

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie



**DETEKCE KRMIV S GENOVĚ MANIPULOVANÝMI ORGANIZMY
U KUŘAT**

Vedoucí diplomové práce:
Doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Autor diplomové práce:
Bc. Petra Vrabcová

2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Petra VRABCOVÁ

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Název tématu: Detekce krmiv s genově manipulovanými organizmy
u kuřat

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úkolem diplomové práce je zvládnout detekci genově manipulovaných krmiv ve tkáních kuřat, v jejich dietě byla tato krmiva obsažena. Detekce bude prováděna molekulárně biologickými metodami. V závěru práce by měla být formulována výživářská doporučení a vyhodnocena potenciální rizika pro konzumenty. Práce bude členěna do obvyklých kapitol:

- 1) Úvod - přehled literatury, zejména z vědeckých časopisů v angličtině
- 2) Materiál a metodika - popis laboratorních metod, používaných pro detekci GMO
- 3) Výsledky a diskuze - analýza jednotlivých tkání vykrmovaných kuřat
- 4) Závěr - shrnutí zjištěných výsledků, formulace výživářských doporučení, vyhodnocení rizik

Při zpracování diplomové práce budou dodržena obvyklá formální pravidla.

Diplomová práce bude podporována finančními prostředky z VZ MSM 6007665806.

Rozsah grafických prací: 3 - 5 tabulek, fotografie gelů

Rozsah pracovní zprávy: 30 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

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

Nicholl, D.S.T. (2002): An Introduction to Genetic Engineering. Cambridge University Press, 292 pp.

Rossi, F., Morlacchini, M., Fusconi, G., Pietri, A., Mazza, R., Piva, G. (2005): Effect of Bt Corn on Broiler Growth Performance and Fate of Feed-Derived DNA in Digestive Tract. Poultry Science, 84, 7, 1022-1030.

Liu, Yi-Ching, 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 pairs of DNA primers. European Food Research Technology, 221, 725-730.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Katedra genetiky, šlechtění a výživy

Konzultant diplomové práce:

Ing. Lenka Hanusová

Katedra genetiky, šlechtění a výživy

Datum zadání diplomové práce:

15. února 2007

Termín odevzdání diplomové práce:

30. dubna 2008

UNIVERZITA
ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice

prof. Ing. Martin Klížek, CSc.

děkan

L.S.

prof. Ing. Václav Řehout, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. února 2007

Prohlašuji, že svoji diplomovou jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

Datum:

14. 3. 2008

Podpis studenta:

Děkuji doc. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc., vedoucímu diplomové práce, za poskytování cenných rad a odborné vedení při zpracování výsledků diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Lence Hanusové za uvedení do problematiky GMO a za pomoc při zpracování diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. Co je GMO?	12
2.2. Historie GMO	13
2.3. Problematika GMO	13
2.4. Legislativa	15
2.5. Metody transformace rostlinných pletiv	16
2.6. Transgeny využívané v transgenních rostlinách	18
2.6.1. Transgeny pro rezistenci k herbicidům	18
2.6.2. Transgeny pro rezistenci k hmyzím škůdcům	19
2.6.3. Transgeny pro rezistenci k virům	20
2.6.4. Transgeny pro pylovou sterilitu	20
2.6.5. Transgeny pro rezistenci k bakteriálním a houbovým chorobám	20
2.6.6. Transgeny pro změněné složení zásobních látek semen	21
2.6.7. Transgeny pro modifikaci barvy květů	21
2.7. Charakteristika v ČR dvou nejdůležitějších GM plodin	22
2.7.1. Geneticky modifikovaná Roundup ready sója	22
2.7.2. Geneticky modifikovaná Bt kukuřice (kukuřice MON810)	23
2.8. Detekce transgenů v surovinách	25
2.8.1. Princip metody PCR	26
2.8.2. ELFO (elektroforéza)	30
3. MATERIÁL A METODY	31
3.1. Materiál	31
3.2. Metody	33
3.2.1. Izolace DNA	33
3.2.2. Detekce fragmentů DNA	34
4. VÝSLEDKY	37
4.1. Izolace DNA	37
4.2. Kontrolní PCR	37
4.3. Multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro lektin (sója) a HMG (kukuřice) ...	38
4.4. Multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro RRS/E sóju a Bt- kukuřici	39
5. DISKUSE	42

6. ZÁVĚR.....	44
7. SUMMARY	45
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	46
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	47

1. ÚVOD

Genetické inženýrství umožňuje přenášet geny mezi různými biologickými druhy způsobem, který je přírodě cizí. Vědci, pracující v tomto oboru, mění samu podstatu života - manipulují s geny bakterií, rostlin a zvířat a vytvářejí nepřirozené nové formy života s kvalitativně novými vlastnostmi. Vnášejí geny z bakterií do rajčat, kukuřice a sóji, geny z ryb do jahod a lidské geny zase do ryb. Takto - obecně řečeno - vznikají geneticky manipulované (modifikované) organismy označované jako GMO.

Cílem genetického inženýrství je vytvořit nové organismy odolné vůči škůdcům a zajistit tak např. zemědělcům vyšší výnosy či užitkovost. U geneticky manipulovaných potravin se prodlužuje trvanlivost nebo zlepšuje kvalita.

Pěstování geneticky modifikovaných organismů (GMO) se stává nedílnou součástí zemědělství mnoha států světa a s tím rostou i požadavky na rychlou a spolehlivou metodu, která by umožňovala snadné a levné sledování výskytu GMO v rostlinách a rostlinných produktech.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Co je GMO?

Již více než dvacet let je pro vytváření nových hospodářsky využitelných organismů používáno moderních biotechnologických postupů, využívajících metod molekulární genetiky, založených na cíleném přenosu genů. Vznikající organismy jsou nazývány geneticky modifikované (GMO). Do dědičného základu organismu je vnášen prověřený gen o známém složení a funkci - nesoucí pouze požadovanou vlastnost. Ostatní geny zůstanou prakticky nedotčeny (Hutař, 2007). Rozvoj moderních biotechnologií umožňuje takové změny, ke kterým by v přírodě nemohlo nikdy dojít. Jejich prostřednictvím je možný přenos genů mezi organismy, které se v přírodě ani neseťkají (Ondřej a Drobník, 2002). Uplatnění těchto biotechnologických postupů v zemědělství a v potravinářském průmyslu přináší značné úspory nákladů a může pomoci vyřešit problém nedostatku potravin způsobený neustále se zvyšující populací, obzvláště v zemích třetího světa (Lin *et al.*, 1996).

Na základě principu předběžné opatrnosti je respektováno, že by použití GMO mohlo mít i nechtěné následky pro přírodu a lidské zdraví. Vznikají tak sice určitá omezení, ale rychlý vývoj těchto technologií a rozvoj jejich použití jsou předpokladem, že zkušenosti budou přibývat a omezení tím pádem mizet (Hutař, 2007).

GMO jsou velmi dobře definovanými organismy. Podléhají režimu kontroly a schvalování, jakým neprocházejí žádné jiné organismy využívané v zemědělství. GMO jsou před použitím v zemědělství podrobeny důkladné kontrole, která posuzuje ze všech možných hledisek rizika pro zdraví lidí a zvířat, rizika pro vlastní zemědělskou výrobu a rizika dopadů na životní prostředí. Schválené GMO lze proto považovat za zcela bezpečné. Díky důkladným testům, trvajícím 7 až 10 let, jsou GMO zřejmě bezpečnější než většina obdobných organismů využívaných v zemědělství (Anonym, 2007).

Tvorbě GMO předcházela metoda šlechtění, kterou člověk prováděl již od mladší doby kamenné. Jedná se také o zásah do dědičnosti. Při této metodě však dochází k míchání neznámých genů s neznámým účinkem. Oproti tomu při transgenozí vnášíme do organismu gen nebo skupinu genů, o kterých přesně víme, odkud pocházejí, jakou vlastnost kódují, a známe i pořadí bází v jejich DNA. Známe tedy i složení bílkovin, které podle vnesených transgenů vznikají. Do rostliny tedy vnášíme přesně určenou genetickou informaci (Drobník *et al.*, 2002).

2.2 Historie GMO

Jako zlomový rok ve vývoji molekulární biologie a biotechnologií považovat rok 1953, kdy J. D. Watson a F. H. C. Crick sestavili model struktury DNA. Za svůj objev spolu s M. H. F. Wilkinsem obdrželi v roce 1962 Nobelovu cenu (Ondřej a Drobník., 2002).

Velice důležitým mezníkem je rovněž rok 1964, kdy N. W. Nierenberg položil základ k dešifrování genetického kódu. H. G. Khorana syntetizoval všechny tripletety genetického kódu. V roce 1969 O. Smith izoloval a charakterizoval první restriční endonukleázu (Vejl, 2007).

Objev restričního štěpení DNA tak umožnil rozvoj řady technik studujících polymorfismy nukleových kyselin a současně umožnil tvorbu *in vitro* rekombinovaných molekul DNA (Weaver, 2005).

Pro tvorbu geneticky modifikovaných organismů (GMO) je důležitý výzkum, který provedl v roce 1972 P. Berg, který započal s tvorbou *in vitro* rekombinovaných molekul DNA. V druhé polovině 70. let minulého století je již řešena problematika spojená s legislativou a bezpečností práce s GMO. Na konferenci v USA byla v roce 1975 stanovena první pravidla pro práci s nekombinovanou DNA (Vejl, 2007).

V roce 1977 firma Genetech jako první na světě začala používat organismy s rekombinovanou DNA pro produkci látek určených k výrobě léků. Jako první produkt šlechtění rostlin s využitím transgenoz je registrována a komerčně využívána první geneticky modifikovaná (GM) odrůda rostlin – rajče „FlavrSavr“ s dlouhou trvanlivostí plodů v roce 1993 (Ovesná, 2006).

2.3 Problematika GMO

Proti pěstování transgenních rostlin bylo vzneseno mnoho námitek. Doposud získané výsledky neprokázaly žádné nebezpečí pěstovaných odrůd transgenních rostlin, jako např. toxicitu nebo alergenicitu pro člověka, velkoplošné uvolňování transgenů do přírody (Ondřej, 1997). Riziko alergenicity geneticky modifikovaných potravin není o nic vyšší než to, které je představováno konvenčně vyšlechtěnými plodinami, nebo rostlinami introdukovanými z jiných částí světa (Royal society, 2002). Také se ovšem ukázalo, že některé transgeny mohou produkovat toxické proteiny. Tyto transgeny ale nebyly nikdy použity v odrůdách (Ondřej et al., 1999). Vliv každého nového transgenu na člověka, prostředí člověka a přírodní prostředí musí být podrobně testován (Ondřej, 1997).

