

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat

**GENETICKY MANIPULOVANÉ PRODUKTY Z KRMIV
V LEDVINÁCH KUŘAT**

Bakalářská práce

Miroslav Pospíšil

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:

Děkuji paní Ing. Lence Hanusové, Ph.D. za odborné vedení při tvorbě této bakalářské práce, za poskytnutí podkladů, informačních dokumentů a za pevné nervy, které musela projevit při mé tvorbě.

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 14.4.2009

.....
Miroslav Pospíšil

Anotace

Bakalářská práce podává přehled o zvládnutí detekce genově manipulovaných produktů z krmiv v ledvinách kuřat, jejichž dieta obsahovala krmiva, která prošla genovou modifikací. K tomuto pokusu byly zapotřebí dvě GM rostliny. První byla insekt rezistentní Bt-kukuřice a druhá herbicid tolerantní Roundup Ready sója. Obě rostliny byly použity jako přísada v krmných směsích pro drůbež. Detekce hledaných transgenů byla prováděna pomocí molekulárně genetických metod - PCR a elektroforézy. Na základě výsledků práce budou zhodnocena rizika zjištěná pro konzumenty.

Klíčová slova: GMO, transgen, Bt-kukuřice, Roundup Ready sója

Annotation

This bachelor thesis gives an overview of managing detection of genetically manipulated products from chicken feed. Kidneys of chickens which were fed by feed that has been genetically modified were subject to examination. Two GM plants were necessary for the examination, one of them being resistant Bt-maize, the other one herbicide-tolerant Roundup Ready soya. Both plants were used as additives in feed mixture for poultry. Detection of prospective transgenes was realized by means of molecular-genetic methods – PCR and electrophoresis. Ascertained risks for consumers will be evaluated upon the results of the thesis.

Keywords: GMO, transgene, Bt-corn, Roundup Ready soya

OBSAH

OBSAH.....	5
1. Úvod.....	6
2. Literární přehled.....	8
2.1 Definice a historie geneticky modifikovaného organismu	8
2.2 Metody genetického inženýrství u rostlin.....	9
2.3 Příklady geneticky modifikovaných organismů	10
2.3.1 Geneticky modifikované mikroorganismy.....	10
2.3.2 Geneticky modifikovaní živočichové	10
2.3.3 Geneticky modifikované rostliny	11
2.3.3.1 Geneticky modifikovaná Roundup Ready sója	11
2.3.3.2 Geneticky modifikovaná Bt kukuřice	12
2.4 Vliv GMO na zemědělství a hospodářství.....	13
2.4.1 Krátkodobé a dlouhodobé ekologické vlivy transgenních rostlin z hlediska možných rizik	13
2.4.2 Klady využití biotechnologií.....	14
2.4.3 Zápory využití biotechnologií.....	14
2.4.4 Potenciální rizika GM plodin.....	15
2.5 Možnosti šíření transgenů.....	15
2.6 Metody využití k detekování.....	16
2.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	16
2.6.2 Elektroforéza	18
3. Materiál a metody	20
3.1 Materiál.....	20
3.2 Izolace DNA z ledvin kuřat.....	20
3.3 Kontrola izolace DNA.....	21
3.4 Detekce fragmentů DNA	22
3.4.1 PCR pro detekci kontrolních genů	23
3.4.2 PCR pro detekci transgenů	23
4. Výsledky	25
4.1 Izolace DNA.....	25
4.2 Detekce.....	25
5. Diskuze	28
6. Závěr.....	30
Seznam použité literatury.....	31

1. Úvod

Genetické modifikace jsou v současné době předmětem mnoha diskuzí. Lidská populace stále roste. V současnosti žije na zemi kolem 6,5 miliardy obyvatel. Podle francouzského Národního demografického ústavu (2005) se každý den narodí 365 tisíc dětí a ve stejném časovém úseku zemře 155 tisíc osob, z čehož vyplývá, že každým dnem se populace zvětšuje o 210 tisíc obyvatel a některé odhady hovoří o překročení 8,5 miliard obyvatel v roce 2025. Tato skutečnost klade stále vyšší nároky na zemědělství nejen co se týče objemu produkce, ale také co se týče její kvality. Zemědělství však má pouze omezené zdroje. Průměrná plocha obdělávané zemědělské půdy v roce 1961 byla 0,44 ha na obyvatele, v roce 2002 to bylo 0,26 ha na obyvatele a výhled na rok 2050 ukazuje pouze na 0,15 ha na obyvatele. Zemědělci a šlechtitelé jsou tímto postaveni před nelehký úkol a tím je zabezpečit dostatečné množství potravy pro stále se rozrůstající celosvětovou populaci z naopak stále se zužujících ploch obdělávané půdy. Klasickým šlechtěním se docílilo mnoha pokroků během minulých desetiletí, avšak u řady plodin se již dosáhlo hranice biologického výnosu a tím i hranice možností tohoto šlechtění. Zde nastupují nové poznatky genetiky a molekulární biologie nabízející další možnosti k tvorbě nových geneticky upravených (transgenních) odrůd zemědělských plodin.

Cíl práce

Úkolem bakalářské práce je zvládnout detekci geneticky manipulovaných produktů z krmiv v ledvinách kuřat, v jejichž dietě byla tato krmiva obsažena. Detekce bude prováděna molekulárně-genetickými metodami. V závěru práce by měla být vyhodnocena potenciální rizika pro konzumenty.

2. Literární přehled

2.1 Definice a historie geneticky modifikovaného organismu

Dědičná informace zemědělských plodin prošla během jejich domestikace a následného šlechtění dramatickou proměnou. Šlechtitelé si přitom vypomáhali i mezidruhovým křížením nebo umělým navozováním mutací. Většina těchto šlechtění probíhala metodou pokusů a omylů. S prudkým rozvojem molekulární genetiky se otevřela možnost zasáhnout do dědičné informace rostlin zcela cíleně. Takový cílený zákrok je označován jako genetická modifikace a jeho využití pro šlechtění zemědělských plodin lze považovat za celkem logické pokračování procesu, jenž započal před více než deseti tisíciletími domestikací planě rostoucích rostlin (Kadlec, nepublikováno).

Existuje celá řada definic geneticky modifikovaného organismu. Jako jedna z nejjednodušších je uváděna následující definice. Jako geneticky modifikovaný organismus (GMO) se označuje organismus, jehož genetický materiál (tedy sekvence DNA v buňkách) byl úmyslně změněn. V této souvislosti se často mluví o tzv. záměrné mutaci. Proces, kterým vzniká geneticky modifikovaný organismus (GMO), se nazývá transgenóza. Tato metoda je založena na vnášení jednotlivých klonovaných genů do rostlinného genomu.

