

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

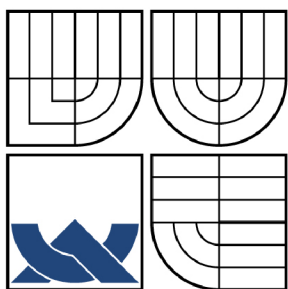
APLIKACE BAKTÉRIE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

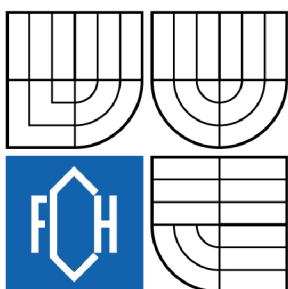
VIERA KOVÁČOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# APLIKACE BAKTÉRIE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS APPLICATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

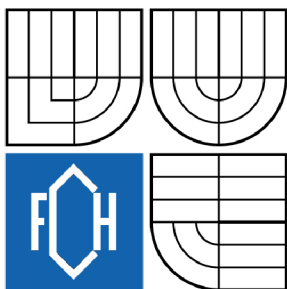
VIERA KOVÁČOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce	<b>FCH-BAK0185/2007</b>	Akademický rok: <b>2007/2008</b>
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	<b>Kováčová Viera</b>	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí bakalářské práce	<b>Ing. Libor Babák, Ph.D.</b>	
Konzultanti bakalářské práce		

### Název bakalářské práce:

Aplikace bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

### Zadání bakalářské práce:

1. Základní rysy *A. tumefaciens*
2. Cytologie *A. tumefaciens*
3. Biotechnologické využití *A. tumefaciens*

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2008

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

---

Viera Kováčová  
student(ka)

---

Ing. Libor Babák, Ph.D.  
Vedoucí práce

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Táto práca sa zaoberá biotechnologickými aplikáciami baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, ktorá je schopná sprostredkovať genetickú transformáciu nie len rastlín. Medzi hlavné body projektu patrí popis základných vlastností a cytológia *A. tumefaciens* s následným prehľadom využitia danej baktérie v modifikačných metódach rôznych organizmov. Cieľom state o biotechnologickom využití *A. tumefaciens* je porovnanie účinnosti tejto metódy modifikácie s inými, zhrnutie pozitív jej používania pre budúci vývoj ľudstva a predstavenie základných transformačných metód modifikácie najdôležitejších úžitkových plodín. Poslednou časťou projektu je stručné zhrnutie základných štatistických a legislatívnych údajov z oblasti týkajúcej sa geneticky modifikovaných plodín.

## **ABSTRACT**

This project focus on biotechnologic applications of bacterium named *Agrobacterium tumefaciens*, which is capable to mediate genetic transformation not only for plants. Main points of project are divided between description of basic natures and cytology of *A. tumefaciens* following by overview of usage *A. tumefaciens* in methods of modifications of different cells. Target of paper about biotechnologic use of *A. tumefaciens* is confrontation of effectivity of this method of modification with else, summary of positiv benefits of its using for future development of human population and introduction of fundamental transformation methods of modification most important crop plants. Final part of project is brief summation of basic statement from statistics and legislature of genetic modified crops.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

*Agrobacterium tumefaciens*, prenos genetickej informácie medzi ríšami, genetická modifikácia, úžitkové plodiny

## **KEYWORDS**

*Agrobacterium tumefaciens*, trans-kingdom gene transport, genetic modification, crop plants



KOVÁČOVÁ, V. APLIKACE BAKTÉRIE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS . BRNO: VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, FAKULTA CHEMICKÁ, 2008. 57 S. VEDOUcí BAKALÁŘSKÉ PRÁCE ING. LIBOR BABÁK, PH.D.

### PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma "Aplikace bakterie Agrobacterium tumefaciens" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení §152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.“

V Brně dne .....

.....  
(podpis autora)

