
Genetické modifikace rostlin

Genetické modifikace rostlin uskutečňované metodami genového inženýrství jsou definovány jako přímé a cílené zásahy do dědičného materiálu organismů, čímž rozumíme DNA. Jde o speciální oblast molekulární genetiky, jejímž základem je transgenóza, tedy vnášení jednotlivých klonovaných genů do genomu rostlin. Umožňuje rekombinaci DNA také u druhů, které nejsou vůbec příbuzné. V klasickém šlechtění bylo možné pouze křížení rostlin v rámci druhů, popř. rodů, a to již s obtížemi. Transgenní rostliny jsou rostliny, do jejichž genetického základu byl vnesen jeden nebo více genů (obvykle 3 až 5) z nepříbuzných organismů.

Cizí geny začaly být do rostlin začleňovány počátkem 80. let. Roku 1983 byl do rostlinného genomu vnesen gen řídící tvorbu neomycinfosfotransferázy II (*nptII*). Tento enzym podmiňuje rezistenci vůči kanamycinu. Modelovou rostlinou se stal tabák (*Nicotiana tabacum*). První polní pokusy s transgenními rostlinami se uskutečnily r. 1987. Tabák rezistentní k virům byl první geneticky modifikovanou plodinou, která byla povolena pro komerční využití. Firma Calgene (USA) získala r. 1994 jako první souhlas ke komerčnímu využití geneticky modifikované plodiny jako potraviny. Bylo to rajče Flavr Savr se zpóźděným dozráváním.

1. Teoretický výzkum

V průběhu posledních přibližně dvou desetiletí byla nashromážděna řada poznatků genového inženýrství, významných z hlediska vlastního transformačního procesu i z hlediska aplikace ve šlechtitelských programech. Genové inženýrství využívá modelových systémů a modelových organismů (tabák, huseníček). Byla dostatečně poznána struktura a funkce T-DNA plazmidů Ti a Ri u druhů *Agrobacterium tumefaciens* a *A. rhizogenes*. Byla objasněna struktura a funkce oblasti *vir*, která je nezbytná pro mobilitu T-DNA se začleněným cizím genem. Přenos požadovaného genu se může uskutečnit jednak ve formě plazmidového kointegrátu, jednak binárním vektorovým systémem; tato druhá alternativa významně převažuje. Málo známé jsou procesy, které se uplatňují při interakci mezi buňkami bakteriálními a rostlinnými. Postupně jsou objasňovány mechanismy řídící začlenění T-DNA do rostlinné recipientní buňky. Kromě Southernovy hybridizace a sekvencování DNA se významnou metodou při studiu transformace rostlin stala fluorometrická metoda při stanovení přítomnosti a exprese glukuronidázy (signální gen *GUS*), která usnadňuje např. stanovení funkce rozdílných promotorů. S podobným cílem se dnes využívá také signální gen *GFP* (angl. green fluorescent protein).

Pro začleňování cizích genů do rostlin byla vypracována řada alternativních metod. U dvouděložných rostlin je nejvíce využívána transformace prostřednictvím T-DNA plazmidu *A. tumefaciens*. Tento postup byl již využit i u některých jednoděložných rostlin např. u kukuřice, rýže, pšenice a ječmene. Jako vektory cizorodých genů jsou perspektivní také viry.

Jsou to především rostlinné viry s jednovláknovou DNA (skupina geminivirů), při jejíž replikaci dochází k chybám jen v nízké četnosti (10^{-6}).

U jednoděložných rostlin je nejvýznamnější biolistická metoda používaná v různých modifikacích. K transgenozí různých rostlinných pletiv se využívají malé částice (mikroprojektily), na jejichž povrchu je vektorová DNA. Jsou vstřelovány do rostlinných buněk prostřednictvím různých vysokotlakých zařízení. V následující fázi se pletiva kultivují *in vitro*, kde je iniciována kalogeneze a potom regenerace rostlin na selektivním médiu. Cizorodá DNA se introdukuje i do izolovaných protoplastů endocytózou. Ta je stimulována dodáním polyetylglykolu (PEG) do roztoku DNA, působením iontů vápníku a zvýšeného pH nebo elektroporací. Další metodou je mikroinjekce cizí DNA do jader buněk.

Při transformaci prostřednictvím *A. tumefaciens* se do rostlinné DNA introdukuje nízký počet kopií T-DNA. Postupy přímé transformace jsou většinou méně účinné a nevýhodou je i začlenění transgenů ve větším počtu kopií, což má za následek jejich různé přestavby v důsledku homologních rekombinací a také umlčování transgenů.

1.1. Mechanismus přenosu DNA

Podstatou virulence agrobakterií je přenos části plazmidové DNA (Ti, Ri plazmidu), tzv. T-DNA (obr. 1), do napadené buňky, která je schopna stabilní integrace do rostlinného genomu a v jeho rámci replikace a genové exprese. Velikost Ti plazmidu je 150 – 200 kb. Velikost T-DNA se pohybuje v rozmezí 15 – 45 kb, v závislosti na typu plazmidu. Součástí T-DNA jsou geny pro syntézu látek hormonální povahy a geny pro syntézu opinů. Jsou to nízkomolekulární látky vznikající kondenzací aminokyselin s ketokyselinami nebo cukry. Jsou syntetizované v napadené rostlinné buňce a jejich import do bakteriální buňky a následné využití jako zdroje uhlíku, dusíku a energie pro agrobakterie umožňují speciální enzymy kódované geny na plazmidu mimo oblast T-DNA. Obdobnou funkci mají agrocinopiny, které slouží agrobakteriím jako zdroj fosforu, uhlíku a energie. Podle produkce opinů jsou rozlišovány oktopinové, nopalínové, agropinové a sukcinamopinové typy Ti plazmidů. Po integraci T-DNA do chromozomu produkuje rostlinná buňka hormony, které způsobují tvorbu nádorů, a opinů, které jsou pro agrobakterie zdrojem uhlíku a dusíku (obr. 2).

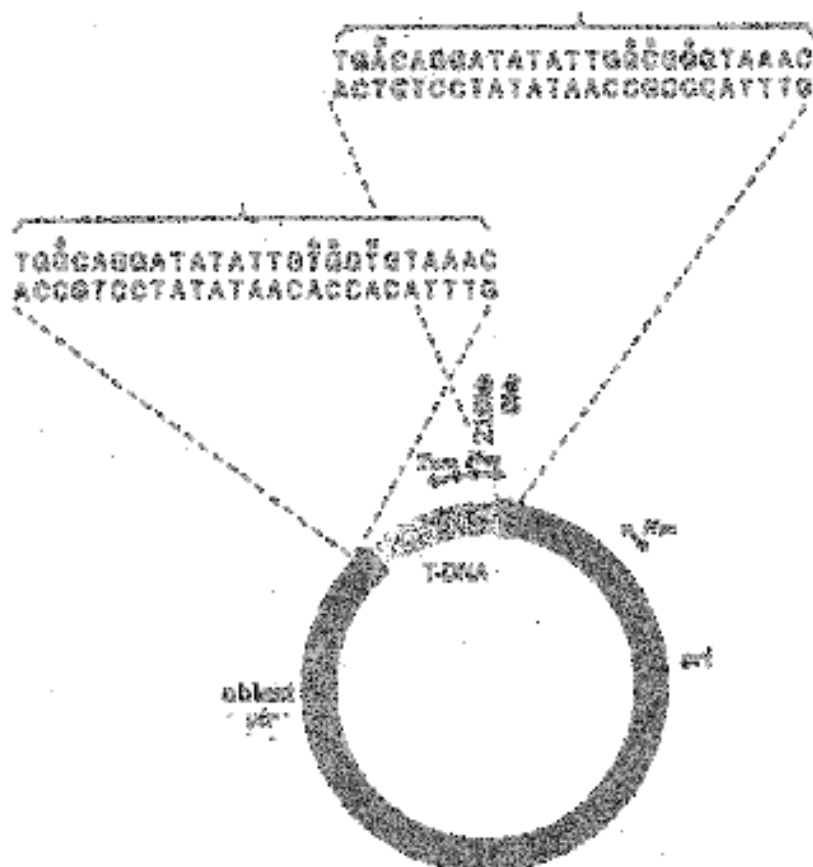
Agrobakteriální infekce je výsledkem součinnosti tří hlavních genetických komponent bakterie. První z nich, T-DNA, je přenášeným elementem, který však nekóduje produkty, jež by jeho přenos zprostředkovaly. Většinu produktů funkčních při přenosu T-DNA zajišťuje oblast *vir* umístěná na plazmidu Ti, popř. Ri. Třetí komponentou přenosu T-DNA jsou oblasti na chromozomu agrobakterie (např. geny *chvA* a *chvB* jsou nezbytné pro přichycení bakteriálních buněk k buněčné stěně rostlinných buněk prostřednictvím syntézy a transportu β -1,2-glukanu).

Nádorový růst vyvolávají rostlinné hormony, jejichž tvorbu řídí bakteriální geny obsažené v T-DNA. Brzy se podařilo zaměnit tyto geny za jiné, dodávající rostlinám nové zajímavé vlastnosti. Kromě vnášení cizorodých genů do stávajícího genomu je transformace pomocí modifikované T-DNA využívána i pro studium kódujících a regulačních sekvencí rostlinného genomu metodami specifického značení genu (angl. gene tagging), promotoru (angl. promotor tagging) a genovou aktivací.