Tyto metody odstartovaly v roce 1977, kdy bylo jednoznačně prokázáno, že půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vnáší svou DNA do rostlinného genomu (Chilton et al., 1977), ale byly předjímány již mnohem dříve. Úspěch byl zaznamenán Mary-Dell Chiltonovou a spolupracovníky (1977), kteří z bakterií *Agrobacterium tumefaciens* izolovali velký (přes 100 kb) plazmid. Ten byl rozštěpen restriční endonukleázou, jednotlivé fragmenty byly radioaktivně označeny a použity, každý samostatně, jako sonda při hybridizaci DNA-DNA v roztoku. Dva z několika desítek štěpů dávaly pozitivní signál. Tyto pokusy byly základem rychlého rozvoje studia transgenózy rostlin v následujících letech (Ondřej a Drobník, 2002).

Metody genového inženýrství umožnily získat jednoznačný důkaz přenosu a zapojení cizorodé DNA do dědičné informace rostlinných buněk. Transgenóza se tak stala dalším z bohaté palety nástrojů, které moderní šlechtění využívá (Ondřej a Rakouský, 1997). Do dědičného základu organismu je vnášen prověřený gen o známém složení a funkci - nesoucí pouze požadovanou vlastnost. Ostatní geny zůstanou

prakticky nedotčeny. 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 nesetkají (Ondřej a Drobník, 2002).

Uplatnění těchto biotechnologických postupů v zemědělství a 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).

2.2 Metody genetického inženýrství u rostlin

Do dnešního dne bylo vyvinuto mnoho postupů, jak vpravit cizorodou DNA do rostlinného genomu. Zdaleka nejrozšířenější jsou však dva okruhy postupů, a to přímá transformace nukleovou kyselinou a transgenoze pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (1.).

První způsob představuje mikrobombardování neboli mikrobalistická metoda, ve které se užívají zlaté nebo wolframové mikroprojektily o velikosti 2 µm. Kuličky se smíchají s roztokem plazmidové DNA, který obsahuje další látky. Voda se při laboratorní teplotě z roztoku odpaří, přičemž plazmidová DNA ulpí na kuličkách. Do pletiv se kuličky vstřelují přístrojem, který dává impulzy pro výstřel například rychlým vyrovnáním přetlaku helia (Ondřej a Drobník, 2002).

Druhý způsob transgenoze je u rostlin založen na stabilní integraci části plazmidové DNA bakterie *Agrobacterium tumefaciens* do jaderného genomu rostlin. I toto je přirozený proces existující v přírodě (2.). Transgenoze není nepřirozeným způsobem rozšíření genetické proměnlivosti. Vyskytuje se běžně bez zásahu člověka u půdních bakterií *Agrobacterium tumifaciens* a *Agrobacterium rhizoides*. Ti (tumor inducing - nádory vyvolávající) plazmidy těchto bakterií jsou schopné část své DNA tzn. T-DNA (transferred - přenášenou DNA) integrovat do chromozomu vyšších rostlin, kupříkladu tabáku. Onkogenní a opinové geny plazmidů vyvolávají u příjemce, tj. tabáku, tvorbu nádorů a v nich produkci opinů, tj. zdrojů dusíku a uhlíku, využívaných půdními bakteriemi. Jde v podstatě o genetický parazitismus bakterií na hostiteli - rostlině. Člověkem řízená transgenoze využívá zmíněné T-DNA bakteriálních plazmidů k transportu žádaných genů, sekvencí DNA různého původu, které v plazmidové DNA nahrazují opinové a onkogenní geny.

Předpokladem genového inženýrství, vytváření transgenních rostlin, se stalo využívání enzymů, tzv. restrikčních endonukleáz. Tyto enzymy řezou dvojitou DNA na dílčí úseky, segmenty, které často představují jednotlivé geny. Získané segmenty lze spojovat s cizorodou DNA pomocí enzymů ligáz. Vznikají tak rekombinované molekuly DNA obsahující DNA příjemce a segment T-DNA plazmidu nesoucí žádaný transgen (3.).

2.3 Příklady geneticky modifikovaných organismů

V současné době se lze setkat s geneticky modifikovanými mikroorganismy, rostlinami i živočichy. Příklady jednotlivých skupin geneticky modifikovaných organismů jsou uvedeny v přehledu níže.

2.3.1 Geneticky modifikované mikroorganismy

Příkladem geneticky modifikovaného mikroorganismu mohou být geneticky upravené bakterie, kterých se využívá například k výrobě lidského inzulínu. V tomto případě se přenáší rekombinantní DNA z B-buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní do bakterie *Escherichia coli* nebo *Saccharomyces cerevisiae*, které poté syntetizují inzulín (Procházka, 1998). GM mikroorganismy jsou také poměrně rozšířené používány v potravinářském průmyslu k fermentaci potravin (např. při výrobě sýrů), při výrobě potravinářských přísad, apod.

2.3.2 Geneticky modifikovaní živočichové

Nejčastějším zástupcem geneticky modifikovaných živočichů jsou transgenní myši, které v laboratorních podmínkách slouží k výzkumu lidských chorob. Byly tak již vychovány myši s pozměněným genem (gen Dhcr24), který kóduje enzym účastnící se při tvorbě cholesterolu. Výzkum myší zbavených cholesterolu dává velkou šanci účinné léčby lidem trpícím vysokou hladinou cholesterolu. Největší pozornost je v dnešní době věnována vybraným jedincům, kteří mohou být využiti pro produkci farmakologicky využitelných proteinů. Takto může být díky některým hospodářským zvířatům produkce některých proteinů mnohem efektivnější než produkce proteinů za pomoci

bakterií. Například argentinskí vědci oznámili, že přivedli na svět 4 geneticky modifikované jalovice, jejichž mléko obsahuje lidský inzulín (4.).

2.3.3 Geneticky modifikované rostliny

Cizí geny začaly být do rostlin začleňovány počátkem 80. let. Roku 1983 byl do rostlinného genomu vnesen gen řídící tvorbu neomycinofosfotransferázy II (*nptII*). Tento enzym podmiňuje rezistenci vůči kanamycinu. Modelovou rostlinou se stal tabák (*Nicotiana tabacum*). První polní pokusy s transgenními rostlinami se uskutečnily r. 1987. Tabák rezistentní k virům byl první geneticky modifikovanou plodinou, která byla povolena pro komerční využití. Firma Calgene (USA) získala r. 1994 jako první souhlas ke komerčnímu využití geneticky modifikované plodiny jako potraviny. Bylo to rajče Flavr Savr se zpóźděným dozráváním (Ovesná, 2006).

2.3.3.1 Geneticky modifikovaná Roundup Ready sója

Tato plodina byla vyvinuta společností MONSANTO. Jedná se o linii GTS 40-3-2, jež je tolerantní k herbicidu glyfosátu (účinné látce herbicidu Roundup) 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, část genu z *Petunia* hybrida zajišťujícího tvorbu tranzitního peptidu (CTP) pro transport enzymu EPSPS do chloroplastu a terminátor NOS 3 z *Agrobacterium tumefaciens* (Padgett *et al.*, 1995).