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	ZÁKLADNÉ RYSY <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....	8
2.1	TAXONOMICKÉ ZARADENIE .....	8
2.2	HISTÓRIA.....	8
2.3	VLASTNOSTI <i>A. TUMEFACIENS</i> .....	9
2.4	IZOLÁCIA, KULTIVÁCIA A DETEKCIA .....	9
3	CYTOLÓGIA <i>A. TUMEFACIENS</i> .....	11
3.1	TVAR BUNKY A KOLÓNÍ.....	11
3.2	GENETICKÁ VÝBAVA <i>A. TUMEFACIENS</i> .....	11
3.3	PATOGÉNNY ŽIVOTNÝ CYKLUS .....	13
3.4	METABOLIZMUS .....	14
3.4.1	<i>Karbohydrátový metabolizmus</i> .....	14
3.4.2	<i>Octopinový a nopolinový metabolizmus</i> .....	17
3.5	PATOGENITA .....	18
3.5.1	<i>Rastlinný patogén</i> .....	18
3.5.2	<i>Ľudský patogén</i> .....	19
3.6	SYMPTÓMY CROWN GALL DISEASE .....	20
3.6.1	<i>Mnohobunečné interakcie A. tumefaciens</i> .....	20
3.6.1.1	<i>Interakcia medzi bunkami baktérií, A. tumefaciens. – A. tumefaciens</i> .....	20
3.6.1.2	<i>Interakcia medzi A. tumefaciens a hostiteľskou bunkou</i> .....	20
3.7	PODROBNÝ POPIS INTERAKCIE <i>A. TUMEFACIENS</i> S RASTLINNOU BUNKOU .....	21
3.7.1	<i>Kolonizácia</i> .....	21
3.7.2	<i>Spustenie bakteriálneho virulentného systému</i> .....	22
3.7.3	<i>Vznik T-DNA prenosového komplexu</i> .....	23
3.7.4	<i>Samotný transport T-DNA</i> .....	23
3.7.5	<i>Integrácia T-DNA do rastlinného genómu</i> .....	25
4	BIOTECHNOLOGICKÉ VYUŽITIE <i>A. TUMEFACIENS</i> .....	27
4.1	CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY MODIFIKÁCIE RASTLÍN .....	27
4.1.1	<i>Binárny vektor</i> .....	28
4.1.2	<i>Ko-integrovaný vektor</i> .....	28
4.2	TYPY TKANÍV VHODNÉ NA TRANSFORMÁCIU .....	29
4.3	MOŽNOSTI ZVÝŠENIA TRANSFORMAČNEJ EFEKTIVITY .....	30
4.4	GENETICKÁ TRANSFORMÁCIA ORGANIZMOV NEPATRIACICH MEDZI TYPICKÉ POLEHOSPODÁRSKE PLODINY .....	31
4.4.1	<i>Morské riasy</i> .....	31
4.4.2	<i>Ihličnany</i> .....	31
4.4.3	<i>Fungi</i> .....	32
4.4.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
4.4.3.2	<i>Agaricus bisporus</i> .....	33
4.4.3.3	<i>Dimorfné huby</i> .....	34
4.4.4	<i>HeLa bunky</i> .....	34
4.4.5	<i>Vývoj plodín atakujúcich ľudské ochorenia</i> .....	35

4.5	TYPY GM PLODÍN.....	36
4.6	TRANSFORMÁCIE DIKOTYLEDONOVÝCH RASTLÍN.....	36
4.6.1	<i>Sója</i> .....	37
4.6.2	<i>Bavlna</i> .....	38
4.6.3	<i>Repka olejná</i> .....	39
4.7	TRANSFORMÁCIA MONOKOTYLEDONOVÝCH RASLÍN .....	40
4.7.1	<i>Obilniny</i> .....	40
4.7.1.1	<i>Pšenica</i> .....	41
4.7.1.2	<i>Čirok</i> .....	42
4.7.2	<i>Ryža</i> .....	43
4.7.3	<i>Kukurica</i> .....	43
5	STATISTIKA, LEGISLATIVA, PERSPEKTÍVA .....	45
5.1	LEGISLATÍVA.....	45
5.1.1	<i>Sledovateľnosť a značenie</i> .....	45
5.1.2	<i>Monitoring možných účinkov na životné prostredie a zdravie</i> .....	45
5.2	ŠTATISTIKA PESTOVANIA GM PLODÍN .....	46
5.3	ČESKÉ SKÚSENOSTI S GM RASTLINAMI.....	46
5.4	BUDÚCI VÝVOJ V OBLASTI GM PLODÍN.....	47
6	ZÁVER.....	49
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	51
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....	56
9	ZOZNAM OBRÁZKOV .....	57

# 1 ÚVOD

Genetické transformácie rastlín vedúce v prírode k neoplastickému rastu, ktoré spôsobuje *Agrobacterium tumefaciens*, sú jediným známym prípadom prenosu DNA medzi ríšami. Okrem toho je *A. tumefaciens* prinajmenšom za laboratórnych podmienok schopné modifikovať široké spektrum nerastlinných eukaryotických buniek, od morských rias cez huby až po ľudské bunky. To nám podsúva otázku, ako môže byť virulentný mechanizmus *A. tumefaciens* funkčný u toľkých evolučne odlišných druhov? Kam až siahajú jeho schopnosti a ako sa dajú tieto prednosti biotechnologicky využiť v prospech ľudstva? To sú zásadné otázky, na ktoré sa vedci snažia podať odpoveď z najrôznejších uhlov pohľadu.

