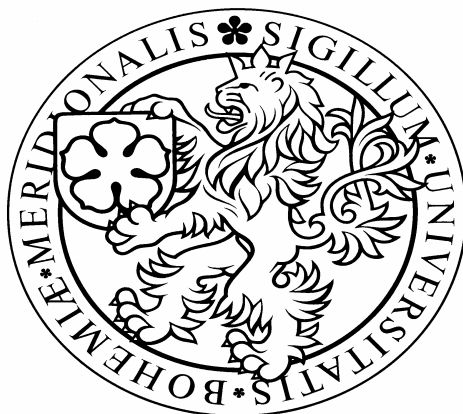


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra genetiky, šlechtění a výživy



GENETICKY MANIPULOVANÉ PRODUKTY Z KRMIV V JÁTRECH KUŘAT

Bakalářská práce

Pavλίna Bucková

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Hanusová
Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Řehout, CSc.

Tato práce byla financována z finančních prostředků z VZ MSM 6007665806

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat mé školitelce Ing. Lence Hanusové za vstřícnost a ochotu, poskytnutí důležitých informací a času který mi věnovala. Vladimíře Fořtové, BBus (Hons) za technickou pomoc. Mé velké dík patří Ing. Janu Fouskovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad. A celé mé rodině, za jejich podporu v dobách studia.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 18.4.2008

.....

Pavλίna Bucková

Anotace

Úkolem této práce je zvládnout detekci genově manipulovaných produktů (GMP) z krmiv v játrech kuřat, v jejichž dietě byla tato krmiva obsažena. Byly použity 2 GMO plodiny: insekt rezistentní Bt-kukuřice - herbicid tolerantní Roundup Ready sója. Obě plodiny jsou důležitým komponentem krmných směsí pro drůbež. Detekce bude prováděna molekulárně biologickými metodami. V závěru práce by měla být vyhodnocena potenciální rizika pro konzumenty.

Klíčová slova : GMP, Bt-kukuřice, Roundup Ready sója

Annotation

Aim of this thesis is to manage detection of genetically modified products (GMP) from feed in liver of chicken, which diet contained GMP feed. Two GMO crops were used for feed, insect-resistant Bt-maize and herbicide – tolerant Roundup Ready soybean . Both crops are important components of chicken feed. The detection will be practise by molecular biological methods. The possible dangers for consument should be evaluated in conclusion.

Keywords: GMO, Bt-corn, Roundup Ready soya

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY – JEJICH DEFINICE A VZNIK	10
2.2. GENETICKY MODIFIKOVANÉ ROSTLINY	11
2.2.1. Přehled některých transgenů, používaných pro tvorbu GMO	12
2.2.1.1. Transgenozé geny pro toleranci k herbicidům.....	12
2.2.1.1.1. Transgen pro rezistenci k glyfozátu.....	12
2.2.1.1.2. Transgen pro rezistenci k fosfinitricinu	13
2.2.1.1.3. Další herbicidy, pro které vytváříme tolerantní transgenní rostliny:	14
2.2.1.2. Transgenozé geny pro rezistenci k hmyzím škůdcům	14
2.2.1.2.1. Transgen pro δ -endotoxin <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
2.2.1.2.2. Geny rostlinného původu způsobující rezistenci k hmyzím škůdcům.....	16
2.3. CHARAKTERISTIKA V ČR DVOU NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH GM PLODIN	17
2.2.2. Roundup Ready sója	17
2.2.3. Bt – kukuřice MON 810	18
2.3. NAKLÁDÁNÍ S GENETICKY MODIFIKOVANÝMI ORGANISMY	18
2.3.1. Způsoby nakládání s GMO	19
2.3.2. Rizika geneticky modifikovaných rostlin	20
2.4. METODY MOLEKULÁRNÍ GENETIKY VYUŽITÉ PŘI DETEKCI GMO.....	21
2.4.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
2.4.2. Elektroforéza nukleových kyselin.....	22
3. METODIKA A MATERIÁL.....	24
3.1. MATERIÁL	24
3.2. METODIKA	26
3.2.1. Izolace DNA z jater kuřat	26
3.2.1.1. Kontrola izolace DNA	26
3.2.2. Detekce fragmentů DNA	27
3.2.2.1. PCR pro kontrolní geny	27
3.2.2.2. PCR pro transgeny	27

3.2.2.3. Vyhodnocení získaných výsledků.....	28
4. VÝSLEDKY	29
4.1. IZOLACE DNA	29
4.2. PCR S PRIMERY PRO KONTROLNÍ GEN GHCH1	29
4.3. DETEKCE	29
4.4. PŘEHLED POZITIVNÍCH VZORKŮ	31
5. DISKUZE	32
6. ZÁVĚR	34

1. ÚVOD

Používání GMO se rozvíjí rychlým tempem nejenom v základním výzkumu. Prostřednictvím geneticky modifikovaných organismů jsou připravována léčiva, diagnostika, enzymy pro potravinářskou výrobu a podobně. V zemědělství se rozšiřuje pěstování geneticky modifikovaných plodin zejména v Americe a v Asii. Jedná se převážně o sóju, kukuřici, bavlník a řepku. Nejpoužívanější modifikace představují tolerance ke širokospektrým herbicidům a odolnost vůči hmyzím škůdcům (tzv. Bt plodiny, produkující toxiny z *Bacillus thuringiensis*). Dalšími vlastnostmi, na které se zaměřuje výzkum GM plodin, je například odolnost vůči virům, lepší využívání dusíku, odolnost vůči suchu nebo zasolení půdy, změny ve složení olejů nebo škrobu atd. Kromě zemědělských plodin jsou pro komerční využití v Evropě schváleny i geneticky modifikované karafiáty se změněnou barvou květu (geny z petúnie). Pokusně jsou pěstovány i stromy, např. topol pro technické účely a virus-rezistentní ovocné stromy. V laboratořích a sklenících jsou k výzkumným účelům i pro možné komerční využití modifikovány např. petúnie, tabák nebo chryzantémy.

Tento zvyšující se nárůst s sebou přináší otázku bezpečnosti potravin, pocházejících z GMO. Pozornost lidí se stále více zaměřuje na možné negativní, ale i pozitivní důsledky zařazování potravin a krmiv do výživy lidí a zvířat, které pocházejí z geneticky modifikovaných plodin. Pěstování GM plodin by mohlo vést rovněž ke snížení biologické rozmanitosti zemědělských plodin, pokud by se komerční pěstování zaměřilo pouze na malý počet GM odrůd. Na druhou stranu, negativní důsledky na biologickou rozmanitost má každé intenzivní zemědělství. Rizikem je také možný vznik rezistentních plevelů, pokud by docházelo k používání stále stejných herbicidů. Další nevyjasněnou skutečností je tzv. horizontální přenos transgenu z podsklizňových zbytků v půdě na jiné organismy, nebo možnost přenosu a kontaminace nemodifikovaných plodin při opylení.

Nevíme, jestli se negativa spojená s GMO neprojeví až ve vzdálenější budoucnosti. Co však říci můžeme je to, že GMO určené k výrobě potravin prochází velmi přísným schvalovacím procesem, ve kterém jsou všestranně testovány. Tedy, aspoň podle dostupných možností dnešních technologií. Zjišťuje se, jestli přenosem genu nedošlo ke změně složení rostliny (hlavně těch částí, které jsou dále využívány ke zpracování a konzumaci), provádí se testy na toxicitu, alergenicitu, kontrolují se výživové vlastnosti

atd. Rostliny jsou také několik let pěstovány v různých přírodních podmínkách, aby se ověřilo, jestli jsou vlastnosti modifikované odrůdy ustálené. Další fází je zkrmování těchto plodin zvířaty. A jen v případě, že všechny testy dopadnou dobře, je možno použít tyto plodiny pro lidskou výživu.

Průběh testování bezpečnosti GM plodin spočívá v tom, že nejprve se s novou bílkovinou provádějí zkoušky na stravitelnost v simulované žaludeční šťávě. Další velmi často citovanou starostí je alergie. K jejímu testování je dohodnut systém zkoušek, který začíná tím, že se složení bílkoviny srovná se známými kombinacemi aminokyselin, které vyvolávají alergii. Pak se sleduje vliv na živočichy.