Propagátoři geneticky modifikovaných rostlin argumentují sníženou spotřebou chemických pesticidů a vyšší produktivitou zemědělství. Nelze však přehlížet ani možná rizika. Geny odpovědné za odolnost geneticky modifikovaných rostlin vůči škůdcům nebo za odolnost k herbicidům (přípravkům k hubení plevelů) přetrvávají v plodinách i v potravinách. V této souvislosti se uvádějí případné zdravotní problémy, např. nebezpečí vzniku alergií, ale jak již bylo výše uvedeno, výskyt alergií je minimální. K ekologickým rizikům patří možné šíření nežádoucích genů, např. pylem, a riziko vzniku „superplevelů“ tolerantních k herbicidům (Petr, 2005).

Největší riziko je v hrozícím paušálním zavádění odolných transgenních rostlin v situacích, kdy jejich použití není účelné. Jako důsledek neuváženého masového použití transgenního osiva hrozí předčasná selekce rezistentních populací škůdců (Kadlec, 2006).

Poznatky o působení toxinů z transgenních rostlin na necílové organizmy vyvolávají spekulace o neblahém vlivu rozsáhlých porostů transgenních odrůd na biologickou diverzitu. I když se nesplnily katastrofické předpovědi o vlivu transgenní kukuřice na populace migrujícího motýla „monarchy“ (*Danaus plexippus*), zjištění toxického působení pylu Bt-kukuřice podnítilo další studium působení toxinů z transgenních plodin na necílové organizmy.

Z hlediska podílu GMO na výživě zvířat jsou důležitá následující fakta:

- * Dědičná informace ve formě DNA nevstupuje do organismu zvířat jen s GMO. DNA je nedílnou součástí jakékoli potravy a kromě ní se v zažívacím traktu vyskytuje i DNA mikroflóry trávicího traktu a DNA z buněk sliznice trávicího traktu.
- * DNA přijímaná s potravou za milióny let existence stávajících živočišných druhů (včetně člověka) své konzumenty nijak neohrozila.
- * Dědičná informace (obecně, nikoli jen geny typické pro GMO) je silně degradována při přípravě krmiv a v zažívacím traktu při trávení.
- * Pokud nějaká dědičná informace krmiva „přežije“ a pronikne přes střevní stěnu, bývá zachycena buňkami imunitního systému a nepředstavuje pro organismus žádné nebezpečí.

- * Riziko nepředstavuje ani přenos DNA z GMO na mikroorganismy (např. v bacheru, střevu nebo silážování). Pravděpodobnost, že dojde k přenosu genů z GM rostlin na mikroorganismy je astronomicky malá (Bertoni and Marsan, 2005).

Zkrmování GMO hospodářskými zvířaty je proto spojeno s mizivými riziky. Bezpečné jsou z hlediska lidské výživy a lidského zdraví i živočišné produkty zvířat krmených krmivem z GMO.

V současnosti nelze prokázat jakýkoli rozdíl v živočišných produktech zvířat krmených GMO a produkty získaných od zvířat, která GMO nekonzumují. Přesto jsou zemědělci nuceni odběrateli, aby garantovali, že nepoužívají v krmivech GMO (Doubková, 2007).

Důvodem nejsou zdravotní rizika spojená se zkrmováním GMO hospodářskými zvířaty, ale reklamní a obchodní zájmy prodejců potravin. Prodejci jsou k tomuto motivování poptávkou spotřebitelů iracionálně vystrašených nejružnějšími dezinformačními kampaněmi (Doubková, 2007).

2.4 Legislativa

- Zákon č. 153/2000 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty a o změně některých souvisejících zákonů
- Vyhláška č. 372/2000 Sb., kterou se stanoví technická řešení, pomocí kterých může vzniknout geneticky modifikovaný organismus, a technická řešení, která ke vzniku geneticky modifikovaného organismu nevedou
- Vyhláška č. 373/2000 Sb., kterou se stanoví požadavky na uzavřený prostor a ochranná opatření pro jednotlivé kategorie rizika při uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými organismy
- Vyhláška č. 374/2000 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty včetně všech příloh (Anonym, 2008a)

2.5. Metody transformace rostlinných pletiv

Prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* - disková metoda transformace

Autorem této metody je Horsch *et al.* (1985). Metoda je založená na tom, že se korkovrtem vysekají terčíky ze sterilních rostlin a ty se pak kultivují společně s bakteriemi *Agrobacterium* několik minut až dnů. Při přenosu se nejčastěji využívá vektoru, který nese gen zajišťující rezistenci k nějakému antibiotiku.

Po kokultivaci se segmenty přenesou na selekční agarové médium s příslušným antibiotikem, které umožňuje přežití a růst pouze transformovaným buňkám, a antibiotikem pro eliminaci bakterií *Agrobacterium* (ticarcilin, carbenicilin, cefotaxim). Médium by mělo stimulovat kalogenezi a podporovat vývin prýtlů, které se pak přepasážují na jiné médium k zakořenění.

Tato metoda reprezentuje ideální kombinaci vysoké frekvence transformace s jednoduchou a rychlou selekcí a regenerací transformovaných rostlin (Wiesing *et al.*, 1988). Používá se v mnoha modifikacích.

Přímá transformace

Přímý přenos genů byl vyvinut jako alternativa používání bakterií *Agrobacterium*, protože se předvíдалy problémy s transformací obilnin. Přenos DNA může být podněcován různými způsoby (Paszkowski *et al.*, 1984).

Protoplasty mají pro přenos genů některé výhody. Volně prostupná plasmalema zajišťuje, že geny mohou prostoupit do každého protoplastu (Potrykus, 1991). Čerstvě izolované protoplasty se inkubují s exogenní DNA. K příjmu roztoku DNA může docházet pouze endocytózou. Existuje několik způsobů, jak endocytózu stimulovat (Ondřej, 1999):

- 1) Pomocí polyethylenglykolu.
- 2) Působení iontů vápníku a zvýšeného pH.
- 3) Elektroporace.
- 4) Použití lypozómů
- 5) Mikroinjekce.

1) Využití polyethylenglykolu

Dodáním polyethylenglykolu do roztoku DNA se navodí zrněny plasmalemy, které vedou k fúzi protoplastů a také k endocytóze (Ondřej, 1999).

2) Elektroporace

Výboj kondenzátoru přes buněčnou populaci vede k přechodnému otevření plasmalemy. Tato elektroporace usnadňuje vstup molekul DNA do buněk, jestliže je DNA v přímém kontaktu s membránou (Fromm *et al.*, 1987). Pro transformaci protoplastů je elektroporace jednou z běžných a účinných metod transformace (Shillito *et al.*, 1985).

3) Mikroinjekce

Tato metoda používá mikrokapiláry a mikromanipulátory k přenosu DNA do daných buněk tak, že injektované buňky mohou přežít a proliferovat (Neuhaus a Spangenberg, 1990). Nevýhodou této metody je značná náročnost na provedení a vybavení. Do buňky se však dostane optimální množství DNA a experimentátor si může vybrat odpovídající buňku. Přenos DNA je přesný, přímo do jádra a pod stálou vizuální kontrolou (Potrykus, 1991).

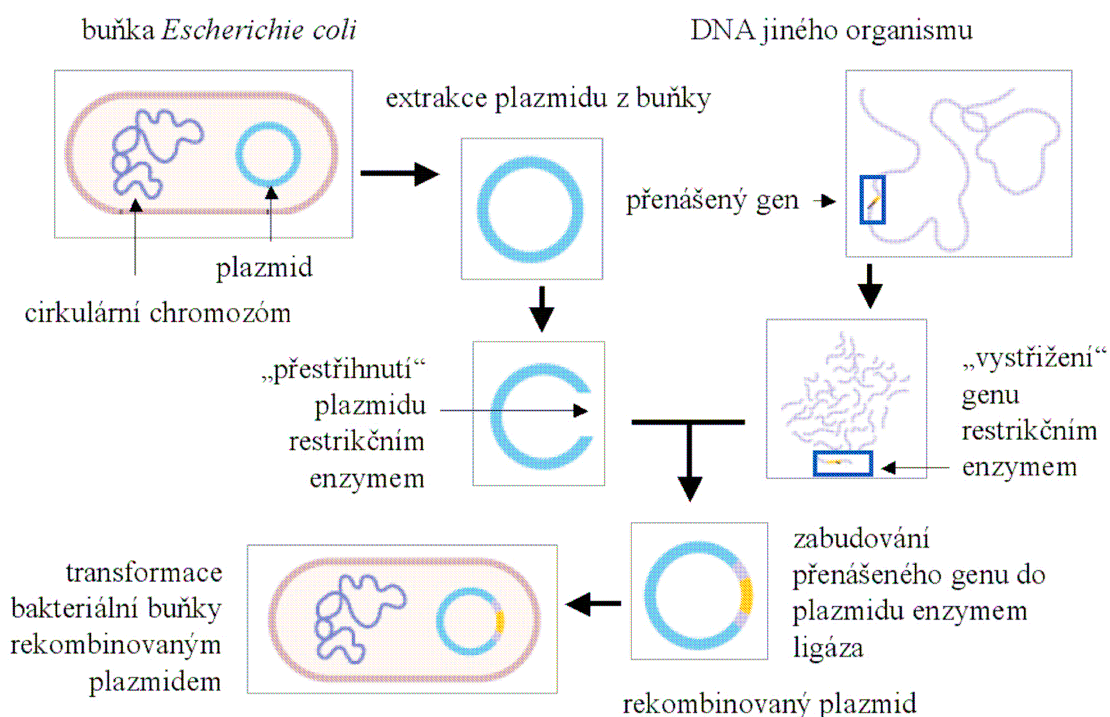
4) Využití lipozómů

DNA obsažená v lipozómech je aplikována na různé tkáně, buněčné kultury (Gad *et al.*, 1990) a pylové láčky (Ahokas, 1987) z toho důvodu, že lipozómy mohou pomáhat při transportu DNA přes membránu, nebo přímo přes buněčnou stěnu (Potrykus, 1991). Enkapsidace DNA v membráně zajišťuje ochranu před nukleázami a není třeba žádný nosič. Na druhé straně jsou zapotřebí krátké ultrazvukové vibrace, aby se DNA uzavřela na vnitřní fázi lipozómů, a ty mají za následek časté zlomy (Wiesing *et al.*, 1988).