Geny kódují jednak syntézu bílkovin (kódující funkce) bez ohledu na vývojové vzdálenosti dárce a příjemce přenášené DNA, jednak mají regulační funkci. Regulační složka musí pocházet z rostliny. Geny ze vzdálených organizmů se proto upravují metodami genového inženýrství tak, že se ke kódující části připojí regulační část odpovídající přijímající rostlině.

Tak dostáváme tzv. chimérické (složené) geny, které obsahují části DNA pocházející z různých organismů. Vytvářený gen (rosteinného původu nebo chimérický) se nazývá transgen, a rostlina, která ho přijala do své genetické výbavy (genomu), se označuje jako transgenní.

Obr. 1: Obecná struktura Ti plazmidu *Agrobacterium tumefaciens* (*vir*– geny virulence, *ori* – začátek replikace, *Nos*, *Noc* - geny pro syntézu a katabolismus nopalínu, *Tum* – geny pro tvorbu).



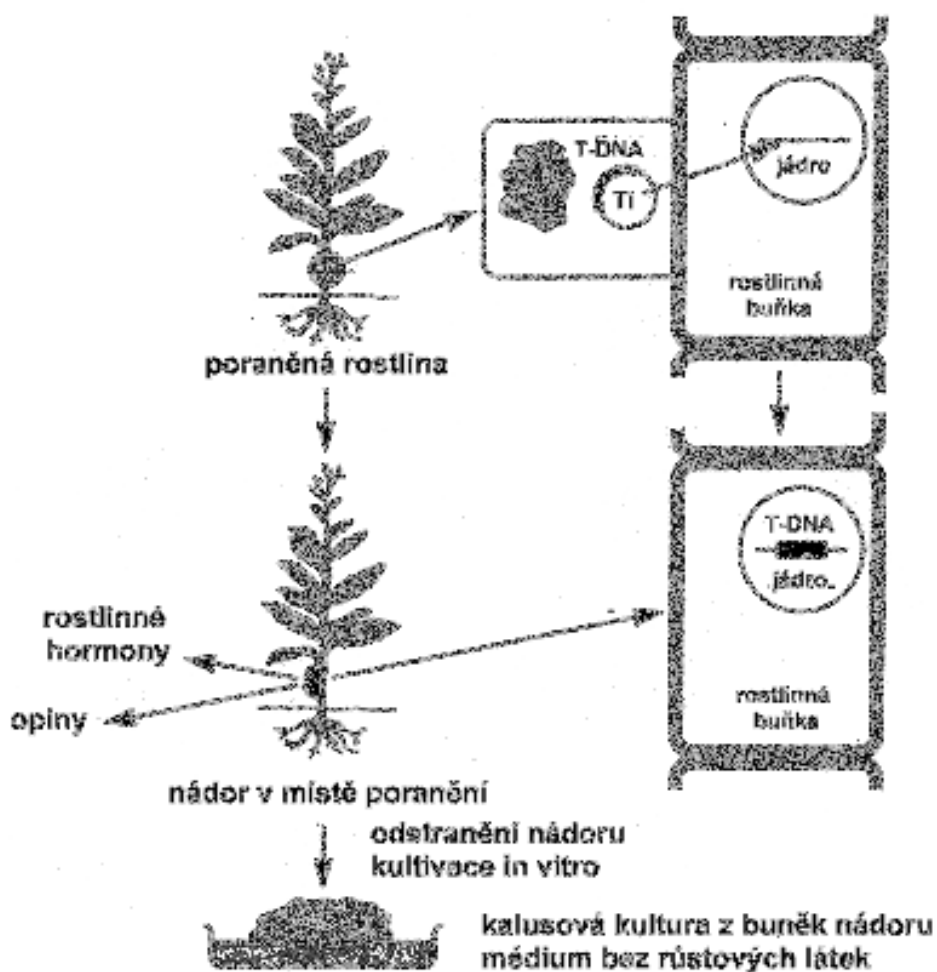
Intermediální (kointegrativní) vektor je malý plazmid *Escherichia coli*, do něhož je vložen úsek T-DNA. Restrikčním štěpením a ligací se do tohoto úseku vkládá požadovaný gen. Konjugací je pak plazmid přenesen do *A. tumefaciens*, kde je modifikovaná T-DNA začleněna do Ti plazmidu homologní rekombinací. Binární vektorový systém je způsob, při němž geny virulence Ti plazmidu a sekvence T-DNA jsou odděleny na samostatných plazmidech, protože bylo zjištěno, že úsek virulence a T-DNA nemusí být společně na jednom plazmidu. Tzv. mini Ti plazmid s hraničními sekvencemi T-DNA je díky své velikosti snadným objektem pro genetické modifikace. Klasický typ binárního vektoru je vhodný pro přenos několika málo genů současně. Velikost T-DNA začleněné do vektoru je omezena (asi 10 kb). Pro přenos větších úseků DNA byl vytvořen nový typ binárního vektoru BIBAC (binární BAC), což je umělý bakteriální chromozom, jehož součástí jsou signální geny. Tento vektor umožňuje přenos až 150 kb cizorodé DNA.

V systému binárních vektorů část Ti plazmidu obsahující oblast *vir* produkuje faktory potřebné pro přenos T-DNA. Produkt genu *virG* je pozitivním transkripčním faktorem, který aktivuje expresi ostatních genů *vir*. Geny *virD1* a *virD3* (v komplexu s proteinem VirD2)

svými produkty umožňují vytvoření zářezu v jednom řetězci T-DNA a na její volný 5' konec se váže protein VirD2. Dalším genem, jehož funkce byla objasněna, je gen *virE2*. Protein VirE2 se váže na jednořetězcovou DNA, která je přenášena do rostlinné buňky, a stabilizuje ji. Geny operonu *virB* kódují membránové proteiny, které umožňují transport z bakteriální do rostlinné buňky. Gen *virF* určuje specifitu hostitele.

Menší část původního Ti plazmidu nesoucí T-DNA, je schopna replikace jak v agrobakteriu, tak i v *Escherichia coli*. Geny T-DNA mohou být nahrazovány rostlinnými selekčními markery, reportérovými geny a dalšími DNA elementy při použití *E. coli* jako hostitele. Takto vytvořený binární vektor je transformací nebo konjugací přenesen do agrobakteriálního kmene. Zatím jen částečně jsou známy procesy, které se uplatňují při integraci mezi buňkami bakteriálními a rostlinnými. Pouze částečně je znám mechanismus řídicí začlenění T-DNA, její části a do ní začleněného genu do rostlinné akceptorové buňky.

Obr. 2: Infekce rostlin *Agrobacterium tumefaciens*.



Při transgenozi se často využívají explantátové kultury. Sterilní části rostliny (listů, kořenů apod.) se krátkodobě pěstují v umělých živných prostředích společně s kulturou bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která na svém Ti plazmidu nese T-DNA s geny, které chceme včlenit do rostlinného genomu. Při této kultivaci T-DNA plazmidu přejde do některých rostlinných buněk. V další etapě se musí rostlinné buňky dělit, až k úplné regeneraci

v životaschopnou rostlinu (využití schopnosti totipotence každé buňky). Živná půda obsahuje selekční látku, která umožňuje růst jen transformovaným buňkám.

Do rostlinného genomu je včleňována 1, 2 nebo více kopií T-DNA. Kopie T-DNA mohou být v rámci jednoho rostlinného genomu integrovány do různých chromozomů, často však dochází k integraci několika kopií T-DNA do jednoho lokusu. Bylo zjištěno, že vysoký stupeň exprese transgenů souvisí s inzercí jediné kopie T-DNA v lokusu, zatímco transformanty s multimerní T-DNA uspořádanou v jednom lokusu do obrácených repetití vykazují nízkou expresi transgenů doprovázenou zvýšenou metylací integrované T-DNA. U vícenásobných inzercí T-DNA byla prokázána kosuprese transgenů, jejíž míra byla závislá na způsobu uspořádání T-DNA kopií v genomu.

Z rozsáhlého souboru údajů vyplývá, že není problém vpravit exogenní DNA (cizí gen) do rostlinné buňky. Základní problém kromě exprese a někdy i stability cizího genu představuje častá neschopnost transformovaných buněk, nádorů nebo tkáňových kultur diferencovat prýty a kořeny a vytvořit tak celistvou rostlinu.

Hnací silou výzkumu v této oblasti jsou očekávané přínosy v zemědělské a obecně produkční praxi.

2. Aplikovaný výzkum

V současné době se pozornost aplikovaného výzkumu v oblasti geneticky modifikovaných rostlin soustřeďuje na více než dvacet druhů zemědělsky významných plodin a celkem asi 50 druhů kulturních rostlin. Z hlediska evropského zemědělství to je zejména brambor, tabák, rajče, řepka olejná, dále len, kukuřice a pšenice. Pozornost je věnována i okrasným rostlinám a řadě dřevin. Kromě těchto druhů je v USA věnována pozornost bavlníku a v Asii sóje. Kanada se příliš neliší od Evropy. Počet polních pokusů s geneticky modifikovanými rostlinami se od roku 1987, kdy bylo uváděno 9 případů, zvýšil v roce 1998 na 1045.

Dnes se již metodami genového inženýrství vnesly do genomu rostlin stovky možná i tisíce genů. Tyto geny pocházejí z jiných rostlin, ale také živočichů, bakterií nebo virů a mohou to být i geny syntetizované v laboratoři. Každý cizí gen vnáší do rostlinné DNA novou vlastnost. Spektrum genů, které byly do zemědělsky významných plodin včleněny, je rozsáhlé. Zvláště ceněné jsou odolnost vůči chorobám, škůdcům a nepříznivým vlivům prostředí. Odolnost proti chorobám a škůdcům umožňuje podstatně snížit používání agrochemikálií v zemědělství, což přispívá nemálo ke zlepšení životního prostředí.