V této práci se budeme zabývat vlivem Bt kukuřice a Round Ready sójou na drůbež. Obě plodiny jsou důležitým komponentem krmných směsí pro drůbež. Jedná se o insekt rezistentní Bt kukuřici a Roundup Ready sóju, jež je tolerantní k látce glyfozátu (účinnému prvku herbicidu Roundup). Sledování zařazení modifikované kukuřice a sóji do výživy drůbeže by nemělo ovlivnit užitkové vlastnosti ani kvalitu produkce. Zkrmování GMO hospodářským zvířatům je spojeno s mizivými riziky. Bezpečné jsou z hlediska lidské výživy a lidského zdraví i živočišné produkty zvířat krmných krmiv z GMO. V současnosti nelze prokázat jakýkoliv rozdíl v živočišných produktech zvířat, krmných GMO, a produkty získanými od zvířat, která GMO nekonzumují.

C1

Detekce genově manipulovaných produktů z krmiv v játrech kuřat. Zařazení modifikované kukuřice a sóji do výživy drůbeže, zkoumání, zda ovlivňují geneticky modifikované plodiny užitkové vlastnosti a kvalitu produkce kuřat. Zkoumání zdravotní nezávadnosti těchto krmiv. Vyvrácení spekulací, že není riziko používání geneticky modifikovaných rostlin, a využití GM organismů a produktů pro lepší vývoj lidstva.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Geneticky modifikované organismy – jejich definice a vznik

Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je životaschopný organismus, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací, tj. cílenou změnou části dědičné informace. Tato změna se přenáší i na potomstvo. Přesné znění zákona č. 78/2004 říká, že geneticky modifikovaným organismem rozumíme organismus, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací provedenou postupy, které budou zmíněny. Do této skupiny se řadí např. geneticky modifikované rostliny, mikroorganismy, houby, živočichové - transgenní myši, hospodářská zvířata a další (Flachowsky *et al.*, 2005).

Příprava rekombinantních molekul DNA a klonování genů je základem genového inženýrství (GI). Zahrnuje úpravy deoxyribonukleové kyseliny (DNA) s cílem pozměnit dědičné vlastnosti příjemce. Technika, kterou se připravují rekombinantní molekuly DNA, je provedena biochemickými a molekulárně-biologickými postupy. Tyto vytvořené kombinace většinou v přírodě neexistují. Spojení cizorodé informace ve formě fragmentu DNA s vektorovou molekulou plazmidu, fága nebo viru umožňuje přenos exogenní DNA do buňky procesem transformace, transfekce nebo transdukce. Genové inženýrství umožňuje izolaci, purifikaci a studium jednotlivých genů ve větším množství, jejich expresi a opětné zavedení do buňky, a tím přípravu genové banky, která je spíše genetickým materiálem individua než druhu (www.transgen).

Na rozdíl od klasických genetických postupů, jakými jsou např. křížení nebo indukce mutací, které se využívají k získávání jedinců daného druhu s novými vlastnostmi, dovolují techniky genového inženýrství přenášet geny do taxonomicky vzdálených organismů a překonávat tak přirozené mezidruhové reprodukční bariéry. Transgenní organismy se proto vyznačují vlastnostmi, které by se u daného druhu v průběhu evoluce ve volné přírodě pravděpodobně nikdy nevytvořily. S využitím metod mutagenese *in vitro* lze geny navíc cíleně upravovat a vzájemně kombinovat, což vede ke tvorbě pozměněných nebo nových produktů. Gen upravený metodami genového inženýrství a přenášený do hostitelského organismu se označuje jako transgen. Organismus, jehož genom obsahuje stabilně začleněný transgen, se označuje jako transgenní nebo též geneticky modifikovaný organismus (zkr. GMO). Proces vytváření transgenních organismů se označuje jako transgenoze (Rosypal, 2002).

2.2. Geneticky modifikované rostliny

Nejvýznamnější oblastí ve vývoji nových GMO jsou především geneticky modifikované rostliny, které se používají pro výrobu potravin a krmiv. Využití těchto rostlin se rozšiřuje po celém světě. Cílem je získat takové odrůdy, které jsou odolné proti suchu, slané vodě, rezistentní vůči škůdcům a chorobám.

S využitím metod mutagenese in vitro lze geny navíc cíleně upravovat a vzájemně kombinovat, což vede ke tvorbě pozmeněných nebo nových produktů.

První geneticky modifikovanou plodinou bylo rajče, které vyvinula společnost Calgen pod názvem FlavSavrs. V roce 1992 jej začala testovat společnost Food and Drug Administration, která neprokázala žádná zdravotní rizika u tohoto rajčete, proto bylo uvedeno na trh v USA. Tato odrůda byla klasickým šlechtěním upravena tak, aby plody dobře vypadaly a daly se bez poškození dobře skladovat a upravovat, chuťově však nebyly nijak kvalitní (www.gmo-compass).

Další příklady geneticky modifikovaných rostlin, využívaných v současné době jsou uvedeny v tabulce 1.

kukuřice s kombinovanou modifikací pro rezistenci vůči hmyzu (Bt endotoxin) a toleranci k herbicidu glufosinátu amonnému (Bt – 176)
kukuřice s kombinovanou modifikací pro rezistenci vůči hmyzu (Bt endotoxin) a toleranci k herbicidu glufosinátu amonnému (linie Bt-11)
kukuřice tolerantní vůči herbicidu glufosinátu amonnému (linie T 25)
Kukuřice rezistentní vůči hmyzu (Bt endotoxin) (linie MON 810)
karafiáty se změněnou barvou květu
karafiáty s prodlouženou trvanlivostí
řepka olejka tolerantní k herbicidu glufosinátu amonnému, hybridní (MS1 x RF1)
řepka olejka tolerantní k herbicidu glufosinátu amonnému, hybridní (MS1 x RF2)
sojové boby tolerantní k herbicidu glyfosátu
tabák tolerantní k herbicidu bromoxynil

Tab. 1 Příklady geneticky modifikovaných rostlin využívaných v současné době.

2.2.1. Přehled některých transgenů, používaných pro tvorbu GMO

2.2.1.1. Transgenozní geny pro toleranci k herbicidům

Nejvíce registrovaných pokusů s transgenními rostlinami se týká tolerance k herbicidům. Herbicidy tvoří největší část používaných pesticidů u běžně pěstovaných plodin, neboť bez ochrany proti plevelům není možno žádnou kulturní plodinu pěstovat.

Využití transgenních rostlin tolerantních k herbicidům znamená u řady plodin snížení spotřeby těch herbicidů, které se aplikují preventivně do půdy (preemergentních pesticidů). Pěstování transgenních rostlin by mělo i pozitivní přínos pro ekonomiku státu, hlavně v zemědělství. Několika násobně by se zmenšili náklady na nákupy pesticidů a herbicidů. Také umožňují nahradit klasické herbicidy typy, které se v půdě lépe odbourávají a jsou šetrnější k životnímu prostředí, k pracovníkům v zemědělství i ke konzumentům (www.biotech).

Transgeny pro rezistenci k herbicidům nepředstavují žádné riziko pro přírodní společenstva (kromě plevelů), živočichy ani člověka. Možnost přenosu tolerance k herbicidům na příbuzné plevelné druhy přirozeným sprašováním je extrémně nízká. Pokud by snad na určitém území ke vzniku populace určitého druhu plevelů rezistentních k určitému herbicidu přece jen došlo, znamenalo by to jen, že tam bude nutno používat po určitou dobu jiné odrůdy a jiné herbicidy, s odlišným mechanismem účinku (Ondřej, 2002).

2.2.1.1.1. Transgen pro rezistenci k glyfozátu

Herbicid glyfozát je po chemické stránce terciální amin, N-(fosfonometyl)glycin (Comai *et al.*, 1983; Comai *et al.*, 1985). Blokuje syntézu aromatických aminokyselin tím, že inhibuje enzymatický krok biosyntézy šikimátu. Tento herbicid působí na všechny rostoucí rostliny, je tedy neselektivní. Jeho herbicidní aktivita je podmíněna inhibicí enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát-syntázy (EPSP). Šikimátová dráha probíhá v buňkách chloroplastů.

Rostliny po styku s herbicidem glyfozátem vadnou, hnědnou a nakonec dochází k úhynu (Fujimoto *et al.*, 1993).

Existují tři typy transgenů podmiňující rezistenci ke glyfozátu

1. Transgen pro enzym EPSP, který řídí nadprodukcii tohoto enzymu (klonované geny *Petunia* a *Arabidopsis*) (Horsch *et al.*, 1988; Shah *et al.*, 1986).