5) Mikroprojektily

Mikroprojektily jsou mikroskopické kuličky z inertního kovu, které jsou obalené vektorovou DNA. Jsou vstřelovány do rostlinných buněk, které jsou ve vakuovaném prostředí (Ondřej, 1999). Tato metoda je výhodná tím, že je univerzální (Klein *et al.*, 1988; Sanford, 1990). Jeden výstřel může způsobit mnoho zásahů, a tím přenést geny do většího množství buněk. Cílové buňky mohou být umístěny na povrchu, ale také v hlubší vrstvě orgánů (Potrykus, 1991).

Obr. 1. Schéma metody získání bakterií nesoucích rekombinované plazmidy



2.6. Transgeny využívané v transgenních rostlinách

2.6.1. Transgeny pro rezistenci k herbicidům

Herbicid zpravidla působí toxicky na jeden enzym, který je významný pro život rostliny. Transgeny mohou různým způsobem toto působení na rostlinu potlačovat.

Existují tři hlavní mechanismy navození rezistence rostlin k herbicidům transgenozí (Ondřej, 1997):

1. Transgen kóduje nadbytek enzymu, který je inaktivován herbicidem.
2. Transgen kóduje odlišnou formu enzymu, která není herbicidem inaktivována.
3. Transgen kóduje enzym, který rozkládá herbicid.

V současné době jsou nejrozšířenější transgeny pro rezistenci ke dvěma typům herbicidům, a to ke glyfozátu a fosfinotricinu.

Herbicid glyfozát patří mezi nejrozšířenější herbicidy. Jeho účinek spočívá v tom, že blokuje aktivitu enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy (EPSP), který zprostředkovává syntézu aromatických aminokyselin (Ondřej, 1992). Obchodně je distribuován pod jménem Roundup firmy Monsanto. Existuje již řada druhů rostlin, které jsou rezistentní ke glyfozátu, např. salát (Nagata *et al.*, 2000), topol (Meilan *et al.*,

2000) a cukrovka (Mannerlof *et al.*, 1997). Některé rostlinné druhy mají ke glyfozátu přirozenou toleranci, která může být způsobená různými příčinami. Existují dva typy transgenů, podmiňující rezistenci ke glyfozátu:

Prvním typem transgenů je gen pro enzym EPSP. Enzym je produkován v nadbytku, nebo je produkován odlišný, modifikovaný enzym, který není glyfozátem inhibován. Gen pro glyfozátoreduktázu. Tento enzym glyfozát metabolizuje (Ondřej, 1999).

V druhém případě se využívá genů pro odolnost vůči herbicidu fosfotricin. Herbicid fosfotricin blokuje enzym glutaminsyntázu, která detoxikuje amoniové ionty vzniklé redukcí dusičnanů, degradací aminokyselin a dalšími cestami (Ondřej, 1999). Vyrábí se biotechnologickým způsobem prostřednictvím aktinomycet *Streptomyces viridochromogenes* a *Streptomyces hygroscopicus*. Gen, který kóduje fosfotricinacetyltransferázu, klonovaný ze *S. hygroscopicus* je označován *bar* a gen ze *S. viridochromogenes* je označován *pat*. Oba geny byly použity pro transformaci rostlin a jsou využity v již existujících odrůdách (Ondřej, 1999). Gen *bar* byl také integrován do rostlinného genomu máty peprné, ananasu a topolu.

Herbicide na bázi sulfonylmočoviny jsou druhově specifické. Nepůsobí na jednoděložné rostliny a na některé druhy dvouděložných rostlin, které dovedou tyto herbicide rozložit během několika hodin. Toxicita herbicidů typu sulfonylmočoviny spočívá v inaktivaci enzymu acetolaktátsyntázy, který se podílí na syntéze aminokyselin s rozvětveným řetězcem, tedy leucinu, izoleucinu a valinu (Ondřej, 1992).

2.6.2. Transgeny pro rezistenci k hmyzím škůdcům

Pro navození rezistence rostlin k hmyzím škůdcům byl využit gen pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* je gram-pozitivní bakterie, která při sporulaci syntetizuje insekticidní krystalický protein. Protein je tvořen uspořádáním jedné nebo několika polypeptidových podjednotek. Při rozpuštění v alkalickém prostředí ve střevě hmyzu je aktivován proteázami, které specificky odštěpují C-terminální vysokomolekulární část krystalického proteinu a několik aminokyselin na N-konci. Tím teprve vzniká toxický protein (Ondřej, 1999). Transgen pro δ -endotoxin byl vnesen do některých druhů kulturních rostlin, kde poskytuje ochranu proti hmyzím škůdcům (Parrott *et al.*, 1994).

2.6.3. Transgeny pro rezistenci k virům

Genetický materiál většiny virů je jednořetězcová RNA. Pomocí T-DNA *Agrobacteria* lze vnést do rostlin virovou cDNA. Zde vznikají virové nebo viroidové částice nezávisle na integraci T-DNA do rostlinného genomu. Tento způsob se nazývá agroinfekce (Ondřej, 1999).

Obecným mechanismem vzniku rezistence proti virům je exprese transgenů pro plášťový protein odpovídajícího viru. Exprese tohoto proteinu byla zjištěna u viru mozaiky tabáku, X-viru bramboru, viru mozaiky okurky a viru mozaiky vojtěšky. Další, zatím ve šlechtění rostlin nepoužívanou možností, je transgen pro tzv. movement protein, protein pro přenos viru z buňky do buňky. Jiné rezistence mohou být založené na transgeny pro replikázu nebo antisense RNA (Hammond a Kamo, 1995).

2.6.4. Transgeny pro pylovou sterilitu

Pylová sterilita je požadována pro produkci heterózního osiva. Transgen pro pylovou sterilitu je dominantní, a tak po křížení pylově sterilních dominantních homozygotů s recesivními fertálními homozygoty vznikají fertální heterozygoti. Pro výnos plodů nebo semen je třeba fertální F1 generace, a proto druhý partner musí mít gen pro obnovení fertility (Ondřej, 1999).

Existuje několik systémů, jak navodit pylovou sterilitu. Jedním z nich je využití chimérického genu pro barnázu, extracelulární RNázu, z *Bacillus amyloliquifaciens*. Před tento gen byl umístěn promotor, který je specifický pro tapetum, a tudíž exprese tohoto genu dochází k destrukci tapetových buněk prašníků a následně degeneraci pylových zrn.

V bakteriálních buňkách současně existuje protein barstar, který je vnitro buněčný inhibitor barnázy. Jiná linie s tímto transgenem může působit jako obnovitel fertility.

2.6.5. Transgeny pro rezistenci k bakteriálním a houbovým chorobám

Rezistenci rostlin k houbovým chorobám zvyšují transgeny, které kódují chitinázy (Grison *et al.*, 1996). Jedním z dalších mechanismů je využití transgenů pro lysozym z bakteriofága T4, který narušuje buněčnou stěnu bakterií. Účinné jsou také transgeny pro některé obranné toxické proteiny jiných rostlinných druhů (Carmona *et al.*, 1993).

2.6.6. Transgeny pro změněné složení zásobních látek semen

Je snaha získat především zlepšenou výživnou hodnotu semen. Řešení problému spočívá jednak ve zvýšení syntézy nedostatkových aminokyselin a pak ve zvýšení proporce zásobních proteinů, které obsahují ve větší míře tyto nedostatkové aminokyseliny.

Nedostatkové aminokyseliny lze zvýšit manipulacemi v regulaci biosyntézy aminokyselin, aby se zvýšila syntéza nedostatkového methioninu. Inzerce a exprese genů, které kódují proteiny bohaté na bílkoviny, může řešit druhý problém (Ondřej, 1999).

Transgenozi je také možné využít ke změně spektra mastných kyselin v semenech olejnin. Olej z těchto rostlin je vhodný pro různé využití (v kosmetickém průmyslu, v potravinářství, jako mazadla) (Murphy, 1996). Transgenní odrůdy se změněným spektrem mastných kyselin existují zatím jenom u řepky.

2.6.7. Transgeny pro modifikaci barvy květů

Změna barvy květů může být navozena vložením genů pro nové cesty biosyntézy flavonoidů a antokyanů. Zatím nejvíce výsledků bylo získáno především u *Petunia*. Vnesením genu pro antisense RNA pro enzym chalkonsyntázu lze získat zajímavé dekorativní zbarvení květů, protože v místech, kde je tento transgen exprimován dochází ke ztrátě zbarvení. Ke snížení exprese původního genu pro chalkonsyntázu může také dojít při vnesení téhož genu do genomu (Napoli *et al.*, 1990).

2.7. Charakteristika v ČR dvou nejdůležitějších GM plodin

2.7.1. Geneticky modifikovaná Roundup ready sója

Popis:	sója s tolerancí k herbicidu glyfosátu (účinné látky herbicidu Roundup) linie GTS 40-3-2 a veškeré potomstvo odvozené z této linie tradičními šlechtitelskými postupy (obch. název Roundup Ready sója)
Produkt:	sojové boby
Použití produktu:	import za účelem zpracování obdobně jako nemodifikované sojové boby; není určeno k pěstování
Genetická modifikace:	gen CP4 EPSPS (z <i>Agrobacterium</i> sp. kmen CP4) pro toleranci ke glyfosátu
Závěry hodnocení rizika:	zařazení do první kategorie rizika
Způsob laboratorní kontroly přítomnosti genetické modifikace:	analýza PCR podle standardního operačního postupu firmy Monsanto uvedeného v žádosti
Uživatel, který požádal o zápis:	MONSANTO ČR s.r.o. Brno, Rybkova 1, okres Brno-město, PSČ 602 00 IČO: 63 67 76 28
Rozhodnutí o zápisu:	14.05.2001 rozhodnutí vydáno dne 14. května č.j. 570-2/OER/01
Doba platnosti zápisu:	10 let

Tab. č. 1.: Popis Roundup ready sóji

Jedná se o linii GTS 40- 30- 2, jež je tolerantní k herbicidu glyfosátu (účinné látky herbicidu Roundupu) a která obsahuje uvedené DNA sekvence: gen CP4 EPSPS (z *Agrobacterium* sp. Kmen CP4- o které je mj. známo, že v přírodě přenáší své geny do rostlin), promotor 35S (P- E35S) z mozaikové virózy kvěťáku. Na 5'- konci je připojena část genu z *Petunia* hybrida zajišťující tvorbu tranzitního peptidu (CTP) pro transport enzymu EPSPS do chloroplastu a terminátor NOS 3 z *Agrobacterium tumefaciens* (Flachowsky *et al.*, 2007). Komerční označení je Roundup Ready sója. Přesné složení transgenů je chráněno patentem, který je majetkem firmy Monsanto Inc. V České republice byla uvolněna do oběhu v roce 2001. Sója s rezistencí pro glyfosát byla jedinou GM plodinou, která byla legálně obsažena v potravinách prodávaných v České republice ještě před vstupem do EU.