Dnešní generace transgenních odrůd obsahuje cizí geny (transgeny), které byly klonovány v bakteriích a přeneseny do rostlinného genomu asi před deseti lety. Nesrovnatelně větší počet transgenů bude využit v nových odrůdách, které se objeví v příštích letech.

Všechny transgenní odrůdy a zvláště jejich nové znaky kódované těmito transgeny byly velmi pečlivě testovány, neboť všechny rozvinuté země mají zákonodárství, které takové testování vyžaduje. Prověřují se nejen vlastnosti produktů transgenů (bílkoviny), pokud jde o zdravotní nezávadnost, rozklad v zažívacím traktu apod., ale i ekologické vlastnosti. Toto testování se vyžaduje, aby bylo zaručeno, že nehrozí žádné riziko a také proto, aby bylo možné na konkrétní námitky ze strany veřejnosti proti jejich používání odpovědět konkrétními vědeckými argumenty. Roku 2000 byl schválen zákon 153/2000 Sb. O nakládání s geneticky modifikovanými organizmy a produkty s platností od 1. ledna 2001. Od doby přijetí tohoto zákona došlo ke změnám v klíčových právních předpisech Evropských společenství, Česká

republika ratifikovala Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti – mezinárodní dohodu týkající se dovozu a vývozu GMO – a do české legislativy byly transportovány některé relevantní předpisy ES z oblasti zdravotnictví. Nutnost změn byla tak rozsáhlá, že bylo rozhodnuto připravit zcela nový zákon o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, je to zákon 78/2004 Sb., který nabyl účinnosti 25. února 2004.

V následujících kapitolách budou zmíněny jednotlivé typy transgenů již využívaných nebo využitelných ve šlechtění rostlin.

2.1. Rezistence k herbicidům

Prvním šlechtitelsky významným úspěchem bylo vnesení transgenu pro odolnost rostlin vůči herbicidům. Jedná se o herbicidy nové generace, které jsou sice velmi účinné, ale účinkují jen na rostliny, ne na živočichy, a rychle se rozkládají, aniž by zanechávaly škodlivé zplodiny. Byly známy dříve, než byly vytvořeny účinné transgenní rostliny, ale nedaly se použít pro ochranu před zaplevelením, protože působily na všechny rostliny, tedy i na kulturní odrůdy, které mají chránit. Teprve až po vnesení transgenů pro necitlivost do rostlinných genomů jsou tyto účinné a bezpečné herbicidy k dispozici pro ošetřování transgenních plodin. V praxi to znamená, že místo několikanásobného postřiku různými herbicidy se rostlina ošetří tímto novým herbicidem jen jednou, nejvýše dvakrát. Celkové množství herbicidu se snižuje, což je prospěšné pro životní prostředí.

Herbicid zpravidla působí toxicky na jediný enzym, významný pro život rostlin. Existují tři hlavní mechanismy navození rezistence rostlin k herbicidům transgenozí:

- (1) transgen kóduje nadbytek enzymu, který je aktivován herbicidem,
- (2) transgen kóduje odlišnou formu enzymu, která není herbicidem inaktivována,
- (3) transgen kóduje enzym, který rozkládá herbicid.

Jedná se o tři typy herbicidů a jim odpovídajících transgenů:

- (1) Transgen pro odolnost vůči herbicidu glyfozátu (N-fosfinometylglycinu), vyráběnému pod technických názvem Roundup. Herbicid blokuje aktivitu enzymu 5-enolpyruvátšikimát-3-fosfosyntázy (EPSPS). Tento enzym nemají živočichové, ale jen rostliny, bakterie a některé houby. V rostlinách připravuje stavební kameny bílkovin nezbytné pro živočichy, kteří si je sami nedovedou připravit a musí je dostat v potravě. Transgen kóduje obdobný enzym EPSPS, původem z bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, který však není glyfozátem blokován. Vnesený gen je tedy pouze variantou vlastního rostlinného genu. Nadprodukcí enzymu EPSPS kódují transgeny klonované z *Petunia* a *Arabidopsis*. Druhým typem transgenů využívaného při rezistenci vůči glyfozátu je gen pro glyfozát oxidoreduktázu (GOX), který byl klonován z bakterie *Achromobacter*.
- (2) Transgeny pro necitlivost k herbicidům typu fosfinotricinu (4-hydroxy-metyl fosfinothricin-D,L-homoalanin), známého také pod názvem glufosinát. Tento herbicid blokuje enzym glutamínsyntázu, zneškodňující amoniak, který se tvoří při používání dusičnanů i dalšími cestami. Pokud je enzym inhibován, amoniakové ionty rostlinu otráví a ta uhynie. Pro získání necitlivosti k tomuto herbicidu můžeme použít dva transgeny, které oba pocházejí z běžné půdní aktinomykety. Gen *bar* (*bialaphos resistance*) se získal ze *Streptomyces hygroscopicus* a obdobný gen *pat* (*phosphinothricin acetyltransferase*)

byl klonován ze *S. viridochromogenes*. Enzymy kódované těmito geny přeměňují herbicid na sloučeninu, která je netoxická jak pro rostliny tak pro živočichy a rychle se rozkládá.

- (3) Transgen pro rezistenci vůči herbicidům založeným na sulfonylmočovině (např. sulfuron) působí jen na dvouděložné rostliny, a proto se již dříve používal k ošetřování kultur obilovin. Nyní se tyto možnosti rozšiřují i na transgenní dvouděložné rostliny. Toxicita herbicidů typu sulfonylmočoviny je podobně jako u glyfozátu záležitost biochemických drah tvořících aminokyseliny, které živočichové nedovedou syntetizovat, a proto na ně nepůsobí. Jako transgen se používá např. gen pocházející z mutantní linie rostliny *Arabidopsis thaliana*.

2.2. Rezistence k virům

V současné době je známo asi 600 typů rostlinných virů a z nich 250 působí vážnější onemocnění. Virová onemocnění způsobují asi 15% ztráty sklizně. Rostlinné viry je možné rozdělit podle jejich genetického materiálu na viry s jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou RNA a viry s jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou DNA. Z hlediska genového inženýrství jsou často studovány geminiviry, které patří do skupiny virů s jednořetězcovou kruhovou DNA. Tato DNA je schopna se autonomně replikovat v jádrech jako mimochromozomová kružnicová kopie. Stejně jako rostlinných virů se využívá také viroidů. Jsou to patogeny tvořené krátkou jednořetězcovou kružnicovou RNA, jejíž krátké úseky se párují za vzniku prutovité sekundární struktury. K translaci viroidů nedochází, přesto však vyvolávají symptomy infekce.

Roku 1985 byla vyslovena hypotéza, podle které hostitel, u něhož dochází k expresi určitých sekvencí nukleových kyselin patogena, se může stát rezistentní k tomuto patogenu. Hypotéza byla poprvé potvrzena roku 1996 u tabáku. Transgenní rostliny s genem pro plášťový protein byly rezistentní k viru tabákové mozaiky (TMV). V současné době se projev transgenů pro plášťový protein považuje za obecně působící mechanismus rezistence k odpovídajícímu viru. V polních pokusech byly úspěšně testovány rostliny brambor, které jsou rezistentní k viru X. Další pokusy se provádí s rezistencí k viru Y, viru svinutky listů brambor a viru mozaiky vojtěšky. Přítomnost bílkoviny v rostlinné buňce působí odolnost vůči tomu typu viru, z něhož pochází gen, a k virům příbuzným.

Dlouho se nedařilo získat rezistenci k virům pomocí antimediatorových konstrukcí transgenů. Antimediatorová RNA vzniká transkripcí DNA, která je komplementární ke kódující genové sekvenci. V současné době jsou pouze v některých případech pro získání rezistence účinné transgeny kódující antimediatorová RNA k rostlinným virům. Tak je tomu např. u potyviru – viru žluté mozaiky bobu, nebo u geminiviru – viru zlaté mozaiky rajčete. U tabáku a bramboru byl jako transgen využit gen pro antivirový protein z *Phytolacca americana*. Tento protein působí rezistenci k virovým infekcím obecně.

V poslední době byl transpozonovou mutací klonován z genomu tabáku gen *N* pro rezistenci k viru tabákové mozaiky. Gen podmiňuje hypersenzitivní reakci, tedy vznik ohraničených lezí v místech infekce. Gen byl přenesen do genomu tabáku a rajčete citlivého k TMV a u obou podmiňoval rezistenci. Sekvence tohoto viru je do značné míry homologní genu *Arabidopsis thaliana* *RPS2*, který kóduje protein podmiňující rezistenci k bakteriím r. *Pseudomonas*. Tento gen patří do skupiny rostlinných genů, které podmiňují specifické interakce rostlina-patogen vedoucí k hypersenzitivní reakci. Aktivace tohoto genu vede k programované buněčné smrti. Hypersenzitivní reakci předchází rychlá indukce mnoha biochemických a

fyziologických procesů jako je např. produkce fytoalexinů, ukládání ligninu a aktivace genů souvisejících s obrannými reakcemi rostlin.