*A. tumefaciens* slúži ako modelový organizmus pri rôznych štúdiách poskytujúcich odpovede na otázky z oblasti mechanizmov vzniku transgénnej DNA, zvyšovania imunity rastlinných ale tak aj ľudských buniek, pri snahe zefektívniť pestovanie hospodárskych plodín v dobe ich neustáleho nedostatku. Pomocou *A. tumefaciens* je možné obohacovanie plodín o esenciálne látky nutričného charakteru alebo o látky zvyšujúce efektivitu reakcie imunitného systému v boji proti rôznym ochoreniam, ktoré by mohli byť záchranou pre ľudí z tretieho sveta, ale aj ďalších ťažko chorých.

## 2 ZÁKLADNÉ RYSY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

### 2.1 Taxonomické zaradenie

*Agrobacterium tumefaciens* je predstaviteľom rodu *Agrobacterium* z čelade *Rhizobiaceae*. Patrí do rádu *Rhizobacteria*, triedy *Alphaproteobacteria*, ríše *Bacteria* (eubacteria) [1].

Rod *Agrobacterium* zahŕňa viacero druhov, napríklad: *tumefaciens*, *rhizogenes*, *rubi*, *vitis*, *larrymoorei* a ďalšie. Pre transformáciu rastlín sa používajú prvé dva menované druhy. Druh *A. tumefaciens* obsahuje niekoľko poddruhov, ktoré sú vo veľkom prograse vzhľadom na neustále genetické modifikácie: Ach5, apple 185, B2A, II CHRYS, RS5, T37, 15955, novovytvorený K1026, známy K84 a najznámejší C58. Od *A. tumefaciens* C58 bol na výskumné účely odvodený A348 a ďalšie. V prípade *A. tumefaciens* sa ľahko stretnúť i so synonymami *Rhizobium radiobacter* alebo s ekvivalentným menom *Agrobacterium radiobacter*. Najskúmanejší a najpoužívanejší podruh *A. tumefaciens* C58 má taxonomické identifikačné číslo 176299 a možno v dostupnej literatúre objaviť formy: U. Washington, Dupont, Cereon [2].

Rod *Agrobacterium* bol dlhá najnovších noriem premenovaný na *Rhizobium*. Aj keď dané premenované druhy netvoria vo všeobecnosti symbiotické koreňové uzlinky, pretože neobsahujú Sym plazmid ani iný priemiestnenia schopný element s génmi pre tvorbu symbiotických uzlín. [3], [4].

*Rhizobium*, *Agrobacterium* a *Allorhizobium* patria všeobecne do čelade *Rhizobiaceae*, spolu so *Sinorhizobium*. Druhy *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* a *A. vitis*, spolu s *Allorhizobium undicola*, tvoria monofyletickú skupinu so všetkými zástupcami druhu *Rhizobium*. O danej skutočnosti svedčí porovnávací analýza 16S rDNA. Monofyletická podstata *Agrobacterium*, *Allorhizobium* a *Rhizobium* a ich spoločný fenotypový rodový popis podporuje ich zlúčenie do jedného rodu, *Rhizobium*. Názov *A. tumefaciens* sa zachovával ako pomenovanie člena z druhu *Agrobacterium*, ale prívlastok *radiobacter* získal prednosť a v upravenom názvosloví sa vyskytuje ako *Rhizobium radiobacter*.

*Agrobacterium larrymorrei* podľa nových pravidiel má názov *Rhizobium laeeymoorei*. *Agrobacterium radiobacter* nazývaný aj *Agrobacterium tumefaciens* sa dlhá nového volá *Rhizobium radiobacter*. Starý názov *Agrobacterium rhizogenes* bol premenovaný na *Rhizobium rhizogenes*. *Agrobacterium rubi* a *Agrobacterium vitis* boli premenované na *Rhizobium rubi* a *Rhizobium vitis*. [4].

### 2.2 História

V roku 1907 bolo *A. tumefaciens* objavené mikrobiológmi Smithom a Townsendom ako mikroorganizmus spôsobujúci neobmedzené bujenie parenchýmu rastlín. Od tejto doby pre rôzne príčiny bol zahájený proces štúdia *A. tumefaciens* širokým spektrom vedcov ako patogenného pôvodcu ochorenia pomenovaného Crown gall disease (krčkovitosť rastlín) [5]. Začiatkom päťdesiatych rokov 20. storočia Armin Braun predpovedal, že *A. tumefaciens*