Podstatou této tolerance jsou nové geny, které byly vloženy do rostlin, aby byly překonány účinky glyfosátu. Glyfosát (N- fosfonometyl glycin) inhibuje aktivitu enzymu EPSPS (5- enolpyruvylshikimate- 3- phosphate syntetáza), který je důležitým článkem syntézy aromatických aminokyselin. Po ošetření glyphosfatovým herbicidem není rostlina schopná produkovat shikimat a umírá. Gen EPSPS má nízkou schopnost

vázat glyphospat. Rostlina tedy zůstává schopná produkovat shikimat i v přítomnosti glyphospathu a je tedy tolerantní k herbicidům s touto účinnou látkou.

Princip přípravy Roundup Ready sóji

K pravení cizorodé DNA do buněk se používá tzv. konstrukt. V případě sóji obsahují již výše zmíněné úseky DNA: signál pro rostlinu, 2x část genu z petúnie, 2x gen pro EPSPS, gen zneškodňující kanamycin, signál plastidu, gen pro beta glukorondiázu (GUS), další signál pro rostlinu.

Externí DNA vpravená do buňky se musí stabilně zařadit do vlastní DNA sóji, aby se s ní normálně množila, předávala při křížení a zajišťovala stálost požadované vlastnosti. Je vítané, když se nezařadí celý konstrukt, ale jen nezbytné geny. Identifikace a místo zařazení genů se v případě sóji kontrolovalo několika metodami analýzy DNA a z různých typů přeměněné sóji se vybrala linie označená 40-3-2, která ve své DNA nesla jen asi polovinu konstruktů a to na jednom definovaném místě ve svém genetickém materiálu. Důležité je, že se nezařadil gen pro necitlivost ke kanamycinu ani gen pro beta glukorondiázu. Tyto geny jsou důležité pro techniku konstrukce, ale nikoli pro vlastní necitlivost k herbicidu.

Průběh testování bezpečnosti GM plodin spočívá v tom, že nejprve se s novou bílkovinou provádějí zkoušky na stravitelnost v simulované žaludeční šťávě. EPSPS je velmi snadno rozložitelná. Pak se testuje vliv na živočichy. Dávka se vypočte tak, jako by člověk nejedl nic jiného než stravu z Roundup rezistentních plodin a vypočtená hodnota se násobí bezpečnostním koeficientem nejméně 1000.

Další velmi často citovanou problematikou jsou alergie. K jejímu testování je dohodnut systém zkoušek, který začíná tím, že se složení bílkoviny srovná se známými kombinacemi aminokyselin, které vyvolávají alergie. Nové bílkoviny v modifikované sóje se neshodují s žádnou takovou strukturou. Po srovnání struktur následuje kontrola pomocí imunologické reakce in vitro (ELISA test) a nakonec následuje test na kůži. Ve všech těchto testech se sójová nová bílkovina ukázala jako nealergenní.

2.7.2. Geneticky modifikovaná Bt kukuřice (kukuřice MON810)

Bt kukuřice je pojmenování pro GM kukuřici, která se vyznačuje odolností vůči hmyzím škůdcům. Díky genovému inženýrství získala tato kukuřice schopnost produkovat vlastní insekticid – Bt toxin, který hubí určitého specifického škůdce, u kukuřice je zacílen na zavíječe kukuřičného. Z hlediska bezpečnosti je třeba

podotknout, že Bt toxin není jedovatý pro zvířata ani člověka. Toxin byl získán od půdní bakterie *Bacillus thuringiensis*, od které i kukuřice následně získala označení Bt.

Uvedená linie (MON810) byla vyvinuta společností MONSANTO a je druhou nejrozšířenější genetickou modifikací. Komerční označení je MaisGard nebo YieldGard. V České republice byla uvolněna do oběhu v roce 2005.

Bacillus thuringiensis je půdní spirálující bakterie, která při sporulaci tvoří v buňce krystal speciální bílkoviny, která proto dostala název Cry- protein. Ten způsobuje, že si rostlina vytváří svůj vlastní toxin hubící hmyz (Mazza et al., 2005).

Objevení insekticidních účinků Bt- proteinu není novou záležitostí. Bakterie *Bacillus thuringiensis* byla popsána vědci již před sto lety. Jedná se o běžný půdní mikroorganismus a z tohoto pohledu jsou tedy Bt- hybridy kukuřice skutečně přírodním produktem, i když vytvořeným novými metodami. Protein δ - endotoxin, který bakterie produkuje, byl využíván jako komerční bioinsekticid v zemědělství, lesnictví a zahradnictví již od roku 1935. Za jeho hlavní výhodu je považována vysoká specifika účinku a tím spojená cílená eliminace larev škůdců. Ochrana však nikdy nebyla stoprocentní, protože závisela na dokonalém pokrytí rostlin účinnou látkou.

Kukuřice linie MON810 byla získána vnesením genu pro protein Cry1A(b) z již zmiňované půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* do kukuřičného kultivaru Hi- II. Zmíněný gen kóduje tvorbu δ - endotoxinu, který je toxický zejména pro larvu řádu *Lepidoptera* (motýli) a *Coleoptera* (brouci), kam patří i zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*)

Podstatou působení je, že Bt protein Cry1A(b) je v zažívacím traktu škůdce aktivován v toxin, který se váže ke specifickým receptorům střešní výstelky. Po požití pletiv takovéto rostliny larvou zavíječe dochází v důsledku perforace střev ke kolapsu zažívacího traktu. Larvy přestávají přijímat potravu a do 72 hodin hynou (Meeusen a Warren, 1989).

Endotoxiny z různých kmenů *Bacillus thuringiensis* působí specificky na zcela určité skupiny hmyzu. Dosud bylo popsáno 89 různých kmenů této bakterie tvořících různé Cry- proteiny. Geny pro ně jsou na plasmidech, které se snadno předávají mezi bakteriálními buňkami. Pokud dojde k tomu, že je Cr- protein pozřen hmyzem, rystal se za vhodných okolností rozpustí. Tyto okolnosti zahrnují především různá kyselost trávicích šťáv nutná pro rozpuštění krystalů Cry- proteinů, čímž je dána hrubá specifická účinku. Rozpuštěná bílkovina se navazuje specificky- systémem podobným

reakci antigen → protilátka- na určité struktury buněk výstelky trávicí trubice. Navázeli se, naruší buněčnou membránu a buňka hyne. To pak vede k uhynutí hmyzu.

Pro jiné živočichy je Bt protein neškodný, protože nedisponují odpovídajícími receptory. Stráví ho bez vedlejších účinků jako každý jiný protein. Ve srovnání s používanými insekticidy působí kukuřice YieldGard pouze na cílené škůdce a užitečný hmyz zůstává uchráněn.

YieldGard produkuje dostatečné množství Bt proteinu v listech, stoncích a klasech, kterým se kukuřice účinně chrání proti zavíječi kukuřičnému od výsevu až po sklizeň. Rostliny kukuřice mají možnost se normálně vyvíjet, přijímat živiny, vodu a lépe tak odolávat možným nepříznivým povětrnostním podmínkám. Technologie YieldGard tak vedle kvalitnější a výnosnější produkce celkově přispívá ke zvýšení rentability zemědělské výroby.



Obr.2: Bakterie *Bacillus thuringiensis*

2.8. Detekce transgenů v surovinách

V rámci EU i ČR jsou navrhovány, optimalizovány a do praxe zaváděny postupy umožňující detekci transgenů. Techniky pro detekci GMO lze rozdělit do dvou hlavních skupin - detekce proteinů, které jsou v rostlině kódovány vneseným transgenem a identifikace DNA. Vzhledem k tomu, že proteiny při zpracování podléhají konformačním změnám a dochází k jejich denaturaci, vývoj se spíše ubírá směrem identifikace na úrovni DNA. Takové techniky budou zřejmě uplatňovány i pro identifikaci transgenů v osivu i sadbě, protože transgeny v budoucnu nemusí být nutně v těchto vývojových fázích rostlin exprimovány.

Současná stanovení vycházejí z předpokladu, že v dosud povolených transgenních odrůdách (USA, Kanada, Japonsko a EU) jsou deklarované geny. Při přípravě transgenních odrůd, které jsou v současném světě na trhu, byly použity některé selekční markery - obvykle rezistence vůči antibiotikům (např. ke kanamycinu - který je

odbouráván enzymem neomycinfosfotrasferáza - NTPII) nebo herbicidům (např. Basta, toleranci zajišťuje enzym phosphinotricinacetyltransferáza - PAT). Také byly použity shodné úseky DNA jako regulační sekvence - např. promotor 35S z viru CaMV nebo terminátor genu pro nopalinsyntázu (NOS). U odrůd prošlých schvalovacím řízením je také znám transgen, který zajišťuje deklarovanou vlastnost odrůdy a je známa alespoň část jeho sekvence. Proto se v pro identifikaci transgenních materiálů zavádějí postupy, při kterých je nejprve detekována přítomnost sekvencí regulačních oblastí a selekčních markerů, které se v určitých kombinacích vyskytují ve všech schválených odrůdách a pak je možné pokračovat identifikovat specifický transgen. V současné době se jedná o metody založené převážně na PCR, ale vzhledem k tomu, že v blízké době mohou být vyvinuty transgenní rostliny, které nebudou obsahovat selekční markery a budou mít jiné typy regulačních oblastí, je možné, že se přejde k mikročipům a budou použity principy DNA/ DNA hybridizace.

Bylo také představeno několik technik, které umožňují semikvantitativní nebo kvantitativní stanovení zastoupení transgenů. Opět se jedná o techniky na bázi PCR a je třeba je ještě vylisovat (Ovesná a Drašarová, 2007).

Metoda PCR se používá necelých 15 let a je jednou ze základních metod molekulární genetiky. Umožňuje vyhledat v přebytku různých typů DNA určitý krátký úsek DNA (asi 2000 bp) a mnohonásobně ho namnožit (Drobník *et al.*, 2002).