Využití živočišného transgenu bylo popsáno u transgenních rostlin bramboru, které ve svém genomu mají krysí gen pro 2,5-oligoadenyl syntetázu a které jsou více rezistentní k viru X bramboru než transgenní rostliny s genem pro plášťový protein tohoto viru. Enzym úzce souvisí s interferonovým systémem savců. Interferony jsou specifické proteiny vylučované savčími buňkami při virové infekci, při proliferaci buněk a imunitních procesech. Indukují syntézu dalších proteinů, které vedou k inhibici množení virů. Jedním z těchto proteinů je právě 2,5-oligoadenylát syntetáza.

Plášťové bílkoviny a příslušné geny denně konzumujeme ve velkých kvantech, protože mezi rostlinami v naší stravě jsou i rostliny virózní. Konzumujeme plášťový protein, ale i virovou RNA, které v transgenní rostlině budeme ušetřeni.

2.3. Odolnost k hmyzím škůdcům

V přírodě žijící bakterie druhu *Bacillus thuringiensis* produkují při vytváření sporů bílkovinu toxickou pro některé skupiny hmyzu. Jednotlivé poddruhy a kmeny produkují proteiny s různým spektrem citlivosti k hmyzím taxonům. Tento protein se nazývá δ -endotoxin. Dříve se kultury této bakterie vyráběly ve velkých objemech (u nás např. ve Slušovicích) a používaly jako postřik polních kultur proti hmyzím škůdcům. δ -endotoxinů bylo již charakterizováno přes 150. Geny kódující tyto toxiny byly rozděleny do 5 hlavních tříd CryI až CryV, z nichž každá je ještě členěna na podtřídy. Aby získaly entomopatogenní aktivitu, musí být δ -endotoxiny rozpuštěny ve střevě hmyzu a aktivovány proteázami, které specificky odštěpují C-terminální vysokomolekulární část protoxinu a několik aminokyselin na A-konci. Tak vzniká výsledný menší polypeptid, který je teprve aktivním toxinem.

Různé geny pro δ -endotoxiny nebo jen jejich části označené Bt se užívají jako transgeny a prostřednictvím T-DNA jsou včleňovány do rostlinného genomu. Aby docházelo i k expresi těchto genů v rostlinném genomu, musely se metodami genového inženýrství složitě upravit. V poslední době byla účinnost tohoto systému podstatně zvýšena a spektrum hmyzích řádů, na které působí, rozšířeno (*Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*). Díky poměrně úzkému rozsahu působnosti δ -endotoxinu, působí toxin jen na cílového škůdce a ne na užitečný hmyz a transgenní rostliny se mohou stát součástí integrované ochrany rostlin.

Účinnost transgenů byla obvykle dosti nízká. Příčinou byla především nestabilita mRNA v rostlinných buňkách. Původní geny byly proto modifikovány. Gen pro δ -endotoxin z *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* byl znovu syntetizován tak, aby při zachování struktury výsledného proteinu bylo využito degenerovaných kodonů vyskytujících se v rostlinném genomu nejčastěji. Takový gen byl vnesen do genomu bramboru a byla zjištěna vysoká účinnost produktu takto upraveného genu a vysoká rezistence k mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Výnosové a jakostní parametry zůstávají stejné a mikrobiální populace na transgenních rostlinách se jen nepatrně liší od těch, které byly nalezeny u standardních odrůd. U tabáku bylo dosaženo podstatného zvýšení proporce δ -endotoxinu v proteinech listů, jestliže byl protein směřován do chloroplastů. Nyní existuje transgenní kukuřice odolná proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*). Transgeny pro δ -endotoxin byly zavedeny také do genomu sóje, rajčete, brokolice, bavlníku a dalších kulturních rostlin. Obdobně byl upraven také gen pro rezistenci k motýlím škůdcům, pro δ -endotoxin cryIA(b) *B. thuringiensis*, který se vnášel do genomu rýže se sekvencí bazí v kódujícím úseku upravenou tak, aby poskytoval maximální expresi v genomu rýže.

Do rostlinného genomu byly vpraveny také geny, jejichž proteiny podmiňují blokádu některých enzymů trávicího traktu hmyzu a to vede k jeho uhynutí. Existují např. rostliny hrachu, které nesou transgen pro inhibitor α -amylázy, nebo rostliny s geny pro inhibitory proteáz. Některé z těchto genů pro inhibitory proteáz pocházejí z genomu lyšaje (*Manduca sexta*), který napadá tabák. Transgenní tabák s genem pro delta-endotoxin *B. thuringiensis* je právě toxický pro lišaje. Někdy transgen aktivuje geny pro inhibitory proteáz, jako transgen kódující prosystemin (proteinový signál poranění) v genomu rajčete. Rovněž gen pro inhibitor chymotrypsinu z tabáku, který patří do skupiny genů pro inhibitory proteázy II, podmiňuje při silné konstitutivní expresi v rostlinách tabáku rezistenci k hmyzím škůdcům.

Pro savce a ptáky jsou toxické lektiny. Jsou to proteiny, které vážou sacharidy a většina z nich má antinutriční charakter, jako např. WGA (angl. wheat germ agglutinin) ze zrn pšenice. Transgenní tabák s lektiny hrachu byl toxický pro motýla *Heliothis virescens*. Většina experimentů s lektiny se soustřeďuje na získání rostlin rezistentních proti mšicím. Rostliny tabáku s genem *GNA* sněženky (*Galanthus nivalis* agglutinin) byly rezistentní vůči mšicím *Myzus persicae* a *Aulocarthum solani*.

Transgenní rostliny tohoto typu existují již deset let. Žádné nepříznivé účinky δ -endotoxinu na ostatní organizmy se ani přes důkladné a nákladné testování nezjistily.

2.4. Rezistence k bakteriálním a houbovým chorobám

Transgeny, které kódují chitinázy, zvyšují rezistenci rostlin k houbovým chorobám. V polních pokusech byly testovány rostliny řepky olejné s transgenem pro chitinázu, které vykazují zvýšenou odolnost k různým houbovým patogenům, jako je *Cylindrosporium concentricum*, *Phoma ingram*, *Sclerotinia sclerotinium*. Transgeny pro glukonázy zesilují účinek transgenů pro chitinázy.

Existuje řada dalších mechanismů rezistence k bakteriálním a houbovým chorobám navozených transgenozí. Jednou z nich je využití transgenů pro lysozym z bakteriofága T4, který narušuje buněčné stěny bakterií. V genomu bramboru působí vysoký stupeň rezistence k *Erwinia carotovora*. Účinné jsou také transgeny pro některé obranné toxické proteiny jiných rostlinných druhů. Např. exprese genu pro thionin ječmene v genomu tabáku vede ke zvýšení rezistence k bakteriálním patogenům. Transgen pro rezistenci k tabtoxinu z *Pseudomonas syringae* patovar *tabaci* působí rezistenci tabáku k tomuto bakteriálnímu patogenu. Živočišný gen pro laktoferin, což je protein vyskytující se v mléce, v genomu tabáku rovněž působí vysoký stupeň rezistence k bakteriálním patogenům a tato rezistence bude mít pravděpodobně obecný charakter.

2.5. Změny ve složení zásobních látek rostlin

Do této oblasti patří především zásobní oleje a zásobní proteiny semen, škrob v bramborových hlízách a lignin. Syntézu všech uvedených typů makromolekul lze v současné době účinně modifikovat transgenozí a všechny pozitivní změny mají obrovský význam pro výživu, krmivářství nebo průmysl.

Klonování genů, zvláště *Arabidopsis thaliana*, umožnilo poznat genetické založení biosyntézy a mechanismu ukládání lipidů. Má to praktický význam jednak proto, že transgenoze umožňuje dosažení změn ve spektru mastných kyselin v olejích kulturních rostlin, a jednak proto, že membránové lipidy ovlivňují toleranci k nízkým teplotám, účinnost

fotosyntézy, procesy hydratace a dehydratace pylu a toleranci k suchu. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem se účastní zrání plodů, květů, klíčení pylu, klíčení semen, růstu axilárních pupenů a dalších procesů. Lipidy jsou prekurzory kyseliny jasmonové, která zprostředkovává přenos signálu v rostlinách.

Byla již klonována celá řada genů, které se účastní biosyntézy lipidů. Většina z nich byla použita při experimentech s transgenozí. Zmíníme se především o těch transgenech, které byly využity pro navození změn ve spektru olejů semen olejodárných rostlin, především řepky olejné. V pokusech bylo využito nejen rostlinných, ale i živočišných a bakteriálních genů.

Spotřeba rostlinných olejů neustále stoupá. Předpokládá se, že v roce 2010 bude světová spotřeba asi 100 mil. tun. Hlavní čtyři kulturní rostliny pro produkci olejů jsou sója, palma olejodárná, řepka olejná a slunečnice. Oleje slouží jednak k přímé konzumaci člověkem a zkrmování zvířaty (asi dvě třetiny), jednak pro různé průmyslové využití. Ve všech případech je podstatné složení mastných kyselin v olejích.

V jedlých olejích převažují mastné kyseliny, které mají 18 uhlíků a 2 až 3 dvojně vazby. Tyto kyseliny se obvykle charakterizují poměrem (např. 18:2), v němž první číslo udává počet uhlíků a druhé počet dvojných vazeb v molekule. Převažuje 7 hlavních typů mastných kyselin, které tvoří celkem 95% obsahu jedlých olejů: kyselina palmitová (16:0), stearová (18:0), olejová (18:1), linolová (18:2), linolenová (18:3), eikosnová (20:1) a eruková (22:1). Rostlinné oleje mají obvykle formu triglycerolů, v nichž tři mastné kyseliny jsou esterifikovány třemi hydroxylovými zbytky. Základní výstavba mastných kyselin se děje v chloroplastech, kde dochází ke skládání jednotek obsahujících dva uhlíky do řetězců obsahujících 16 až 18 uhlíků.