Podstatou této tolerance jsou tedy nové geny, které byly vloženy do rostlin, aby byly překonány účinky glyfosátu. Glyfosát (N-fosfonomethyl-glycin) inhibuje aktivitu enzymu EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy), který zprostředkovává syntézu aromatických aminokyselin. Nefunkční enzym blokuje syntézu aromatických aminokyselin, což vede ke smrti rostlin. Tento enzym je obdobný pro bakterie, houby a zelené rostliny, u živočichů se však nevyskytuje. U rostlin tolerantních k přípravku Roundup je funkce rostlinného EPSPS nahrazena upraveným EPSPS enzymem, který spolu s dalšími doprovodnými geny zodpovídá za herbicidní toleranci. K přenosu nových genů do rostlin se využívá speciálních vektorů, tzv. plazmidů, do jejichž DNA je možno včleňovat cizí DNA a tyto jsou pomocí různých metod přenášeny do rostlin.

Zvláštností enzymu EPSPS je, že je sice kódován v DNA v jádře a syntetizován v cytoplazmě, ale pak se přesunuje do chloroplastů a tam umožňuje onu pro rostliny zcela nepostradatelnou chemickou reakci. Pořadí aminokyselin v bílkovinné molekule vlastního enzymu EPSPS je u všech uvedených skupin organismů velmi podobné. Gen z bakterie *Agrobacterium* sp. kmen CP4 však řídí produkci nepatrně odlišného enzymu, necitlivého ke glyfosátu. Jelikož citlivost ke glyfosátu zabezpečuje jeden enzym a tedy jeden gen, zvolilo se jako nejschůdnější vnesení genu pro EPSPS necitlivý na glyfosát. Jako dárce takového genu padla volba na běžnou půdní bakterii *Agrobacterium*, o které je mj. známo, že v přírodě přenáší své geny do rostlin (Kadlec, nepublikováno).

GTS 40-3-2 bylo testováno na zkušebních polích ve Spojených státech, střední a jižní Americe, Evropě a Kanadě od roku 1991. Na stopadesáti zkušebních polích se vedl tříletý výzkum, jenž předcházela komercializaci daného kmenu. Výzkum dokázal, že se linie GTS 40-3-2 výrazně neliší od konvenčních sójových bobů. Ke komerčním účelům byla Roundup Ready sója schválena nejprve ve Spojených státech roku 1994, v Evropě to bylo o dva roky později v roce 1996 (konference FAO/WHO, 2000). V České republice byla uvolněna do oběhu v roce 2001.

2.3.3.2 Geneticky modifikovaná *Bt* kukuřice

Insekt-rezistentní *Bt* kukuřice linie MON 810 byla vyvinuta společností Monsanto. Tato kukuřice obsahuje insekticidní protein z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), což je půdní sporulující bakterie, která při sporulaci tvoří v buňce krystal speciální bílkoviny, tzv. Cry protein. Ten způsobuje, že si rostlina vytváří svůj vlastní toxin hubící hmyz, především zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) (Archer et al., 2000). Prvního regulačního schválení se linie MON 810 dočkala ve Spojených státech roku 1995 a od té doby mohla být užívána jako krmivo pro dobytek i jako lidská strava v mnoha zemích (Argentina, Kanada, Japonsko, Jižní Amerika a Evropská unie) (5.). V České republice byla *Bt* kukuřice zaregistrována v roce 2002. *Bt*-gen, tzn. část DNA pocházející z *Bacillus thuringiensis*, byl izolován a metodami genového transferu vnesen do genomu kukuřice. Výsledný hybrid kukuřice pak obsahuje kromě své „klasické“ genetické výbavy též *Bt*-gen, jehož exprese se projeví produkcí delta-endotoxinu přímo v rostlině.

Podstatou působení je, že *Bt* protein Cry1A(b) se v zažívacím traktu škůdce aktivuje na toxin, který se váže ke specifickým receptorům střevní výstelky. Po požití pletiv

takovéto rostliny larvou zavíječe dochází v důsledku perforace střev ke kolapsu zažívacího traktu. Larvy přestávají žrát a do 72 hodin hynou (Petr, 2005).

2.4 Vliv GMO na zemědělství a hospodářství

Doposud získané výsledky kultivace transgenních odrůd neprokázaly žádné nebezpečí jejich velkoplošného uvolňování do přírody. Na druhé straně byly získány transgenní rostliny, které nebyly zamýšleny k využití jako odrůdy, ale které prokázaly, že proteiny, jež jsou produkty některých transgenů, mohou být toxické. Transgenní rostliny, které již byly a ještě budou získány, představují velmi variabilní skupinu. Z tohoto důvodu a vzhledem k všeobecným konvencím práce s transgenními rostlinami je nutno, aby jednotlivé nové typy transgenních rostlin byly v počátečních fázích výzkumu izolovány od vnějšího prostředí a jen postupně do něho vpravovány. Od 1. 1. 2001 platí zákon č. 153/2000 Sb., obsahující zásady práce s transgenními organismy, na který navazují prováděcí vyhlášky Ministerstva životního prostředí ČR č. 372, 373 a 374/2000 Sb. (Doubková, 2007)

Využití GM plodin umožňuje např. pěstování vybraných plodin na původně nevhodných půdách při dosažení optimálních výnosů. Příkladem je transgenní rýže, do které byly vneseny nicotiamin-aminotransferasové geny pro tvorbu dvou typů fyto siderofores (látky zajišťující vázání železa) z ječmene pěstovaného na alkalických půdách s nízkou zásobeností železem. Díky této genetické úpravě bylo dosaženo poměrně vysokých výnosů (Takahashi, 2001).

2.4.1 Krátkodobé a dlouhodobé ekologické vlivy transgenních rostlin z hlediska možných rizik

Při hodnocení možných vlivů transgenních rostlin je třeba rozlišovat bezprostřední a krátkodobé vlivy na jedné straně a možné dlouhodobé vlivy na straně druhé. Podobně jako malý polní pokus nedá přehled o tom, k jakým dalším vlivům může docházet při pěstování na malých plochách, ani krátkodobý pokus nedá informaci o tom, jaké mohou být dlouhodobé vlivy daného GMO (Dale, 1999). Po uvolnění do prostředí musí následovat soustavné monitorování transgenních rostlin a jejich možných vlivů (Kjellsson a Strandberg, 2001).