2.8.1. Princip metody PCR

Polymerázová řetězová reakce je biochemická reakce, která využívá enzym DNA-polymerázu k namnožení DNA. DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' → 3'. K tomu kromě templátového vlákna a nukleotidtrifosfátů potřebuje krátký existující úsek druhého vlákna, tzv. primer, který můžeme syntetizovat uměle jako oligonukleotid (Weaver, 2005). Pokud známe sekvenci templátového vlákna, můžeme si připravit primer, který bude za vhodných teplotních podmínek tvořit vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákně, tedy hybridizovat. V případě primeru ale nehovoříme o hybridizaci, ale o tzv. nasedání primeru. Takto jsme schopni určit, od kterého místa a kterým směrem (od 3'-konce primeru) se má začít syntetizovat komplementární vlákno. Hovoříme o tzv. extenzi primeru (prodlužování primeru přidáváním dalších nukleotidů na 3'-konci). Podle jednoho templátového vlákna tímto způsobem vznikne jen jedna

kopie. Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Máme-li tedy teoreticky na začátku k dispozici dvě templátová vlákna (jednu dvojevláknovou molekulu), pak vzniknou v prvním cyklu dvě kopie. Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou 4 kopie. Celkem osm templátových vláken slouží v dalším cyklu k syntéze dalších osmi vláken, takže se produkt hromadí geometrickou řadou. Ze 2 vláken získáme po 30 cyklech teoreticky celkem $2^{30} = 107\,370\,000$ kopií (Křemen et al., 1998).

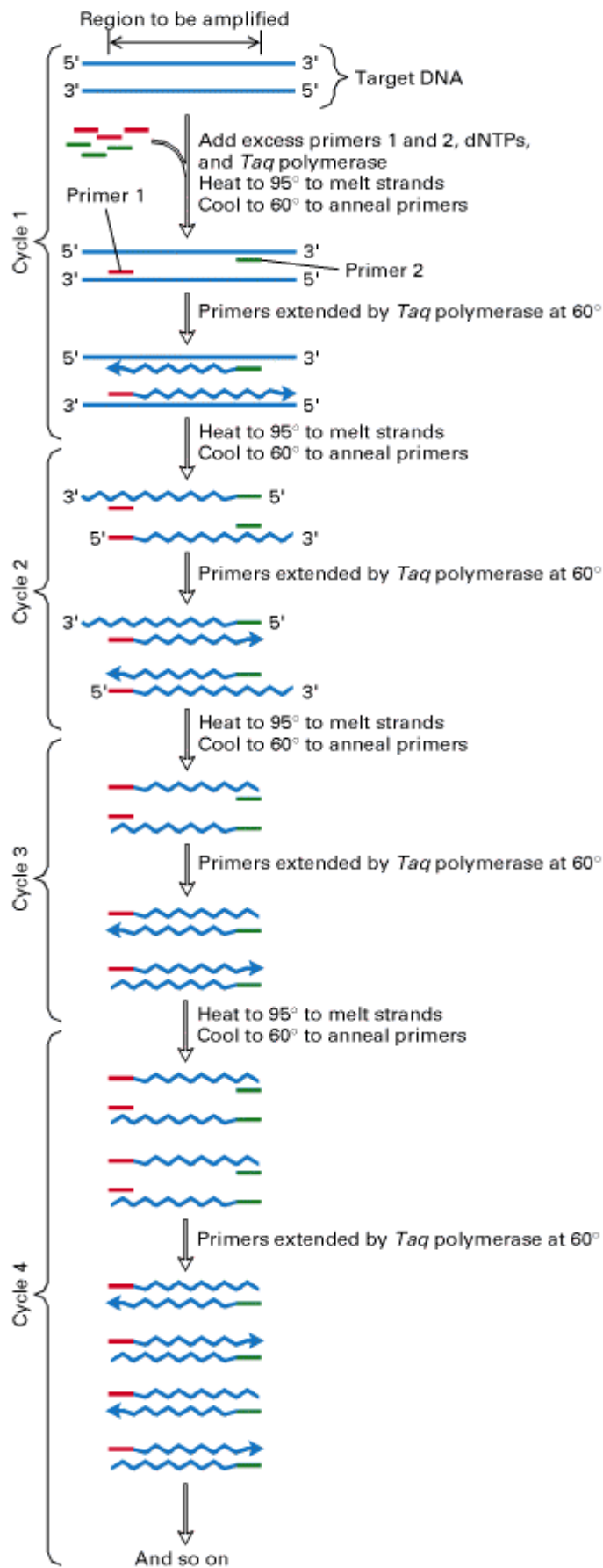
Požadavky na DNA- polymerázu a primery: Na začátku každého cyklu musíme denarovat templátovou DNA vysokou teplotou, která ničí normální DNA-polymerázy, musíme při PCR používat tzv. termostabilní polymerázy. Tyto enzymy pocházejí z bakterií, žijících v extrémních podmínkách. Jejich proteinová struktura je uzpůsobena tak, že odolává po určitou dobu i teplotám kolem 95 °C. Nejčastěji se používá tzv. Taq-polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*. Dnes používané termostabilní polymerázy jsou dále vylepšeny metodami genové manipulace tak, aby byly ještě odolnější a lépe vyhovovaly svému použití (Křemen et al., 1998).

Pro každou PCR, která má za cíl amplifikovat konkrétní úsek templátové DNA, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu primerů musíme zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě jen na přesně komplementární sekvenci v templátové DNA. Kdyby nasedaly nejen na přesně komplementární sekvence, tedy i jinde v templátové DNA, nedošlo by k efektivní amplifikaci zvoleného úseku. Proto musejí mít oba primery shodnou, nebo téměř shodnou teplotu tání. Ta závisí na délce molekuly a na její sekvenci, přesněji řečeno na poměru G-C párů a A-T párů v sekvenci. Kromě požadavku na shodnou teplotu tání musí konkrétní pár primerů splňovat i další požadavky - nesmí tvořit tzv. dimery a vlásenky. Dimer vzniká spárováním dvou primerů navzájem. Vlásenky vznikají spárováním konců stejného primeru navzájem (Šmarda et al., 2005).

Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru. Zkumavky s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu. Obvyklé je sestavování reakční směsi tzv. "na ledu", aby se zabránilo předčasné aktivitě Taq-polymerázy.

Výsledek PCR amplifikace lze detekovat na gelu, tzn. že se vzorek reakční směsi nanese na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a podrobí se elektroforéze (Šmarda *et al.*, 2005).

Obr. č. 3 Průběh PCR reakce



2.8.2. ELFO (elektroforéza)

Elektroforéza patří k nejdůležitějším technikám na separaci nukleových kyselin. Je to fyzikálně chemická metoda pro dělení látek v elektrickém poli. Zařízení se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, vlastního držáku gelu, ve kterém bude docházet k separaci, a externího zdroje stejnoměrného napětí.

Agaróza vařená s 10x TBE se nalije do vaničky (agarózová ELFO) nebo mezi skla (PAGE ELFO) a nechá se ztuhnout. Jamky pro umístění vzorků se tvoří pomocí tzv. hřebenů s definovanou šířkou. DNA migruje směrem k anodě. Rychlost pohybu studované DNA závisí na jejích vlastnostech (např. elektrický náboj, prostorové uspořádání), na vlastnostech nosiče (gelu), vlastnostech pufru a na přivedeném napětí. Obecně platí, že větší molekuly se pohybují pomaleji (Šmarda *et al.*, 2005).

Agarózová elektroforéza

Jako prostředí pro dělení slouží gel z agarózy (polysacharid izolovaný z mořských řas). Koncentrace agarózy určuje velikost pórů a tím propustnost pro DNA určité velikosti. Homogenita a rozlišovací schopnost je nižší než u PAGE, ale špičkové vysoce kvalitní agarózy se vlastnostem polyakrylamidu přibližují. Výhodou je velmi snadná příprava gelů (Šmarda *et al.*, 2005).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

V roce 2006 byly organizovány tři experimenty, jejichž cílem bylo ověřit vliv zkrmování geneticky modifikovaných rostlin na užitkové vlastnosti brojlerových kuřat, na vybrané fyziologické ukazatele a možnost transferu transgenní DNA do krve kuřat.

Pro studium přenosu genů z GMO do krve a tkání brojlerů byly použity linie GTS 40 – 3 – 2 u Roundup Ready sóji a linie MON810 u Bt kukuřice. Brojleři byli rozděleni do 4 skupin (jednalo se o tři pokusné a jednu kontrolní skupinu), krměných odlišnou krmnou směsí. Do pokusných skupin i kontrolní skupiny bylo zařazeno 100 kusů jednodenních nesexovaných brojlerových kuřat ROSS 308. Kuřata byla chována na hluboké podestýlce z drcené slámy. Krmivo a voda bylo podáváno ad libitum. Krmná směs byla kuřatům předkládána v tubusových krmítkách a voda byla k dispozici v kloboukových napáječkách.

Pokusné skupiny i kontrolní skupina byly krměny směsmi shodného komponentového i živinového složení. Rozdíl byl pouze v zastoupení modifikované sóji (zastoupení extrudované sóji ve směsích činilo 36 %, 39 % a 33 %) a kukuřice (Zastoupení kukuřice ve směsích činilo 30 – 35 %). Krmivo pro první skupinu obsahovalo Bt kukuřici MON810, krmivo druhé skupiny Roundup Ready sóju a krmivo pro třetí skupinu oba druhy., tj. Roundup Ready sóju i Bt kukuřici MON810. Čtvrtá skupina fungovala jako kontrola a byla krměna krmivem bez GMO.

Krmné směsi byly rozděleny dle fází výkrmu na směsi:

- * BR 1 (1.- 21. den výkrmu)
- * BR 2 (22.- 37. den výkrmu)
- * BR 3 (38.- 42. den výkrmu)

Jedna pokusná skupina měla v krmné směsi zařazenu modifikovanou extrudovanou Roundup ready sóju, druhá pokusná skupina GM kukuřici a třetí skupina brojlerů měla zařazeny obě geneticky modifikované plodiny. Kontrolní skupina měla ve směsích zařazeny pouze standardní sóju a kukuřici.

Komponenty	BR 1	BR 2	BR 3
Kukuřice- standard nebo GM	31,00	30,00	35,00
Sója- standard nebo GM	36,00	39,00	33,00
Pšenice	24,05	27,15	28,25
Rybí moučka 64 % N1	5,00	-----	-----
Dicalciumfosfat	2,00	2,30	2,20
Vápník	1,00	0,50	0,50
Sůl	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

V tabulce č. 2 je uvedeno zastoupení jednotlivých složek v použitých směsích

Směsi byly sestaveny pro experimentální účely vyšším podílem sóji. Vyšší, než běžně doporučované zastoupení extrudované sóji zvýšilo hladinu metabolizovatelné energie. Vyšší hladina energií neměla negativní vliv na růst a zdravotní stav kuřat. Směs BR1 byla sypká, BR2 a BR3 byly granulované.