Pro potravinářské účely je žádoucí, aby převažovaly nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou a se středním (16-18) počtem uhlíků (především 18:1). Hlavním cílem je snížení obsahu kys. erukové 22:1 a kys. linolenové 18:3 a zvýšení obsahu kyseliny olejové.

Řepka olejná má přes 60% mastných kyselin 20:1 a 22:1. V současné době je hlavní olejninou právě řepka olejná a hlavním cílem šlechtění a genového inženýrství je snížení obsahu kyseliny erukové, snížení obsahu kyseliny linolenové a případně produkce kyseliny γ -linolenové. Tato mastná kyselina má řadu příznivých somatických účinků, především snižování hypercholesterolemie a dalších klinických poruch, které vedou ke koronárním a cévním onemocněním. Kromě toho působí ústup atopického ekzému u dětí, ústup alergií a zmírňování periodických obtíží žen. Olej s vysokým obsahem této mastné kyseliny se získává ze semen pupalky, brutnáku nebo černého rybízu a prodává se jako velmi drahý komerční farmakologický produkt. Kyselina γ -linolenová není obsažena v oleji semen řepky, je tam však kyselina linolenová, která může být přeměněna na γ -linolenovou prostřednictvím enzymu δ -6-desaturázy. Gen pro tento enzym byl zatím klonován z genomu sinice *Synechocystis* a upravený přenesen do genomu tabáku, kde docházelo v semenech k syntéze kyseliny γ -linolenové.

Jiný šlechtitelský cíl je snížení obsahu kyseliny erukové. Bylo toho dosaženo i tradičním šlechtěním řepky olejné. V USA se pěstuje řepka s velmi nízkým obsahem kyseliny erukové.

Existuje již celá řada typů a linií transgenních rostlin řepky se změněným spektrem mastných kyselin v olejích semen nejen pro potravinářské, ale i pro průmyslové využití. Dvě prozatím nejpozoruhodnější linie s modifikací poměru mastných kyselin v olejích semen byly uvedeny do polních pokusů v roce 1993/94 firmou Calgene. Řepka obsahuje v olejích semen 1-2% kyseliny stearové a méně než 0-1% kyseliny laurové. Existují linie s obsahem 40% kyseliny stearové a 40% kyseliny laurové v olejích semen. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny laurové byla již v roce 1995 v USA uvolněna pro komerční využití.

Genetické modifikace u stromů jsou zaměřeny na nízký obsah ligninu ve dřevu, aby bylo vhodnější pro výrobu papíru. Ročně stojí odstraňování ligninu ze dřeva 20 miliard dolarů. Gen zodpovědný za tvorbu ligninu byl nalezen a pracuje se na jeho vyřazení z funkce u vybraných druhů stromů. Geneticky modifikované osiky mají o 45% méně ligninu a zároveň rychleji rostou. Hledají se geny, které by zabránili GM stromům produkovat pyl a zabránilo se tak hybridizaci GM a normálních stromů. Tím by se také ulevilo lidem alergickým na pyl. Je snaha o rozluštění genetického kódu stromů; za vhodného kandidáta byl vybrán topol *Populus balsamifera* (genom 550 Mb). Pro srovnání, borovice *Pinus taeda* má genom velký 20 000 Mb, její genom je také sekvencován.

Manipulace se spektrem zásobních bílkovin semen se provádí se dvěma praktickými cíli:

- (1) Optimalizace spektra aminokyselin v zásobních proteinech semen. Semena rostlin, zvláště luskovin a obilovin, slouží k potravinářským a krmivářským účelům, ale z hlediska složení aminokyselin nejsou plnohodnotná. Semena luskovin mají nedostatek methioninu a cysteinu, obilninám chybí lysin a methionin. Cílem genových manipulací je doplnit zásobní proteiny semen o typy, které obsahují nadbytek těchto aminokyselin.
- (2) Včleňování genů pro zásobní proteiny semen do genomu. Ve specifických případech je výhodné, aby byly do genomu vneseny geny pro další proteiny, které by mohly být ukládány podobně jako zásobní proteiny, protože jsou v této formě snadno extrahovatelné a využitelné např. farmakologicky.

Proteiny semen *Brassica napus* jsou významné z hlediska vyváženého, plnohodnotného složení aminokyselin, protože pokrutiny zbylé ze semen řepky po extrakci olejů se používají jako krmivo. Proteiny semen řepky mají nedostatek aminokyselin lysinu a methioninu. Byl klonován gen pro zásobní protein semen z *Bertholetia excelsa* (paraořech). Tento albumin 2S obsahuje vysoký podíl methioninu. Jeho gen, i s původním promotorem, byl vnesen do genomu řepky. V semenech dochází k expresi transgenu, a tím ke zlepšení složení aminokyselin v jejich proteinech. Stejný gen, ale s proteinem leguminu *Vicia faba*, byl včleněn také do genomu *Vicia narbonensis* a projevoval se v semenech této vikvovité rostliny, v nichž se trojnásobně zvýšil obsah methioninu.

V roce 1994 se podařilo transgenozí dosáhnout změn složení lipidů. Do genomu tabáku byl vnesen antimediatorový konstrukt, který inaktivuje geny pro cinnamyl alkoholdehydrogenázu, enzym katalyzující poslední krok biosyntézy prekursoru ligninu. Lignin byl pak pozměněn ve složení i struktuře a byl přístupnější chemické extrakci. Xylemová pletiva měla červenohnědou barvu. Genový konstrukt vnesený do genomu osiky podmiňuje červenohnědou barvu dřeva jako nový, nábytkářsky dobře využitelný znak podmíněný transgenozí.

2.6. Rajčata s prodlouženým dozráváním

Zrání plodů rajčat z genetického hlediska představuje sérii koordinovaných biochemických změn a změn fyziologie pletiv. Příčinou jsou regulované změny genové exprese. Jako první transgen byl využit gen pro enzym, který hydrolyzuje pektiny, polygalakturonázu. Vnesení konstruktů s antimediatorovým genem pro polygalakturonázu s 35S promotorem do genomu rajčete vede ke snížení až ztrátě exprese původního rostlinného genu pro polygalakturonázu a ke změnám zralých plodů. Plody byly podstatně produktivnější, byly méně napadány bakteriálními a houbovými chorobami. Ale příliš se nezměnila jejich tendence k měknutí. Šťáva z transgenních rajčat měla podstatně hustší konzistenci, větší viskozitu a více sušiny.

Nedozrávání rajčat je možno dosáhnout také inhibicí jednoho z genů pro syntézu etylenu s transgenem, který produkuje antimediatorem RNA. Etylen je plynný rostlinný hormon, který spouští mimo jiné kaskádu procesů vedoucích ke zrání plodů. Pokud se v průběhu vývoje plodů etylen v příslušnou dobu netvoří, plody nečervenají a nedozrávají a zůstávají na keřích velké a zelené. Je možné je sklídit všechny najednou, bez poškození je transportovat a ještě po transportu delší dobu skladovat. Jestliže mají dozrát, dají se do kontejneru, do kterého se vpustí etylen. Ke spotřebiteli se dostanou plody v optimální kvalitě, čerstvě dozrálé a nepoškozené.

Hormon etylén vyžaduje specifické receptory pro citlivost a přenos signálu po směru reakce. Nově byly genetické manipulace biosyntézy etylénu zaměřeny na identifikaci genu kódujícího tento specifický receptor. Gen *Etr1-1* kóduje mutovaný receptor, který kóduje dominantní necitlivost k etylénu u *A. thaliana*, a způsobuje významné zpoždění ve zrání plodů u rajčete a petúnie.

2.7. Pylová sterilita

Praktický význam pylové sterility v klasických šlechtitelských postupech spočívá především v nuceném cizosprašení pro produkci heterózního osiva. Při tvorbě transgenních odrůd se často objevuje požadavek, aby transgen nebyl přenášen pylem, tedy požadavek pylové sterility. Pylová sterilita využitelná ve šlechtění (jaderně-cytoplazmatický typ s obnoviteli fertility) neexistuje u všech odrůd kulturních rostlin a je tedy žádoucí, aby transgenóze přinesla široce využitelné systémy. Takové systémy jsou v současné době asi čtyři. Pylová sterilita podmíněná transgenózí je sporofytického typu stejně jako klasický jaderný typ pylové sterility, ale je dominantní. Po křížení pylově sterilních dominantních homozygotů s recesivními pylově fertilními homozygoty vznikají pylově sterilní heterozygoti. Pokud však jsou plody a semena produktem plodiny (kukuřice, rajčata řepka), je třeba, aby rostliny F₁ generace byly úplně fertily. Proto druhý partner křížení musí mít gen, který funguje jako obnovitel fertility.

