



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Zdravotní risk a zisk geneticky modifikované zlaté rýže**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: [Specializace ve zdravotnictví](#)

**Autor:** Kateřina Kučerová

**Vedoucí práce:** RNDr. Štěpánka Šebestiánová, Ph.D.

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem **Zdravotní risk a zisk geneticky modifikované zlaté rýže** jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11. 8. 2020

.....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucí své práce, RNDr. Štěpánce Šebestiánové, Ph.D., za cenné rady, věnovaný čas při konzultacích a za trpělivý přístup. Také děkuji Ing. Tomáši Kocábkovi, Ph.D. a Ing. Janě Jehlíkové za odborné rady a čas, který mi věnovali v laboratoři Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR. V neposlední řadě také děkuji rodině a partnerovi za veškerou podporu při studiu.

## Zdravotní risk a zisk geneticky modifikované zlaté rýže

### Abstrakt

Lidé v rozvojových zemích velmi často trpí výrazným deficitem vitamínu A vlivem nedostatečné a nevyvážené stravy. Tento vitamín je nezbytný mimo jiné pro tvorbu zrakového pigmentu rhodopsinu. Podle Světové zdravotnické organizace každý rok kvůli tomuto deficitu oslepne až půl miliónu dětí. Jeho nedostatek také oslabuje imunitu a tím výrazně zvyšuje riziko úmrtí na různá infekční onemocnění. Nejlepším řešením této deficiencie by bylo, kdyby byl vitamín obsažen přímo v často jediném pokrmu, ke kterému se tyto lidé dostanou – v loupané rýži. Již existuje zvláštní, geneticky modifikovaná rýže, do které byla komplikovanou a rozsáhlou úpravou její DNA vnesena celá metabolická dráha, která zajišťuje produkci  $\beta$ -karotenu v této plodině. V teoretické části své práce se zabývám projektem zlaté rýže a vzniku této geneticky modifikované plodiny metodou nepřímé transgenozy, pomocí bakterie rodu *Agrobacterium tumefaciens*. Plazmidy této bakterie jsou schopny začleňovat části své genetické informace do cílového organismu. Díky restrikcčním enzymům, umíme do plazmidů vkládat námi vybrané geny, které poté zavedeme do konkrétní rostliny. Jsou ale tyto výtvořiny bezpečné? Názory na tyto plodiny jsou velice rozmanité, ale jedno zajímá všechny: jak bezpečně určit takto genově manipulovanou rostlinu? V laboratoři si tyto pokusy lze nejlépe osvojit na modelovém materiálu. Proto se v experimentální části své bakalářské práce zabývám transgenozí modelové rostliny *Nicotiana tabacum* pomocí vybraného kmene *Agrobacterium tumefaciens*. Tyto bakteriální kmeny mi byly poskytnuty ze soukromých sbírek Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích. Cílem mé práce v laboratoři bylo praktické zvládnutí metodiky přípravy modelové, geneticky modifikované rostliny a následné ověření přítomnosti vnesených genů ve zkoumaných vzorcích modelového organismu. Konkrétně genů pro rezistenci vůči antibiotikům. K tomuto účelu byla použita izolace DNA, PCR amplifikace a elektroforetické testy. Byl ověřen i signální gen používaný při agroinfekci. Dále bylo sledováno, kolik kopií transgenu se při agroinfekci do výzkumného materiálu integrovalo.

### Klíčová slova

Zlatá rýže; GMO; transgenozy rostlin; PCR; *Agrobacterium tumefaciens*; elektroforéza; *Nicotiana tabacum*

## Health risk and profit of genetically modified golden rice

### Abstract

People in developing countries very often suffer from severe vitamin A deficiency due to an insufficient and unbalanced diet. This vitamin is necessary, among other things, for the production of the visual pigment rhodopsin. According to the World Health Organization, up to half a million children go blind each year because of this deficit. Its deficiency also weakens the immune system and thus significantly increases the risk of death from various infectious diseases. The best solution to this deficiency would be if the vitamin was contained directly in the only food that these people get – in husked rice. There is already a special, genetically modified rice, into which has been introduced by a complicated and extensive modification of its DNA the entire metabolic pathway, which ensures the production of  $\beta$ -carotene in this crop. In the theoretical part I deal with the golden rice project and the origin of this genetically modified crop by the method of transgenesis, using bacteria of the genus *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmids of this bacterium are able to incorporate parts of their genetic information into the target organism. Thanks to restriction enzymes, we can insert genes selected by us into plasmids, which we then introduce into a specific plant. But are these products safe? Opinions on these crops are very diverse, but one thing interests everyone: how to safely identify a genetically engineered plant? In the laboratory, these experiments can best be mastered on model material. Therefore, in the experimental part of my bachelor thesis I deal with the transgenesis of the model plant *Nicotiana tabacum* using a selected strain of *Agrobacterium tumefaciens*. These bacterial strains were provided to me from the private collections of the Institute of Molecular Plant Biology in České Budějovice. The aim of my work in the laboratory was to master the practical methodology of preparation of genetically modified plant and subsequent verification of the presence of introduced genes in the examined samples of the model organism. Specifically, genes for antibiotic resistance. DNA isolation, PCR amplification and electrophoretic assays were used for this purpose. The signal gene used in agroinfection was verified too. Also, it was monitored how many copies of the transgene were integrated into the research material during agroinfection.

### Key words

Golden rice; GMO; plant transgenesis; PCR; *Agrobacterium tumefaciens*; electrophoresis; *Nicotiana tabacum*

## Obsah

Úvod .....	8
Teoretická část .....	9
1. Vitamín A a lidské zdraví .....	9
2. Proč zrovna modifikovaná rýže? .....	11
3. Vznik GM rýže .....	12
4. Modifikace rýže .....	13
5. Transgenóze rostlin pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	15
6. Risk v podobě GMO .....	16
4. Podpora .....	18
Cíle práce .....	19
Metodika .....	20
1. Příprava médií .....	20
1.1. MS médium .....	20
1.2. Kultivační agarové MS.R. médium .....	21
1.3. LK médium .....	22
2. Bakterie rodu <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
3. Transformace listových segmentů .....	24
4. Přenášení tabákových listů .....	25
5. Izolace DNA metodou mp (miniprep) .....	26
6. Elektroforetická separace .....	27
7. Izolace rostlinné DNA .....	28
8. PCR .....	28
9. Průkaz signálního genu GFP .....	29
10. Výsev semínek .....	29
Výsledky .....	30
1. Elektroforetická separace bakteriální DNA .....	30
2. Hlavní průkaz genu z rostlin .....	31
3. Průkaz signálního genu GFP .....	32
4. Štěpné poměry semínek .....	34
Diskuze .....	36
Závěr .....	39
Seznam použité literatury .....	41

Seznam obrázků .....	44
Seznam tabulek .....	45
Přílohy .....	46
Seznam zkratk .....	49

## Úvod

Deficience vitamínu A je stále aktuální a velký problém v rozvojových, zejména asijských zemích. Způsobuje šeroslepost až slepotu, sníženou funkci imunity, vývojové vady a mnoho dalších zdravotních problémů, které ve své práci popisují. Nejvíce jsou jí ohroženy malé děti a těhotné ženy. A protože celá karotenoidní metabolická dráha již byla molekulárně popsána a identifikována, zdálo se profesorovi Potrykusovi jako dobrý nápad, zavést biosyntézu provitaminu A do endospermu rýže (*Oryza sativa*) za pomoci stále se rozvíjejících metod genetického inženýrství. Loupaná rýže je totiž hlavním základním jídlem pro stovky milionů lidí. Jedlá část rýže, tzv. endosperm, je za normálních okolností naplněna pouze škrobovými granulemi a bílkovinnou složkou. Zlatá rýže byla upravena tak, aby vytvářela  $\beta$ -karoten, prekurzor vitamínu A, a hromadila ho v již zmiňovaném endospermu. Díky vnesenému  $\beta$ -karotenu získala zrnka typicky zlatou barvu. Momentálně probíhají výzkumy na dobře chráněných polích na Filipínách a v Bangladéši.

Z metod genového inženýrství se k výrobě těchto modifikovaných potravin využívá metoda zvaná transgenóza. Konkrétněji se jedná o tzv. agroinfekci, pomocí gram-negativní bakterie rodu *Agrobacterium tumefaciens*, která je schopna přenosu své genetické informace do cílové rostliny. Díky restrikcčním enzymům umíme do plazmidů vkládat námi vybrané geny, které poté zavedeme do konkrétní rostliny. Jsou ale tyto výtvořiny bezpečné? Jako každý geneticky modifikovaný organismus se musí potýkat s politickými, ideologickými i emocionálními překážkami, které souvisí s GMO (geneticky modifikovanými organismy). Regulace vlády, nepřiměřený strach až nenávisť, dogmatické odmítnutí, většina z toho je založena na neznalosti faktů, dezinformacích, zkreslení pravdy a lži na straně environmentalistů a dalších aktivistických organizací i jednotlivců. GMO byly vždy kontroverzním tématem a názory na tyto plodiny se velmi liší. Jedno ale zajímá všechny – jak a jestli vůbec lze bezpečně určit takto genově manipulovanou rostlinu? Nejčastěji se pro detekci GM (geneticky modifikovaných) potravin používá analýza DNA s pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce). Metodou PCR mohou být amplifikovány promotory, terminátory či vložené geny, specifické části vkládaných DNA konstruktů, sekvence zahrnující část genomu rostliny nebo část vloženého DNA konstruktů.



## Teoretická část

### 1. Vitamín A a lidské zdraví

Vitamín A patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích a přirozeně existuje ve třech formách: retinol, retinal a kyselina retinová. V těle je ukládán do jater (Solomons, 2012). Přijímat ho v potravě můžeme buď jako předem vytvořený vitamin A (retinol) nebo provitamin A ( $\beta$ -karoten a další karotenoidy). Nejlepším zdrojem předem vytvořeného vitamínu A jsou zvířecí játra, dále pak mléčné výrobky a vajíčka. Provitamín najdeme v zelenině, zejména listové, dále v mrkvích, rajčatech a v některém ovoci, jako je například mango (Ross *et al.*, 2014). Množství tohoto důležitého vitamínu je určováno v jednotkách RAE (Retinol Activity Equivalents), někdy i v IU (International Unit). Doporučená denní dávka se liší v závislosti na věku a pohlaví. Např. u dítěte od 1 roku do 3 let (bez ohledu na pohlaví) je doporučená dávka 300  $\mu$  RAE, zatímco u dospělé těhotné ženy, u které došlo ke spuštění laktace, je doporučen denní příjem 1300  $\mu$  RAE (WHO, 2009). Vitamín A je nezbytný pro normální vidění, růst a diferenciaci epitelových buněk, které lemují různé tělní dutiny, keratinizaci, imunitní systém, vývoj pohlavních buněk, plodu, placenty a další různé metabolické funkce (Reddy, 2003).

Pro obyvatele bohatých, dobře rozvinutých západních zemí, bude nedostatek vitamínu A stěží označována za současné nebezpečí. Tato deficiencie je ovšem stále aktuálním a velkým problémem v rozvojových, zejména asijských a afrických zemích. VAD (vitamin A deficiency, česky deficiencie vitamínu A) je podle Světové zdravotnické organizace problémem celkem ve 122 zemích na světě. Je definována jako koncentrace retinolu v séru nižší než 0,70  $\mu$  mol/l (WHO, 2009). K analýze vitamínu A ze séra se využívá HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo hmotnostní spektrometrie (Ross *et al.*, 2014).