Pokus byl opakován třikrát. V průběhu všech tří pokusů byla týdně monitorována celková hmotnost kuřat v každé skupině, váženo bylo 1% kuřat pro vyhodnocení růstu. Ve 21., 35. a 42 dni věku byla vážena kuřata pro statické vyhodnocení jejich hmotnosti. Ve výše uvedených kontrolních dnech se rovněž vyhodnocovala spotřeba krmiva na kg přírůstku a mortalita kuřat.

Pokusy byly vždy ukončeny ve 42. dni věku kuřat. Z každé skupiny bylo náhodně vybráno pět kohoutků a pět slemic, u kterých byla z křídelní žíly odebrána a heparinizována krev pro stanovení hematologických ukazatelů. Po porážce kuřat byla zjištěna hmotnost jatečně opracovaného těla, jateční výtěžnost a hmotnost sleziny (*splen*), jater (*hepar*), ledvin (*rennes*) a srdce (*cor*). 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).

3.2. Metody

3.2.1. Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována z krve pomocí NucleoSpin Blood (50 prep.) kitu (Macherey-Nagel). Při práci s kitem byl dodržován postup dle protokolu výrobce. Z pravidla bylo izolováno současně 20 vzorků (tj. 2 pokusné skupiny).

Postup izolace DNA z krve podle kitu NucleoSpin Blood:

- 1) K 200 μ l krve přidat 25 μ l proteinázy K
- 2) Přidat 200 μ l pufru B3 a vortexovat
- 3) Inkubovat při 70 °C po dobu 10- 15 min
- 4) Přidat 210 μ l 96- 100% etanolu a vortexovat
- 5) Vzorek přendat do kolonky na nové endorfce
- 6) Stočit po dobu 1 min při 14 000 otáčkách
- 7) Kolonku vložit do nové endorfky a přidat 500 μ l pufru BW
- 8) Stočit po dobu 1 min při 14 000 otáčkách
- 9) Kolonku vložit do nové endorfky a přidat 600 μ l pufru B5
- 10) Stočit po dobu 1 min při 14 000 otáčkách
- 11) Odstranit roztok z endorfky a opět stočit za stejných podmínek
- 12) Přesunout kolonku do nové endorfky a přidat 100 μ l přehřátého elučního (vymývacího) pufru BE
- 13) Inkubovat 1 min. při pokojové teplotě
- 14) Stočit po dobu 1 min při 14 000 otáčkách
- 15) Ověřit vyizolování DNA elektroforeticky na 1% agarózovém gelu při 80 V po dobu 70 min
- 16) Uložit do chladu

Po izolaci byly provedeny dvě kontroly. První byla standardní elektroforéza pro genomovou DNA na 1% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem (viz. bod 15 postupu izolace DNA)

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 je uvedeno v tabulce číslo 3. PCR cyklus se skládal ze zahřátí 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). Před samotným cyklem je nutné provést tzv. hotstart. Hotstart

zabezpečuje deaktivaci *proteinázy K*, která se nachází v roztoku izolované DNA. Až poté bylo do reakční směsi každého vzorku přidáno požadované množství *Taq-polymerázy*.

Příprava *Taq-polymerázy*: *Taq-polymeráza*: 0,2 x X

H₂O: 1,8 x X

X= počet vyšetřovaných vzorky

pufr	2 µl
MgCl ₂	1,2 µl
dNTP's	2 µl
GCH1R	1 µl
GCH1F	1 µl
DNA	1,3 µl
Taq- polymeráza	2 µl
H ₂ O	9,5 µl
celkem	20 µl

Tab. č. 3: Složení reakční směsi

Celkem byla DNA izolována ze 180 vzorků krve. V případě nedostatku DNA došlo k přeizolování.

3.2.2. Detekce fragmentů DNA

Pro detekci GMO byly použity komerční kity *GMOIdent Roundup Ready™ Soy* (Eurofins- Gene Scan) a *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.

Nejprve byly provedena PCR pro kontrolní geny. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 4. 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. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu, barveném ethidium bromidem. Souběžně byly provedeny pozitivní a negativní kontroly.

V případě pozitivní kontroly byla na místo DNA vyizolované z krve kuřat použita genomová DNA dodaná jako součást komerčního kitu. Jako negativní kontrola byla použita reakční směs bez DNA, ta byla nahrazena stejným množstvím H₂O.

Premastermix *	19,9 µl
dNTP's	2 µl
GCH1R	1 µl
GCH1F	1 µl
DNA	2 µl
Taq- polymeráza	2 µl
H ₂ O	17,3 µl
celkem	45, 2 µl

Tab. č. 4: Složení reakční směsi pro kontrolní geny (* pro lektin u sóji nebo pro HMG gen u kukuřice)

V druhém kroku byla provedena PCR s transgeny. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 5. 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 negativní a pozitivní kontroly.

PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 2% 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.

Premastermix *	19,9 μ l
dNTP's	2 μ l
GCH1R	1 μ l
GCH1F	1 μ l
DNA	2 μ l
Taq- polymeráza	2 μ l
H ₂ O	17,3 μ l
celkem	45, 2 μ l

Tab. č. 5: Složení reakční směsi pro detekci transgenů (* s primery pro specifický transgen RRS/E pro sóju a MON810 pro kukuřici)

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolace DNA

DNA izolovaná z krve kuřat byla velice kvalitní. Jak z hlediska množství DNA, tak samotné kvality. I přesto docházelo při izolaci DNA z kuřecí krve pomocí kitu NucleoSpin Blood k několika problémům.

Kit NucleoSpin Blood je určen pro izolaci DNA ze savčí krve. Červené krvinky savčí krve jsou bezjaderné, oproti tomu ptačí červené krvinky mají ve své stavbě jádra obsaženy, a proto při smíchání s promívacími roztoky z kitu docházelo ke shlukování krve. Z tohoto důvodu byla krev zachytávána v izolačních kolonkách, proto v jednotlivých krocích izolace docházelo k neúplnému promytí krve a tedy ztrátám DNA. I přesto, jak již bylo výše uvedeno, DNA byla velmi dobré kvality.

Mezi vzorky z kontrolních a pokusných skupin nebyly zjištěny žádné rozdíly v izolaci genomové DNA, jak kvalitativní tak i kvantitativní.

Počet všech testovaných vzorků byl 120 kusů. Vzhledem k problematické izolaci, jak již bylo výše uvedeno, nebylo možné ve 2 případech DNA z krve vyizolovat. V prvním případě bylo odebráno od testovaného zvířete malé množství krve, a proto po první nezdařené izolaci nebylo možné opakování. Ve druhém případě, i přes opakovanou izolaci DNA, nedošlo k vyizolování natolik kvalitní DNA, aby bylo možné s ní nadále pracovat. Pro další analýzy bylo využito 118 vzorků izolované DNA.

4.2. Kontrolní PCR

Námi izolovaná DNA z kuřecí krve sloužila jako templát (předloha) pro PCR reakce. První PCR byla kontrolní reakce s primery pro kuřecí růstový hormon. Tato PCR reakce byla provedena pro potvrzení, že izolovaná DNA je schopná produkovat PCR produkty. Tento PCR produkt má délku asi 1500 bp. Všech 118 vzorků genomové DNA s primery pro růstový hormon (GCH1F a GCH1R) mělo pozitivní reakci (viz obr. č. 4).



Obr. č. 4.: PCR s primery pro růstový hormon. PCR produkt byl detekován u všech testovaných vzorků.

4.3. Multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro lektin (sója) a HMG (kukuřice)

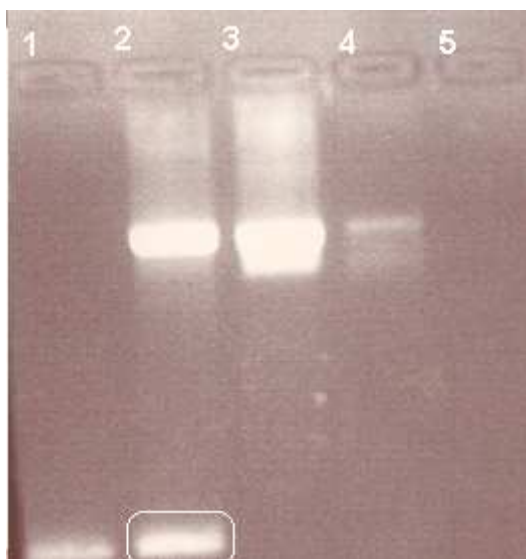
Jak již bylo uvedeno, přenos cizorodé DNA vložené do transgenního organismu existuje. Proto potřebujeme rozlišit rostlinný PCR produkt a PCR produkt z kuřecí DNA. Tzv. PCR s dvojitými páry primerů (multiplex PCR) byla užita pro vnitřní kontrolu. Rozdíl mezi klasickou PCR a aplikovanou PCR je ve složení reakční směsi. Reakční směs pro kontrolní geny obsahovala o jeden pár primerů navíc. Ke klasické PCR reakci s primery GCH1R a GCH1F byl přidán komerčně dodávaný mastermix s primery pro kontrolní gen, lektin pro sójové boby a HMG gen pro kukuřici.

U kontrolních reakcí byly nalezeny pozitivní vzorky. V případě sóji (lektin) byly nalezeny 3 pozitivní vzorky ve třech opakováních a 4 pozitivní vzorky ve 1- 2 opakováních. Daný úsek DNA ze sójových bobů byl tedy detekován u 7 vzorků z celkového počtu 118 testovaných (viz. tab. č. 6 a obr. č. 5). Délka fragmentu DNA je 118 bp.

V případě kukuřice (HMG) bylo nalezeno 5 pozitivních vzorků vždy ve 3 opakováních (viz. tab. č. 6). Délka fragmentu je 120 bp. To znamená že HMG gen pro kukuřici je průkazný v krvi testovaných kuřat.

tkáň	Krev
Počet izolovaných vzorků	118
Detekce sója kontrola	118
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	3
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	4
Celkem pozitivní vzorky	7
Detekce kukuřice kontrola	118
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	5
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	0
Celkem pozitivní vzorky	5

Tab. č 6: Výsledky testovaných vzorků



Obr. č. 5.: Kontrolní PCR s dvojicí primerů pro růstový hormon a lektin.

Dráha 1- gen pro lektin (pozitivní kontrola, délka fragmentu 118 bp). Dráhy 2, 3 a 4 jsou PCR produkty z DNA z krve kuřat. Označený fragment v dráze 2 je PCR produkt genu pro lektin. Další fragmenty v dráhách 2,3,4 jsou PCR produkty genu pro růstový hormon. Dráha 5- negativní kontrola.