Cílem je, aby v buňce bylo tolik molekul EPSP, aby i za předpokladu, že bude veškerý glyfozát vázán na EPSP, stále zbýval volný EPSP, který vykazuje dostatečnou katalytickou aktivitu (Ondřej, 2002). Někteří odborníci však mají pochybnosti, protože intenzita růstu rostlin s tímto transgenem byla podstatě snížena. Důvodem je, že se glyfozát hromadí v apikálních pupenech a tam jej nestačí zvýšené množství enzymu plně vázat. Důsledkem bylo zpomalení růstu (Klee *et al.*, 1987).

2. Transgen pro enzym EPSP, který kóduje modifikovaný enzym EPSP (geny klonovány z bakterií *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* a z rostlin *Petunia hybrida* a *Arabidopsis thaliana*) (Comai *et al.*, 1983; Comai *et al.*, 1985) je tolerantní ke glyfozátu. Bateriální gen je označen jako *aroA*, protože řídí syntézu aromatických aminokyselin (Comai *et al.*, 1983).

3. Transgen pro glyfozát oxidoreduktázu (GOX) (klonován z bakterie *Achromobacter*)
Zde dochází k vnesení transgenů pro enzym, který daný herbicid metabolizuje. Netransgenové rostliny takový enzym nemají. Proto musejí být vneseny geny pro degradaci glyfozátu, ty jsou přítomny v mnoha mikroorganismech (*Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes spp.*) (Ondřej, 2002).

2.2.1.1.2. Transgen pro rezistenci k fosfinitricinu

Herbicid fosfinitricin – chemicky 4-[hydroxy-(metyl)fosfinoyl]-D,L-homoalanin patří mezi neselektivní herbicidy. Jeho působení spočívá v blokování glutaminsyntázy. Tento enzym je klíčový v metabolismu dusíku, který detoxikuje amoniak za vzniku glutamátu, který je dalším vstupním prvkem do dalších metabolických drah rostlin.

V důsledku toho dochází k nahromadění amoniaku ve vysokých koncentracích, což vede k blokádě fotosyntézy a k rozpadu chloroplastů. Po aplikaci herbicidu dochází po několika hodinách k poklesu fotosyntetické aktivity a do několika dnů rostliny zežloutnou a odumřou. (Drobník, 2002)

Bakterie *S. hygroscopicus* a *S. viridochromogenes* také současně syntetizují enzym fosfinitricin-N-acetyltransferázu (PAT), který acetyluje volnou NH_2 – skupinu fosfinitricinu, a tím jej inaktivuje. Gen, který kóduje fosfinitricinacetyltransferázu,

klonovaný ze *S. hygrosopicus* (Thompson *et al.*, 1987) je v literatuře označován *bar* a gen ze *S. viridochromogenes* (Strauch *et al.*, 1988) je označován *pat*. Enzymy kódované oběma těmito geny mají 183 aminokyselin a jejich primární struktura vykazuje značnou homologii (83%) (Wehrmann *et al.*, 1996). Oba geny byly včleněny do vektorových plazmidů bakterií *Agrobacterium tumefaciens* pro transformaci rostlin (DeBlock *et al.*, 1987; Wohlleben *et al.*, 1988) a jsou využity v již existujících odrůdách řepky a kukuřice povolených v USA a Kanadě. (Ondřej, 2002)

2.2.1.1.3. Další herbicidy, pro které vytváříme tolerantní transgenní rostliny:

- herbicidy, které blokuje enzym acetolaktátsytázu (ALS)
- herbicid bromoxynyl, který u rostlin blokuje fotosystém II
- herbicid fenmedifan, působí toxicky na specifické proteiny fotosyntézy
- herbicid triazin, inhibuje fotosyntézu

Většina herbicidů blokuje důležité enzymy pro tvorbu nepostradatelných látek rostlin. Proto se snažíme nacházet takové studie, které i přes jejich používání kulturním rostlinám neškodí. Nejvíce se využívají odrůdy rezistentní ke glyfozátu, který inhibuje enzym účastnící se na biosyntéze aromatických aminokyselin.

2.2.1.2. Transgenozé geny pro resistenci k hmyzím škůdcům

V tabulce 2 je přehled některých základních, a pro nás velmi důležitých, geneticky modifikovaných rostlin rezistentních k hmyzím škůdcům. Geny, které se vkládají do rostlin jsou *CryIA(a)*, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*, *CryIIIa*. Ty kódují specifickou bílkovinu, která škodí hmyzu při styku s ní.

rostlina	gen	hmyz
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>CryIA(a)</i> <i>CryIA(b)</i> <i>CryIA(c)</i> <i>CryIIA</i>	<i>Manduca sexta</i> <i>Heliotus virescens</i> <i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>Helicoverpa zea</i> <i>Spodoptera exitus</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>CryIA(b)</i> <i>CryIA(c)</i>	<i>M. sexta, H. virescens,</i> <i>H. zea,</i> <i>Kriteria lycopersica</i> <i>S. exitus, M. sexta</i>
<i>Zea mays</i>	<i>CryIA(b)</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Manduca sexta</i>
<i>Brassica oleracea</i>	<i>CryIA(c)</i>	<i>Plutella xylostella</i>
<i>Brassica napobrassica</i>	<i>CryIA(c)</i>	<i>Pieris rapae</i>
<i>Brassica napus</i>	<i>CryIA(c)</i>	<i>P. xylostella, T. ni, H. zea,</i>
<i>Picea glauca</i>	<i>CryIA(c)</i>	<i>Plodia interpunctella</i> <i>Cydia pomonella</i> <i>Amyelois transitella</i>
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>CryIA(c)</i> <i>CryIIIA</i>	<i>M. sexta</i> <i>Phthorimea operucella</i> <i>O. nubilalis</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i>

Tabulka č.2: Příklady geneticky modifikovaných rostlin rezistentní proti hmyzím škůdcům využívaných v současné době.

2.2.1.2.1. Transgen pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis byl poprvé objeven v Japonsku v podniku, kde se pěstoval bourec morušový. Bakterie tam působila úhyn motýlů. Pak byl znovu izolován z populace moučných červů v Durynsku (Adang, M. J. and Staver M. J., 1985). Jedná

se o grampozitivní bakterii, která při sporulaci syntetizuje insekticidní krystalický protein. Struktura proteinu je tvořena z jednoho nebo několika typů proteinových subjednotek. Protoxinů neboli δ -endotoxinů bylo již charakterizováno přes 150 a každý z nich měl poměrně úzké spektrum insekticidní resistance.

B. thuringiensis s aktivitou δ -endotoxinu proti broukům byly izolovány v r. 1987 (Sekar *et al.*, 1987). Aby získaly entomopatogenní aktivitu, musí být δ -endotoxiny rozpuštěny při alkalickém pH ve střevě hmyzu a aktivovány proteázami, které specificky odštěpují C-terminální vysokomolekulární část (130 kDa) protoxinu a několik aminokyselin na N-konci. Vzniká výsledný menší polypeptid (60-70 kDa), který je teprve aktivním toxinem. Toxin se specificky váže na apikální část kartáčkové membrány epitelu střev citlivého hmyzu. K navázání dochází ve dvou fázích, z nichž první je reverzibilní a druhá ireverzibilní a předpokládá vazbu toxinu na receptor. Po inzerci toxinu dochází k destrukci střeva. Celý děj je podobný plazmolýze (Sekar *et al.*, 1987).

Specifičnost účinku je dána nejen selektivní afinitou enzymaticky upraveného proteinu k vazebným doménám na membránách střevního epitelu, ale částečně i kyselostí prostředí zažívacího traktu a specifičností trávicích proteolytických enzymů. Díky poměrně úzkému rozsahu působnosti δ -endotoxinu, toxin působí jen na citlivé škůdce a ne na užitečný hmyz a transgenní rostliny, se mohou stát součástí integrované ochrany rostlin (Ondřej, 1999).

Bakterie *B. thuringiensis* se používaly déle než 30 let v USA jako bioinsekticidy k ochraně polních plodin před více než 300 druhy hmyzu. Preparáty jsou ale drahé a bakterie se udrží v porostu jen několik dní. Postřik je proto třeba opakovat (Adang *et al.*, 1985; Adang *et al.*, 1993).

Transgenoze genem pro *B. thuringiensis* nepředstavuje stoprocentní ochranu před škůdci. Chrání z 90-95 % a předpokládá se, že zbytek škůdců se zlikviduje občasným postřikem pesticidy. Někdy se tyto GM rostliny považují za „zelený pesticid“ (Roush, 1997).