Jedná se zejména o dlouhodobé vlivy transgenních rostlin, které vzhledem k tomu, že první transgenní rostliny byly uvedeny na trh v r. 1994, ještě nemohou být všechny známy. Ve Velké Británii se asi na 20 farmách provádí komplexní tříletý výzkum, jehož cílem je studovat právě dlouhodobé interakce, zahrnující vlivy transgenních rostlin na půdní mikroflóru, mikrofaunu a složení plevelů v místě aplikace a v okolí. Takové studie bude třeba provádět i s dalšími transgeny. Každá odrůda a každá zemědělská výroba má vliv na přírodu, biocenózy a prostředí. Nelze tedy prokázat neexistenci vlivů, ale je třeba srovnávat techniky kultivace transgenních rostlin s tradiční zemědělskou velkovýrobou. Z tohoto srovnání vycházejí transgenní odrůdy lépe než klasické (Kjellsson a Strandberg, 2001).

Existují podstatné rozdíly mezi riziky, která se mohou projevit na malé ploše po dobu pěstování jednoho roku, a těmi, která se mohou projevit při mnohaletém pěstování na velkých plochách. Nový typ transgenní rostliny je obvykle nejprve pěstován v uzavřeném skleníku. Jestliže nejsou zjištěny žádné znaky, které by mohly podmiňovat negativní vlivy na biodiverzitu a přírodní prostředí, zdraví člověka a zvířat, je možno požádat o povolení k uvedení do prostředí (Ondřej a Rakouský, 1997).

2.4.2 Klady využití biotechnologií

Jedny z největších kladů využití biotechnologií spočívají v možnosti zvýšené produkce a dosažení vyšší kvality potravin, větší rezistence vůči škůdcům, nepříznivým podmínkám či klimatu. Díky biotechnologiím můžeme dále odstranit alergenní či toxické látky z potravin nebo získat větší množství alternativních zdrojů energie z rostlin jako je biomasa, bionafta a bioethanol. V zemědělství pomáhají biotechnologie zejména k vyšší efektivitě zemědělské výroby snižující nároky na zemědělskou pěstební plochu, snížení chemických prostředků prostřednictvím využívání modifikovaných rostlin produkujících pesticidy, jakož i využívání organismů v určitých průmyslových oblastech (6.).

2.4.3 Zápory využití biotechnologií

U velké části veřejnosti způsobuje představa uvolnění živých modifikovaných organismů do životního prostředí stále obavy. Může být ohrožena biologická

rozmanitost v důsledku invazního charakteru či zvýšené konkurenční schopnosti. Potencionální přenos insertovaného genetického materiálu na další organismy, dopad na půdní bakterie a ovlivnění koloběhu dusíku, možné dopady na druhy, jež nebyly předmětem zájmu či nedostatečné informace týkající se toxicity a alergenitivy potravin vyrobených z GMO vzbuzují stále velké obavy (7.).

2.4.4 Potenciální rizika GM plodin

GM plodina může zplazit a tím se začlenit do planých či zplaňujících populací. Další riziko představuje možnost křížení GM plodiny s planými populacemi téhož druhu, s plevelnými biotypy téhož druhu vyskytujícími se přímo v polních kulturách nebo křížení dané plodiny s dalšími příbuznými druhy a možný únik populací jiných druhů, vyskytujícími se jak v polních kulturách, tak na přirozených stanovištích (Dale, 1999).

2.5 Možnosti šíření transgenu

Transgenní rostliny používané pro výzkum se obvykle pěstují jen v uzavřených systémech (laboratoř, kultivační místnost, izolační skleník pro transgenní rostliny), ale zpravidla se neuvolňují do přírody. Šíření transgenních odrůd, případně jen jejich transgenů v přírodě a v zemědělské krajině se může dít různými způsoby:

a) šíření semen tím, že semena transgenních odrůd budou před sklizní, při ní nebo po ní v přírodě vysypána a rozšířena na místech, kde mohou vzejít a dát vznik další generaci. Tento typ šíření lze omezit na minimum vhodnou agrotechnikou, způsobem transportu a způsobem nakládání s materiálem, ale nelze jej zcela eliminovat.

b) šíření transgenu pylem (Ondřej a Rakouský, 1997)

Dále je možný horizontální přenos transgenu, který si představme jako možnost přírodního přenosu prostřednictvím DNA, případně virových či jiných vektorů mezi nepříbuznými organizmy. Mezi různými bakteriálními druhy může docházet k přenosu některých plazmidů, které nesou geny pro rezistenci k antibiotikům nebo další geny, které nejsou pro bakterie nezbytné, ale za určitých podmínek jim poskytují selekční výhodu (Lorenz et al., 1996).

Bylo experimentálně prokázáno, že šíření transgenů není v ničem odlišné od šíření ostatních genů mezi různými odrůdami téhož druhu (Hokanson et al., 1997), nicméně je

sledováno jako nový jev. Omezíme-li pojednání o této problematice na transgenní odrůdy kulturních rostlin, situace u jednotlivých rostlinných druhů se velice liší. Posuzujeme-li situaci v ČR, některé druhy, jako bavlník nebo papája, se u nás nepěstují. Jiné se dosud na našem území nepěstovaly jako transgenní (sója, dýně, rajčata). Další druhy se u nás pěstovaly nebo pěstují pokusně, většinou na malých plochách (desítky čtverečních metrů) a jen v některých případech plocha osetá transgenními rostlinami činí až několik hektarů. Některé z těchto transgenních kulturních rostlin se množí pouze vegetativně (brambory). U dalších je šíření pylem nepravděpodobné, protože kulturní rostliny nemají plané příbuzné nebo semena nejsou produktem (řepa cukrovka). V semenářských podnicích je třeba dodržovat ochranné vzdálenosti, které vyplývají z vyhlášky k zákonu č. 92/1996 Sb. o odrůdách, osivu a sadbě a které dostačují stejně jako u klasických odrůd. Mezi kulturní rostliny, u nichž šíření pylem u nás přichází v úvahu, patří kukuřice a řepka (Ondřej a Rakouský, 1997).

Ke křížení s příbuznými planými druhy dochází nezávisle na transgenozí celkem u dvanácti ze třinácti nejvýznamnějších kulturních rostlin (Ellstrand et al., 1999).

2.6 Metody využití k detekování

2.6.1 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).