vnáša do rastlín tumor indukujúcu podstatu (TIP). Rok 1973 bol prelomový a zahájil obdobie modernej biotechnológie, bola získaná prvá rekombinantná DNA a v Gente v Belgicku bolo potvrdené, že nositeľom TIP je plazmid *A. tumefaciens* (Ti-plazmid, teda tumor inducing plasmid) [6]. Prvýkrát bol v roku 1977 pomocou pôdnej baktérie *A. tumefaciens* prenesený cudzí gén do rastlinnej bunky. V skorých osemdesiatych rokoch označovaných ako „Zlatý molekulárny vek transformácií sprostredkovaných *Agrobacteriom*“ bolo zistené, že práve T-DNA obsiahnutá v Ti-plasmide je zodpovedná za nárast rastlinných tumorov a že ich rast nezávisí od prítomnosti *A. tumefaciens* v rastlinnom nádore [7]. V roku 1981 bola objavená inaktivácia onkogénov kodovaných agrobakteriálnou DNA a otvorená cesta pre využitie T-DNA v rastlinnej transformácii [6].

### 2.3 Vlastnosti *A. tumefaciens*

Napriek príbuznosti *A. tumefaciens* s baktériami fixujúcimi vzdušný dusík a žijúcimi v symbióze s niektorými rastlinami je *A. tumefaciens* čistý parazit, ktorý rastlinám neprináša žiadny profit.

*A. tumefaciens* je gramnegatívna baktéria, aeróbná, nefermentujúca, bez tvorby endospór, teda nesporulujúca, pohyblivá vďaka jednému až šiestim bičíkom, nefluoreskuje, nie je pigmentovaná, oxidázový test je negatívny, katalázový test je pozitívny. Baktéria je chemoorganotrofná, ale dokáže sa živiť aj saprofytycky. Prirodzene je však polyfágný parazit schopný napadať dikotyledonové rastliny z viac ako šesťdesiatich čeladi i mnohé ďalšie organizmy [8], [9].

### 2.4 Izolácia, kultivácia a detekcia

*A. tumefaciens* je všadeprítomné v pôde. Najčastejšie miesto výskytu a zároveň aj tvorby nádorových prejavov ochorenia zvaného krčkovitosť je okolitá pôda stromov s kôstkovitými a malvicovými plodmi, viniča a niektorých druhov ozdobných rastlín ako je šípková ruža [8]. V prírode sa baktérii najviac darí za teplého vlhkého počasia v rozmedzí teplôt 20 až 27 °C, pričom pri teplote nad 32 °C sa *A. tumefaciens* stáva nepatogénne a jeho aktivitu ovplyvňuje aj pH pôdy. Zvýšená kyslosť pôdy znižuje aktivitu aj patogenitu [5], [10].

Izolácia je najefektívnejšia z tkaniva nádorov rastlín alebo okolitej pôdy či vody. Optimálne tkanivo nádora pre izoláciu je bielej alebo krémovožltej farby z mladých aktívnych nádorov. Nádor je dobré umyť alebo sterilizovať povrch použitím dvadsať percentného domáceho bielidla a následne niekoľkokrát opláchnuť v sterilnej vode. Po narezaní niekoľkých vzoriek z odlišných častí nádorového tkaniva rastliny je potreba rozdeliť vzorky na veľmi malé časti, ktoré sa ponechajú po dobu minimálne 30 minút v skúmavke obsahujúcej sterilnú destilovanú vodu alebo pufráčny roztok. Použitím očkovacej kľučky sa rozotrie vzorka po semiselektívnom médiu 1A, teda po laktózovom agare detekujúcim produkciu 3-ketolaktózy, a naočkované médium sa inkubuje pri 25 až 27 °C. K detekcii *A. tumefaciens* môže byť využité semiselektívne médium 1A aj pri očkovaní vzoriek pripravených z pôdnych roztokov či zavlažovacích vôd, ale prítomnosť kolónií *A. tumefaciens* narastených na danom médiu z pôdnych či vodných vzoriek nemusí znamenať prítomnosť buniek druhu *Agrobacterium*, ktoré vyvoláva rakovinové bujnenie rastlín [8].

Na kultiváciu je vhodné použiť aj klasickú živnú pôdu pre gramnegatívne baktérie pri 30°C a v dostatočne vlhkom prostredí, ak teplota stúpne nad 35 °C, tak môžu byť drobné kolónie *A. tumefaciens* prerastené inou mikroflórou prítomnou v médiu.

Všeobecne sa na izoláciu a identifikáciu virulentných baktérií *A. tumefaciens* využíva semisektívne médium 1A obohatené o tellurite v koncentrácii 60 µg/ml, následne sa kolónie s typickou agrobacteriálnou morfológiou izolujú na tryptikázový sójový mäsopeptónový agar obsahujúci cykloheximid o koncentrácii 200 µg/ml. Vyselektované kolónie sú identifikované použitím *16S rDNA* analýzy použitím primerov *rD1* a *fP1* [11].