První systém využívá chimérického genu pro barnázu z *Bacillus amyloliquefaciens*. Barnáza je extracelulární vysoce aktivní nukleáza této bakterie, která degraduje jak RNA, tak DNA. Je syntetizována jako neaktivní pre-proenzym, k jehož jedné úpravě dochází při opuštění bakteriální buňky a odstranění signálního peptidu. Teprve vně bakteriálních buněk dochází ke druhé úpravě a vzniku aktivního enzymu. V bakteriálních buňkách současně existuje vnitrobuněčný inhibitor, protein barstar, který má 89 aminokyselin. Příslušný gen byl rovněž klonován. Upravený zkrácený gen pro barnázu (zbavený sekvencí, jež jsou u vzniklého proteinu upravovány) byl zařazen za promotor specifický pro tapetovou vrstvu buněk tabáku (označen TA29) a vnesen transgenózí do genomu tabáku a řepky olejné. Tím způsobil selektivní destrukci tapetových buněk prašníků a následně degeneraci pylových zrn. Stejný vliv měl i chimérický gen pro ribonukleázu T1 z *Aspergillus oryzae* s promotorem TA29. Pokud se použije obdobným způsobem v jiné transgenní linii gen barstar se stejným promotorem, pak tato linie může působit obdobně jako obnovitel fertility při klasické cytoplazmaticko-jaderné pylové sterilitě.

Jaderně podmíněná pylová sterilita byla získána u *Petunia hybrida* bloádou syntézy flavonoidů v prašících, která vedla k předčasnému zastavení vývoje pylu. Bylo toho dosaženo jednak transgenózí, jednak antimediatorem genem a jednak kosupresí, tedy vnesením transgenu pro chalkonsyntázu, jehož přítomnost vedla k potlačení vlastního

jaderného genu pro chalkonsyntázu. Tento enzym katalyzuje první krok syntézy prekurzorů flavonoidů. K obnovení fertility byly flavonoidy aplikovány na bliznu nebo jako příměs pylu.

Třetí systém nebyl zatím použit v transgenní odrůdě. Pylové sterility bylo dosaženo expresí genu *rolC* *Agrobacterium rhizogenes* řízeného promotorem 35S. Chimérický konstrukt podmiňoval u transgenních rostlin některých druhů (brambor, *Arabidopsis thaliana*) pylovou sterilitu. K jejímu využití u kulturních rostlin je třeba ještě další gen – obnovitel fertility rostlin F₁ generace. Jako tento gen slouží gen, který produkuje antimediatorovou RNA k mRNA genu *rolC*. U tabáku se projeví negativní morforegulační vlivy transgenu. Rostliny byly nižší a měly sníženou apikální dominanci a obsah chlorofylu v listech.

Čtvrtý systém byl rovněž využit u tabáku. Je to inducibilní systém destrukce specifických rostlinných pletiv. Je založen na aktivitě genového produktu genu *E. coli argE*, který mění netoxickou látku N-acetyl-fosfinotricin na herbicid fosfinotricin. U rostlin, který nesou tento gen, k jehož expresi dochází specificky v tapetálních buňkách prašníků, je tvorba pylu blokována po postřiku rostlin netoxickou koncentrací N-acetyl-fosfinotricinu.

2.8. Modifikace barvy květu

Vnášení genů pro nové cesty biosyntézy flavonoidů a antokyanů umožňuje navozovat změny barvy květů. Bylo dosaženo celé řady změn barvy květů, především u rodu *Petunia*. Vnesením genu pro nový enzym biosyntézy antokyanů (dihydroflavonol-4-reduktázu) bylo dosaženo nové (cihlově červené) barvy květů petúnie. Jiný typ změn květních barv je vnesení genů pro antimediatorovou RNA enzymu pro chalkonsyntázu, který zprostředkovává jeden z prvních kroků biosyntézy antokyanů. Výsledné zbarvení nebo absence zbarvení květů závisí na expresi transgenu v různých částech květu. Pokud je transgen exprimován jen v některých částech květu, pak jsou tyto části bezbarvé a ostatní barevné. Tím může docházet ke vzniku zajímavých, dekorativních vzorů zbarvení květů.

2.9. Odolnost vůči stresovým faktorům

Je známo několik typů transgenů, které zvyšují odolnost rostlin k suchu a k nízkým teplotám. Jeden z nich je gen *SacB* z *Bacillus subtilis*. Tento gen kóduje enzym levansukrázu, který podmiňuje syntézu a akumulaci fruktanů. Transgen má promotor 35S a jeho kódující sekvence navíc signální sekvenci pro přenos enzymů do mitochondrií. Fruktany jsou molekuly polyfruktózy, které jsou produkovány některými bakteriemi a některými rostlinami. Rostlinné fruktany se skládají z 10 až 200 molekul fruktózy, bakteriální mohou být ještě podstatně větší. Jsou rozpustné, mají schopnost depolymerace a opětné polymerace, a tím ovlivňují stabilitu osmotické hodnoty při suchu a nízkých teplotách. Gen *SacB*, vnesený do genomu tabáku, zvyšuje toleranci k suchu. Zvýšenou toleranci k suchu podmiňuje také vnesení upraveného bakteriálního genu pro cholinehydrogenázu do rostlinného genomu. Tento enzym podmiňuje syntézu glycin betainu, což je rovněž osmotikum, které zvyšuje odolnost k suchu. Transgenní tabák je tak schopen růst na médiu s vysokým obsahem chloridu sodného.

Je známo, že v rostlinách je protein, který vycytává sůl a ukládá ji v oddělených kompartmentech uvnitř rostlinných buněk. Pokud je soli hodně, bílkovina nestačí všichni sůl zabudovat a volná sůl přítomná v rostlině naruší normální biochemické pochody v buňkách, a rostlina usychá. Bylo vytvořeno geneticky modifikované rajče vytváří více proteinu

transportujícího sůl a to rostlině dovoluje růst a produkovat plody i v případě, že je zalévána 50x slanější vodou než je běžné. Rajče odolává vodě, která obsahuje třetinu solí vody mořské. Pokus byl proveden ve skleníkových podmínkách r. 2002 a do tří let měly být na trhu komerčně využitelná rajčata s tímto znakem. Gen byl získán z *Arabidopsis* – *AtNHX1*.

Rajče je obecně považováno za citlivé k chladu. Stejně jako u arabisky konstitutivní exprese transkripčního faktoru CBF1 (C-repeat/dehydration response element binding factor 1) z rodiny AP2/EREBP, způsobuje zvýšenou toleranci k chladu, oxidativnímu stresu a vodnímu deficitu u rajčete a řepky olejky.

2.10. Transgenoze pro nové typy využití rostlin

Transgeny pro protilátky

Geny pro monoklonální protilátky je možno vnést do rostlinného genomu. Nemusí obsahovat celý lehký a celý těžký řetězec, ale jen jejich variabilní oblasti (Fab – fragmenty). Využití transgenních rostlin pro produkci monoklonálních antibiotik bylo poprvé publikováno r. 1989. Pro produkci celé protilátky je třeba vnést do rostlinného genomu gen pro lehký řetězec i gen pro těžký řetězec. IgG, které se nacházejí jako protilátky v seru, jsou vylučovány do mezibuněčných prostor. Úseky, které jsou schopny vázat antigeny, tvoří jen malou část celé molekuly. K imunitní odpovědi stačí, aby rostlinné buňky syntetizovaly tyto úseky (Fv – domény).

Předpokládá se, že rostliny by mohly být zdrojem nejlacinějších protilátek. Kromě toho bylo prokázáno, že rostliny budou vhodné pro pasivní imunizaci, spočívající v požívání transgenních rostlin, obsahujících fragmenty protilátek. Např. protilátky proti *Bacillus mutans* (původce zubního kazu) působí průkazně proti této bakterii. Protilátky využitelné v průmyslu mohou být ukládány v semenech rostlin a tam dlouhodobě skladovány, pokud nebudou izolovány.

Prvním příkladem produkce funkční protilátky rostlinou (tabák) byl myší imunoglobulin IgG1. Tvorba protilátky se skládala ze dvou kroků. Nejdříve byly vytvořeny dvě transgenní linie tabáku vždy s jedním genem pro těžký nebo pro lehký řetězec. V druhém kroku byly kříženy dvě rostliny produkující odlišný řetězec a byl vytvořen hybrid mající v genomu oba geny a produkující kompletní protilátku v listech, kde byla součástí proteinů (1,3%).

V roce 1999 bylo oznámeno, že firma Monsanto vyprodukovala rostlinné protilátky proti herpesvirům. Pokusným objektem byla sója. Byly získány čtyři typy rostlin, které produkovaly H řetězec, L řetězec, J (angl. joining; nezbytný pro tvorbu dimerů) řetězec a sekreční komponentu. Teprve křížením jednotlivým rostlin byl vytvořen čtyřnásobný hybrid produkující kompletní protilátku.

Rostlinné vakciny

Transgenní rostliny mohou produkovat proteiny, které jsou vlastní lidským patogenům napadajícím epiteliální membrány. Jedná se o bakterie a viry způsobující nachlazení, ale také ty, které jsou přenášeny kontaminovanými potravinami nebo pohlavním stykem. Vakciny účinné proti těmto infekcím stimulují mukózní imunitní systém k produkci imunoglobulinů

IgA. Imunitní odpověď vzniká v buňkách epitelu respiračního a trávicího traktu. Transgenní rostliny, u nichž v jedlých pletivech dochází k produkci antigenů, mohou být využity jako levné „potravinové vakciny“. K imunizaci dochází požíváním čerstvé zeleniny nebo jiných rostlinných produktů. Transgeny využitelné jako vakciny budou s největší pravděpodobností introdukovány do genomů tabáku a bramboru. Jsou to tyto transgeny:

- (1) Protein spaA z *Bacillus mutans*. Tato bakterie se vyskytuje v ústní dutině člověka a je hlavní příčinou zubního kazu. V listech transgenního tabáku tvoří tento protein asi 0,02% proteinů listů.
- (2) Povrchový antigen hepatitis B (HBsAg). Hrubý extrakt listů tabáku obsahuje 0,01% tohoto proteinu z celkového množství proteinů listů.
- (3) Termolabilní enterotoxin B z *E. coli* a podjednotka toxinu B cholery. Enterotoxin (LT) z *E. coli* je multimerní protein, který je strukturně, funkčně i antigenními vlastnostmi podobný toxinu cholery (CT).
- (4) Fúzní protein CTB-inzulin. V hlízách transgenních brambor dochází k tvorbě inzulinu a podjednotky B toxinu cholery, která umožňuje transport inzulinu do lymfoidních tkání.