Nezastupitelný význam má tento vitamín pro oči. Tyčinky na sítnici v oku za normálních okolností obsahují zrakový purpur rhodopsin. Ten je účinkem světla rozkládán na opsin a již zmiňovaný retinal. Nedostatek vitamínu A vede tedy nejdříve k šerosleposti neboli hemeralopii (též nyktalopie), kterou definujeme jako sníženou schopnost vidění za šera (Beneš *et al.*, 2015). Dalším stádiem je vznik abnormálních změn spojivky a přítomností tzv. Bitotovy skvrny ve tvaru trojúhelníku (perleťově bílá skvrna na povrchu oka).

Dlouhodobý, takto neléčený stav, vede k xeroftalmii, která se vyznačuje suchostí oka a změnami buněk rohovky. To vede ke vzniku vředů a perforaci rohovky, což má za následek trvalou slepotu (Solomons, 2012). Takto vzniklá slepota je známa již u starověkých Egypťanů – byl nalezen papyrus z roku přibližně 1550 př.n.l., který tento jev popisuje a jako léčba byla těmto pacientům podávána zvířecí játra, ačkoliv důvod, proč tato léčba funguje, byl zjištěn až na začátku 20. století, kdy byl tento vitamín objeven (Regis, 2019).



*Obrázek 1 Zjizvení rohovky u dítěte v důsledku VAD © John DC Anderson, 1999. Community Eye Health Vol 12, No 31.*

Pro imunitní systém je důležitá hlavně kyselina retinová, která je produkována několika typy buněk, které exprimují retinální dehydrogenázy a přeměňují tak vitamín A na jeho hlavní biologicky aktivní metabolit – all-*trans*-retinovou kyselinu (ATRA) neboli tretinoin. Ten se váže na jaderné receptory kyseliny retinové, které jsou exprimovány v lymfoidních buňkách a působí jako transkripční faktory pro regulaci migrace a diferenciaci buněk. Navíc podporuje odpovědi efektorových T-buněk při autoimunitních onemocněních nebo při probíhající infekci.

Dále inhibuje diferenciaci naivních T buněk na Th17 buňky. Důležitá je i u dendritických buněk, kde kyselina zajišťuje migraci, diferenciaci a schopnost prezentovat antigen. Dále je produkce kyseliny pomocí APC (antigen prezentujících buněk) nutná pro diferenciaci naivních CD4+ T-lymfocytů na indukované regulační T-lymfocyty (Raverdeau, Mills, 2014). Jednodušeji řečeno, deficiencie vitamínu A ještě zhoršuje projevy jinak běžných onemocnění.

Nedostatek (ale i nadbytek) vitamínu A v těhotenství může vést k vrozeným vývojovým vadám. Jak již bylo zmíněno, vitamin A je důležitý pro vývoj orgánů embrya, jako jsou plíce, ledviny, oči, kosti, srdce a celý oběhový systém, ale i celý dýchací, urogenitální a nervový systém (Ross *et al.*, 2014). Odhaduje se, že 19 milionů těhotných žen, zejména v subsaharské Africe, jihovýchodní Asii a střední Americe má VAD a více než polovina z nich trpí šeroslepostí, a to hlavně v pozdějších stádiích těhotenství (Sherwin *et al.*, 2012). Je pozoruhodné, kolik vážných až smrtelných dopadů může zapříčinit nedostatek jednoho vitamínu. Studie z roku 2010 ukázala, že kvůli této deficienci zemře ročně asi 700 000 dětí mladších pěti let, tedy téměř 2 000 úmrtí denně, což je více než na tuberkulózu nebo malárii. Podle odhadu založeného na zprávě UNICEF by poskytnutí vitamínu A zabránilo úmrtí 1,9 – 2,7 milionům dětí (Regis, 2019).

Navíc byla strava s vysokým obsahem karotenoidů spojena se sníženým rizikem makulární degenerace, rakoviny kůže, rakoviny prostaty a kardiovaskulárních onemocnění (Reddy, 2003).

## **2. Proč zrovna modifikovaná rýže?**

Mezi časté argumenty odpůrců GMO patří názor, že se přeci velké množství vitamínu A nachází v játrech, žloutcích a v jiných, již zmíněných potravinách (Ondřej, Drobník, 2002). Tyto potraviny jsou ovšem pro chudé obyvatele třetích zemí spíše luxusem, nikoliv každodenní záležitostí. Toto řešení se považuje za vcelku nereálné. Druhým možným, a často navrhovaným řešením, je přimět obyvatele k většímu pěstování listové zeleniny, například špenátu. Mnozí, kteří trpí VAD, ovšem nemají k dispozici vlastní půdu. A ti, kteří přeci jen ano, svoji úrodu paradoxně raději prodají a zisk využijí na jiné účely. Dalším, teoreticky vhodným řešením, by byla suplementace vitamínu A v průmyslově vyráběných tabletách. Příslun takových tablet těmto lidem ovšem nejsou vlády třetích zemí schopné zajistit pravidelně, a už vůbec ne celoživotně (Regis, 2019).

UNICEF a další podobné organizace pracovaly na tzv. doplňkových programech, které měly zajistit suplementaci vitamínu A v tabletách. Bylo ovšem nemožné zajistit tablety všem, obzvláště v nejchudších venkovských oblastech. Mezi další problémy těchto programů patřilo časté vyčerpání zásob tabletek, zpoždění při přepravě, poruchy při zadávání objednávek, malá motivace místních zdravotnických pracovníků a tím pádem také špatný dohled nad dávkami suplementujících (Boyle, 2016).

Rýže (*Oryza sativa*) je základní a často jediné jídlo milionů lidí na planetě. Je i v chudých zemích k dispozici všude a levně, proto je pro umělé obohacení o  $\beta$ -karoten ideální (Regis, 2019).

### 3. *Vznik GM rýže*

Výzkum geneticky vylepšené rýže začal již v roce 1982 a byl z velké části sponzorován Rockefellerovým biotechnologickým programem. Jeho cílem je odstranění deficitu vitamínu A u lidí, kteří si nemohou dovolit pestrou stravu (Ondřej, Drobník 2002). Na tomto projektu zpočátku pracoval pouze profesor Ingo Potrykus, působící na vysoké technické škole v Curychu. V roce 1990 Potrykus a jeho tým vytvořili pomocí *Agrobacterium tumefaciens* první transgenní rýži na světě, která měla zatím pouze tzv. selekční marker – byla rezistentní na antibiotikum hygromycin. Když se v roce 1993 pořádal v New Yorku pod záštitou Rockefellerovy nadace workshop „Potenciál pro biosyntézu karotenoidů v endospermu rýže“, setkal se Ingo Potrykus poprvé s Peterem Beyerem a dohodli se spolu na spolupráci. Beyer se tou dobou zabýval narcisy, jejichž žlutá barva pochází z  $\beta$ -karotenu, a tedy dobře znal celou biosyntetickou dráhu karotenoidů (Potrykus, 2001). Pro Potrykuse a Beyera bylo klíčové objevení plazmidů. Plazmidy jsou malé kruhové úseky DNA, které se volně pohybují v cytoplazmě bakterií a replikují se nezávisle na chromozomech. Tyto kruhové struktury se dají otevřít, do mezery vložit nový gen a pak kruh znovu uzavřít. Otevření plazmidu je umožněno restrikcí endonukleázami, zatímco uzavření je provedeno jiným enzymem, ligázou. Tuto technologii nakonec použili pro zlatou rýži (Regis, 2019). Spolupráce Potrykuse a Beyera byla velmi úspěšná, a tak v roce 1999 byla na světě první GM rýže (kultivar japonica), která vytvářela 1,6  $\mu$ g  $\beta$ -karotenu na 1 g endospermu.

Uspěli tak ve zdánlivě nemožném projektu a umístili do rýže metabolický řetězec, který je schopný v endospermovém pletivu přeměnit tamní prekursor GGPP (geranylgeranyl difosfát) v potřebné karoteny. Díky vnesenému  $\beta$ -karotenu získala zrnka typicky zlatou barvu (Potrykus, 2001).

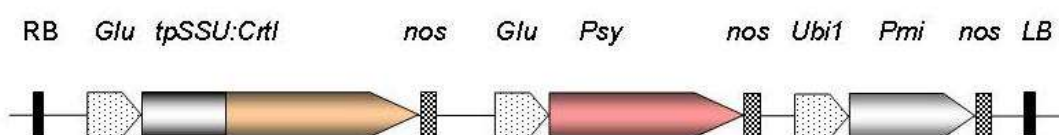
#### 4. Modifikace rýže

Některé části rýže jsou schopny tvořit GGPP (geranylgeranyl difosfát), prekursor  $\beta$ -karotenu, pomocí 4 enzymů – fytoensyntázi, fytoendesaturázi,  $\beta$ -karotendesaturázi a lykopen- $\beta$ -cyklázi. Jedná se ale jen o zelené části rýže, které se nekonzumují (Ondřej, Drobník, 2002). Tyto 4 enzymy jsou tedy přidány do endospermu rýže a to pomocí tzv. genových expresních kazet. Gen pro každý enzym ovšem nikdy nestačí, musí být přítomný také promotor, který je zodpovědný za projev genu, dále musí být přítomný terminátor, který je zodpovědný za přeložení RNA na protein a dále tranzitní sekvence, která slouží k nasměrování proteinu do endospermu. Navíc je jako selekční marker použit gen rezistence na určitá antibiotika. Pro zlatou rýži byl použit gen kódující rezistenci na antibiotikum hygromycin s vlastním promotorem a terminátorem (Ho, 2002).

První prototypy zlaté rýže měly buď dva, nebo tři zavedené geny plus transgen s antibiotickou rezistencí jako selekční marker. Rostliny se dvěma geny navíc obsahovaly fytoensyntetázu (*psy*) z *Narcissus pseudonarcissus* a fytoendesaturázu (*crtI*) z bakterie *Erwinia uredovora* (nově pod názvem *Pantoea ananas*). Ty byly přeneseny společně v genové kazetě. Ty se třemi geny měly navíc lykopen- $\beta$ -cyklázový (*lcy*) transgen, přenesený do další samostatné kazety. Tato rýže dosahovala ovšem jen již zmíněných 1,6  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu na 1 g zrna, a nebyla tak schopná pokrýt denní příjmy provitaminu A u cílové populace (Ye *et al.*, 2000). Aby byla rýže skutečně prospěšná, musela by obsahovat alespoň 2  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu na 1 g zrna (Regis, 2019). V roce 2000 navíc uzavřeli vědci partnerství s agrochemickou švýcarskou společností Syngenta a dostali tak přístup k řadě klíčových technologií. (Potrykus, 2001).

V případě GR1 (Golden rice 1) nahradili vědci ze Syngenty virový promotor *crtI* transgenu promotorem navrženým tak, aby měl největší enzymatickou aktivitu právě v rýžovém zrně a pod *crtI* je nyní karoten desaturáza. Také vyvinuli selekční systém, který nevyužíval gen rezistence na hygromycin. Místo toho použili tzv. systém pozitivní selekce na bázi manózi (gen *Pmi*). Hladiny karotenoidů v zrnech této rýže dosahovaly 6  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu na 1 g zrna (Al-Babili, Beyer, 2005).

U nejnovější verze, GR2, zavedli vědci tři geny v jedné kazetě, znovu umístěny pod kontrolu promotoru specifického pro endosperm. Opět se jednalo o bakteriální gen *crtI* a gen *psy*, ten byl ovšem tentokrát z kukuřice (*Zea mays*). Vědci zjistili, že právě ten dokáže u rýže výrazně zvýšit produkci  $\beta$ -karotenu. Třetí gen byl opět manózový selekční gen (*Pmi*). Kazeta GR2 byla zavedena do genomu americké odrůdy kaybonnet a dosahovala až 37  $\mu$ g na gram zrna.