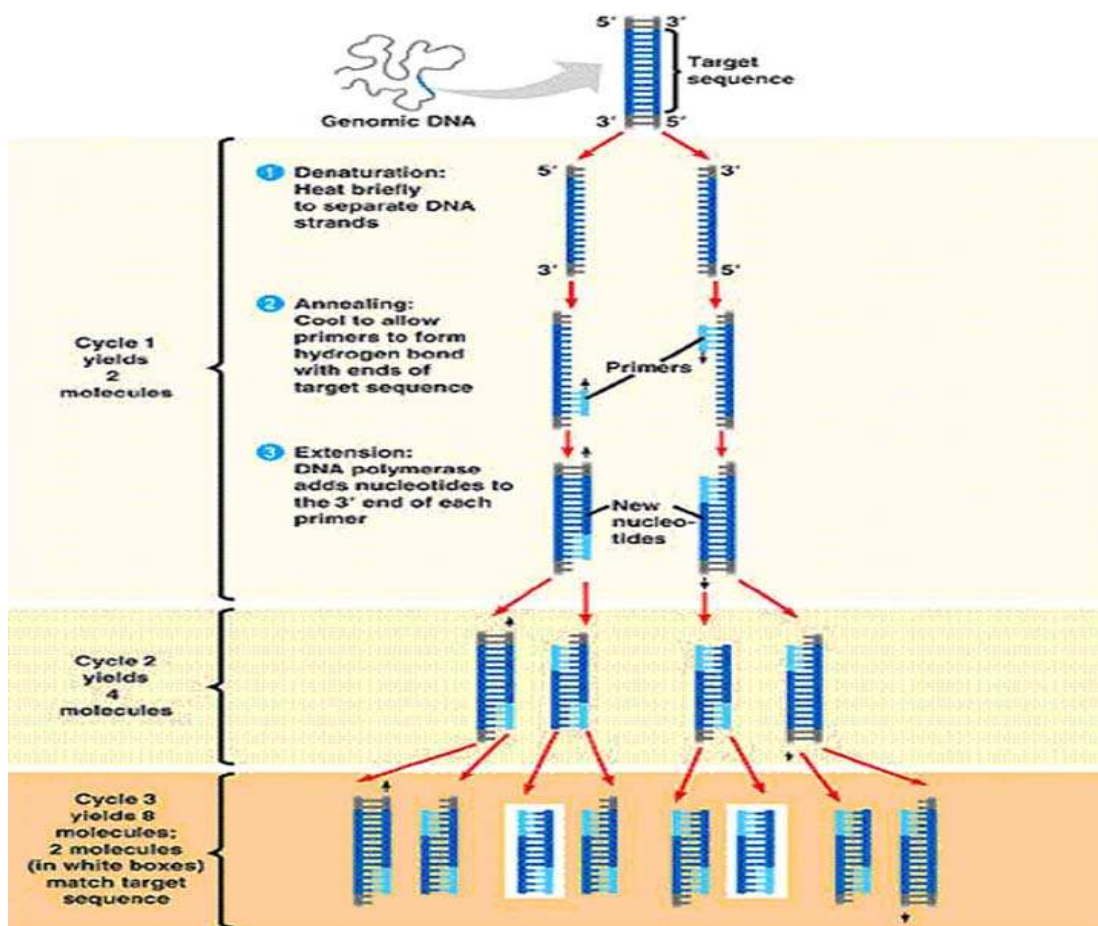
Tato technika umožňuje exponenciální zmnožení (amplifikaci) DNA *in vitro*, které je založeno na unikátních vlastnostech termostabilní Taq-DNA-polymerázou (izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*). Rozpoznání specificky krátkých oligonukleotidů (primerů) hybridizovaných na jedno řetězcové cílové DNA vede k následné polymerizaci DNA a selektivní namnožení 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). Tyto cykly probíhají následovně:

- 1) denaturace - při 94° C je dvouvláknová DNA denaturovaná na dvě jednovláknové templátové molekuly DNA
- 2) annealing - při 30-65°C je nasedání oligonukleotidových sond (primerů) na obou stranách cílové DNA
- 3) elongace - při 65-75°C dochází k syntéze nových vláken pomocí termostabilní DNA polymerázy od 5' konce ke 3' konci.

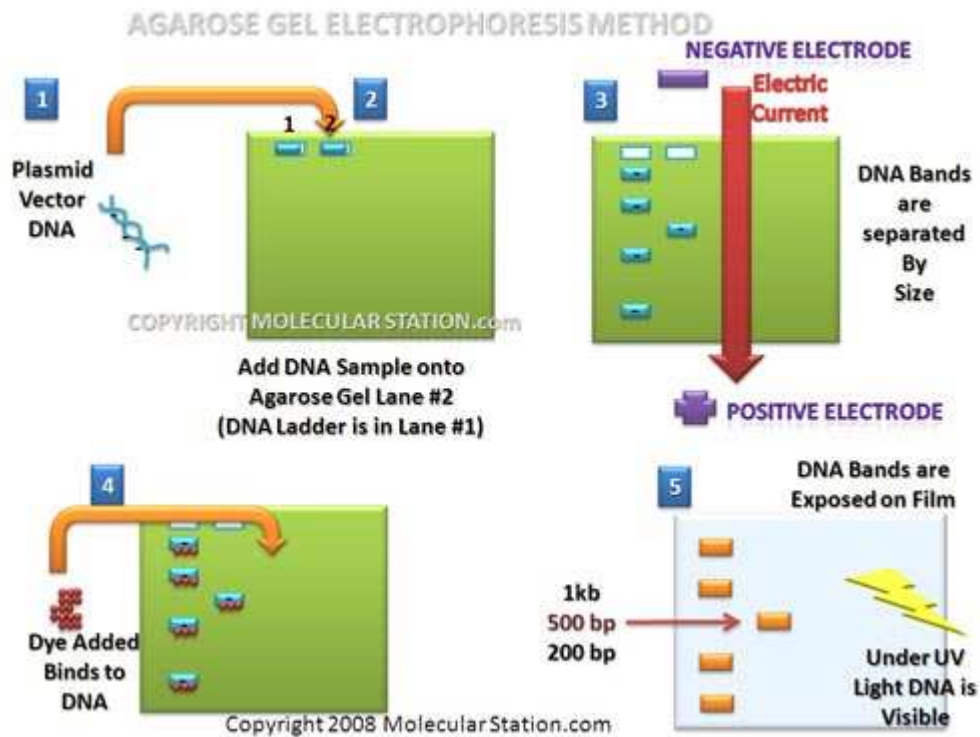
Reakce probíhá v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů. V průběhu 20-30 cyklů dochází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



Obr. č. 1 Princip PCR (<http://scienceblogs.com/insolence/upload/2007/06/PCR.jpg>)

2.6.2 Elektroforéza

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a 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).



Obr. č. 2 Elektroforéza (<http://www.molecularstation.com/images/agarose-gel-electrophoresis.jpg>)

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Pro daný výzkum byly vytvořeny tři pokusné a jedna kontrolní skupina. Pokusné skupiny byly tvořeny 100 kusy jednodenních nesexovaných brojlerových kuřat ROSS 308. Kuřata byla chována na hluboké podestýlce z drcené slámy. Byla krmena a napájena *ad libitum* a to krmivem do tubusových krmítek a vodou do klouboukových napáječek. Krmné směsi byly pro všechny skupiny stejného komponentového i živinového složení, lišily se zastoupením modifikované sóji a kukuřice a 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 brojlerových kuřat byla krmena modifikovanou extrudovanou Roundup Ready sójou, druhá pokusná skupina byla krmena GM kukuřicí, třetí skupina byla krmena jak Roundup Ready sójou tak GM kukuřicí a kontrolní skupina byla krmena pouze standardní sójou a kukuřicí.