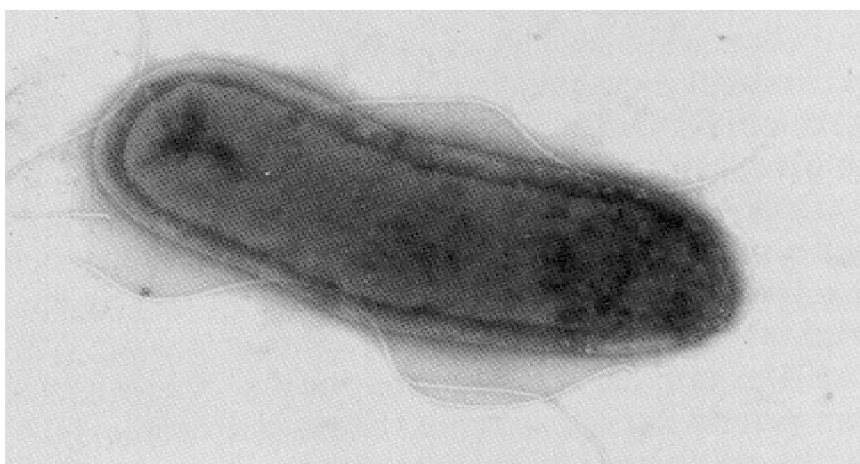
Patogenita izolovaných druhov *Agrobacterium* sa dá overiť aj pomocou testu na plátku mrkvy v Petriho miske alebo vzorke z päť týždňov starej rastliny rajčiaka, ktoré boli prenesená do suspenzie obsahujúcej 10<sup>8</sup> KTJ na 1 mililiter v slanom roztoku o koncentrácii 8,5 g/l. Zároveň sa používajú referenčné druhy *Agrobacteria* v slanom roztoku ako pozitívna, respektívne negatívna, kontrola. Pri pozorovaní vývoja sprievodných symptónov tzv. krčkovitosti rastlín sú naočkované a kontrolné vzorky udržiavané 20 dní pri teplote 25 °C a relatívnej vlhkosti vzduchu 70 %. Symptómy CGD (Crown gall disease) na plátku mrkvy sú pozorovateľné zvyčajne už za 7 – 8 dní a na rastline rajčiaku sú pozorovateľné v priebehu 15 až 20 dní [9].

Na približné určenie množstva virulentných buniek *A. tumefaciens* je najvhodnejšia PCR detekcia v reálnom čase. Pri kombinácii priamej pôdnej DNA extrakcie s PCR znásobením cieľovej DNA nasledovanej rozlíšením PCR produktov na agarózovom gele je možné detekovať okolo 200 kolónií formujúcich jednotku na gram pôdy použitím *virD2* primeru, použitím analýzy pomocou PCR v reálnom čase je možné v takej istej vzorke pôdy detekovať už aj 20 KTJ na gram, táto kvantifikácia trvá asi tri hodiny od extrakcie pôdnej DNA a výrazne uľahčuje detekciu *A. tumefaciens*. Pravdepodobnosť detekcie pri PCR v reálnom čase vystúpi k 90 %, ak je populácia *A. tumefaciens* približujúca sa 1000 KTJ na gram pôdy. Presnosť a rýchlosť detekcie *A. tumefaciens* umožňuje vyvinúť lepšiu kontrolnú stratégiu voči virulentnému *A. tumefaciens* v sadovníctve a zahrádníctve [12].

### 3 Cytológia *A. tumefaciens*

#### 3.1 Tvar bunky a kolónií

*A. tumefaciens* je štíhla mierne zaoblená tyčinka veľkosti 0,6 až 1 na 1,5 až 3 mikrometre. Má jeden až šesť bičkov rozmiestnených po povrchu (peritricha). Existuje samostatne alebo v pároch. Pri kultivácii v médiu obsahujúcom karbohydrátybunky produkujú obrovské množstvo extracelulárnych polysacharidov dávajúcim kolóniam objemný slizký vzhľad [8].



Obr. 3.1: *Agrobacterium tumefaciens* [8]

#### 3.2 Genetická výbava *A. tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens*, kmeň C58, Cereon, obsahuje celkom štyri molekuly DNA o celkovej dĺžke sekvencií 5 673 563 bp (približne 5,7 Mb) a o celkovom počte génov kódujúcich proteíny 6 850. Cirkulárny chromozóm má dĺžku 2 841 581 bp, obsahuje 2 750 ORF a 3 488 génov kódujúcich proteíny. Cirkulárny plazmid známy ako At-plazmid má dĺžku 542 869 pb s 550 ORF a 856 génov. Cirkulárny plazmid označovaný ako Ti-plazmid má dĺžku sekvencií 214 331 bp s obsahom ORF v počte 198 a 281 génov pre virulenciu, katabolizmus špecifických opínov, hosťiteľom riadenú opínovú syntézu a tvorbu rastlinných hormónov. Lineárny chromozóm má dĺžku 2 074 782 bp s počtom génov kódujúcich proteíny 2 225 a obsahuje 1 850 ORF [13], [14].

