Lonnerdal B. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian childern with akute diarrhoea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2007, 40, 258-264.

Zhang J; Hguyen HT; Blum A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50, 291-302.

Zhang X; Buehner NA; Hutson AM; Estes MK; Mason HS. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant biotechnology journal*, 2006, 4, 419-432.

Zhou Q; Liu W; Zhang Y; Liu KK. Action mechanism of acetolactate synthese-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 89, 89-96.

Zupan JR; Zambryski P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant-cell. *Plant Physiology*, 1995, 107, 1041-1047.