Obrázek 2 Genový konstrukt Golden rice 2, Golden Rice Humanitarian Board © 2005-2020.

Popis genového konstrukt Golden rice 2 (obr. 2): RB, pravá hraniční sekvence; *Glu*, glutelinový endosperm-specifický promotor; *tpSSU*, ribulóza bisfosfát karboxyláza z hrachu; *CrtI*, karoten desaturáza z *Erwinia uredovora*; *nos*, terminátor genu nopalin syntáza; *Psy*, gen fytoen syntáza ze *Zea mays*; *Ubi1*, rýžový polyubiquitin promotor; *Pmi*, fosfomanóza izomeráza z *E. coli* pro pozitivní selekci; LB, levá hraniční sekvence (Paine *et al.*, 2005).



Obrázek 3 Golden rice typu 1 a 2 v porovnání s přírodní rýží. Převzato z Paine *et al.*, 2005.

## 5. *Transgenoze rostlin pomocí Agrobacterium tumefaciens*

Transgenoze obecně je metoda genového inženýrství, která je založená na cíleném vnášení jednoho nebo více genů do cizího genomu. Metody transgenoze můžeme rozdělit na přímé (bez prostředníka) a nepřímé (pomocí virů, bakterií). Pro přípravu zlaté rýže byla použita metoda nepřímé transgenoze. Konkrétně pomocí již zmíněné bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která se běžně vyskytuje na kořenových systémech rostlin a využívá je jako své hostitele (Vondrejs, Štorchová, 1997). Tato gramnegativní bakterie napadá poraněnou rostlinu, která produkuje fenolickou látku typu acetosyringonu (např. katechol, acetovanilon, hydroxyacetofenon apod.). Ten se naváže na proteinové receptory na membráně bakterií *Agrobacterium*. To do rostliny vnese část své DNA, lokalizované do části velkého plazmidu Ti, který obohatí rostlinu o dva typické geny:

- geny k tvorbě opínů, což jsou většinou estery bazických aminokyselin s jinými skupinami nízkomolekulárních látek, které bakterii dále slouží jako zdroje dusíku, uhlíku a energie
- geny, které hostitele přinutí k vyšší biosyntéze dvou typů hormonů: auxinů a cytokininů. Tyto typy hormonů vedou k tomu, že se buňky přestanou diferenciovat, což je příčinou vzniku viditelných nádorů na kořenech napadené rostliny. Toto onemocnění, které bylo později pojmenováno jako „crown gall“, popsal jako první už Aristoteles. Pro laboratorní účely je ovšem bakterie upravena tak, aby tento nádor nevznikal.

Ti (tumor indukující) plazmid *Agrobacteria* má délku 150-200 kb a obsahuje 2 nepostradatelné úseky:

- T-DNA (transferred DNA)  
Velký 15–45 kb. Nemá žádné geny pro vlastní integraci, jen vstupuje do rostliny. Začleňuje se do rostlinného genomu náhodně. Nejlépe prostudované typy jsou oktopinový (dále rozdělen na T<sub>L</sub> a T<sub>R</sub>) a nopalinový.
- Virulentní úsek (*vir*) – obsahuje geny nutné pro přenos a integraci T-DNA do buňky, dlouhý 35 kb (Ondřej, Drobník, 2002).

Námi cílená metoda transgenozy využívá laboratorně upravené kmeny *Agrobacterium tumefaciens* (Navrátil, 2006). Ty postrádají v Ti plazmidu oblast T-DNA, která je nahrazena v podobě binárního vektoru. Binární vektor představuje plazmid, jehož klonovací místo je ohraničeno hraničními sekvencemi, mezi nimi se nachází: transkripční promotor – nejčastěji CaMV neboli 35S, gen kódující požadovaný protein a transkripční terminátor – nejčastěji nopalinsyntáza (Lee, Gelvin, 2008). Pomocí těchto bakterií se dají transformovat i nerostlinné buňky, jako jsou například prokaryotní buňky, kvasinky a další houby (Lacroix et al., 2006). Způsob provedení transgenozy je časově náročný. Část rostlinky je vložena do suspenze bakterií. Následně jsou dány na živné médium s fytohormony, které podpoří tvorbu kalusů z transformovaných buněk. Netransformované buňky jsou selektovány pomocí selekčního markeru v médiu. Jedná se o již zmíněná antibiotika, další možností jsou herbicidy (Navrátil, 2006).

## **6. Risk v podobě GMO**

Mnoho lidí na světě se bojí potenciálních negativních důsledků pěstování a konzumace zlaté rýže (McLean, 2005). Problémy s aktivisty začaly hned na samém začátku již v roce 2001, kdy zlatá rýže „překročila“ hranice Filipín kvůli testování. Lidé z organizace Greenpeace okamžitě začali technologii označovat za nebezpečnou a riskantní, aniž by měli potřebné informace (Regis, 2019). První prototypy GR obsahovaly selekční gen, díky kterému byly výsledné rostliny rezistentní na antibiotikum hygromycin (Potrykus, 2011). Někteří kritici GMO tvrdili, že konzumace stravy obsahující geny rezistence na antibiotika by mohla vést k nechtěnému vytvoření rezistence na antibiotika u člověka, tedy že by tento gen mohl vést k rezistenci mezi bakteriemi ve střevním traktu spotřebitele. Tato umělá rezistence, jak uvedli tito kritici, by se mohla šířit na samotné bakterie způsobující onemocnění procesem známým jako horizontální přenos genů, kvůli kterému budou škodlivé bakterie imunní vůči antibiotikům, které používáme k léčení, a to by mohlo mít fatální následky (Regis, 2019). To ovšem vědci považují za nepravděpodobné. Gen rezistence na antibiotika by musel uniknout rostlinné buňce, přežít ve slinách a žaludečních kyselinách. Kromě toho by se gen musel usadit na správném místě v genomu bakterie způsobující onemocnění (Stratilová, Jedličková, 2016). Je to ale vůbec možné? Bez ohledu na to selekční systémy rezistence na antibiotika představují pro mnoho lidí nebezpečí a je rozumné je zcela odstranit a nahradit. Proto byl také později vyvinut manózoový selekční systém, ani ten ale laickou veřejnost o nic víc nepřesvědčil o bezpečnosti GMO (Regis, 2019).



Nejen, že se veřejnost bojí antibiotické rezistence, kritici obviňují GM potraviny také z potenciálního vzniku alergií, vzniku úplně nových nemocí, nebo že nám hrozí jiná, doposud neznámá rizika. A stejně tak existuje možnost, že budou ovlivněna i zvířata, která snědí geneticky modifikované plodiny. Mezi další obavy patří, že geneticky modifikované potraviny začnou růst z výsadby GM plodin v blízkosti geneticky nemodifikovaných plodin, a to bez vědomí pěstitele i spotřebitele (McLean, 2005). Ostatně, tyto obavy jsou na místě, protože už se tak stalo v letech 1998–2000, kdy se geneticky modifikovaná kukuřice „StarLink“ smísila s konvenční kukuřicí. Toho se ovšem vědci u GR nebojí. Zlatá rýže, jak už název napovídá, má opravdu zjevně žlutá zrna. Dalším faktem je, že laboratoře s GM rýží jsou umístěny schválně vzdálené civilizaci, velmi dobře hlídané a co nejvíce oplocené. Většinou ještě obsahují různé dekontaminační chodby, aby nedošlo k nechtěnému vynesení GMO (Regis, 2019).

Dále například členové extrémně levicové organizace KMP (Kilusang Magbubukid ng Pilipinas) věří konspirační teorii, že zlatá rýže se pěstuje proto, aby došlo k nadnárodnímu převzetí trhu s filipínskou rýží. Ve skutečnosti rýži vyrábí organizace veřejného sektoru a byla by rozdávana zdarma zemědělcům, kteří by byli dále podporováni v setí. Tato skupina spolu se skupinou MASIPAG (organizace zemědělců, snažící se o zlepšení kvality života drobných zemědělců) zničila v srpnu 2013 celou úrodu na Filipínách. Jednalo se tak o jeden z mnoha nezákonných útoků (Revkin, 2013).

Mezi nejznámější anti-GMO organizace patří stále Greenpeace, kteří se nyní bojí hlavně nekontrolovaného šíření genetických modifikací v životním prostředí (Hrábek, 2018). Ke GMO jsou velice skeptičtí i představitelé katolické církve, kteří berou genetické inženýrství jako „zásah do přirozeného řádu věcí“. Nicméně v posledních letech Vatikán vyjádřil podporu v boji proti hladovění a chudobě právě pomocí geneticky modifikovaných potravin (Drobník, 2010). Dezinformovanost veřejnosti nahrává nejen nevládním organizacím, ale také politickým institucím některých členských států. V EU například stále vzrůstá negativní atmosféra vůči GMO (Stratilová, Jedličková, 2016).

Ale hlavním důvodem, proč zlatá rýže ještě není mezi potřebnými, je mezinárodní dohoda známá jako „Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti“. Cílem tohoto dokumentu, který platí od roku 2003, je zajistit bezpečné zacházení, převoz a používání modifikovaných plodin. Tento protokol, mimo jiné, obsahuje vysoce kontroverzní klauzuli, známou jako „zásada předběžné opatrnosti“. Ta uvádí, že pokud produkt moderní biotechnologie představuje jakékoliv možné riziko pro lidské zdraví nebo životní

prostředí, měla by být přijata opatření k jeho omezení či zabránění jeho zavedení. Kvůli tomuto opatření dochází ke zpoždění výzkumů a schvalovacích procesů o celé roky (Dubock, 2014).

#### ***4. Podpora***

V červnu roku 2016 podepsalo 107 laureátů Nobelovy ceny dopis, v němž naléhavě vyzývá Greenpeace a jeho příznivce, aby ukončili kampaň proti GMO, zejména proti zlaté rýži. I nadace Billa a Melindy Gates podporuje použití geneticky modifikovaných organismů v zemědělském rozvoji a podporuje IRRI (Mezinárodní výzkumný ústav rýže). Ve stejném roce zveřejnila Národní akademie věd USA výsledky rozsáhlé studie geneticky modifikovaných plodin. Vědci provádějící studii pročetli literární rešerše více než 800 publikovaných příspěvků, vyslechli 80 řečníků na třech veřejných setkáních a patnácti webinářích a přečetli více než 700 komentářů z řad široké veřejnosti. Studijní komise nezjistila žádný podstatný důkaz o rozdílu v rizicích pro lidské zdraví mezi geneticky modifikovanými plodinami a konvenčně pěstovanými (Regis, 2019).

## Cíle práce

### 1. Cíle práce

V průběhu této práce je cílem vypracovat odbornou rešerši o zlaté rýži – náhradním potravinovém zdroji vitamínu A, o risku a zisku této geneticky upravené rostliny a o průběhu přípravy transgenních rostlin.

Dále bude mým cílem praktické zvládnutí metodiky přípravy modelového GMO a ověření přítomnosti vnesených genů ve zkoumaných vzorcích na modelovém organismu.

### 2. Výzkumné otázky

- Lze dokázat vložený gen bez PCR a elektroforézy nebo pouze po elektroforéze PCR produktů?
- Kolik kopií transgenu se při agroinfekci do výzkumného materiálu integrovalo?

## Metodika

Metodická část mé bakalářské práce byla provedena v laboratoři Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích.