Směs BR1 byla sypká, směsi BR2 a BR3 byly v granulovaném stavu. Kvůli experimentálnímu využití obsahovaly vyšší podíl sóji, než je běžně doporučované, což mělo za následek zvýšení hladiny metabolizované energie. Vyšší hladina energie neměla negativní vliv na růst a zdravotní stav kuřat.

Po ukončení výkrmu brojlerových kuřat ve 42. dni jejich věku bylo z každé skupiny náhodně vybráno pět kohoutů a pět slepic. Z těchto vybraných jedinců byla při porážce z křídelní žíly odebrána krev ke stanovení hematologických ukazatelů. Dále byla u kuřat zjištěna hmotnost jatečně opracovaného těla, jateční výtěžnost a hmotnost sleziny, jater, ledvin a srdce. Pro genotypizování byla použita odebraná krev, vzorky jater a ledvin, odebrané při porážce od 120 kuřat (10 kuřat z každé pokusné i kontrolní skupiny x 3 opakování).

3.2 Izolace DNA z ledvin kuřat

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

Postup izolace DNA z krve podle kitu NucleoSpin Blood:

- 1) K 200 μ l krve přidáme 25 μ l proteinázy K.
- 2) Přidáme 200 μ l pufru B3 a vortexujeme.
- 3) Inkubujeme při 70 °C po dobu 10- 15 min.
- 4) Přidáme 210 μ l 96- 100% etanolu a vortexujeme.
- 5) Vzorek přendáme do kolonky na nové ependorfce.
- 6) Stočíme po dobu 1 min. při 14 000 otáčkách.
- 7) Kolonku přendáme do nové ependorfky a přidáme 500 μ l pufru BW.
- 8) Stočíme po dobu 1 min. při 14 000 otáčkách.
- 9) Kolonku přendáme do nové ependorfky a přidáme 600 μ l pufru B5.
- 10) Stočíme po dobu 1 min. při 14 000 otáčkách.
- 11) Odstraníme roztok z ependorfky a opět stočíme za stejných podmínek.
- 12) Přendáme kolonku do nové ependorfky a přidáme 100 μ l předehřátého elučního (vymývacího) pufru BE.
- 13) Inkubujeme 1 min. při pokojové teplotě.
- 14) Stočíme po dobu 1 min. při 14 000 otáčkách.
- 15) Ověříme vyizolování DNA elektroforeticky na 1% agarózovém gelu při 80V po dobu 70 min.
- 16) Uložíme do chladu.

3.3 Kontrola izolace DNA

První kontrola izolace byla provedena standardní elektroforézou pro genomovou DNA na 1,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. Druhá kontrola izolace proběhla pomocí PCR pro růstový hormon kuřat. Pro tuto reakci byly použity primery 5'-ATC CCC AGG CAA ACA TCC TC-3'(forward) (*GCHIF*) a 5'-CCT CGA CAT CCA GCT CAC AT-3'(reverse) (*GCHIR*). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1. PCR cyklus obsahuje zahřátí na 95 °C po dobu 4 minut, následuje 35 cyklů složených z 30 vteřin při 94 °C, 120 vteřin při 60 °C a 90 vteřin při 72 °C (Bucková, 2008).

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

Tabulka 1: Složení reakční směsi

3.4 Detekce fragmentů DNA

K detekci fragmentů DNA sloužily komerční kity GMOIdent Roundup ReadyTM Soy (Eurofins- Gene Scan) a GMOIdent Mon810TM Corn (Eurofins – Gene Scan). Ke kitu je dodáván vždy premastermix pro specifický transgen a premasterix pro kontrolní gen. V případě Roundup Ready sóji se jedná o premastermix, označovaný RRS, u Bt kukuřice o premastermix YG-IR. Jako kontrolní geny byly vybrány v případě sóji gen pro lekti a v případě kukuřice HMG gen. Jako detekční metoda byla zvolena multiplex-PCR se dvěma páry primerů. Prvním párem byly primery obsažené v premastermixu pro sledovaný gen. Jako druhý pár byly použity primery pro růstový hormon kuřat (GCH1). Tento pár sloužil pro vnitřní kontrolu správného průběhu PCR reakce. Pokusy byly prováděny vždy v maximálním množství 5 vzorků s 1 pozitivní a negativní kontrolou. Pozitivní a negativní kontrola byla využívána pro kontrolu správnosti průběhu PCR reakce. Pro pozitivní kontrolu byla místo DNA vyizolované z krve kuřat použita genomová DNA, která byla dodána jako součást komerčního kitu. Jako negativní kontrola byla využita reakční směs, do které byla místo DNA přidána ve stejném množství H₂O.

PCR produkty byly následně analyzovány elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem.

3.4.1 PCR pro detekci kontrolních genů

Nejprve byla provedena PCR pro kontrolní geny. Složení reakční směsi vycházelo z údajů výrobce kitu a je uvedeno v tabulce 2.

Prvním krokem bylo zahřátí reakční směsi na 94 °C po dobu 2 minut, po kterém následoval cyklus 50 opakování při 94 °C a 25 sekundách, dále při 62 °C a 30 sekundách, při 60 °C a 45 sekundách, po kterých následovaly 3 minuty při 72 °C. Po cyklech proběhla analýza elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu, barveném ethidium bromidem, souběžně s elektroforézou byla provedena pozitivní a negativní kontrola.

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

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR s kontrolními geny

3.4.2 PCR pro detekci transgenů

Jako druhý krok byla provedena PCR pro detekci transgenů. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3. PCR cyklus byl stejný jako probíhal u PCR pro kontrolní geny (viz. kapitola 3.4.1. PCR pro detekci kontrolních genů). PCR produkty se analyzují 2,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem pomocí elektroforézy. Pokusy provádíme vždy v maximálním množství 5 vzorků 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

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro detekci transgenu

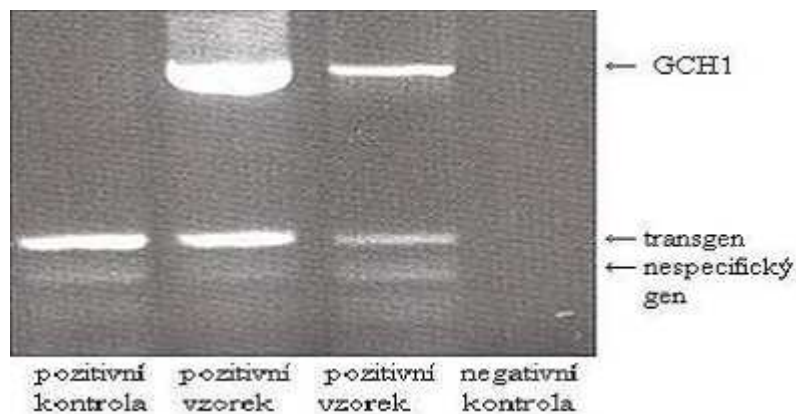
4. Výsledky

4.1 Izolace DNA

U všech dvaceti vzorků, na kterých byla provedena standardní izolace DNA, i přes použití kitů NucleoSPin Tissue, který je primárně určen pro izolaci z tkání savců, nebyly zjištěny žádné výrazné problémy s izolací z tkání kuřat ani žádné rozdíly v izolaci DNA mezi pokusnými skupinami. Ani při kontrole na 1,5% agarózovém gelu, obarveném ethidium bromidem nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi pokusnými skupinami.