4.4. Multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro RRS/E sóju a Bt- kukuřici

Po provedení všech kontrolních PCR s primery pro růstový hormon a multiplex PCR se sadami primerů pro růstový hormon a lektin u sóji resp. HMG u kukuřice, následovala multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro růstový hormon a transgeny RRS/E u sóji a Bt- kukuřice.

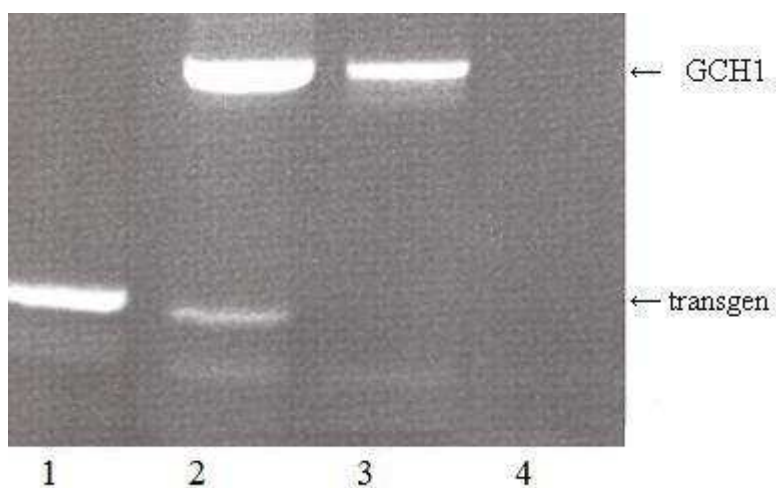
V této části práce bylo testováno stejných 118 vzorků pomocí multiplex PCR s dvojicí primerů: primery GCH1R a GCH1F pro růstový hormon a primery pro transgenní DNA, která je přítomná v RoundupReady sóje a kukuřici MON810. U kukuřice MON810 bylo testováno pouze 42 vzorků. I při sledování přechodu transgenů do krve kuřat byly nalezeny pozitivní reakce.

U detekce transgenů ze sóji bylo nalezeno 11 reakcí, které byly pozitivní v 1- 2 opakováních. Avšak pozitivní reakce ve všech třech opakováních nalezena nebyla. I přesto lze konstatovat, že došlo k přenosu transgenní části DNA ze sóji do organismu kuřete krmeného krmnou směsí, ve které byla RoundupReady sója obsažena (tab. č. 7, obr. č. 6). Délka fragmentu transgenní části DNA je 128 bp.

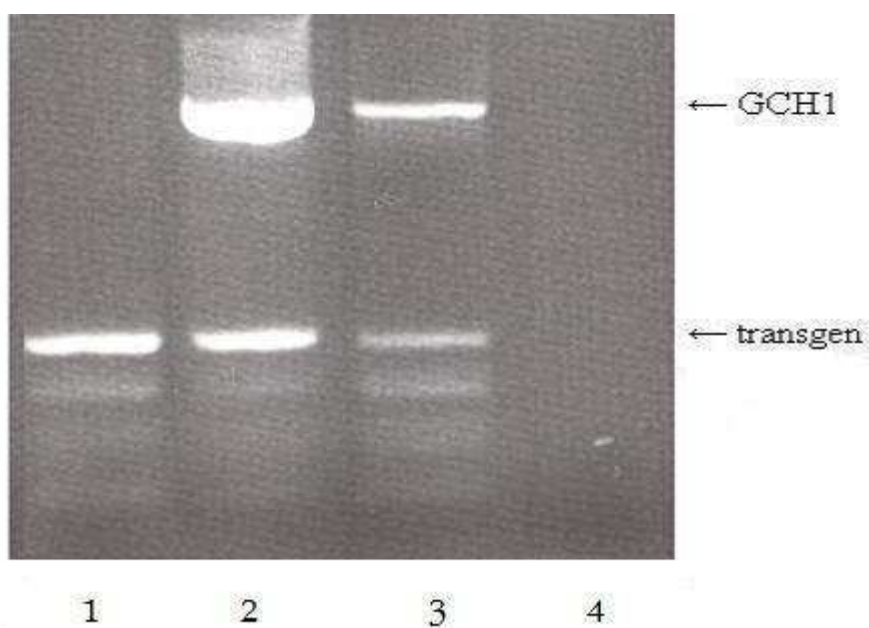
Při detekci na transgen u Bt- kukuřice bylo zjištěno 7 pozitivních reakcí v 1- 2 opakováních. Ve 4 případech byla pozitivní reakce prokázána ve všech třech opakováních. To znamená, že bylo celkem zjištěno 11 pozitivních vzorků z celkového počtu 42 vzorků. (tab. č. 7, obr. č. 7). Délka fragmentu transgenní části DNA je 92 bp.

tkáň	Krev
Počet izolovaných vzorků	118
Detekce sója transgen	118
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	0
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	11
Celkem pozitivní vzorky	11
Detekce kukuřice transgen	42
Počet pozitivních vzorků (3 pozitivní ze 3 opakování)	4
Počet pozitivních vzorků (1 -2 pozitivní ze 3 opakování)	7
Celkem pozitivní vzorky	11

Tab. č. 7: Výsledky testovaných vzorků pro transgen



Obr. č. 6.: Elektroforeogram Multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro růstový hormon a transgen RRS/E u sóji. Dráha 1- gen pro RRS/E (pozitivní kontrola délka 128 bp); dráha 2- pozitivní vzorek; dráha 3- negativní vzorek; dráha 4- negativní kontrola (PCR mix + voda).



Obr. č. 7.: Elektroforeogram Multiplex PCR s dvěma sadami primerů pro růstový hormon a transgen MON810 u kukuřice. Dráha 1- gen pro MON810 (pozitivní kontrola 92 bp); dráha 2- pozitivní vzorek; dráha 3- pozitivní vzorek; dráha 4- negativní kontrola (PCR mix + voda).

5. DISKUSE

V trávicím traktu dochází vlivem žaludečních kyselin a mikrobiální aktivity k rychlejší degradaci nukleových kyselin (DNA). Není však možné vyloučit, že fragmenty, které se dostanou do střevního epitelu, jsou hostitelským zvířetem absorbovány. U nepřežvýkavců byly nalezeny úlomky transgenní DNA z rostlin v některých tkáních a orgánech. Avšak nebyly nalezené části transgenní DNA v orgánech a tkáních zvířat, produkující živočišné produkty (Anonym, 2008b).

Flachowsky and Aulrich (2007) nenašli prokazatelné rozdíly ve výživné hodnotě a kvalitě potravin mezi izogenními a transgenními rostlinami, kromě nižšího obsahu mykotoxinů v Bt kukuřici. Zjistili, že fragmenty rostlinné DNA se mohou nacházet v některých tkáních (např. svaly), ale fragmenty transgenní DNA nebyly nalezeny.

Khumrirdpetch et al. (2001) uskutečnili pokus na třech skupinách brojlerů, kterým byly podány tři skupiny krmných směsí. Byly odebrány vzorky z masa, kůže a dvanáctníku. Vzorky z PCR byly vyhodnocené jako negativní. Uvádějí však, že tyto poznatky potřebují další prověření.

V případě našeho testování byly nalezeny pozitivní vzorky, a to v celkem 22 případech. Přejít fragmentů DNA a tedy rovněž transgenu přes střevní stěnu je možné předpokládat jako fyziologický pochod. Další důvody možných pozitivních nálezů lze spatřovat v některém z následujících faktorů:

Kokcidióza

Kokcidióza je onemocnění způsobené parazitickými prvky – kokciemi rodu *Eimeria*. Lze je nalézt všude tam, kde jsou kuřata chována, v malochovech i velkochovech. Kokcidióza zůstává celosvětově jedním z nejčastějších onemocnění drůbeže, a to i přes značný pokrok v oblasti chemoterapie, managementu chovu, výživy a genetiky.

Onemocnění se projevuje zánětem střevní sliznice různého stupně, který způsobuje pokles užitkovosti až úhyn postižených zvířat (Bedrník, 2005).

Jelikož při tomto onemocnění dochází k zánětu střevní sliznice, dochází zde 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 vyizolování transgenu a námi testovaný vzorek se zdá být pozitivní.

Infekce

Pokud se v těle zvířete (respektive trávicím traktu) objeví infekce, ať je to z jakéhokoliv důvodu, dochází ke stejné imunologické reakci, jako v předchozím případě (viz kokcidióza).

Aflatoxiny

Aflatoxiny (difurankumariny) patří mezi mykotoxiny, což jsou látky s extrémně vysokou toxicitou. Jsou vytvářeny plísněmi *Aspergillus* (především *A. flavus* a *A. parasiticus*). Mají silný vliv na poškozování jater a u zvířat byl při chronickém příjmu prokázán karcinogenní účinek.

Kukuřice, arašídny, skořápkové plody (především pistácie, lískové ořechy, para ořechy a mandle) a koření (především pepř, chilli, muškátový oříšek, paprika) mohou obsahovat hlavně aflatoxin B (Miller and Trenholm, 1997).

Při požití krmiva, které obsahuje větší či menší množství aflatoxinů, dochází k obraně organismu, která se opět projeví infekcí (viz kocidióza).

Transgen z ovzduší

K znečištění krve transgenem mohlo dojít přímo, a to při samotném odebrání krve. Je jisté, že při odběru nebylo zajištěno takové prostředí, kde by nemohlo dojít ke kontaminaci (sterilní a bezprašné). Při manipulaci s krmivem dochází k prášení. Jelikož krmivo mimo jiné obsahuje i transgenní DNA, dostává se do ovzduší i transgen. Dochází ke spadu prašných částic, které při odběru mohly kontaminovat krev, a to buď přímým spadem do ependorfky s krví a nebo neopatrnou a nesterilní prací pracovníka odebírajícího krev (kontaminované ruce, kontaminovaná sada na odebrání krve, atd.).

Prašnost

Ke kontaminaci transgenní DNA může docházet díky prašnosti místností, kde jsou testovaná kuřata chována. Jedná se o prostupnost transgenů z plic do krve. Plíce jsou díky okysličování krve velmi krveným orgánem, a proto je možné, že zachycené částice v plicních sklípcích se mohou vyplavovat do krve a naše testování se jeví jako pozitivní při nálezů transgenní DNA.

6. ZÁVĚR

Z výsledků provedeného testování lze usuzovat na možný výskyt části přenášených genů v krvi kuřat.