### 1. Příprava médií

Jako první byla v laboratoři připravena kultivační média, která slouží pro pěstování a kultivaci rostlin a bakterií. Konkrétně to byla agarová MS (Murashige and Skoog, 1962) média, MS.R. (Murashige, Skoog, 1962) regenerační média a LK (Langley, Kado, 1972) média.

#### 1.1. MS médium

Toto agarové kultivační médium bylo použito ke kultivaci rostlinných částí. Je vhodné pro kultivaci tabáku (Murashige, Skoog, 1962).

*Vybavení:* laminární box, magnetické míchadlo, analytické váhy (zn. Kern), autokláv, laboratorní sklo

*Chemikálie:* MS médium s přidanými vitamíny (Gamborg B5 Vitamins), sacharóza, plant agar, destilovaná voda

*Postup přípravy:*

1. Na analytických vahách bylo naváženo 4,4 g MS média s přidanými vitamíny, 30,0 g sacharózy, 5,0 g plant agaru. Směs byla rozmíchána v 1 000 ml destilované vody.
2. Bylo zapotřebí upravit pH směsi přesně na 5,8. To bylo provedeno postupným přidáváním KOH (1 M) po kapkách za stálého míchání na magnetickém míchadle.
3. Směs se dále autoklávovala 30 minut (teplota 121 °C, přetlak 1,2 kg/cm<sup>2</sup>).
4. Poté se směs nechala vychladnout na teplotu 60 °C a vše bylo rozlito do sterilních Petriho misek ve sterilním boxu s laminárním prouděním vzduchu. Do každé misky bylo nalito přibližně 20 ml tohoto média.

### *1.2 Kultivační agarové MS.R. médium*

Kultivační agarové médium označené jako MS.R., tedy regenerační, bude sloužit k regeneraci tabákových transformantů. Složení bylo sestaveno na základě dostupné literatury a zkušeností laboratoře. Půdy obsahovaly mimo jiné hormony pro podporu tvorby kalusů.

*Chemikálie:* MS médium s přidanými vitamíny (Gamborg B5 Vitamins), sacharóza, BAP (zásobní roztok), NAA (zásobní roztok), plant agar, timentin, kanamycin

#### *Příprava zásobních roztoků:*

##### *BAP (6-benzylaminopurin)*

1. 0,1 g BAPu bylo rozpuštěno v KOH (1 M). Dále bylo smícháno s 25 ml destilované vody.
2. Směs se nechala povařit, průběžně bylo kontrolováno rozpuštění BAPu.
3. Směs se dále po rozpuštění BAPu nechala vychladnout a poté byla doplněna destilovanou vodou na 100 ml.

##### *NAA (kyselina $\alpha$ -naftyloctová)*

1. 10 mg NAA bylo rozpuštěno v KOH (1 M).
2. Po rozpuštění NAA se doplnila směs destilovanou vodou na 100 ml. Tato směs se skladovala v lednici.

#### *Postup přípravy MS.R. média:*

1. Bylo smícháno 4,4 g MS média s přidanými vitamíny, 30 g sacharózy, 6,0 g plant agaru, 1,0 ml z připraveného zásobního roztoku BAP a 1,0 ml NAA.
2. Na magnetické míchačce bylo upraveno pH na 5,8 postupným přidáváním KOH (1 M).
3. Směs byla poté sterilizována v autoklávu.
4. Po autoklávování byla navíc do vychladlé směsi přidána antibiotika, konkrétně 250 mg timentinu a 100 mg kanamycinu. Tato antibiotika budou sloužit jako selekční agens.
5. Média byla rozlita do předem připravených sterilních Petriho misek.

### *1.3 LK médium*

LK médium (Langley, Kado, 1972) je určeno na kultivaci bakterií, používaných pro transgenozí.

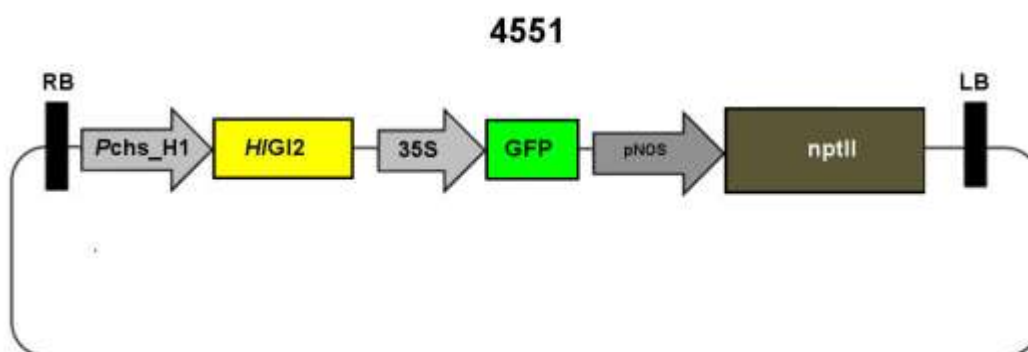
*Chemikálie:* sacharóza, kasein hydrolyzát, kvasniční extrakt,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , plant agar

*Postup přípravy LK média:*

1. Na analytických vahách bylo naváženo 10,0 g sacharózy, 8,0 g kasein hydrolyzátu, 4,0 g kvasničního extraktu, 2,0 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,3 g síranu hořečnatého a 15 g plant agaru.
2. Směs byla rozpuštěna v 1 000 ml destilované vody.
3. V tomto případě bylo pH upraveno pomocí NaOH (1 M) přesně na 6,5.
4. Autoklávování probíhalo 30 minut na 120 °C.
5. Médium se nechalo vychladnout, dále byl skladováno v Erlenmeyerově baňce v chladu.

## 2. Bakterie rodu *Agrobacterium tumefaciens*

Ústavem molekulární biologie rostlin AV v Českých Budějovicích mi byly poskytnuty bakterie rodu *Agrobacterium tumefaciens*. Jednalo se o kmen LBA4404 označený pro laboratoř dále jako „4551“. Tento kmen bakterií je standartně uchováván v mrazícím boxu při -80 °C.



Obrázek 4 Schéma plazmidového vektoru bakterii 4551. Zdroj: vlastní.

Tento konkrétní plazmid, který mi byl poskytnut, nesl u levé hraniční sekvence selekční gen pro neomycin phosphotransferázu II neboli *nptII*, který byl vyizolován z *E.coli* a nese vlastnost odolnosti vůči antibiotiku kanamycinu a neomycinu. Dále je v konstrukt bakterií zabudovaný signální gen pro GFP (green fluorescent protein), který byl vyizolován z medúzy *Aequorea victoria*. Má schopnost přeměňovat ultrafialové nebo modré světlo na zelené (Hraška *et al.*, 2006). Mezi nimi je umístěný promotor pro nopalin syntázu (pNOS), který určuje projev *nptII*. Projev GFP určuje promotor viru tabákové mozaiky (CaMV) 35S. A nakonec gen *HIG12* z *H. influenzae* je řízen promotorem pro chalkonsyntázu *Pchs\_H1* u pravé hraniční sekvence.

Tento kmen bakterií byl napěstován na pevném LK médiu, obohacené o kanamycin (50 mg/l) a dále naočkován do tekutého média sterilní kličkou. Poté byly bakterie kultivovány na třepačce 16 hodin, při teplotě 28 °C. Narostlé médium bylo centrifugováno 20 minut při 4 500 otáčkách za minutu a teplotě 20 °C. Získaná peleta byla dále resuspendována v MgSO<sub>4</sub> (0,01 M), jelikož hořčík stimuluje proces přenosu DNA.

Do kultury 20 ml bakterií bylo dále přidáno 200 µl acetosyringonu (20 mM). Poté byla dána na několik minut na třepačku.

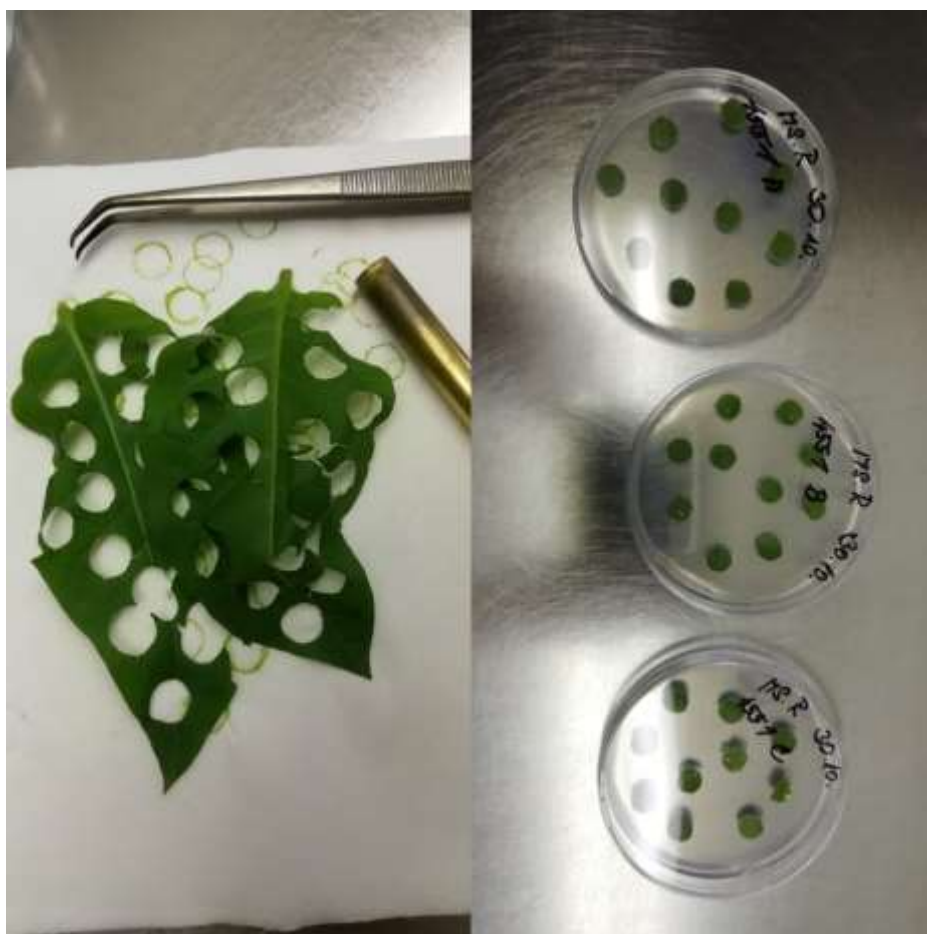
### 3. Transformace listových segmentů

*Pomůcky:* sterilní kličky, vortex mixer, korkovrt, mikropipeta, špičky, centrifuga, třepačka

Jako modelový organismus byl použit tabák virgnský neboli *Nicotiana tabacum*. Nejen, že se snadno transformuje, navíc se jeho části velmi dobře a rychle regenerují na živných půdách. Ústavem molekulární biologie rostlin AV ČR mi byla poskytnuta mladá tabáková rostlina (viz. příloha č. 1), pěstovaná ve skleníkových podmínkách. Z ní byl odtrhnut zcela náhodný list, ze kterého byly připraveny kruhové segmenty korkovrtem o průměru 1 cm. Tyto segmenty byly sterilizovány v desinfekčním roztoku obsahující chlornan sodný (5 %) s malou kapkou detergentu (přípravek Jar). Tento desinfekční roztok byl odebrán za zcela sterilních podmínek pipetou do Petriho misek a segmenty do nich byly ponořeny na 15 minut. Poté byly segmenty oplachovány sterilní vodou. Oplachování bylo opakováno celkem 3 x, a to vždy po deseti minutách.