2.2.1.2.2. Geny rostlinného původu způsobující rezistenci k hmyzím škůdcům

Již dnes je známo několik dalších mechanismů bránících rozšíření rezistence, které využívají rostlinných genů. Syntéza antimetabolických proteinů, které narušují proces trávení hmyzu, je obrácená strategie, kterou rostliny široce využívají. Takové proteiny

mohou být syntetizovány konstitutivně, zvláště v pletivech, která jsou často napadána hmyzem, jejich syntéza může být také indukována teprve mechanickým poškozením, k jakému dochází při okusu hmyzem. Transgeny pro inhibitory amyláz a proteáz v transgenních rostlinách inhibují enzymy v trávicím traktu hmyzu, a tím působí jejich úhyn (Thomas *et al.*, 1995). Dalšími takovými geny mohou být geny, kódující lektiny, jejichž účinkem je vázání toxických cukrů a tím způsobují otravu organismu. V neposlední řadě lze do této skupiny zařadit geny pro chitinázy a tryptofandekarboxylázy.

2.3. Charakteristika v ČR dvou nejdůležitějších GM plodin

2.2.2. Roundup Ready sója

Sója, která je díky cizímu genu odolná proti herbicidu glyfozátu Roundup (tzv. Roundup Ready soja čili RR soja), se pěstuje v baště této plodiny (v USA) na 90% ploch (www.transgen)

Tuto rostlinu vyvinula společnost MONSANTO. Jedná se o linii GTS 40-3-2, jež je tolerantní k herbicidu glyfosátu (účinné látky herbicidu Roundup) a která obsahuje uvedené DNA sekvence: gen CP4 EPSPS (z *Agrobacterium* sp. kmen CP4 – o kterém je známo, že v přírodě přenáší své geny do rostlin a způsobuje tumory na rostlinách), promotor 35S (P-E35S) z mozaiky kvěťáku, část genu z *Petunia* hybrida zajišťujícího tvorbu tranzitního peptidu (CTP) pro transport enzymu EPSP do chloroplastu a terminátor NOS 3 z *Agrobacterium tumefaciens* (Padgett *et al.*, 1995).

Důvodem vložení těchto genů do rostliny bylo překonání negativních účinků glyfozátu. Glyfozát (N-fosfonometyl glycin) inhibuje aktivitu enzymu EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy), který zprostředkovává syntézu aromatických aminokyselin. Nefunkční enzym blokuje syntézu aromatických aminokyselin, což vede ke smrti rostliny. Tento enzym se vyskytuje také u bakterií, hub a zelených rostlin, u živočichů se nevyskytuje. Rostliny tolerantní k přípravku Roundup, mají funkci rostlinného EPSPS nahrazenou upraveným EPSPS enzymem. K přenosu cizích vektorů do DNA rostlin se používá speciálních přenosných vektorů, např. plasmidů, kterým je možno jejich genetickou informaci upravovat (včleňovat a vyřazovat cizí DNA) a přenášet je různými metodami do DNA rostliny. Enzym EPSPS je kódován

v DNA, syntetizován v cytoplasmě, ale odtud se přemísťuje do chloroplastů, kde vykonává onu důležitou, nepostradatelnou chemickou reakci pro rostlinu. Pořadí aminokyselin v bílkovinné molekule vlastního enzymu EPSPS je u všech organismů velmi podobné.

Konstrukt pro přeměnu běžné sóje v odrůdu necitlivou glyfozát tedy obsahuje tyto úseky DNA: signál pro rostlinu, 2x část genu z petúnie, 2x gen pro EPSPS, gen zneškodňující kanamycin, signál plastidu, gen pro beta glukuronidázu (GUS), další signál pro rostlinu. Jak vidíme, některé geny se zdvojují. Celkový konstrukt má konečnou velikost něco málo pod 10 tisíc „písmen“, tedy párů basí, což je asi 0,05% celkové DNA rostliny. (Kadlec, nepublikováno)

2.2.3. Bt – kukuřice MON 810

Bt - kukuřice je transgenní rostlina s rezistencí proti hmyzím škůdcům kódující bílkovinu δ -endotoxin bakterie *Bacillus thuringiensis*.

Tato linie byla získána vnesením genu pro protein Cry1A(b) z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* do kukuřičného kultivaru Hi-II. Zmíněný gen kóduje tvorbu δ -endotoxinu, který je toxický zejména pro larvy řádu *Lepidoptera* a *Coleoptera*, kam patří i zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*). Vnesený gen je kontrolován CaMV 35S promotorem (promotor z viru květákové mozaiky) a NOS terminátorem (z *Agrobacterium tumefaciens*). Přítomnost intronu hsp70 kukuřice v kódující části transgenu zaručuje vysokou úroveň exprese Cry1A(b) genu (Archer *et al.*, 2000).

Cry1A(b) gen byl jedním z prvních genů, použitých pro transformaci rostlin. Insekticidní působení Cry1A(b) proteinu je umožněno přítomností speciálního vazebného místa v epiteliální membráně trávicího traktu náchylného hmyzu. Po navázání Cry1A(b) proteinu je střevní membrána několika způsoby poškozena, zejména je zasažen transportní mechanismus (Pla *et al.*, 2006).

2.3. Nakládání s geneticky modifikovanými organismy

Česká komise pro nakládání s geneticky modifikovanými a produkty byla jmenována ministrem životního prostředí k 2.1.2001, na základě Zákona č. 153/2000 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty a o změně některých zákonů. (Ministerstvo životního prostředí, 2006). Tvoří ji 16 členů, kteří jsou odborníky

na geneticky modifikované rostlin, živočichy a mikroorganismy ve vztahu k zemědělství, ekologii, zdravotnictví a legislativě. Úkolem této komise je: hodnotit žádosti o zapsání do seznamu uživatelů GMO a do seznamu GMO, provádět odborné kontroly pracovišť GMO a příslušné dokumentace a navrhováním metod pro zkoušky geneticky modifikovaných organismů. Je poradním orgánem Ministerstva životního prostředí a podává mu svá doporučení. Rozhodnutí o GMO vydává Ministerstvo životního prostředí v součinnosti s Ministerstvem zemědělství a Ministerstvem zdravotnictví ([www.biotrin](http://www.biotrin.cz)).

2.3.1. Způsoby nakládání s GMO

Způsobem jak nakládat s geneticky modifikovanými rostlinami nám ukládá od 1.1.2001 Zákon č. 153/2000 o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty a o změně některých dalších zákonů. Garantem zákona je Ministerstvo životního prostředí, ve spolupráci s Ministerstvem zemědělství a Ministerstvem zdravotnictví (Doubková, 2007). Podle tohoto zákona každá právnická osoba, která hodlá nakládat s GMO, musí podat žádost o zapsání do seznamu uživatelů. Současně geneticky modifikovaný organismus, se kterým se bude nakládat, musí být zařazen do seznamu geneticky modifikovaných organismů.

Existují tři typy nakládání s GMO:

- 1) uzavřené nakládání (v laboratořích, kultivačních místnostech, fermentorech, uzavřených sklenících nebo zvěřincích)
- 2) uvádění do prostředí (např. pokusné pěstování transgenních rostlin v přírodě), kdy již není možno zabránit nekontrolovatelnému šíření, ale jeho objem je omezen. Jde o polní pokusy s geneticky modifikovanými rostlinami na přesně definovaném pozemku, které podléhají přísným pravidlům, sklizené rostliny a semena se po skončení pokusu musí stanoveným způsobem zlikvidovat. Pozemek je i po následujících několik let kontrolován (Stejskal *et al.*, 2005)
- 3) uvádění do oběhu, kdy transgenní organismus je volně dostupný (prodej) a jeho další šíření není legislativně omezeno

2.3.2. Rizika geneticky modifikovaných rostlin

Jako každý živý organismus i GM rostliny a živočichové se rozmnožují a dále šíří. Jakmile se uvolní do prostředí, nelze je vzít zpět. A tak otázkou, na kterou také dodnes neznáme odpověď, zůstávají vztahy geneticky modifikovaných organismů k dalším složkám ekosystému. I když jsou agroekosystémy druhově velmi chudé, např. ve srovnání s přirozenými ekosystémy mokřadů nebo deštných pralesů, přesto dosud neznáme všechny interakce, které v nich probíhají a do nichž geneticky modifikované organismy vstupují. Tím méně je možné odhadnout, jak geneticky modifikované organismy zapůsobí na ostatní organismy ekosystému. V praxi se může stát, že se vlivem působení geneticky modifikovaných organismů přeneše odolnost proti postřikům i na plevel a hmyz (Flachowsky *et al.*, 2005).