Metodou Multiplex PCR bylo nalezeno 11 pozitivních reakcí u RoundupReady sóji a 11 pozitivních reakcí u Bt- kukuřice MON810.

I přesto, že transgen nalezen byl, není jeho výskyt nikterak závažný. Neovlivňuje zdravotní stav jak zvířete krmeného geneticky modifikovanou rostlinou, tak následného konzumenta daného zvířete.

Odborná literatura uvádí, že přenos celého přeneseného genu je velmi nepravděpodobný. Abychom mohli toto tvrzení potvrdit či vyvrátit, bylo by nutné provést sekvenci detekovaných fragmentů transgenní DNA. Tato analýza však nebyla součástí práce.

Součástí prováděných analýz byl průkaz netransgenní rostlinné DNA v krvi kuřat. Pozitivní nálezy byly zjištěny u 12 testovaných kuřat, a to v 7 případech u sóji a v 5 případech u kukuřice. Výskyt rostlinné DNA můžeme považovat za fyziologický stejně jako výskyt fragmentů transgenu.

Pro úplnost lze dodat, že v dalších analýzách, které byly provedeny na pracovišti, kde byla diplomová práce zpracována, se nepodařilo prokázat výskyt transgenu RoundupReady sóji či Bt- kukuřice ve tkáních kuřat (játra a ledviny).

Z výživářského hlediska lze konstatovat, že zařazení RoundupReady sóji a Bt- kukuřice MON810 do krmné dávky zvířat nemá vliv na jeho zdravotní stav, stejně tak jako jeho následného konzumenta.

7. SUMMARY

The aim of this study is to consider possible transfer of transgene DNA from genetically modified feed into blood of broilers. Broilers were fed with feedings, containing genetically modified RoundupReady soybean and Bt-maize MON810.

After appointed period of fattening, blood samples from broilers were collected and DNA from these samples was isolated. Control PCR with primers for chicken growth hormone gene GCH1R and GCH1F for verifying of capability of isolated DNA to produce PCR product was performed. In case of positive result, multiplex PCR with dual primers (it means primers for chicken growth hormone gene and primers from commercial kits) was used. Commercial kits contained two types of mastermixes – one with primers for so-called control genes and one with primers for transgene. Kits for RoundupReady soybean contained mastermixes with primers for lectin (control gene) and for RRS/E (transgene). Kits for Bt-maize MON810 contained mastermixes with primers for HMG gene (control) and with primers for YieldGard gene (transgene). Multiplex PCR was done in subsequent pattern. First time, it was done multiplex with primers for control genes. Next time, we used mastermix for transgenes.

Testing for presence of nontransgenic DNA in blood resulted in 7 positive reactions for lectin (soybean control gene) and 5 positive reactions for HMG (maize control gene). Presence of DNA fragment of transgene was confirmed by 11 samples of RoundupReady soybean and 11 samples by Bt-maize MON810.

Although, the transgene fragment was found in blood samples, its occurrence is anyway relevant. It does not influence healthy of animal, feeding with genetically modified plant, and also it does not influence possibly consumer of this animal.

Key words: broilers, GMO, RoundupReady soybean, Bt-maize MON810, DNA, PCR

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cDNA - deoxyribonukleová kyselina získaná reversní transkripcí

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ELFO - elektroforéza

EPSP – 5- enolpyruvylšikimát- 3 - fosfátsyntáza

GMO – geneticky modifikovaný organismus

GUS - β - glukorondiáza

HMG – high mobility group protein

NOS - nopalinsyntáza

NTPII - neomycinfosfottransferáza

PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

RRS/E – RoundupReady sója

9. POUŽITÁ LITERATURA:

- Ahokas, H. (1987): Transfection by DNA-associated liposomes evidenced at pea pollination. *Hereditas* 106: 129-138.
- Anonym (2007): <http://www.vuzv.cz/vyziva/studie03.htm> (online 2007). Accessed 16.12.1007.
- Anonym (2008a): <http://www.mze.cz> (online 2008). Accessed 26.2. 2008.
- Anonym (2008b): http://www.agrofilm.sk/2005/pdf/sprav2005_04.pdf (online 2008). Accessed 19.3. 2008.
- Bedrník, P. (2005): Kokcidióza drůbeže a její kontrola – minulost, přítomnost, budoucnost. *Veterinářství*. ISSN 0506-8231. 55 (3). 164-165.
- Bertoni G., Marsan A. P. (2005): Safety Risks for Animals Fed Genetic Modified (GM) Plants. *Veterinary Research Communications*. 29.13–18.
- Carmona, J. M., Molina, A. Q., Fernández, J. A., López-Fando, J. J., Garcia Olmedo, F. (1993): Expression of alfa-thionin gene from barley in tobacco confers resistance to bacterium pathogens. *Plant J.* 3: 457-462.
- Doubková Z. (2007): Regulace GMO v České Republice a Evropské Unii. Sborník ze semináře Pěstování geneticky modifikovaných rostlin. ČZU Praha. 40- 45.
- Drobník, J., Ondřej, M., Petr, J. (2002): Geneticky modifikované organismy v zemědělství. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha.
- Flachowsky, G., Aulrich, K. (2007): Assessment of genetically modified crops (GMO) in animal nutrition, <http://bsas.org.uk/downloads/mexico/080.pdf> (online 2008). Accessed 21.3. 2008.
- Fromm, M., Callis, J., Taylor, L. P., Walbot, V. (1987): Electroporation of DNA and RNA into plant protoplast. *Methods Enzymol.* 153: 351-366.
- Gad, A. E., Rosenberg, N., Altmann, A. (1990): Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant.* 79: 154-157.
- Grison, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J. J., Toppan, A. (1996): Fields tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnol.* 14: 643- 646.

- Hammond, J., Kamo, K. K. (1995): Effective resistance to potyvirus infection conferred by expression of antisense RNA in transgenic plants. *Molec. Plant Microbe Interact* 8: 674-682.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., Fraley, R., T. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229- 1231.
- Hutař, M. (2007): GMO a ekologické zemědělství. Sborník ze semináře Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí. ČZU Praha. 3- 14.
- Kadlec J., Kváčová B., Řehout V., Čítek J., Hradecká E. (2006): The negative and positive effects of genetically modified organisms in nutrition of farm animals and human: a review. In: *Biotechnology 2006*, SBU České Budějovice.
- Khumnirdetch, V., Intarachote, U., Treemane, S., Tragoonroong, S., Thummabood, S. (2001): Detection of GMOS in the broilers that utilized genetically modified soybean meals as a feed ingredient. *Plant & Animal genome IX Conference*, San Diego.
- Klein, T. M., Fromm, M. E., Gradziel, T., Sanford, J. C. (1988): Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *BioTechnology* 6: 923- 926.
- Křemen J., Pohlreich P., Stříbrná J. (1998): *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Karolinum. 114.
- Kuhlein U., Ni L., Weigend S., Gavora J. S., Fairfull W., Zadworny D. (1997): *Animal Genetics*. 28. 116- 123.
- Lin, J.-J., Kuo, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., MacDonald, M. H., Kenworthy, W., Ude, G. N., Matthews, B. F. (1996): *Plant Molecular Biology Reporter*. 14 (2).156-169.
- Mannerlof, M., Tuvensson, S., Steen, P., Tenning, P. (1997): Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica* 94: 83-91.
- Mazza R., Soave M., Morlacchini M., Piva G., Marocco A. (2005): *Transgenic Research*, 14, 775- 784.
- Meeusen R. L., Warren G. (1989): *Annu. Rev. Entomol.*, 34, 373- 381.
- Meilan, R., Han, K. H., Ma, C. P., James, R. R., Eaton, J. A., Stanton, B. J., Hoie, E., Crockett, R. P., Strauss, S. H. (2000): Development of glyphosate-tolerant hybrid cottonwoods. *Tappi J.* 83: 164-166.

- Miller, J. D., Trenholm H. L. (1997): Mycotoxins in grain : compounds other than aflatoxin. St. Paul : Eagan Press. 552.
- Murphy, D. J. (1996): Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Tibtech*. 14: 206- 213.
- Nagata, R. T., Dusky, J. A., Ferl, R. J., Torres, A. c., Cantliffe, D. J. (2000): Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 669- 672.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990): Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*2: 279-289.
- Neuhaus, G., Spangenberg, G. (1990): Plant transformation by microinjection techniques. *Physiol Plant*. 79: 213-217.
- Ondřej, M. (1992): Genové inženýrství kulturních rostlin. Academia. Praha. 1. vydání. 232.
- Ondřej, M. (1997): Transgeny pro šlechtění rostlin. *Genet. a Šlecht.* 33 (2): 135-160.
- Ondřej, M. (1999): Úvod do problematiky transgenoz rostlin. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 35: 95- 108.
- Ondřej, M., Drobník, J. (2002): Transgenoz rostlin. Academia. Praha.
- Ovesná, J. (2006): Geneticky modifikované organismy a jejich možné uplatnění v rostlinné výrobě. Sborník ze semináře Pěstování geneticky modifikovaných rostlin v ČR. ČZU Praha. 3- 13.
- Ovesná, J., Drašarová Z. (2007): Identification of transgenes in plants, seeds and derived products. www.agris.cz. (online 2007). Accessed 24.3. 2008.
- Parrott, W. A., AU, J. N., Adang, M. J., Bailey, M. A., Boerma, H. R., Stewart, C. R. (1994): Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In vitro Cello Dev. Biol.* 309: 144-149.
- Paszkowski, J., Shillito, R. D., Saul, M. W., Mandak, V., Hohn, T., et al. (1984): Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3: 2712-2722.
- Petr, J. (2005): Geneticky modifikované rostliny (1. část). *Úroda*. 53 (1). 34- 37.
- Potrykus, F. (1991): Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 42: 205-225.
- Royal Society (2002): Genetically modified plants for food use and human health - an update (Ref. 4/02). London The Royal Society. www.royalsoc.ac.uk.

- Sanford, J. C. (1990): Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79: 206-209.
- Shillito, R. D., Saul, M. W., Paszkowski, J., Miiller, M., Potrykus, I. (1985): High frequency direct gene transfer to plants. *BioTechnology* 3: 1099-1103.
- Šmarda, J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. Brno - Kraví Hora. 188.
- Vejl, P. (2007): Geneticky modifikovaný organismus z pohledu genetiky a šlechtění. Sborník ze semináře Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí. ČZU Praha. 3- 14.
- Weaver, R. F. (2005): *Molecular biology*. Mc Graw Hill. 852.
- Wiesing, K., Schell, J., Kahl, G. (1988): Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22: 421-77.