Po posledním odsátí vody byla k segmentu přidána tekutá kultura příslušného bakteriálního kmene *Agrobacterium tumefaciens* (4551) na 20 minut. Tato ko-kultivace probíhala za mírného třepání na třepačce, bakterie by se měly dostat do rostliny řeznými ranami. Poté byly tyto bakterie odsáty sterilní špičku a segmenty nasazeny na 3 Petriho misky s MS.R médiem po deseti segmentech na 1 misku. Toto médium neobsahovalo žádná antibiotika. Segmenty byly do Petriho misek umístěny průduchy orientovanými navrch. Při pokojové teplotě byly kultivovány po 24 hodin.





*Obrázek 5 Transformace listových segmentů diskovou metodou, vlevo: zbytek listu po vyříznutí segmentu korkovrtem, vpravo: segmenty na třech Petriho miskách s médiem.  
Zdroj: vlastní.*

#### **4. Přenášení tabákových listů**

Segmenty byly postupně přenášeny na média, obsahující určité množství antibiotik. Konkrétně kanamycin o koncentraci 100 mg/l – toto antibiotikum by mělo zajistit, že budou na médiích s přidanými antibiotiky regenerovat pouze rostliny nesoucí plazmid, který obsahuje gen pro antibiotickou rezistenci. Dále je do půdy přidán timentin o koncentraci 250 mg/l, pro postupnou eliminaci přežívajících bakterií. Půdy obsahovaly také hormony (BAP = 1,0 mg/l, NAA = 0,1 mg/l) pro podporu tvorby kalusů.

## 5. Izolace DNA metodou mp (miniprep)

Dále byla provedena izolace bakteriální DNA metodou miniprep.

Cílem této izolace bylo vyizolovat plazmid z kultury bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a *E. coli* (ta standartně slouží k uchovávání vzorku plazmidu v laboratoři a bude sloužit jako kontrola).

*Pomůcky a chemikálie:* mikrozkušavky typu Eppendorf, centrifuga, vortex mixér, buněčina, octan amonný (7,5 M), isopropanol, ethanol (70 %), roztok A a B

*Složení roztoku A na 1 l:*

25 ml TRIS (1 M, pH 8)

20 ml EDTA (0,5 M)

45 ml glukózy (20 %)

*Složení roztoku B na 100 ml:*

200 ml SDS (dodecylsírán sodný, 2 %)

0,798 g NaOH (0,2 M)

*Postup:*

1. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 1,5 ml bakterií, které byly v tekutém LK médiu.
2. Bakterie byly stočeny v centrifuze při 15 000 otáčkách za minutu na 2 minuty.
3. Vzorek byl vyndán z centrifugy, se shora byla odsáta nadbytečná tekutina.
4. Do mikrozkušavky bylo přidáno dalších 1,5 ml bakterií a vzorek byl znovu dán do centrifugy na 2 minuty při 15 000 otáčkách.
5. Sediment byl smíchán s 200  $\mu$ l roztoku A a mikrozkušavka byla dána na pár sekund na vortex mixer.
6. Dále bylo přidáno 400  $\mu$ l roztoku B a celá směs se 6 x rychle promíchala převrácením. Poté jsem směs nechala stát při pokojové teplotě 10 minut, kdy probíhala lyze buněk, oddělení proteinů od DNA a denaturace.
7. Bylo přidáno 250  $\mu$ l octanu amonného, celá směs byla důkladně promíchána převrácením 1 minutu.
8. Směs byla dána na 30 minut do mrazáku při teplotě  $-20$  °C. Po celém objemu se vytvořila hustá bílá sraženina.
9. Následovala 2 x centrifugace při 15 000 otáčkách na 2 minuty.

10. Poté byl důkladně odsát supernatant a přidán isopropanol 0,6 ml.
11. Směs byla nechána hodinu stát. Poté byla mikrozkuhavka přenesena do chlazené centrifugy. Centrifugace probíhala při 14 000 otáčkách za minutu po 30 minut.
12. Byl přidán vychlazený ethanol (70 %), následovala poslední centrifugace na 2 minuty při 15 000 otáčkách za minutu.
13. Následně byl ethanol vylit opatrným převrácením a vzorek byl nechán sušit po dobu 30 minut.
14. Nakonec bylo do mikrozkuhavky přidáno 30  $\mu$ l sterilní vody.

## **6. Elektroforetická separace**

*Pomůcky:* elektroforéza se zdrojem (viz příloha č. 2), vanička, hřebínek, agaróza (1 %), pufr 50xTAE (*Tris-Acetate-EDTA*), nanášecí pufr, ladder (1 kB)

*Příprava 1 l zásobního roztoku 50xTAE:*

Bylo naváženo 242 g TRIS base (pH 8), doplněno vodou do 800 ml, přilito 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8). Byla zapnuta míchačka na 50 °C a pomalu přiléváno 57,1 ml ledové kyseliny octové. Nakonec byla směs doplněna vodou do 1000 ml.

1. Agaróza byla smíchána s pufrem v Erlenmeyerově baňce.
2. Směs agarózy a pufru byla dána do mikrovlnné trouby a ponechána v ní, dokud nebyl gel úplně rozpuštěný. Směs byla nechána vychladnout při pokojové teplotě.
3. Dále byl do směsi přidán ethidium bromid.
4. Směs byla dále vylita do vaničky, byl vložen hřebínek a gel se nechal ztuhnout. Po ztuhnutí byl hřebínek vyndán.
5. Dále byla vanička usazena do elektroforetické vany, přidáno TAE.
6. Nakonec byl pipetou do jamek nanesen ladder a vzorky s pufrem a byl zapnut zdroj pro separaci molekul.

## 7. Izolace rostlinné DNA

Byla provedena izolace rostlinné DNA za účelem PCR amplifikace. Jako vzorky sloužily mnou vypěstované transgenní rostliny *Nicotiana tabacum*, které přežily selekci na kultivačních médiích.

*Pomůcky a chemikálie:* zkumavka typu eppendorf, tyčinka, centrifuga, extrakční pufr (složení: 200mM Tris HCl, pH 8; 250mM NaCl; 25mM EDTA, 0,5 % SDS), ethanol (70 %), isopropanol, TE pufr (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8)

### *Postup:*

1. Vzorky rostlin byly zhomogenizovány ve zkumavce typu eppendorf pomocí tyčinky, bez přítomnosti pufru.
2. Ke vzorku bylo do zkumavky přidáno 400  $\mu$ l extrakčního pufru, následovalo vortexování na 5 sekund.
3. Dále byl vzorek dán do centrifugy na 3 minuty při 14 000 otáčkách za minutu.
4. Bylo odebráno 300  $\mu$ l supernatantu. Byl přemístěn do nové sterilní zkumavky typu eppendorf.
5. Dále bylo ke vzorku přidáno 300  $\mu$ l isopropanolu, směs byla promíchána a vzorek byl nechán stát při pokojové teplotě 3 minuty.
6. Následovala centrifugace po dobu 5 minut při 14 000 otáčkách za minutu.
7. Bylo přidáno 800  $\mu$ l ethanolu, směs byla promíchána a nechána vysušit se.
8. Supernatant byl odsát, pelet byl nechán vysušit.
9. Nakonec bylo přidáno 75  $\mu$ l TE pufru, pelet byl rozpuštěn velmi jemným převrácením.

## 8. PCR

Dále byla provedena amplifikace specifického úseku vneseného genu pomocí PCR. *Pomůcky a materiál:* DNA templáty, sNTPS (deoxynukleosidtrifosfáty), specifické primery (forward, reverse), polymeráza, pufr (obsahující  $Mg^{2+}$ )  
Použité primery pro PCR amplifikaci *nptII*, které se specificky naváží na část sekvence, převzato z Bříza *et al.* (2008):

*NPT1* 5'-ACG CAG GTT CTC CGG CCG CTT G-3'

*NPT2* 5'-GAA GCG GTC AGC CCA TTC GCC G-3'

Pro amplifikaci genu *nptII* byl použit termocykler (příloha č. 3) přednastavený dle schématu, viz tabulka č. 1.

*Tabulka 1 Nastavení termocykleru pro PCR amplifikaci*

<i>Cyklus</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>	<i>Opakování</i>
1.	95 °	2 minuty	1 x
2.	94 °	30 sekund	34 x
3.	55 °	45 sekund	
4.	72 °	1 minuta 20 sekund	
5.	72 °	3 minuty	1 x

Dále byla opět provedena elektroforetická separace PCR produktů. Cílem této elektroforézy bude znázornění přítomnosti genu *nptII* v modelové rostlině po PCR.

### **9. Průkaz signálního genu GFP**

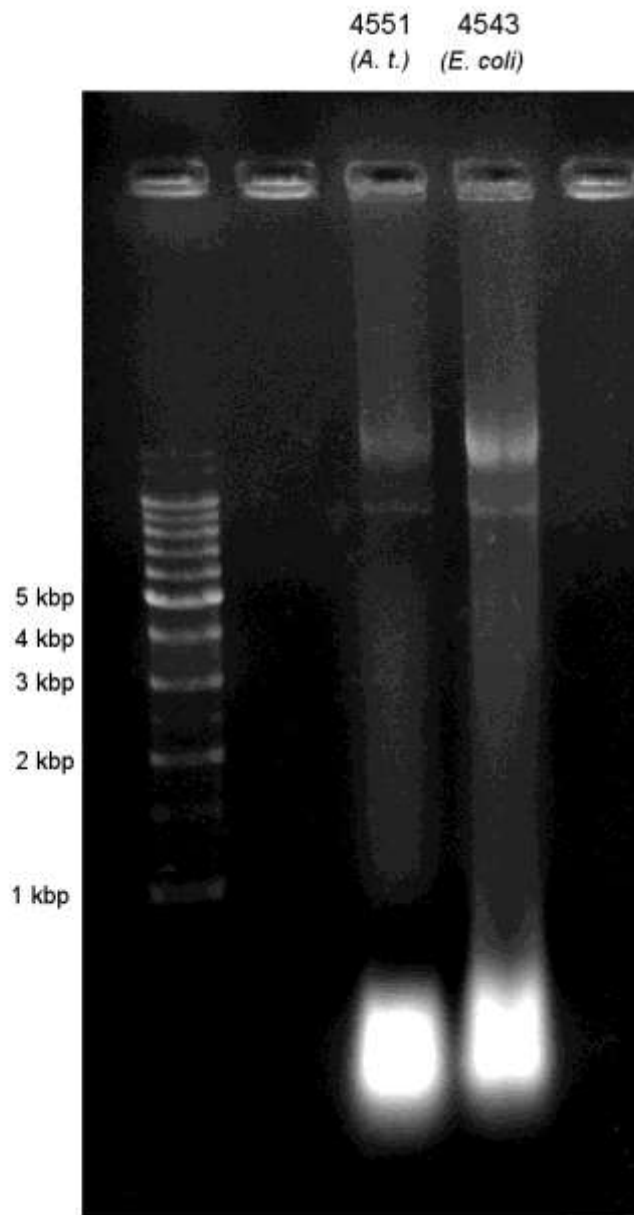
V rostlině přítomný plazmid 4551 měl zabudovaný signální gen GFP z medúzy *Aequorea victoria* s příslušným promotorem 35S. Tento signální gen mohl být jednoduše ověřen bez použití PCR a elektroforézy. K ověření stačilo použít tzv. agroinfiltraci. Injekčně byla vpravena bakteriální suspenze nesoucí binární vektor do listu narostlého tabáku. Produkované proteiny bylo možné detekovat již několik dní po agroinfiltraci.