Používání ingrediencí a produktů z geneticky modifikovaných rostlin v potravě pro lidi a zvířata se stále objevují sporné otázky. Na příklad, zda není porušena vyživovací hodnota potravin, zda je možný negativní vliv geneticky modifikovaných produktů na zdraví zvířat a produkty z nich či nepřechází rekombinantní DNA a nové proteiny do zažívacího traktu a tkáně lidí, zvířat (Chesson *et al.*, 2005).

Existují důkazy, že pěstování některých GM rostlin v přírodě způsobuje úhyn housenek motýlů a larev užitečného hmyzu. Vznikají tzv. super plevele odolné vůči herbicidům, které nutí používat postřiky v daleko větším rozsahu (Kadlec, nepublikováno).

Další studie potvrdily, že larvy euroasijské babočky jsou citlivé na Bt-toxin jako larvy motýla monarchy (Felke and Langenbruch, 2004). Výzkumy dále naznačují, že Bt plodiny mohou rovněž poškozovat organismy živící se hmyzem, který je toxinům vystaven. Laboratorní studie, uskutečněné ve Švýcarsku, mimo jiné dokázaly, že úmrtnost larev zlatoočky obecné (*Chrysoperla carnea*) je po konzumaci zavíječe voskového živeného GM kukuřicí je téměř dvojnásobná (Hillbeck *et al.*, 1999). Dalším a důležitým problémem jsou Bt-toxiny vylučované kořeny Bt rostlin (Saxena *et al.*, 2002). Tyto toxiny se rychle nerozkládají, nýbrž zůstávají v půdě, jsou absorbovány do půdních částic a zůstávají fyziologicky aktivní po několika dalších měsících (Zwahlen *et al.*, 2003).

Kumulativní účinky nepřetržitého dlouhodobého pěstování GM plodin jsou velmi důležitým faktorem a měly by být zahrnuty do rizikové analýzy. I u tradičních druhů nehybridních odrůd rostlin již došlo k tomu, že např. pyl z GM řepky opyloval jinou

řepu ve vzdálenosti dvou kilometrů (Timmons *et al.*, 1995). Podle odpůrců GMO představují tyto plodiny skrytou hrozbu nejen pro přírodu, ale i pro zdraví člověka.

Studie jejich dlouhodobých účinků na lidské zdraví nebyly nikdy zpracovány a bezpečnost GM potravin je podle nich tedy sporná. Řada odpůrců GMO varuje před GM rostlinami obsahující geny odolné vůči antibiotikům, což může negativně ovlivnit účinnost antibiotik v lidském těle. Typickým příkladem je GM kukuřice, která je nositelem genu zodpovídajícím za rezistenci vůči antibiotikům a je součástí krmných směsí pro výkrm kuřat. Tento gen by mohl být teoreticky transferován z trávené kukuřice do střevních bakterií, které tak získají rezistenci vůči antibiotikům. Skutečností je, že transfer takového genu do střevních bakterií kuřat krmných GM kukuřicí nebyl dosud prokázán (Flachowsky *et al.*, 2005).

2.4. Metody molekulární genetiky využité při detekci GMO

2.4.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je relativně jednoduchá, ale velmi efektivní metoda detekce malého množství DNA sekvence. Její podstatou je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' OH-konce směřují proti sobě (Jakubowski *et al.*, 2006).

Tato technika umožňuje exponenciální zmnožení (amplifikaci) DNA *in vitro*, které je založeno na unikátních vlastnostech termostabilní Taq-DNA-polymerasou (izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*). Rozpoznání specificky krátkých oligonukleotidů (primerů) hybridizovaných na jedno řetězcové cílové DNA vede k následné polymerizaci DNA a selektivní namožení již dříve známých fragmentů DNA (Heller, 2003).

V PCR se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři cykly: denaturace dvouvláknové DNA, připojení primerů k odděleným vláknům DNA, syntéza nové dvouvláknové DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (Bezunk, 2007).

Cyklická reakce o třech teplotních fázích:

- Denaturace : při 94° C je dvouvláknová DNA denaturovaná na dvě jednovláknové templátové molekuly DNA
- Annealing : při 30-65°C je nasedání oligonukleotidových sond (primerů) na obou stranách cílové DNA
- Elongace : při 65-75°C dochází k syntéze nových vláken pomocí termostabilní DNA polymerasou od 5' konce ke 3' konci

Reakce se provádí v zařízení nazývaném thermocycler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů. V průběhu 20-30 cyklů dochází ke zdvojnásobení a exponenciálnímu nárůstu počtu úseků na DNA ohraničených místy, k nimž se připojily primery. Výsledným produktem reakce PCR jsou fragmenty DNA definované délkou analogické restriční fragmentům, jejichž přítomnost v reakční směsi se prokazuje např. stanovení jejich velikosti elektroforézou v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu (Knippers, 1985).

2.4.2. Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě (Šmarda, 2005).

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu, označovaná jako elektroforetická pohyblivost, je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti.

Pro proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit vhodným barvivem. Nejčastěji se používá ethidiumbromid, který se vmezeruje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak patrné jako proužky, jejichž intenzita je přímo úměrná koncentraci DNA. Ethidiumbromid lze použít rovněž pro barvení RNA; intenzita jejího zbarvení je však nižší. Pokud jsou molekuly nukleových kyselin radioaktivně označeny, znázorní se polohy proužků na gelu

autoradiograficky. K detekci poloh fragmentů lze využít rovněž hybridizaci se značenou sondou (Rosypal, 2002).

3. METODIKA A MATERIÁL

3.1 Materiál

V roce 2006 byly vytvořeny tři výzkumné experimenty, jejichž cílem bylo ověřit vliv zkrmování geneticky modifikované Roundup Ready sóji linie GTS 40-3-2 a geneticky modifikované kukuřice MON 810. Sledováno bylo, jaký mají vliv na uživatelské vlastnosti brojlerových kuřat, na jejich vybrané fyziologické ukazatele a možnost transferu transgenní DNA do tkáně kuřat.

Ve všech třech pokusech byly vytvořeny tři pokusné a jedna kontrolní skupina. Do pokusných skupin a i kontrolní skupiny bylo zařazeno vždy 100 kusů jednodenních nesexovaných brojlerových kuřat ROSS 308. Při chovu kuřat byla použita hluboká podestýlka z drcené slámy. Krmivo bylo podáváno do tubusových krmítek, voda do kloboukových napáječek a vše bylo monitorováno. Krmivo a voda bylo podáváno ad libitum.

Krmné směsi byly shodného komponentového a živinového složení a byly podávány všem skupinám, tak i kontrolní skupině. Rozdíly mezi krmnými směsmi byly v různém zastoupení množství modifikované sóji a kukuřice. Byly rozděleny dle fází výkrmu na směsi BR1 (1. – 21. den výkrmu), BR2 (22. – 37. den výkrmu) a BR3 (38. – 42. den výkrmu).

První pokusná skupina měla zařazenou modifikovanou extrudovanou Roundup Ready sóju, druhá pokusná skupina měla zařazenou GM kukuřici a třetí skupina měla zařazené obě dvě geneticky modifikované plodiny. Kontrolní skupina měla zařazené ve všech směsích pouze standardní geneticky nemodifikovanou sóju a kukuřici.

V tabulce č.3 je uvedeno složení použitých krmných směsí.

Složky	BR 1	BR 2	BR 3
Kukuřice – standard nebo GM	31,00	30,00	35,00
Extrudovaná sója – standard nebo GM	36,00	39,00	33,00
Pšenice	24,05	27,15	28,25
Rybí moučka 64 % NI	5,00	-----	-----
Dicalciumfosfate	2,00	2,30	2,20
CaCO ₃ (vápenec)	1,00	0,50	0,50
NaCl	0,25	0,35	0,35
Aminovitan BR 1 – 3	0,50	0,50	0,50
DL methionin premix 40%	0,20	0,20	0,20

Tabulka č.3 Obsahuje složky krmných směsí v %

Veškeré pokusy byly ukončeny ve 42. dni věku kuřat. Z každé skupiny kuřat bylo náhodně vybráno pět kohoutků, pět slepiček, u kterých u kterých byla při porážce z křídelní žíly odebrána a heparinizována krev pro stanovení hematologických ukazatelů.