Pri prenose DNA z *A. tumefaciens* do hosťiteľskej bunky je prenášaný iba úsek z Ti-plazmidu nazývaný T-DNA, ktorý je ohraničený 25 bp dlhými repetíciami. Dĺžka T-DNA je približne 23 kb. Tieto repetície slúžia ako signálne úseky pre transférový aparát. T-DNA obsahuje gény, ktoré kódujú gény zapojené do syntézy opínov a fytohormónov, napriek tomu že sú to gény sídliace v bakteriálnom plazmide, sú aktívne len v rastlinnej bunke, to znamená, že musia obsahovať typické eukaryotické kontrolné sekvencie. Všetky tieto gény obsahujú TATA a CAAT boxy a typické rastlinné polyadenylované signály [5], [15].



Sú známe dva typy Ti-plazmidu, nopalínový a oktopínový, oba majú T-DNA regióny, ale líšia sa ich štruktúrou. Nopalínová T-DNA je tvorená jedným súvislým segmentom o veľkosti 22 kb a oktopínová T-DNA je tvorená tromi segmentmi, ľavým segmentom (TL) s dĺžkou 13 kb, centrálnym úsekom (TC) dlhým 1,5 kb a pravým segmentom (TR) DNA s veľkosťou 7,8 kb. TL DNA má onkogénnu funkciu a TR obsahuje gény pre syntézu opínov. K prenosu je postačujúci aj samotný TR úsek, avšak zvyšné úseky zvyšujú efektivitu prenosu svojou prítomnosťou. Žiadne iné sekvencie nie sú pri prenose T-DNA žiadané. Pravý segment obsahuje repetíciu s dvoma konzervatívnymi doménami s veľkosťou 13 a 5-7 bp, delícia prvých šesť alebo posledných desať zablokuje transfét T-DNA [15].

Pri transformácii z hľadiska genetickej výbavy *Agrobacteria* sú dôležité dva kroky: naviazanie baktérie na rastlinnú bunku a transfér DNA to bunky hostiteľa. Každý z krokov zahŕňa odlišnú sadu génov.

V prípade viazania baktérie na rastlinnú bunku sú najviac potrebné tri chromozomálne gény *A. tumefaciens* pre virulenciu s označením *chvA*, *chvB* a *pscA*, ďalšími chromozómom určenými genetickými elementami v pripájacom procese sú *chvE*, *cel locus* a *att locus*. Mutácie v miestach *chvA* a *chvB* vedú k značnému poklesu väzby *A. tumefaciens* na rastlinnú bunku, pričom *chvA* kóduje transportné faktory a *chvB* kóduje proteíny vyžadované pri beta-glukanovej syntéze. *PscA* je potrebný pre syntézu väčšiny neutrálnych a kyslých extracelulárnych polysacharidov, konkrétne cyklických glukánov a kyslých sukcinoglykanov. *Chv E* je potrebný pre cukrom vystupňovanú indukciu vir génov a bakteriálnu chemotaxiu. *Cel locus* má zodpovednosť za syntézu celulóзовých vlákien a 20 kb dlhý *att* lokus súvisí so syntézou povrchových bunkových proteínov a obsahuje gény potrebné pre úspešné prilnutie baktérie k hostiteľovi.

Inzercia do ľavej 10 kb dlhej strany *att* lokusu spôsobí produkciu avirulentných mutantov, ktorých virulencia ale môže byť obnovená, ak sa použije kultivačné médium, ktoré bolo už skôr upravené inkubáciou divokého typu virulentného *A. tumefaciens* s rastlinnými bunkami. Predchádzajúcimi reakciami bola dosiahnutá produkcia a akumulácia zložiek, ktoré chýbajú v mutantnej baktérii, ktoré znovu podmieňujú v médiu interakciu baktéria – hostiteľ.

V kontraste s týmto dejom je ale mutačná inzercia na pravej strane v úseku 10 kb na *att locus* vedúca k ireverzibilnej strate prilievajúcej schopnosti, ktorá nemôže byť obnovená ani v upravenom médiu.