### **10. Výsev semínek**

Semena *Nicotiana tabacum* ze tří námi vypěstovaných rostlin byla před výsevem na média v eppendorfce vysterilizována roztokem (2 ml Sava + 18 ml vody). Byla přidána kapka přípravku Jar, aby nedocházelo ke přílišnému shlukování semínek. Semínka byla dále 3 x promyta sterilní destilovanou vodou. Dále byl do mikrozkuřavky přidán roztok 0,1 % agarózy a vody. Semínka tabáku byla vysévána pomocí mikropipety na připravená média, a to za pomoci upravených špiček. Těm bylo před rozšířeno ústí vysterilizovanými nůžkami. Médium obsahovalo 100 mg/l kanamycinu. Práce se semínky probíhala po celou dobu v laminárním boxu. Dále bylo sledováno, jaký počet kanamycin rezistentních a kanamycin senzitivních rostlin vyrostle na médiu. Vyhodnocení probíhalo na základě velikosti rostlin, zejména kořínků.

## Výsledky

### 1. Elektroforetická separace bakteriální DNA

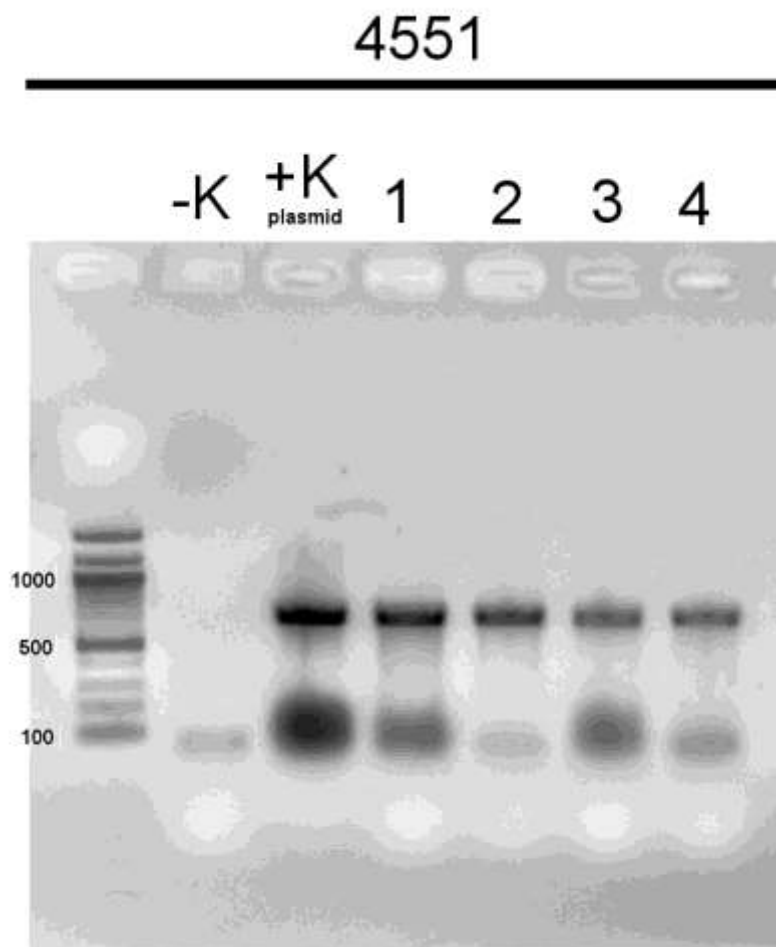


Obrázek 6 Elektroforetická separace bakteriální DNA

Z leva: DNA ladder (1 kb), plazmid *Agrobacterium tumefaciens*, plazmid *E. coli*

Ze spodu nahoru: RNA, CCC a OC forma. Vyhodnoceno jako 13 kbp.

## 2. Hlavní průkaz genu z rostlin



Obrázek 7 Elektroforetická separace z rostlinné DNA

Po PCR byly vzorky vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy. Jako vzorky byly použity rostliny, které přežily selekci na médiích s antibiotiky.

Z leva: DNA ladder (100 bp)

K<sup>-</sup> - negativní kontrola – použit průkazně netransformovaný tabák

K<sup>+</sup> - pozitivní kontrola – plasmid bakterie *Agrobacterium tumefaciens* 4551

1 – vzorek listu z vypěstované transformované rostliny č. 1

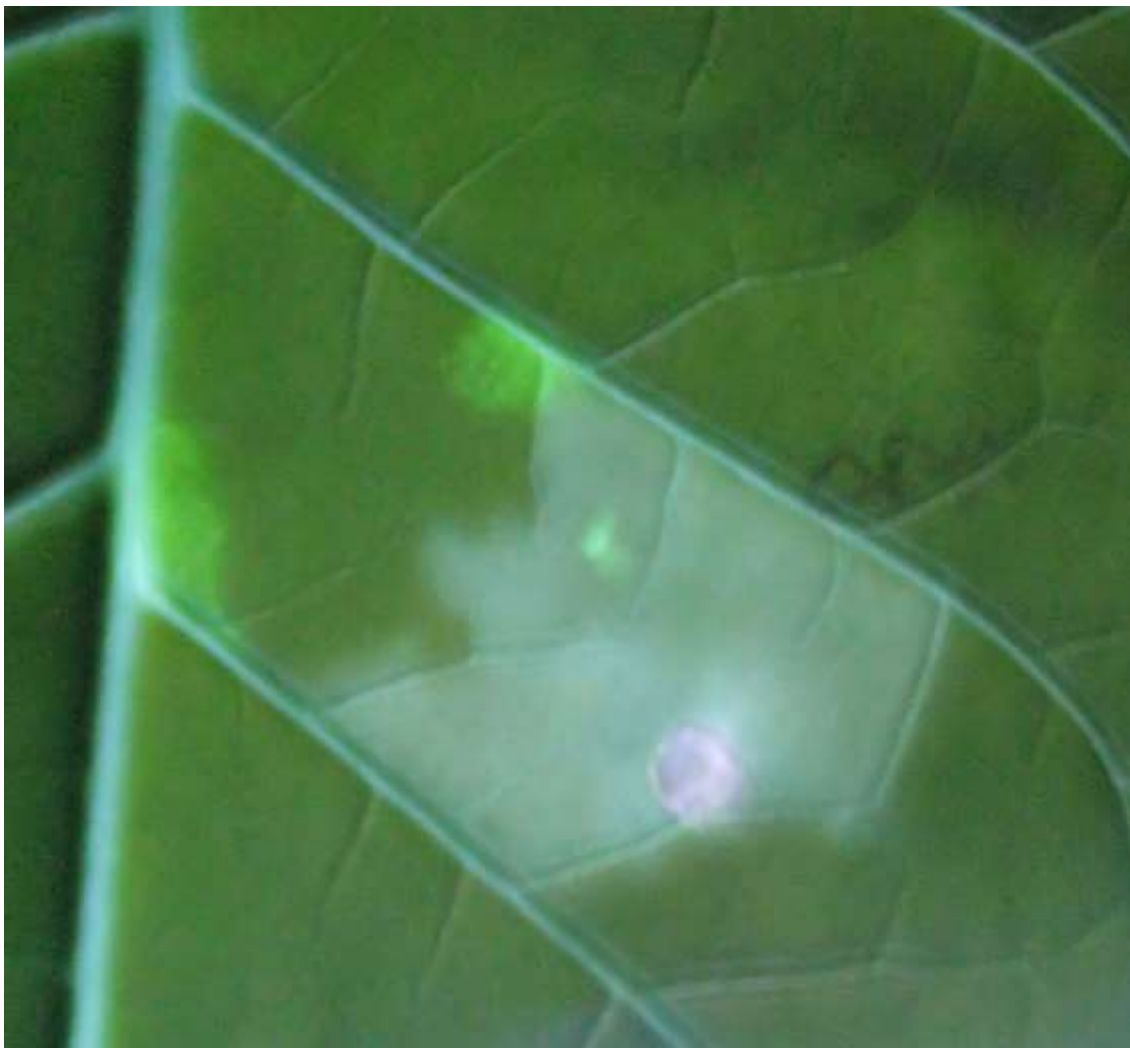
2 – vzorek listu z vypěstované transformované rostliny č. 2

3 – vzorek stonku z vypěstované transformované rostliny č. 3

4 – vzorek stonku z vypěstované transformované rostliny č. 4

Vyhodnoceno: 700 bp

3. Průkaz signálního genu GFP



*Obrázek 8 Průkaz GFP z transformovaného tabáku*





*Obrázek 9 Průkaz GFP z transformovaného tabáku*

Jelikož měl tento plazmid zabudovaný signální gen GFP z medúzy, i ten mohl být ověřen v tmavé místnosti s UV zářivkou. K ověření stačilo znát transientní expresi, konkrétně techniku zvanou agroinfiltrace. Injekčně byla vstříknuta bakteriální suspenze do mezibuněčných prostor listů transformovaného tabáku. Produkované proteiny bylo možné detekovat již několik dní po agroinfiltraci. V listu se dočasně dosáhne velmi vysoké exprese genu, takže lze snáze zobrazit, co potřebujeme – v tomto případě světélkování (Chen *et al.*, 2014).

#### 4. Štěpné poměry semínek

Nakonec byla vyseta semínka ze tří námi vypěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* na nová média. Počet transgenních (kanamycin rezistentních) a netransgenních (kanamycin senzitivních) rostlin uvádím v tabulce č. 2.

Počet lokusů, do kterých se začlenila T-DNA, se určuje z poměrů mezi rezistentními a senzitivními rostlinami ve druhé generaci rostlin. Při integraci transgenů do jednoho lokusu se vyskytuje štěpný poměr 3:1, do dvou lokusů 15:1 a do tří lokusů poměr 63:1 (Ondřej, Drobník, 2002). Proto bude vypočítán chí kvadrát test.

Tabulka 2 Semínka druhé generace (T2)

Semínka z rostlin	Rostou, transgenní	Malé, netransgenní
1.	90	7
2.	94	8
3.	86	5

Vzorec pro výpočet  $x^2$ :

$$x^2 = \frac{(\text{sledovaný počet transgenních rostlin} - \text{očekávaný počet trans. rostlin})^2}{\text{očekávaný počet transgenních rostlin}} + \frac{(\text{sledovaný počet netransgenních rostlin} - \text{očekávaný počet netransgenních rostlin})^2}{\text{očekávaný počet netransgenních rostlin}}$$

Tabulka 3 Výsledek chí kvadrát testu při předpokládaném poměru 3:1

Semínka z rostliny	$x^2$
1.	3,995
2.	4,046
3.	4,197

Tabulka 4 Výsledek chí kvadrát testu při předpokládaném poměru 63:1

Semínka z rostliny	$x^2$
1.	4,437
2.	5,175
3.	3,026

*Tabulka 5 Výsledek chí kvadrát test při předpokládaném poměru 15:1*

<i>Semínka z rostliny</i>	$\chi^2$
1.	0,489
2.	0,700
3.	0,943

## Diskuze

Na samém začátku mé laboratorní práce byla připravena média, která sloužila k uchovávání bakterií a média, sloužící jako selekční marker pro pěstované modelové rostliny. Listy modelového organismu byly ko-kultivovány s upravenými bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*. Dále jsme sledovali, které rostliny na mnou připravených selekčních médiích uhynou a které budou regenerovat a dále růst. Díky fytohormonům a vlastnosti zvané totipotence začaly opravdu některé rostliny regenerovat. Ty jsme dále přesazovali do čerstvých regeneračních médií. Do médií byla přidána v určitém množství antibiotika kanamycin a timentin. Kanamycin nám měl zajistit, že na médiích s přidanými antibiotiky regenerovaly pouze rostliny nesoucí plazmid, který obsahuje gen pro antibiotickou rezistenci. Timentin nám sloužil pro postupnou eliminaci přežívajících bakterií. Půdy obsahovaly také hormony (BAP = 1,0 mg/l, NAA = 0,1 mg/l) pro podporu tvorby kalusů. Některé z rostlin byly tzv. chimérické. To znamená, že neměly ve všech buňkách identickou genetickou informaci. V průběhu přesazování byly ovšem chimérické rostliny eliminovány.