Po porážce a vykrvení kuřat, byla zjištěna hmotnost jatečně opracovaného těla, jateční výtěžnost a hmotnost sleziny (*splen*), jater (*hepar*), ledvin (*rennes*) a srdce (*cor*), vše bylo řádně zaznamenáno pro statistické účely. Pro genotypizování byla při porážce odebrána heparizovaná krev a vzorky jater a ledvin od celkového počtu 120 kuřat (10 kuřat z každé pokusní i kontrolní skupiny x 3 opakování). Pro naše pokusy bylo využito po 5 vzorcích jater z každé pokusné skupiny – tj. celkem 20 vzorků.

3.2 Metodika

3.2.1 Izolace DNA z jater kuřat

Genomová DNA z jater byla izolována pomocí NucleoSpin Tissue kitu (Macherey-Nagel). Postup byl proveden podle protokolu výrobce, který je vždy přiložen u zakoupeného kitu. Před začátkem izolace musí být nejprve zahřán inkubátor nebo vodní lázeň na 70 °C a poté do něj vložen pro zahřátí pufr BE.

Vlastní postup izolace :

Z jater kuřat se odebral vzorek o hmotnosti 25 mg a byl vložen do eppendorfky, k tomu bylo přidáno 180 µl pufru T1 a 25 µl proteinázy K. Následně byl vzorek vortexován 10 sekund. Takto připravené vzorky se vložily do termostatu, kde se inkubovaly při 56°C po dobu 1 hodiny. Následně bylo přidáno 200 µl pufru B3. Vzorek byl důkladně promíchán a inkubován 10 min. při 70 °C. Poté bylo přidáno 210 µl 96 – 100% etanolu. Vzorek se přenesl do kolonky nové eppendorfky a vložen do centrifugy a stočen po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách. Suspenze z eppendorfky byla odstraněna a přidán byl 500 µl pufru BW. Opět bylo provedeno stočení 1 minutu při 11 000 otáčkách. Dále suspenze odstraněna a přidáno 600 µl pufr B5, vzorek stočen při 11 000 otáčkách po dobu 1 minuty, suspenze odstraněna a opět stočena při stejných otáčkách a čase. Kolonka byla přendána do nové eppendorfky a byl přidán eluční pufr BE o objemu 100 µl. Na chvíli se vzorek nechal inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě, opět stočení při 11 000 otáčkách 1 minutu. Kolonka se musí opět dát do nové eppendorfky, přidalo se 50 µl předehřátého elučního pufru BE a vzorek tkáně se nechal inkubovat 1 min/pokojové teplotě a opět stočen do nové eppendorfky. Nakonec byly vyzolované vzorky DNA uloženy při 4 °C.

3.2.1.1. Kontrola izolace DNA

Po izolaci byly provedeny dvě kontroly. První byla standardní elektroforéza pro genomovou DNA na 1,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem.

Druhou kontrolu představovala PCR pro růstový hormon kuřat. Použité primery pro tuto reakci byly: 5'-ATC CCC AGG CAA ACA TCC TC-3'(forward) (GCH1F) a 5'-CCT CGA CAT CCA GCT CAC AT-3'(reverse) (GCH1R).

Složení reakční směsi bylo následující: 2 µl 1x PCR pufru, 1,2 µl MgCl₂, 1 µl primery GCH1R and GCH1F, 2 µl dNTP's, 2 µl Taq, 1,3 µl DNA a 9,5 µl H₂O. PCR cyklus se skládal ze zahřátí na 4 min. při 94°C, následovaným 35 cykly složenými z 30 s při 94°C, 120 s při 60°C a 90 s při 72 °C (Kuhlein et al., 1997).

3.2.2. Detekce fragmentů DNA

Pro detekci GMO byly použity komerční kity *GMOIdent Roundup Ready*™ Soy (Eurofins - Gene Scan) and *GMOIdent MON810*™ Corn (Eurofins - Gene Scan). Každý kit obsahuje premastermix pro specifický transgen, RRS pro Roundup Ready sóju a YG-IR pro Bt kukuřici, a premastermix pro kontrolní geny, lektin u sóji a HMG gen u kukuřice.

3.2.2.1. PCR pro kontrolní geny

Nejprve byla provedena PCR pro kontrolní geny. Reakční směs byla následující: 19,9 µl premastermix pro lektin u sóji či pro HMG gen u kukuřice, po 1 µl primery GCH1R and GCH1F, 2 µl dNTP's, 2 µl Taq, 2 µl vyizolovaná genomová DNA a 17,3 µl H₂O. PCR reakce se skládala z 2 min. zahřátí při 94°C a 50 cyklů: 25 s při 94°C, 30 s při 62°C a 45 s při 60°C, po kterých následovaly 3 min. při 72 °C. Souběžně byly provedeny pozitivní a negativní kontroly. V případě pozitivní kontroly byla místo DNA vyizolované z jaterní tkáně kuřat použita genomová DNA dodaná jako součást komerčního kitu. Jako negativní kontrola byla použita reakční směs bez DNA, pouze s H₂O. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu, barveném ethidium bromidem.

3.2.2.2. PCR pro transgeny

V druhém kroku byla provedena PCR pro transgeny. Reakční směs byla následující: 19,9 µl premastermix s primery pro specifický transgen, po 1 µl primery GCH1R and GCH1F, 2 µl dNTP's, 2 µl Taq, 2 µl vyizolovaná genomová DNA a 17,3 µl H₂O. PCR reakce se skládala z 2 min. zahřátí při 94°C a 50 cyklů: 25 s při 94°C, 30 s při 62°C a 45 s při 60°C, po kterých následovaly 3 min. při 72 °C. Souběžně byly provedeny pozitivní a negativní kontroly.

Jako pozitivní kontrola je využíván vzorek, v jehož reakční směsi byla DNA vyizolovaná tkáň kuřat nahrazena genomovou DNA pro detekovaný transgen. Tato genomová DNA byla dodaná jako součást komerčního kitu. Negativní kontrolu tvoří tzv. slepý vzorek. V tomto případě je v reakční směsi DNA nahrazena H₂O. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu, barveném ethidium bromidem.

V obou případech detekce se pokusy prováděly v maximálním množství 5 vzorků s 1 pozitivní a 1 negativní kontrolou. Ve výjimečných případech se množství současně detekovaných vzorků snižovalo na 3 vzorky s 1 pozitivní a 1 negativní kontrolou.

3.2.2.3. Vyhodnocení získaných výsledků

Jako vzorky s pozitivním nálezem transgenů byly označeny takové vzorky, u kterých byla přítomnost transgenů detekována ve všech 3 opakováních genotypizace. Dále byly nalezeny vzorky, u kterých byla pozitivní detekce transgenů pouze v 1 nebo ve 2 opakováních genotypizace z celkového počtu 3 opakování genotypizace.

4. Výsledky

4.1. Izolace DNA

U všech 20 vzorků byla provedena standardní izolace DNA pomocí komerčního kitu. Přestože je kit NucleoSPin Tissue určen primárně pro izolaci z tkání savců, nebyly zjištěny žádné výraznější problémy s izolací DNA z tkání kuřat. Z hlediska kvality a množství vyizolované DNA nebyly zjištěny žádné kvantitativní ani kvalitativní rozdíly mezi kontrolními a pokusnými skupinami. Po izolaci DNA byla provedena kontrola pomocí elektroforézy v 1,5% agarozovém gelu, obarveném ethidium bromidem. Ani zde nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi kontrolní a pokusnými skupinami

4.2. PCR s primery pro kontrolní gen GHCH1

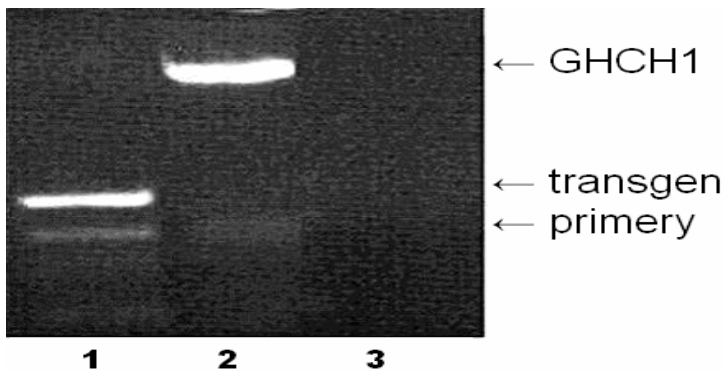
Pomocí PCR byl detekována přítomnost genu kuřecího růstového hormonu, jehož délka je 780 bp. Tento fragment byl detekován u každého testovaného vzorku pomocí elektroforézy v 1,5% gelu. Vzorky vyizolované DNA tedy nevykazují žádný rozdíl ani při PCR. V tomto ohledu nebyly zjištěny žádné rozdíly ani mezi kontrolní a pokusnými skupinami.