Tieto výsledky naznačujú, že gény umiestnené na ľavej strane *att locus* sa zapájajú do molekulárnych signalizačných procesov, ale pravostranné gény sú z najväčšou pravdepodobnosťou zodpovedné za syntézu základných zlúčenín. Ľavá strana *att locus* obsahuje operón zložený z deviatich otvorených čítacích rámcov (ORF), z ktorých štyri vykazujú homológiu ku génom súvisiacimi s tzv. transportným systémom podmieneným periplazmatickými väzbovými proteínmi (ABC). Mutačná analýza dokazuje poruchu v produkcii a akumulácii špecifických zlúčenín esenciálnych pre bakteriálne prilnutie k hostiteľovi. Gény kódujúce ABC transportér môžu byť zapojené do vylučovania týchto substancií z baktérie ako aj do zavedenia niektorých rastlinou vytvorených aktivátorov syntézy týchto prilievajúcich špecifických zlúčenín do baktérie.

Druhú sadu génov možno označiť ako gény *vir*, ktoré sú stimulované po uvoľnení acetosyringonov a hydroxy-acetosyringonov z poranených rastlinných buniek. 30 až 40 kb veľký virulentný (*vir*) región je zorganizovaný do šiestich esenciálnych operónov, ktoré sú potrebné pre T-DNA prenos (*virA*, *virB*, *virD* a *virG*) a pre zvyšujúcu sa pravdepodobnosť úspechu transféru (*virC* a *virE*) a do dvoch neesenciálnych (*virF* a *virH*). *VirA*, *virG* a *virF* sú

jediné monocistronické, ďalšie sú polycistronické a kódujú niekoľko proteínov, *virE*, *virC* a *virH* majú dva gény, pričom operón *virD* má až štyri gény a operón *virB* dokonca jedenásť génov. Regulácia týchto dôležitých génov je jednotná a znamená kaskádu transkripčných pochodov.

Kaskáda začína s *virA*, ktorý je konštitutívne exprimovaný. *VirA* kóduje transmembránový proteín, ktorý je citlivý voči chemickým podnetom z prostredia, teda je schopný identifikovať prítomnosť acetosyringonu. *VirG* produkuje dva transkripty, ktoré sa líšia na 5'-koncoch mRNA. Jeden je exprimovaný konštitutívne a druhý, dlhší, je exprimovaný iba v prítomnosti rastlinou indukovaných zlúčenín, teda substrátu. Jediné dva konštitutívne prepisované operóny *virA* a *virG* kódujú dvojzložkový systém aktivujúci prepis iných génov *vir*.

Polypeptidové reťazce vzniknuté prepisom *virB* a *virE* sú vysoko indukovateľné fenolickými zlúčeninami, ktoré vylučuje poranená rastlina. Polycistronický *virE* kóduje proteín viažuci sa na jednovláknovú DNA a obaľuje T-vláknko počas transféru do rastlinnej bunky. *VirC* a *virD* kódujú stranovošpecifickú endonukleázu, ktorá ktorá štiepi vlákno DNA v mieste 25bp dlhej repetície tvoriace ohraničenie T-DNA. Vzniká tak T-vláknko, ktoré je medziproduktovou molekulou transportovanou do rastlinnej bunky. *VirB* môže zohrať úlohu pri riadení prenosu T-DNA po povrchu bakteriálnej bunky [5], [15].

### 3.3 Patogénny životný cyklus

Patogénne formy *A. tumefaciens* môžu prežiť saprofytycky v pôde až do dvoch rokov. Ak sa nablízku v okolitej pôde vyskytne hostiteľská rastlina poranená vplyvom presádzania, hmyzom za účelom potravy alebo iným spôsobom, baktéria sa chemotaktickým pohybom presunie k poranenej časti a umiestni sa medzi bunky hostiteľa v rane.

Takto umiestnené baktérie začnú stimulovať okolie hostiteľských buniek k rýchlemu a nepravidelnému deleniu. Baktérie dosahujú tohto delenia vložением časti vlastnej DNA do hostiteľských bunecných chromozómov, ktorá spôsobuje nadprodukcii cytokinínov a auxínov, ktoré sú regulátormi rastlinného rastu a zároveň sa tvoria opíny slúžiace k výžive *A. tumefaciens*.

Výsledné tkanivo rastlín získané rýchlym delením je nediferenciované bielej alebo krémovožltej farby a bunky môžu obsahovať jedno alebo viac jadier. Toto tkanivo pokračuje vo svojom zväčšovaní sa, pričom nádor je formovaný na koreni alebo stonke v závislosti od pôvodne poranenej strany rastlinného tela.

Baktéria obsadzuje intercelulárny priestor na periférii nádora a nie je prítomná v centre rastúceho tumora. Nádor nie je chránený epidermis a tak je citlivý povrch nádora náchylný k napudnutiu sekundárnym patogénom, hmyzom alebo saprofytom.