Nejdříve jsem si otestovala předložené upravené bakterie. Izolace bakteriální DNA byla provedena metodou miniprep. Tato metoda je vhodná i pro malé množství DNA materiálu, navíc je poměrně rychlá. Provedena byla izolace DNA nejen z bakterií rodu *Agrobacterium tumefaciens*, ale také z bakterie rodu *E. coli*. Důvod byl ten, že *E. coli* standartně slouží k uchovávání vzorku plazmidu v laboratoři molekulární biologie rostlin a sloužila nám tak jako kontrola. Vyizolovaná DNA byla znázorněna pomocí gelové elektroforézy, jak uvádím na obrázku č. 6. Zde můžeme vidět, že velikost odpovídá přibližně 13 kbp. Pro přesnější výsledek by se musel udělat řidší gel (0,7 % agaróza) a elektroforéza by musela běžet při hodně pomalé rychlosti (např. 25 V) přes noc. Nám ovšem stačil fakt, že jsme vůbec plazmid vyizolovali a velikost odpovídá alespoň přibližně.

Po několika týdnech už jsme měli narostlé modelové rostliny. To, že modelový organismus *Nicotiana tabacum* vyrostl na připraveném selekčním médiu, do kterého byl přidán kanamycin, není ovšem dostatečným důkazem, že se v rostlině opravdu nachází konkrétní plazmid s antibiotickou rezistencí. Z toho důvodu byla provedena detekce selekčního markeru *nptII*.

Byla vyizolována rostlinná DNA, použita PCR amplifikace, která je známá pro svou vysokou senzitivitu a specifitu (Holst-Jensen *et al.*, 2003). Výsledek byl znázorněn pomocí gelové elektroforézy, jak uvádím na obrázku č. 7. Nevznikaly žádné nespecifické produkty. Velikost amplifikovaného fragmentu jsem vyhodnotila jako 700 bp. Tento fragment má mít velikost přesně 699 bp (Bříza *et al.*, 2008), mé výsledky tak považuji za správné. Potvrdilo se tak, že tato modifikovaná rostlina obsahovala dle předpokladů konkrétní plazmid, tedy i selekční gen pro rezistenci vůči kanamycinu a neomycinu *nptII*. Míru exprese by bylo dále možné určit pomocí analýzy qPCR (Heid *et al.*, 1996).

Přítomný signální gen pro green fluorescent protein, izolovaný z tichomořské medúzy *Aequorea victoria*, nemusel být potvrzen PCR a elektroforetickými testy, byl potvrzen vizuálně, a to pomocí transientní exprese. Stačilo použít tzv. agroinfiltraci, kdy jsem pomocí injekční stříkačky vpravila bakteriální suspenzi do listu GM tabáku. Rostlinku jsem dala do tmavé místnosti a posvítila na ní UV lampičkou, viz obrázek č. 8 a 9. Produkované proteiny bylo možné detekovat již 2 dny po agroinfiltraci. Dočasně jsme dosáhli velmi vysoké exprese GFP, ale tak po týdnu začala znovu vyhasínat, až vyhasla úplně. Naproti tomu u stabilní exprese může být exprese GFP natolik specifická, že zobrazení vyžaduje kvalitnější přístroje, např. fluorescentní mikroskop (Chen *et al.*, 2014).

Za účelem zjištění, kolik kopií transgenů (T-DNA) se do rostlin další generace integrovalo, jsem provedla růstový test na selekčním médiu obsahujícím kanamycin o koncentraci 100 mg/l, kde se měla dále možnost projevit přítomnost vneseného genu *nptII*. Vysela jsem semínka ze tří transgenních tabáků a po třech týdnech kultivace na selekčním médiu jsem si zaznamenala počet transgenních (kanamycin rezistentních) a netransgenních (kanamycin senzitivních) rostlin, jak uvádím v tabulce č. 2. Předpokládala jsem možnosti inserce jednoho, dvou, tří anebo i více transgenů. Tyto jednotlivé možnosti jsem otestovala pro všechny předpokládané poměry, viz tabulka č. 3., 4., a 5. Pro tyto testované štěpné poměry s jedním stupněm volnosti platí na 5 % hladině významnosti kritická hodnota 3.84. Mezi napozorovanými poměry mezi rezistentními a senzitivními rostlinami ve druhé generaci a teoretickým štěpným poměrem 3:1 a 63:1 se mi na 5 % hladině významnosti pomocí chí-kvadrát testu podařilo prokázat rozdíl, a tedy můj předpoklad mendelistického štěpného poměru 3:1 (a 63:1), který odpovídá integraci transgenů do jednoho (a do tří) lokusů, byl vyvrácen u semínek ze všech tří rostlin. Pro testovaný poměr 15:1 se mi naopak pro jeden stupeň volnosti a kritickou

hodnotu 3.84 nepodařilo rozdíl prokázat, proto předpokládám, že se při transgenozí integrovaly dva transgeny. Počet kopií konstruktů v transgenní rostlině je velmi individuální, záleží na technice transformace, na způsobu pěstování bakterií, vlastním uspořádání komponent u T-DNA, ale nejpodstatnější roli hraje uspořádání tzv. *vir* genů na pomocném plazmidu a celkově použitý kmen *Agrobacterium tumefaciens*. Námí použitý kmen LBA4404 je považován za průměrně virulentní, ale existují i jiné, jako například EHA105 či GV3101, které bývají virulentnější, takže můžeme předpokládat, že by štěpné poměry ukazovaly na ještě více inzertů (Morris, Bryce, 2000).

## Závěr

Cílem mé práce bylo praktické zvládnutí a osvojení si molekulárně genetických metod využívaných při vytváření i detekci GMO a vypracování rešeršní části týkající se geneticky modifikované zlaté rýže, se zaměřením na výhody jejího využívání, ale také na případná rizika a obavy, která panují (nejen) kolem GM rýže.

Zlatá rýže je dle mého názoru skvělým příkladem toho, jak velký může mít genetické inženýrství přínos pro spotřebitele, v tomto případě pro ty chudé a znevýhodněné, kterým jde nejen o zrak, ale i o život. Tento produkt genového inženýrství se ale stále setkává s množstvím problémů, hlavně kvůli procesu jeho výroby a schvalování. Například aktivisté z Greenpeace označují zlatou rýži za nebezpečnou, riskantní a nepotřebnou. Je pravdou, že první prototypy GR nebyly schopné pokrýt denní dávku  $\beta$ -karotenu, to se ovšem vyřešilo vnesením genu *psy* z kukuřice (Opatrný, 2017). Mnoho lidí se bojí hlavně vzniku antibiotické rezistence. Znepokojení veřejnosti z přítomnosti antibiotických selekčních genů u zlaté rýže vedl k tomu, že výzkumníci byli nuceni geny pro hygromycinovou rezistenci nahradit jinými selekčními markery. Ani to ale veřejnost o bezpečnosti nepřesvědčilo, a i nadále čelí zlatá rýže ekoteroristické agresi (Regis, 2019). Tento výtvar Potrykuse, Beyera a jeho týmu, je hlavně kvůli Cartagenskému protokolu o biologické bezpečnosti zapleten do sítě pravidel, pokynů, požadavků, omezení a zákazů. Snaha vědců tak zatím nemá moc pozitivní výsledky, i když od zrodu této modifikované plodiny uplynula již řada let. Zlatá rýže totiž nebyla v rozvojových zemích pro volný prodej stále povolena (Dubock, 2014). Pokud je ovšem známo, tak žádná geneticky modifikovaná potravina po celé čtvrtstoletí od prvního GMO zdravotně nepoškodila žádnou osobu a podle FDA (Food and Drug Administration), je zlatá rýže k jídlu naprosto bezpečná (Regis, 2019). I když zatím jsme neměli možnost studovat dlouhodobý účinek na lidské zdraví, i tak mnoho vědců a humanistů věří, že zlatá rýže může být skvělým řešením VAD ve světě a zachrání tak mnoho životů.

Ve své laboratorní práci se mi úspěšně podařilo vypěstovat modelovou geneticky modifikovanou rostlinu. Byla použita velmi efektivní metoda nepřímé transgenózy pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tedy stejná metoda genového inženýrství, jakou vznikla zlatá rýže (Ondřej, Drobník, 2002). Pomocí vhodně zvolených metod, izolace DNA, PCR amplifikace a gelové elektroforézy, se potvrdilo, že tato GM rostlina obsahovala dle předpokladů selekční gen pro rezistenci vůči kanamycinu a neomycinu *nptII* a také signální gen pro GFP izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*.

Ten se nám podařilo prokázat i bez PCR a elektroforézy. Byla sledována i další generace transgenních rostlin, zde jsem se pokusila zjistit, kolik kopií konstruktů se integrovalo.

Při své práci v laboratoři jsem si nejen osvojila molekulárně genetické metody, ale dokázala jsem, že jsem schopna prokázat ve sledovaném materiálu pomocí vhodných metod jakékoliv uměle vložené geny. U zlaté rýže se lidé také bojí kontaminace běžného typu rýže, i když vědci tvrdí, že je to téměř vyloučeno (Regis, 2019). K detekci přímo zlaté rýže bych dle doporučení Evropské komise použila qPCR podle Jacchia *et al.* (2015). Pro nás je důležité, že takto geneticky modifikované rostliny lze bezpečně určit. Pochopení vzniku GM produktů je důležité pro případnou správnou detekci těchto modifikovaných plodin. Výroba i detekce jakýchkoliv geneticky modifikovaných organismů je a nadále i bude důležitým tématem našeho světa a znalost jejího zvládnutí považuji za velmi důležité.