4.3. Detekce

Detekce byla prováděná metodou dvou multiplexních PCR reakcí, kde jako vnitřní kontrola byl použit výše zmiňovaný pár primerů pro gen GHCH1. Společně s ním byly nezávisle na sobě sledovány dva transgeny a kontrolní geny (Lecitin, HMG). Pomocí detekce genů pro lecitin (sója) a gen HMG (kukuřice) byl prováděn předběžný screening na přítomnost DNA z těchto rostlinných druhů v těle testovaných zvířat. V prvním multiplexu byla kombinace primerů pro GHCH1 a primerů pro kontrolní geny. V druhém, následném multiplexu pak byla použita následující sestava genů: primery pro GHCH1 a primery pro transgeny z Bt kukuřice a RR sóji. Přítomnost 780 bp ampliconu genu GHCH1 na gelu potvrzovala bezchybný průběh amplifikační reakce i

v případě nepřítomnosti fragmentu pro daný transgen nebo kontrolní gen. Kombinace fragmentu pro růstový hormon GHCH1 a fragmentu o délce 120 bp (v případě multiplexu pro kontrolní gen kukuřice), respektive 118 bp (v případě kontrolního genu pro sóju) dokazoval přítomnost rostlinné DNA ve sledované tkáni. Přítomnost fragmentů 92 bp a 128 bp u konkrétních vzorků v kombinaci s pozitivní kontrolou GHCH1 potvrdila přenos sledovaných transgenů z Bt kukuřice, respektive z RR sóji (viz obr.1 a 2). Celkový počet pozitivních záchytů je uveden v tabulce 5.

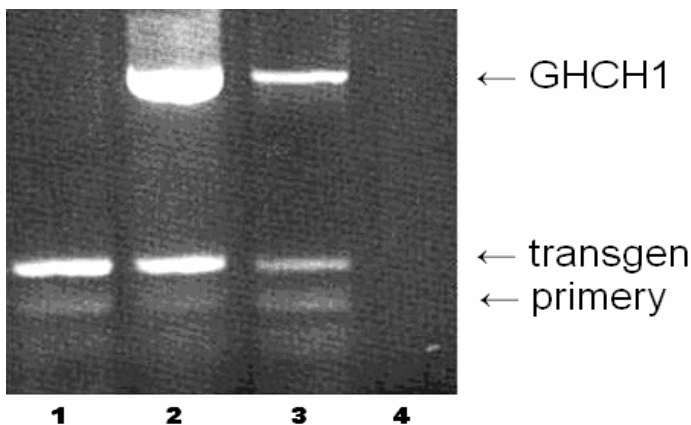
Obrázek č. 1 Detekce fragmentu Bt-kukuřice v játrech kuřat



Obr č.1:

- 1 - pozitivní kontrola na přítomnost transgenu ve vzorku,
- 2 - negativní vzorek, pouze GHCH1
- 3 - negativní kontrola

Obrázek č.2 Detekce fragmentu RR sóji v játrech kuřat



Obr č.2 :

- 1 - pozitivní kontrola na přítomnost transgenu ve vzorku
- 2 - pozitivní vzorek, přítomnost transgenu a gen GHCH1

3 - pozitivní vzorek, přítomnost transgenů a gen GHCH1

4 - negativní kontrola

4.4. Přehled pozitivních vzorků

U 20 sledovaných vzorků byla detekována přítomnost kontrolního genu z RR sóji u 18 vzorků. Z toho byl jeden vzorek pozitivní ve všech třech opakování. U zbylých 17 vzorků bylo pozitivní zachyt v 1 či ve 2 opakováních z celkového počtu 3 opakování. Pozitivní detekce na transgen z RR sóji byl zjištěn ve 3 vzorcích 1 či ve 2 opakováních z celkového počtu 3 opakování. Přítomnost kontrolního genu a transgenů z Bt kukuřice však nebyla potvrzena v žádném z případů (viz tabulka č. 5)

Tkáň	Játra
Počet izolovaných vzorků	20
Detekce sója kontrola	
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	1
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	17
Celkem pozitivní vzorky	18
Detekce sója transgen	
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	0
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	3
Celkem pozitivní vzorky	3
Detekce kukuřice kontrola	
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	0
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	0
Celkem pozitivní vzorky	0
Detekce kukuřice transgen	
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	0
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	0
Celkem pozitivní vzorky	0

Tabulka č. 5 obsahuje přehled o pozitivních vzorcích

5. Diskuze

U kuřat v trávicím traktu je kyselé prostředí, jsou zde přítomny žaludeční kyseliny a mikroorganismy, ti svou mikrobiální aktivitou napomáhají také ke kyselému pH. Vlivem těchto látek v kyselém prostředí dochází k rychlejší degradaci nukleových kyselin (DNA). Nukleové kyseliny se štěpí na kratší řetězce, nebo mění svou chemickou strukturu. Některé fragmenty DNA přijaté potravou, jsou v některých případech střevním epitelem absorbované a některé ne. V tkáních jsou často nalézány úlomky fragmentů DNA z rostlin.

Flachowsky a Aulrich v roce 2007 zjistili, že fragmenty rostlinné DNA se mohou objevovat v tkáních (svaly, orgány) zvířat a lidí. Zkoumali, zda přechází transgenní rostlinná DNA z potravy do tkání zvířat, ale fragmenty nebyly nalezeny. Roku 2001 Khumnirdpetch a kolektiv uskutečnili pokus na třech skupinách brojlerů. Každé skupině bylo podáváno krmivo o jiném složení. První krmná směs neobsahovala geneticky modifikovanou (GM) sóju, druhá obsahovala GM sójou a třetí obsahovala geneticky modifikované organismy. Výsledek přítomnosti transgenů rostlin byl negativní. Tento výzkum však pokračuje dál, dokud se neprokáže 100% nezávadnost u lidí a zvířat.

V případě našeho testování bylo nalezeno 18 pozitivních případů netransgenů a 3 u transgenů. To však neznamená, že se musí jednat o transgeny z GM rostlin. Mohou být i jiné příčiny pozitivních nálezů. To lze odůvodnit některými z následujících faktorů: např. infekce v trávicím traktu, viry a bakterie, transgeny z ovzduší, znečištění vzorků při odebrání, kontaminace rukou, nesprávné zacházení při izolaci DNA, nesterilní prostředí a jiné. A jak by mohlo ke všemu dojít:

➤ **Infekce v trávicím traktu**

Pokud se v těle zvířete (respektive trávicím traktu) objeví infekce, ať je to z jakéhokoliv důvodu, dochází k imunologické reakci. Kdy bílé krvinky „vyčytávají“ cizorodé látky, mezi které může patřit i transgenní DNA. Proto při izolaci DNA z krve může dojít k vyzolování transgenů a námi testovaný vzorek se zdá být pozitivní.

➤ **Transgen z ovzduší**

Ke znečištění tkáně transgenem mohlo dojít primárně, a to při samotném odebrání vzorku. Pokud nebyly dodrženy takové podmínky u daného Při manipulaci s krmivem dochází k prášení, tím se kontaminuje vzduch a do ovzduší se dostává i transgen. Dochází ke spadu prašných částic, které při odběru mohli kontaminovat

vzorky. Proto neopatrnou a nesterilní prací pracovníka odebírajícího vzorky (kontaminované ruce, kontaminovaná sada na odebírání tkáně, atd.) může docházet k pozitivním (zkresleným) výsledkům.

6. Závěr

Producenti geneticky modifikovaných organismů (GMO) připouštějí teoretickou možnost existence rizika vzhledem ke zdraví člověka a hospodářských zvířat i vzhledem k životnímu prostředí. Každá geneticky modifikovaná plodina proto prochází dlouholetou pečlivou analýzou, než je puštěna do oběhu. Od roku 1999 bylo celosvětově hodnoceno 6000 druhů. U žádného nebyl sledován škodlivý efekt. Zařazení modifikované kukuřice a sóji do výživy drůbeže neovlivnilo její užitkové vlastnosti ani kvalitu produkce. Zkrmování GMO hospodářským zvířatům je spojeno s mizivými riziky. Bezpečné jsou z hlediska lidské výživy a lidského zdraví i živočišné produkty zvířat krměných krmivem z GMO. V současnosti nelze prokázat jakýkoliv rozdíl v živočišných produktech zvířat krměných GMO a produkty získanými od zvířat, která GMO nekonsumují.