2.11. Transgeny pro průmyslově nebo zemědělsky významné enzymy

Produkce biodegradovatelných polyesterů

Hlavním nedostatkem syntetických polymerů (polyetylen, polyvinylchlorid) je jejich neomezená trvanlivost a z toho vyplývající problémy s jejich likvidací. Existují však polymery, které mají všechny dobré vlastnosti dnešních, až na to, že je běžné půdní bakterie rozloží. Bakterie jsou schopny syntetizovat polyestery jako např. polyhydroxybutyrát (PHB). Jeho tvorba je zprostředkována třemi enzymy a ty jsou kódovány třemi geny. Do genomu *Arabidopsis thaliana* byly introdukovány tři upravené bakteriální geny, které mají všechny promotor 35S. Rostliny produkují PHB a ten se hromadí v listech, v buněčných inkluzích v cytoplazmě, vakuolách i buněčném jádře. Tvoří však pouze 0,14% sušiny. Akumulace PHB se silně zvyšuje, jestliže je dopravován do chloroplastů. Potom tvoří asi 14% sušiny. Pro vlastní průmyslovou produkci se předpokládá, že tento polymer bude produkován v plastidech hlíz bramboru. Pro tento účel by byly vhodné již existující transgenní brambory, které neobsahují škrob. Uvažuje se rovněž o akumulaci v semenech. Rostlinné části akumulující PHB nebudou vhodné ke konzumaci.

Exprese transgenů pro fytázu

Fytáza je enzym, který podmiňuje degradaci kyseliny fytové a ta je hlavní zásobní formou fosforu v semenech. V semenech rostlin se fytáty syntetizují a akumulují v zásobních orgánech, v dělohách a endospermu. Fytáza se syntetizuje při klíčení semen, štěpí fytát a uvolňuje se fosfát, který je zužitkován rostlinou při klíčení. Semena obilovin mají fytázy. Jsou však považovány za antinutriční faktor, protože vážou prvky jako je vápník, železo a zinek a ty jsou nedostupné pro využití živočichy. Fytáza z *Aspergillus niger* přeměňuje kyselinu fytovou na další formy a dochází k přeměně až na anorganický fosfor. U přežvýkavců je fytát

z potravy rozkládán fytázou bakterií, které jsou v trávicím traktu. U drůbeže nebo prasat tento mechanismus není. Potrava je doplňována o fosfáty, ale ty jsou zužitkovány jen asi z 1/3.

Je snaha nahradit mikrobiální fytázu fytázou produkovanou rostlinami, do jejichž genomu byl introdukován bakteriální gen pro fytázu. Bylo dosaženo exprese genu pro fytázu z *Aspergillus niger* u tabáku a uvažuje se i o biotechnologické produkci enzymu prostřednictvím rostlinných buněk.

Transgenní rostliny pro fytoremediaci

Některé transgenní rostliny jsou schopny měnit toxickou formu dvoumocných iontů rtuti na mnohem méně toxickou formu elementární rtuti. Tyto rostliny se využívají při fytoremediaci, tedy odstraňování toxických látek z prostředí (ovzduší, půda a vzduch). Při bioremediaci se k tomuto účelu využívají nižší organizmy jako jsou bakterie a houby.

Zajímavou skupinu transgenů tvoří geny pro metalothioneiny. Jsou to živočišné proteiny, které mají schopnost pevně vázat některé toxické těžké kovy, jako např. kadmium, olovo a rtuť. Cílem praktického využití transgenních rostlin s těmito geny je získat rostliny, které by sloužily jako „odpadní koše“ a čistily půdu při rekultivacích. Umožní odstranění toxických látek z půdy tím, že budou ve zvýšené míře akumulovány v rostlinách a ty pak zlikvidovány. Druhým způsobem využití transgenů tohoto typu je zajištění jejich exprese v kořenech. Toxické kovy se zadržují a hromadí již v kořenech a nedostávají se do dalších částí rostlin, které jsou určeny pro konzumaci. Modelovými druhy do jejichž genomů byly introdukovány příslušné geny jsou *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* a *Brassica* sp.

Další typy transgenů

V Kanadě se podařilo připravit transgenní řepku produkující vysoké procento erukové kyseliny, která je jednak surovinou pro výrobu nylonu a jednak výchozím materiálem pro fotografický a jiný chemický průmysl. Významná je i jiná transgenní řepka používaná pro výrobu bionafty. Bionafta má z ekologického hlediska dvojí význam. Její případný únik neohrožuje vodní toky a prostředí, protože je snadno biologicky rozkládána, a jejím spalováním se jen vrací do oběhu oxid uhličitý, který řepka z ovzduší při svém růstu odčerpala. Není tedy skleníkovým plynem navíc.

Využití dalších transgenů je zaměřeno na modifikace vlastností požadovaných u rostlinných surovin tak, aby bylo zlepšeno jejich průmyslové zpracování a hospodářské využití. Tak byly např. vypěstovány odrůdy kávy bez kofeinu, aniž je pak nutno použít extrakčních způsobů dekofeinace. Další skupinou je získání geneticky modifikovaných kvasných organismů zejména pro vinařství, lihovarnictví, pro pekařský a pivovarnický průmysl.

Uvedené typy transgenních rostlin patří k „první generaci“ a transgeny, které jsou v nich využity, byly obvykle získány před deseti a více lety. Mnohonásobně více typů transgenních rostlin je připraveno ke schválení jako nové odrůdy nebo schvalovací proces již probíhá. Ještě nesrovnatelně více transgenů se studuje v laboratořích. Využívají se jako nástroje ke studiu regulace a struktury rostlinného genomu, různých fyziologických a morfologických procesů a dalších základních otázek molekulární biologie rostlin. Laboratoře tohoto typu jsou i u nás. Na Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích se problematikou transgenoz rostlin zabývají již téměř dvacet let. U části transgenů rostlin se během

experimentální práce ukazuje, že by mohly být využitelné ke zlepšení dědičného základu kulturních rostlin. Takovéto klonované geny se pak stávají středem zájmu nejen akademických pracovišť, ale také biotechnologických firem. Ty obvykle provádějí velice široký výzkum každého genu a všech jeho možných příznivých i nepříznivých projevů dříve, než získají transgenní linii kulturní rostliny, která by se po dalším ověřovacím a schvalovacím řízení mohla stát novou transgenní odrůdou.

Odrůda musí projít velice přísným souborem zkoušek podle zákonných norem týkajících se geneticky modifikovaných organismů. Na ně pak navazují podrobné ověřovací testy povinné u každé nové odrůdy. Protokoly z výsledků všech těchto studií, které provádějí vědecká pracoviště v různých klimatických zónách, tvoří velmi rozsáhlou dokumentaci, na jejímž základě komise odborníků rozhodují o registraci odrůdy a o jejím uvolnění k prodeji jako technické plodiny, krmiva nebo potraviny. Rozhodující však je, zda zemědělci budou novou odrůdu kupovat a vysévat a to budou jen tehdy, bude-li její pěstování výhodnější nežli u existujících odrůd a bude-li její produkt na trhu žádan.

Některé cíle genové inženýrského šlechtitelství spadají do oblasti biosyntézy specifických produktů (zesilovače vůně u rajčat, enzymy pro potravinářský průmysl, vitamíny, aminokyseliny, lidský serralbumin, cyklodextrin u brambor, enkefalin u řepky, polyhydroxybutyrát jako surovina pro výrobu biodegradovatelných umělých hmot u huseníčku, barva květů a jiných rostlinných částí u petúnií a kukuřice). Prakticky významná jsou studia indukce pylové sterility transformací. Genové inženýrství u dřevin se soustřeďuje zejména na topoly (rychlost růstu, odolnost vůči herbicidům), jabloně (zakořeňování řízků) a vlašský ořech.

Některé příklady nových typů rostlin:

Hlavní potravina asi pro 4 miliardy lidí je rýže. Hlavním problémem především v chudých zemích je nedostatek vitamínu A. Symptodem nedostatku je šeroslepost až úplná slepota. Uvádí se, že asi 124 mil. dětí má nedostatek vitamínu A, slepota postihuje až 0,5 mil. dětí ročně. Proto je snaha obohatit rýži o β karoten (provitamin A). Prostřednictvím genetických modifikací byla provedena introdukce tří genů do genomu rýže, jejichž exprese vedla k tvorbě provitaminu v endospermu. Byly to geny *psy* (phytoen syntáza) z narcisu s promotorem specifickým pro endosperm, *ctrl* (karoten desaturáza) z bakterie *Erwina* a gen pro enzym lykopen β -cyklázu. Tato modifikovaná rýže má žlutooranžovou barvu, proto se jí říká zlatá rýže. Další modifikace u rýže má za cíl zvýšit obsah železa.