4.2 Detekce

Přítomnost fragmentu kuřecího hormonu dlouhého 780 bp byla detekována pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu. Ani zde nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi pokusnými skupinami. Dále pomocí dvou multiplexních reakcí, kde bylo k vnitřní kontrole použito páru primerů pro gen GCH1, byla prováděna celková detekce. S daným genem byly sledovány transgeny a kontrolní geny pro lektin (u sóji) a HMG gen (u kukuřice), které sloužily jako předběžný screening na přítomnost DNA z rostlinných druhů v těle testovaných kuřat. První multiplex obsahoval primery pro GHCH1 a primery pro kontrolní geny. Druhý multiplex obsahoval primery pro GCH1 a primery pro transgeny Roundup Ready sóji a Bt kukuřice. Díky 780 bp amplikonu genu GHCH1 na agarózovém gelu byla potvrzena bezchybná amplifikační reakce, i kdyby chyběl fragment pro hledaný transgen či kontrolní gen. Výskyt fragmentu pro růstový hormon GHCH1 a fragmentu pro kontrolní gen kukuřice o délce 120 bp nebo fragmentu pro kontrolní gen sóji o délce 118 bp znamenal výskyt rostlinné DNA ve sledované tkáni. Výskyt fragmentů 92 bp a 128 bp u daných vzorků v kombinaci s pozitivní kontrolou GCH1 potvrzuje přenos transgenů z Bt kukuřice či Roundup Ready sóji. Příklad elektroforetické detekce pozitivního vzorku a pozitivní a negativní kontroly jsou uvedeny na obrázku 3 na příkladě detekce Roundup Ready sóji v krvi kuřat.

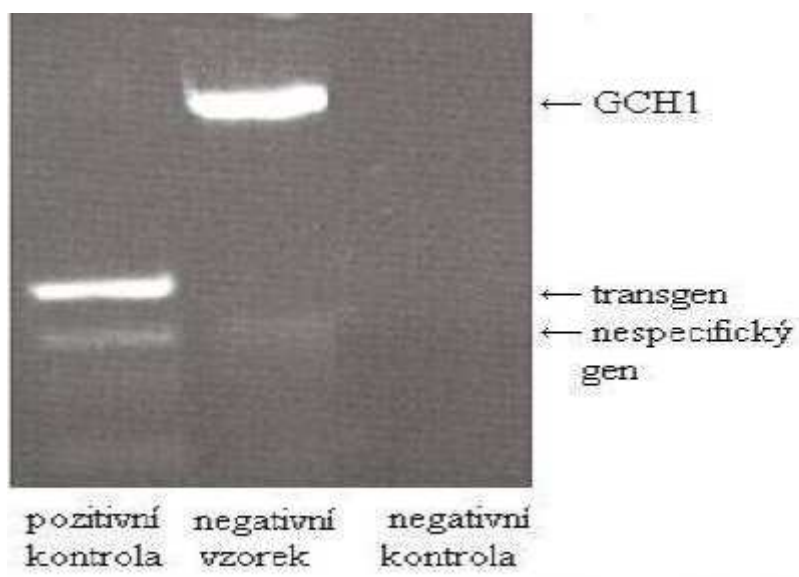


Obrázek č. 3 Výsledek elektroforózy detekce fragmentu Roundup Ready sóji v krvi kuřat

Detekovaný fragment	Počet analyzovaných zvířat	Počet pozitivních detekcí
Kontrolní gen Roundup Ready sója (lektin)	20	0
Transgen Roundup Ready sója (RRS)	20	0
Kontrolní gen Bt kukuřice (HMG)	20	0
Transgen Bt kukuřice (YGR)	20	0

Tab. 4 Celkové množství pozitivních záchytů v ledvinách kuřat.

Tabulka 4 znázorňuje výsledky detekce pro jednotlivé kontrolní geny a transgeny u námi vybraných vzorků z ledvin brojlerových kuřat. Rozdělení tabulky je určeno podle krmné směsi do 4 skupin. První 2 skupiny tvoří kontrolní gen a transgen k Roundup Ready sóje a další 2 skupiny jsou kontrolní gen a transgen k Bt kukuřici. U každé detekce bylo sledováno 20 vzorků a jak je z tabulky zřejmé, v žádném námi sledovaném vzorku nedošlo k pozitivnímu záchytu. Na obrázku 4 je zachycen případ negativního výsledku detekce transgenu Bt kukuřice v ledvinách kuřat. Výskyt fragmentu pro růstový hormon GCH1, ale postrádání fragmentu pro kontrolní gen Bt kukuřice o délce 120 bp znamená negativní kontrolu na výskyt rostlinné DNA ve sledované tkáni.



Obrázek č. 4 Výsledek elektroforézy detekce fragmentu Bt kukuřice v ledvinách kuřat

5. Diskuze

Trávicí trakt obsahuje velké množství žaludečních kyselin a mikrobiální aktivity, která napomáhá k rychlé degradaci nukleových kyselin (DNA). Musíme brát v úvahu, že všechny fragmenty, které se dostanou do střevního epitelu, nemusí být nutně hostitelským zvířetem absorbovány. To má za následek, že v některých případech jsou v tkáních sledovaného jedince fragmenty nalézány a v některých případech jsou výsledky negativní.

V této práci byla sledována možnost přenosu fragmentů rostlinné DNA a fragmentů transgenů z krmiv do ledvin kuřat. Souběžně byly prováděny další dvě práce zaměřené na obdobné téma. V první práci byla studována možnost přenosu fragmentů DNA z krmiv do krve a ve druhé práci do jater kuřat. V obou pracích byly, na rozdíl od této práce, zachyceny fragmenty DNA daného druhu transgenné rostliny i fragmentu transgenů ve sledovaných tkáních (Bucková, 2008; Vrabcová, 2008). Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky Flachowského a Aulricha z roku 2007, kteří našli fragmenty rostlinné DNA v různých tkáních kuřete, například ve svalech. Pokusy uskutečněné na třech skupinách brojlerů, které byly krmeny třemi různými dietami a kde byly odebrány vzorky z masa, kůže a dvanáctníku, naopak vyšly jako negativní (Khumnirdpetch et al., 2001).