Naše zjištěné cizorodé geny v játrech kuřat, jsou velmi malé fragmenty. Jsou schopny kódovat malý jednoduchý peptid, což je zanedbatelné pro organismus. Proto jejich škodlivé účinky jsou mizivé.

Seznam použité literatury

Literatura

Adang, M. J., Brody, M. S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, T., Shewmaker, C. K., Oakes, J. W., McBride, K. E.: The reconstruction and expression of *Bacillus thuringiensis* cryIIA gene in protoplast and potato plants. *Plant Mol. Biol.* 21: 1131-1145, 1993.

Adang, M. J., Staver, M. J., Rocheleau, T. A., Leighton, J., Barker, R. F., Thompson, D. V.: Characterisation full-length and truncated plasmid clone of the crystal protein *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HG-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300, 1985.

Archer T.L., Schuster G., Patrick C., Cronholm G., Bynum E.D. Jr., Morrison W.P., 2000: Whorl and stalk damage by European and Southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. *Crop Protect*, 19, 181 – 190.

Bertoni, G., Marsan, P. A. (2005): Safety Risks for Animals Fed Genetic Modified (GM) Plants. *Veterinary Research Communications*, 29, 13 - 18

Bezunk, F.: Porovnávání geneticky modifikované kukuřice a nemodifikované kukuřice, str. 39, 2007.

Comain, L., Facciotti, D., Hiatt, W. R., Thompson, R. W. E., Stalker, D. M.: Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744, 1985.

Comai, L., Sen, C. L., Stalker, M.: An alternative *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science* 221: 369-371.

DeBlock, M., Botterman, M., Vandeweile, J., Dockx, M., Thoen, C., Gosselé, V.: Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518, 1987.

Doubková, Z.: Sborník GMO, 2007.

Felke, M., Langenbruch, G. A.: Effect of Bt-maize-pollen on caterpillars of *Inachis io* in a laboratory assay. ISSN 0367-4223, 2004.

Flachowsky, G.; Chesson, A.; Aulrich, K. (2005): Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. Archives of Animal Nutrition. 59 (1), 1 - 40.

Fujimoto, H., Itah, K., Yamamoto, M., Kyozuko, J., Shimamoto. K: Insect resistant rice generated by introduction of modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology 11: 1151-1155, 1993.

Heller, K. J.: Genetically Engineered Food. Methods and Detection. Litges & Dopf Buchbinderei GmbH, Heppenheim, 2003, str. 159, ISBN 3-527-30309-X

Hennig, W. (2002): Genetik. Springer, 853 pp.

Hilbeck, A., Moar, W. J., Pusztai-Carey M., Filippini, A., Bigler, F.: Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. ISSN 0013-8703, 1999.

Horsch, R. H., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Klee, H. J., Fry, J., Hinchey, M. A. W., Shah, D.S.: *Agrobacterium* – mediated gene transfer to plants: engineering tolerance to glyphosate. Iowa State J. Sci. 62:487-502, 1988.

Jakubowski, T., Rzewuska M.: Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. Veterinary microbiology, pages 239-245, 2006.

Klee, H. J., Muskopf, Y. M., Gasser, C. S.: Cloning of *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Biol.* 13: 533-540, 1989.

Knippers, R.: Molekulare genetik. Vierte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1985.

Liu, Y.-C., Lin, S.-H., Lai, H.-M., Jeng, S.-T. (2005): Detection of genetically modified soybean and its product tou-kan by polymerase chain reaction with dual pair of DNA primers. *European Food Research Technology*, 221, 725 – 730

Ondřej, M.; Drobník, J.: Transgenozé rostlin, ACADEMIA, 2002, str. 108 – 129
ISBN 80-200-0958-2

Ondřej, M.; Drobník, J.; Gartland, K. M. A.; Gartland, J. S.: Genové inženýrství rostlin. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1999, str.46, ISBN 80-7080-370-3

Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., La Vallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M. (1995) "Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line" *Crop Sci.* 35: 1451-1461

Petr, J. (2005): Geneticky modifikované rostliny (1.část). *Úroda*, 53 (1), 34 – 37

Pla M., La Paz J.-L., Peñas G., García N., Palau-delmas M., Esteve T., Messeguer J., Melé E., 2006: Assessment of Real-time PCR Based Methods for Quantification of Pollen-mediated Gene Flow from GM to Conventional Maize in a Field Study. *Transgenic Research*, 15, 219 – 228.

Rosypal, S., Doškař, J., Petrzik, K., Růžičková, V.: Úvod do molekulární biologie, díl čtvrtý. Brno, 2002, str. ISBN 80-902562-4-4, str. 1144

Roush, R. T.: Bt- transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new star in resistance management? *Pestic. Sci.* 51: 328-334, 1997.

- Saxena, D., Flores, S., Stazky, G.: Insecticidal toxin in root exudates from Bt-corn. *Nature* 402:480-481, 1999.
- Sekar, V., Thompson, D. V., Maroney, M. J., Bookland, R. G., Adang, M. J.: Molecular cloning and characterisation of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *Tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 7036-7040, 1987.
- Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A., Ayzkentz, J. A., Siegel, N. R., Rogers, S. G., Fraley, R.T.: Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481, 1986.
- Strauch, E., Wohlleben, W., Pühler, A.: Cloning of phosphinothricin-N-acetyltransferase gene from *streptomyces viridochromogenes* Tü 494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* 63:65-74, 1988.
- Stejskal, V., Kocourek, F., Pažourková, Z.: Sborník GMO 2006, ISBN 80-86555-84-4
- Šmarda, J.; Doškař, J.; Pantůček, R.; Růžičková, V.; Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně, 2005, str.13, ISBN 80-210-3841-1
- Timmons C., Hiroaki I. A. J., Connolly D., Zeng M. L., Kahn Y. Wu Z., Tram T., Shaun R. C.: Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386, 502 - 506 (1997).
- Thomas, J. C., Adams, D. G., Keppenne, V. D., Wasmann, C. C., Brown, J. K., Kanost, M. R., Bohnert, H. J.: *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 611-614, 1995.
- Thompson, C J., Movva, N. P., Richard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M.: Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523, 1987.

Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schultz, A.: The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotech.* 14: 1274-1279, 1996.

Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., Pühler, A.: Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces* Tü 494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-27, 1988.

Zwahlen, C., Hilbeck, A., Nentwig, W.: Field decomposition of transgenic Bt maize residue and the impact on non-target soil invertebrates. *Plant and Soil*, 2007.

Internet

www.biotrin.cz/czpages/sem030901c.htm

www.env1: Zákon č. 78/2004Sb. Zákon o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. [online], Ministersvo životního prostředí České republiky, [cit. 21. 2. 2007] dostupný z WWW:

<http://www.env.cz/www/platnalegislativa.nsf/d79c09c54250df0dc1256e8900296e32/538509b51d97a94fc125690b00263a23?OpenDocument>

www.env3: Registr povolených GMO – uvádění do ŽP. [online], Ministersvo životního prostředí České republiky, [cit. 19.3.2008], dostupný z WWW:

http://www.env.cz/_C1256E7F0041C8C2.nsf/gmo-pub-env?OpenView

www.gmo-

compass.org/eng/grocery_shopping/crops/23.genetically_modified_potato.html

Kadlec, J.: Možné negativní a pozitivní důsledky zařazování geneticky modifikovaných organismů do výživy hospodářských zvířat a člověka. [online], Jihočeská univerzita Zemědělská fakulta, 2003, [cit. 21. 2. 2008], dostupný z WWW:

http://www2.zf.jcu.cz/public/departments/koz/studiu/předměty/genetika_02/gmo/studie.pdf

Landa, Z.: Klasifikace *B. thuringiensis* pomocí Cry proteinů. [online], Jihočeská univerzita Zemědělská fakulta, [cit. 15. 3. 2008], dostupný z WWW:

<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/krv/rostlin/vyuka/pp/biopreparaty1/sld012.htm>

www.transgen: Gentechnisch veränderte Pflanzen: Anbauflächen weltweit. Soja. [online], TransGen, 2007, [cit. 15.3.2008], dostupný z WWW:

<http://www.transgen.de/gentechnik/pflanzenanbau/201.doku.html>.