U řepky olejné a sóje je hlavním cílem genetických modifikací zvýšení obsahu vitamínu E.

Arabidopsis hraje důležitou roli při odhalování genů, které mají příznivý dopad na nutriční kvalitu plodin. Cestou pozičního klonování genů byl u *A. thaliana* identifikován gen *VTE3* kódující syntézu enzymu 2-metyl-6phytylbenzoquinol methyltransferázy, který je součástí biosyntézy vitamínu E. Gen pro tento enzym byl dlouho hledán, protože se předpokládalo, že přeměňuje δ -tocopherol na více biologicky aktivní γ -tocopherol. δ -tocopherol se akumuluje v relativně vysoké koncentraci u sóje a dalších olejnin. Transgenní rostliny sóje s exprimovaným genem *VTE3* během tvorby semen již neakumulují δ -tocopherol, tak zlepšují nutriční hodnotu sójového oleje. Koexprese *VTE3* a *Arabidopsis* γ -tocopherol methyltransferázy *VTE4* v semenech způsobuje 100% akumulaci α -tocopherolu, který je biologicky nejvíce aktivním tokopherolem. Tak introdukce dvou genů *Arabidopsis* zlepšuje nutriční kvalitu sójového a řepkového oleje ve srovnání se standardem.

Brazilskými vědci byly identifikovány rostliny kávovníku *Coffea arabica* téměř bezkofeinové (3 keřiky z 3000) v důsledku spontánních mutací. Problém se řeší efektivněji genetickými modifikacemi. Pěstují s již rostliny, kterým chybí klíčový gen pro tvorbu kofeinu, a produkují

o 50 až 70% této látky méně. Toto snížené množství je i v zrnkách budoucí kávy. Podařilo se tak vytvořit produkt, který má srovnatelné množství kofeinu jako u produktů, u nichž je kofein odstraňován fyzikálními metodami. Kofein se extrahuje ze zrn organickými rozpouštědly nebo kyslíčným uhlíkatým. První způsob je levný, ale používaná rozpouštědla jsou karcinogenní, a v kávě mohou zůstat stopy rozpouštědla. CO₂ je neškodný, ale aby se z plynu stalo rozpouštědlo, musí je třeba jej zkapalnit a zchladit. Celý proces je energeticky a technologicky náročný a výsledný produkt prodražuje. Často se odstraňují i aromatické látky.

U GM plodiny je káva bez kofeinu bez jakýchkoliv vedlejších nákladů. Kávovníkové keře se sníženým obsahem kofeinu patří ke kávovníku *Coffea canephora*. Na tvorbě kofeinu v rostlinách se podílí tři enzymy. Genetická modifikace je založena na zabránění exprese jednoho genu

3. Zdravotní a ekologická bezpečnost transgenních rostlin

3.1. Geny pro rezistenci k antibiotikům

V souvislosti s transgenními rostlinami se objevilo množství obav o zdraví, o zachování přírodního prostředí a dalších.

Ke snadnému nalezení buněk, kam byl úspěšně vnesen transgen, se používá gen způsobující necitlivost k určitému antibiotiku, tzv. selektovatelný gen. Selektovatelným genem je obvykle gen pro rezistenci ke kanamycinu nebo gen pro rezistenci k hygromycinu, gen s rostlinnými regulačními úseky. Tyto geny kódují enzymy neomycinofosfotransferázu (NPTII) nebo hygromycinofosfotransferázu (HPT), které inaktivují příslušná antibiotika. Do explantátových kultur pro vypěstování celých rostlin ze segmentů se pak přidává kanamycin př. hygromycin a v kulturách rostou jen transgenní pletiva, netransformovaná odumírají.

Vzniká však námitka proti používání transgenních rostlin, které tyto geny obsahují. Kanamycin se používá i v lékařství a aktivní enzym NPTII je přítomen v pletivech transgenních rostlin. Enzym ale není toxický. U žádného druhu bakterií, kvasinek, rostlin nebo živočichů se toxicita neprojevila. V předběžných testech u pacientů trpících nádorovým onemocněním, u nichž mělo být použito genové terapie, byl protein NPTII aplikován infuzí. Ani tak nebyly zjištěny žádné nepříznivé důsledky, které by svědčily o toxicitě proteinu. Nebylo také jasné, zda by nemohlo požití transgenních rostlin obsahujících aktivní gen *nptII* působit neúčinnost perorální aplikace kanamycinu. Biotechnologická firma Calgene prováděla pokusy s krmením hlodavců transgenními rajčaty s exprimovaným genem *nptII*. Nebyly při nich zjištěny žádné nepříznivé vlivy. Při inaktivaci kanamycinu potřebuje NPTII zdroj energie, adenosintrifosfát, ale ten je v trávicím traktu přítomen jen v nedostatečném množství. V trávicím traktu je protein NPTII rychle rozštěpen. Totéž platí i pro veškerou DNA a možnost, že by se snad nějaký gen mohl potravou přenést do genomu konzumenta, je naprosto vyloučeno.

Také se objevila obava, že by se gen pro rezistenci ke kanamycinu mohl přenést do bakterií a že by mohly vzniknout kmeny bakterií rezistentní ke kanamycinu. Člověk však denně konzumuje ve své potravě hojnost bakterií rezistentních ke kanamycinu (asi 10⁶). Kromě toho většina střevních bakterií se vyskytuje až v tračníku, zatímco většina DNA je rozložena již v žaludku nebo v tenkém střevě. Mezi střevní mikroflórou každého člověka je celkem asi

1012 bakterií rezistentních ke kanamycinu. I kdybychom tedy připustili, že přenos DNA kódující sekvenční genu pro rezistenci ke kanamycinu a napojení za regulační sekvenční jsou v zásadě možné, zvýšení počtu střevních bakterií rezistentních ke kanamycinu by bylo zcela nezjistitelné pro velkou převahu bakterií přirozeně rezistentních.

Další obava veřejnosti se týká toho, zda by rozšíření genu *nptII* v přírodních společenstvech bakterií, vzniklé v důsledku nepředvídatelných rekombinací mezi bakteriemi a rostlinným genomem, nevedlo k poškození prostředí. Zatímco existence nepředvídaných rekombinací mezi bakteriálním a rostlinným genomem nebyla nikdy dokázána, bylo dokázáno, že bakterie rezistentní ke kanamycinu jsou všeobecně přítomné v populacích půdních bakterií. Přitom se geny pro rezistenci ke kanamycinu a další geny volně vyměňují mezi různými bakteriálními kmeny přirozenou konjugací bakterií.

3.2. Geny kódující alergenní proteiny

Některé potraviny obsahují alergeny a tyto alergeny jsou hlavně bílkoviny. Existuje asi 0,5% lidí, kteří jsou alergičtí na některé potravní alergeny. Tyto alergeny se dělí asi do 9 skupin (lískové oříšky, sója, ořechy, pšenice, rýže, mléko, vejce, ryby, korýši, měkkýši). Jsou to zejména některé frakce proteinů semen luštěnin, ale také obilovin, jako je pšenice, rýže, lískové ořechy, para ořechy, některé glykoproteiny pylu, ale i živočišné alergenní proteiny v mléce, rybách, korýších, a další. Proteiny, které jsou potenciálně alergenní, mají značnou odolnost k trávicím enzymům a to lze laboratorně modelovat. Lze také provést imunologickou předpověď, které jsou alergenní (metoda RAST/ELISA). Proteiny, které jsou produkty transgenů již použitých v současných odrůdách, byly testovány pokud jde o jejich degradovatelnost trávicími enzymy i o alergenní vlastnosti a všeobecně byly klasifikovány jako nealergenní. Často z nedostatku jiných argumentů pro nebezpečnost geneticky modifikovaných organismů je citován případ, kdy pro zvýšení obsahu aminokyseliny nezbytné pro živočichy (methioninu) se jako krmivo pro dobytek pokusně vyvinula sója s genem získaným z paraořechů. Ukázalo se, že s tímto genem se přenáší i alergie na paraořechy. Ačkoli tato plodina nebyla určena ke konzumaci jako potravina, její vývoj byl zastaven. Přesto je tento případ neustále připomínán. Nebere se v úvahu, že např. přibližně 95% léčiv je v některé fázi svého vývoje vyřazeno pro nežádoucí účinky a že to nikdo nepoužívá jako argument proti oně dvacetině úspěšných.

3.3. Geny kódující toxiny

Existuje celá řada toxických proteinů jak rostlinných tak živočišných, jejichž geny byly klonovány a z různých důvodů jsou vnášeny do rostlinného genomu. Jsou to např. geny pro toxiny záškrtu nebo cholery. Zatímco první působí letalitu rostlinných buněk, v nichž se projevuje, takže jeho šíření je vyloučeno, u druhého dochází ke zvýšení rezistence vůči rostlinným infekcím. Přesto není myslitelné jeho použití v odrůdách a žádná schvalovací komise, v jejíž kompetenci je schvalování polních pokusů, by polní pokus s takovými transgenními rostlinami nepovolila. Dále existují klonované geny pro různé rostlinné lektiny, z nichž některé jsou pro obratlovce toxické (ricin). K samozřejmým předpokladům akreditace každé laboratoře pracující na transgenozí rostlin patří dokonalá izolace transgenních rostlin od prostředí a postupné uvádění do prostředí až po příslušném povolení. Uvedené transgenní rostliny nebudou nikdy pěstovány mimo chráněné prostory, tím méně používány jako hromadně pěstované odrůdy.