Důvodů možného přenosu fragmentů DNA z krmiv do ledvin kuřat může být několik. Přejít fragmentů DNA a tedy rovněž transgenů přes střevní stěnu si lze vysvětlit jako fyziologický pochod, kdy nejsou všechny fragmenty DNA absorbovány, jak už bylo zmíněno na začátku diskuze.

Další důvody možných pozitivních nálezů lze spatřovat v některém z následujících faktorů.

Kokcidióza - onemocnění způsobené parazitickými prvky (kokcidiemi rodu *Eimeria*). Jejich výskyt může být potvrzen na všech místech, kde dochází k chovu drůbeže (malochovy, velkochovy). Kokcidiózu lze považovat za celosvětově nejčastější onemocnění drůbeže. Tento fakt zatím nijak výrazně nezlepšuje značný pokrok ve výživě, genetice, chemoterapii ani v samotném managementu chovu. Onemocnění se projevuje zánětem střevní sliznice různého stupně, který způsobuje pokles užitkovosti až úhyn postižených zvířat (Bedrník, 2005). Toto onemocnění způsobuje zánět střevní sliznice, tím dochází k vyvolání imunologické reakce, kdy bílé krvinky pohlcují

cizorodé látky, ke kterým může patřit i transgenní DNA, což má za následek, že při vyizolování transgenní DNA se námi testovaný vzorek projeví jako pozitivní. Nejen kokcidióza, ale každé infekční onemocnění organismu z jakéhokoli důvodu vyvolává imunitní reakci, která má za následek tvorbu bílých krvinek.

Aflatoxiny (látky s extrémně vysokou toxicitou) vytváří plísně rodu *Aspergillus* (*A.flavus* a *A. parasiticus*). Mají karcinogenní účinky a silně poškozují játra, stejně jako u kokcidiózy vyvolávají imunitní reakci. Aflatoxin B obsažen ve skořápkových plodech (pistácie, lískové ořechy, para ořechy, mandle), v kukuřici, arašíděch a koření (pepř, chilli, muškátový oříšek, paprika) též vyvolává imunitní reakci (Miller and Trenholm, 1997).

Pozitivní nález ve vzorku může způsobit prostá neopatrnost při odebírání ledviny, kdy si nezajistíme dostatečně sterilní a bezprašné prostředí.

6. Závěr

Cílem naší práce bylo zjistit možný přenos transgenních fragmentů ze střevního traktu do jiných orgánů v organismu, v našem případě do ledvin kuřat. Tato práce vycházela z předpokladu možného přenosu pomocí krve. Pro detekci bylo využito komerčních kitů a metody multiplex PCR. Jak lze vidět v tabulce 4, nebyl nalezen žádný pozitivní záchyt z 20 izolovaných vzorků. Tento výsledek může být zapříčiněn degradací DNA fragmentů během transportu ze střevního traktu do ledvin.

Seznam použité literatury

Literatura

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.

Bedrník, P., 2005: Kokcidióza drůbeže a její kontrola – minulost, přítomnost, budoucnost. *Veterinářství*. ISSN 0506-8231. 55 (3), 164-165.

Bezunk, F., 2007: Porovnání geneticky modifikované a nemodifikované kukuřice. *ZF JU*, 60 pp.

Bucková, P., 2008: Geneticky manipulované produkty z krmiv v játrech kuřat. *ZF JU*, 40 pp.

Chilton, M.D., M.H. Drummond, D.J. Merio, D. Sciaky and A.L. Montoya et al., 1977: Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263-271.

Dale, P.J., 1999: *Methods for Risk Assessment of Transgenic Plants*. Basel, 57-62.

Doubková Z., 2007: Regulace GMO v České Republice a Evropské Unii. Sborník ze semináře Pěstování geneticky modifikovaných rostlin. ČZU Praha, 40- 45.

Ellstrand, N. C., Prentice, H. C., Hancock, J. F., 1999: Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30, 539-563.

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.

Heller, K. J., 2003: Genetically Engineered Food. Methods and Detection.
str. 159, ISBN 3-527-30309-X

Hokanson, S. C., Hancock, J.F., Grumet, R., 1997: Direct comparison of pollen-mediated movement of native and engineered genes. *Euphytica* 96, 397-403.

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

Khumnirdpetch, V., Intarachote, U., Treemanee, S., Tragoonroong, S., Thummabood, S., 2001: Detection of GMOS in the broilers that utilized genetically modified soybeanmeals as a feed ingredient. Plant & Animal genome IX Conference, San Diego.

Kjellsson, G., Strandberg, M., 2001: Monitoring and surveillance of genetically modified higher plants. Guidelines for Procedures and Analysis of Environmental Effects, Berlin, 119.

Knippers, R., 1985: Molekulare genetik. Stuttgart.

Lin, J-J., Kuo, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., MacDonal, M. H., Kenworthy, W., Ude, G. N., Matthews, B. F., 1996: *Plant Molecular Biology Reporter*, 14 (2), 156-169.

Lorenz, M. G., Meyer, B., Wackernagel, W., 1996: Efficiency of horizontal gene transfer by natural genetic transformation of plasmids with homology to the *Pseudomonas stutzeri* chromosome and the effect of DNA restriction. Heidelberg, 101-104.

Miller, J. D., Trenholm H. L., 1997: *Mycotoxins in grain : compounds other than aflatoxin*, Eagan Press, 552.

Ondřej, M., Drobník, J., 2002: *Transgenozé rostlin*, ACADEMIA, 43 pp., ISBN 80-200-0958-2

Ondřej, M., Rakouský S., 1997: Rizika, zásady a perspektivy práce s transgenními rostlinami. Biol. Listy 62, 1-20.

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.

Padgette, 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, č. 1, ISSN 0139-6013

Procházka, S., 1998: Fyziologie rostlin, Academia, ISBN 80-200-0586-2

Šmarda, J., Dostál, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., 2005: Metody molekulární biologie, MU Brno, ISBN 80-210-3841-1

Takahashi, H., Ontsudo, K., Romero, M., Toyoshima, H., Okadome, H., Nishi, A., Sato, H., 2001: Evaluation of basic physical and chemical properties of amylose extender mutants of rice for the presumption of the suitable utilizations. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 48(8), 617-621.

Vrabcová, P., 2008: Detekce krmiv s genově manipulovanými organismy u kuřat. ZF JU, 50 pp.

Internet

1. www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_07_501-507.pdf .

2. www.biotrin.cz/czpages/BIOTRIN060315/Repkova.htm

3. www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=110014&iSub=566&PHPSESSID=3e

4. www.21stoleti.cz/view.php?cisloclanku=2007042001

5. www.ebra.org/ebrabulletin-genetically-modified-food---the-debate-continues_108.htm
6. www.priroda.cz/clanky.php?detail=335
7. www.priroda.cz/clanky.php?detail=335