## Seznam použité literatury

- AL-BABILI, S., BEYER, P., 2005. *Golden Rice – five years on the road – five years to go?* In: *TRENDS in Plant Science*, Vol. 10, No. 12, 565-573 s. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.10.006.
- BENEŠ, J., KYMPLOVÁ, J., VÍTEK, F. 2015. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi*. Grada Publishing. 228 s. ISBN: 978-80-247-4712-5.
- BOYLE, M. A., 2016. *Community Nutrition in Action: An Entrepreneurial Approach*. 7. vydání. Cengage Learning. 792 s. ISBN 978-1305637993.
- BŘÍZA, J., PAVINGEROVÁ, D., PŘIKRYLOVÁ, P., GAZDOVÁ, J., VLASÁK, J., NIEDERMEIEROVÁ, H., 2008. *Use of phosphomannose isomerase-based selection system for Agrobacterium-mediated transformation of tomato and potato*. In: *Biologia Plantarum* 52: 453-461 s. DOI: 10.1007/s10535-008-0090-8.
- DROBNÍK, J., 2010. *Moderní šlechtění a potraviny*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů 2010. 14 s. ISBN 978-80-903930-8-0.
- DUBOCK, A., 2014. *The politics of Golden Rice*. In: *GM Crops Food*. Volume 5, Issue 3; 210-222 s. DOI: 10.4161/21645698.2014.967570.
- HIED, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M., 1996. *Real time quantitative PCR*. *Genome Research* 6: 986-994. DOI: 10.1101/gr.6.10.986.
- HO, M. W., 2002. *'GOLDEN RICE' - An Exercise in How Not to Do Science*. Third World Network, Jutaprint, Malaysia. 19 s. ISBN: 983-9747-81-9.
- HOLST-JENSEN, A., RØNNING, S. B., LØVSETH, A. a BERDAL, K. G., 2003. *PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 375(8), 985-993. DOI: 10.1007/s00216-003-1767-7.
- HRÁBEK, L., 2018. „Zlatá rýže je chiméra“ [online]. Greenpeace Česká republika. [cit. 8.1.2020] Dostupné online z: <https://www.greenpeace.org/czech/clanek/2334/zlata-ryze-je-chimera/>
- HRAŠKA, M., RAKOUSKÝ, S., ČURN, V., 2006. *Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants*. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86(3):303-318, January 2006. DOI: 10.1007/s11240-006-9131-1.
- CHEN, Q., LAI, H., HURTADO, J., STAHNKE, J., LEUZINGER, K., DENT, M., 2013. *Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins*. *Advanced techniques in biology & medicine*, 1(1), 103. DOI: 10.4172/atbm.1000103.

- JACCHIA, S., NARDINI, E., BASSANI, N., SAVINI, C., SHIM, J. H., TRIJATMIKO, K., 2015. *International ring trial for the validation of an event-specific Golden Rice 2 quantitative real-time PCR method*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4954-4965 s.
- LACROIX, B., TZFIRA, T., VAINSTEIN A., CITOVSKY, V., 2006. *A case of promiscuity: Agrobacterium's endless hunt for new partners*. In: *Trends in Genetics*, Volume 22, Issue 1, January 2006, 29-37 s. DOI: 10.1016/j.tig.2005.10.004.
- LANGLEY, R. A., KADO, C. I., 1972. *Conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and relationships of A. tumefaciens mutants to crown-gall tumor induction*. In: *Mutation Research* 14: 277-286 s. DOI: 10.1016/0027-5107(72)90014-0.
- LEE, L. Y., GELVIN, S. B., 2008. *T-DNA Binary Vectors and Systems*. In: *Plant Physiol.* 146, 325–332. DOI: 10.1104/pp.107.113001.
- McLEAN, M. R., 2005. *An Introduction to the Ethical Issues in Genetically Modified Foods* [online]. Záznam z konference „*The Future of Food: Legal and Ethical Challenges*“ na Santa Clara University, April 15, 2005 [cit. 20.5.2020] Dostupné online z: <https://www.scu.edu/ethics/focus-areas/bioethics/resources/genetically-modified-food/>.
- MORRIS, P. C., BRYCE, J. H., 2000. *Cereal biotechnology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. 252 s. ISBN: 1-85573-498-2.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. In: *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 s. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- NAVRÁTIL, O., 2006. *Transgenóze rostlin*. In: *Molekulární biologie a genetika XII*. Praha. Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, 77-89 s. ISBN: 8090258859.
- ONDŘEJ, M., DROBNÍK, J., 2002. *Transgenóze rostlin*. Praha: Academia. 316 s. ISBN 80-200-0958-2.
- OPATRŇÝ, Z., 2017. *Zlatá rýže, příběh naděje a pokrytectví* [online]. Časopis Vesmír 96, 351, 2017/6 [cit. 8.1.2020]. Dostupné online z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2017/cislo-6/zlata-ryze.html>.
- PAINE, J. A., SHIPTON, C. A., CHAGGAR, S., HOWELLS, R. M., KENNEDY, M. J., VERNON, G., DRAKE, R. 2005. *Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content*. *Nature biotechnology*, 23(4), 482-487. DOI: 10.1038/nbt1082.
- POTRYKUS, I., 2001. *The Golden Rice „Tale“* [online], Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology, ETH. *AgBioWorld* [cit. 28.11.2019]. Dostupné online z: <http://www.agbioworld.org/biotech-info/topics/goldenrice/tale.html>

- RAVERDEAU, M., MILLS, K. H. G., 2014. *Modulation of T Cell and Innate Immune Responses by Retinoic Acid*. In: *The Journal of Immunology*. April 1, 2014, 192 (7) 2953-2958; DOI: 10.4049/jimmunol.1303245.
- REDDY V., 2003. *HYPOVITAMINOSIS A*. In: TRUGO L., FINGLAS P. (eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. vydání. Academic Press. 6000 s. ISBN 978-0-12-227055-0.
- REGIS, E., 2019. *Golden Rice: The Imperiled Birth of a GMO Superfood*. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 256 s. ISBN 978-1421433042.
- REVKIN A. C., 2013. *From Lynas to Pollan, Agreement that Golden Rice Trials Should Proceed* [online]. The New York Times [cit. 19.1.2020]. Dostupné online z: <https://dotearth.blogs.nytimes.com/2013/08/27/from-mark-lynas-to-michael-pollan-agreement-that-golden-rice-trials-should-proceed/?src=recg>
- ROSS, A. C., CABALLERO, B. H., COUSINS, R. J., TUCKER, K. L., ZIEGLER, T. R., 2014. *Modern nutrition in health and disease*. 11. vydání. Wolters Kluwer Health. 1616 s. ISBN 978-1-60547-461-8.
- SHERWIN, J. C., REACHER, M., H., DEAN, W. H., NGONDI J., 2012. *Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations*. In: *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Oxford University Press, Volume 106, Issue 4, April 2012, s. 205–214. DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.01.004.
- SOLOMONS, N., 2012. *Vitamin A*. 149 s. In: ERDMAN J. W., MACDONALD I. A., ZEISEL, S. H. (eds.), *Present Knowledge in Nutrition*. 10. vydání. Wiley-Blackwell. 1328 s. ISBN: 978-0-470-95917-6.
- STRATILOVÁ, Z., JEDLIČKOVÁ, M., 2016. *GMO BEZ OBALU*. 4. aktualizované vydání. Praha, Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin. 37 s. ISBN 978-80-7434-295-0.
- VONDREJS, V., STORCHOVÁ, Z., 1997. *Genové inženýrství*. Praha: Karolinum. 59 s. ISBN 80-7184-402-0.
- WHO, 2009. *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005*. Geneva. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva, World Health Organization. 55 s. ISBN 978-92-4-159801-9.
- YE, X., AL-BABILI, S., KLOTI, A., ZHANG, J., LUCCA, P., BEYER, P., POTRYKUS, I., 2000. *Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm*. *Science*, 287(5451), 303-305. DOI: 10.1126/science.287.5451.303.

## Seznam obrázků

Obrázek 1 Zjizvení rohovky u dítěte v důsledku VAD .....	10
Obrázek 2 Genový konstrukt Golden rice 2 .....	14
Obrázek 3 Golden rice typu 1 a 2 v porovnání s přírodní rýží .....	14
Obrázek 4 Schéma plazmidového vektoru bakterií 4551 .....	23
Obrázek 5 Transformace listových segmentů diskovou metodou .....	25
Obrázek 6 Elektroforetická separace bakteriální DNA .....	30
Obrázek 7 Elektroforetická separace z rostlinné DNA .....	31
Obrázek 8 Průkaz GFP z transformovaného tabáku .....	32
Obrázek 9 Průkaz GFP z transformovaného tabáku .....	33

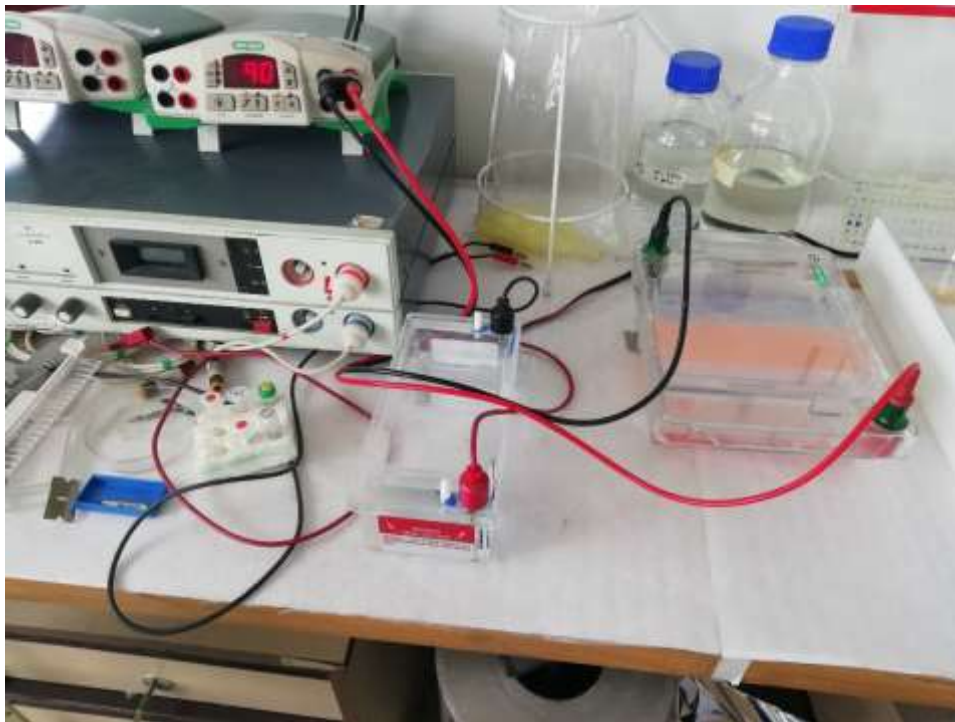
## Seznam tabulek

Tabulka 1 Nastavení termocykleru pro PCR amplifikaci.....	29
Tabulka 2 Semínka druhé generace (T2).....	34
Tabulka 3 Výsledek chí kvadrát testu při předpokládaném poměru <b>3:1</b> .....	34
Tabulka 4 Výsledek chí kvadrát testu při předpokládaném poměru <b>63:1</b> .....	34
Tabulka 5 Výsledek chí kvadrát testu při předpokládaném poměru <b>15:1</b> .....	35

## Přílohy



Příloha č. 1 – mladá tabáková rostlina ve skleníku, jejíž listy byly použity k diskové transformaci



Příloha č. 2 – použitá gelová elektroforéza se zdrojem



Příloha č. 3 – termocykler pro PCR amplifikaci



## Seznam zkratek

ACS = acetonsyringon

APC = antigen prezentující buňky

BAP = 6-benzylaminopurin

č. = číslo

DNA = deoxyribonucleic acid

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid

GFP = green fluorescent protein

GGPP = geranylgeranyl difosfát

GM = geneticky modifikovaný

GMO = geneticky modifikovaný organismus

GR = Golden Rice, zlatá rýže

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IRRI = The International Rice Research Institute, Mezinárodní výzkumný ústav rýže

IU = International Unit

KMP = Kilusang Magbubukid ng Pilipinas

LK = Langley and Kado médium

MS = Murashige and Skoog médium

MS.R. = Murashige and Skoog médium regenerační

NAA = kyselina  $\alpha$ -naftyloctová

Např. = například

*npII* = neomycin phosphotransferase II

PCR = polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

RAE = Retinol Activity Equivalents

T-DNA = transferred DNA

Ti = tumor indukující

tzn. = to znamená

tzv. = takzvaný

VAD = vitamin A deficiency, deficiencie vitamínu A

WHO = World Health Organization, Světová zdravotnická organizace