Degradácia tumoru sekundárnym útočníkom zapríčiňuje jeho hnedé alebo čierne sfarbenie a následné uvoľnenie buniek *A. tumefaciens* naspäť do pôvodne obývanej časti pôdy, odkiaľ môžu byť unesené vodou alebo na danom mieste zostávajú do ďalšieho vegetačného obdobia. V prípade viacročných rastlín môže napadnuté tkanivo prežiť a byť naďalej obývané *A. tumefaciens*, až kým tumor neodpadne, alebo v nasledujúcej sezóne baktéria zase zapríčiní rast nového nádora na tom istom mieste [8].

## 3.4 Metabolizmus

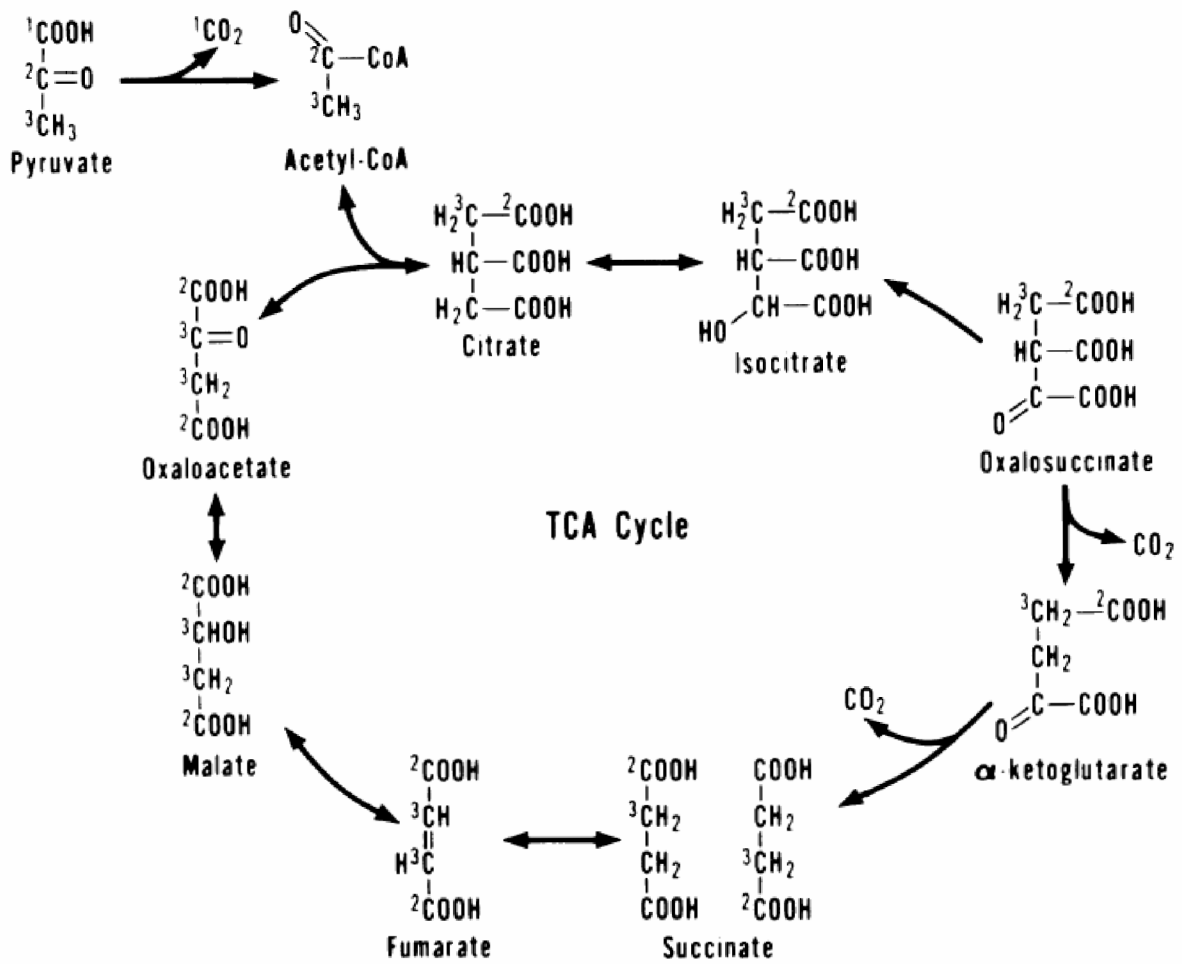
### 3.4.1 Karbohydrátový metabolizmus

Činnosť reakcií pentózového cyklu v *A. tumefaciens* je oveľa väčšia ako u iných normálne sa vyskytujúcich baktérií a z tohto pohľadu *A. tumefaciens* opäť reprezentuje unikátnu kategóriu.

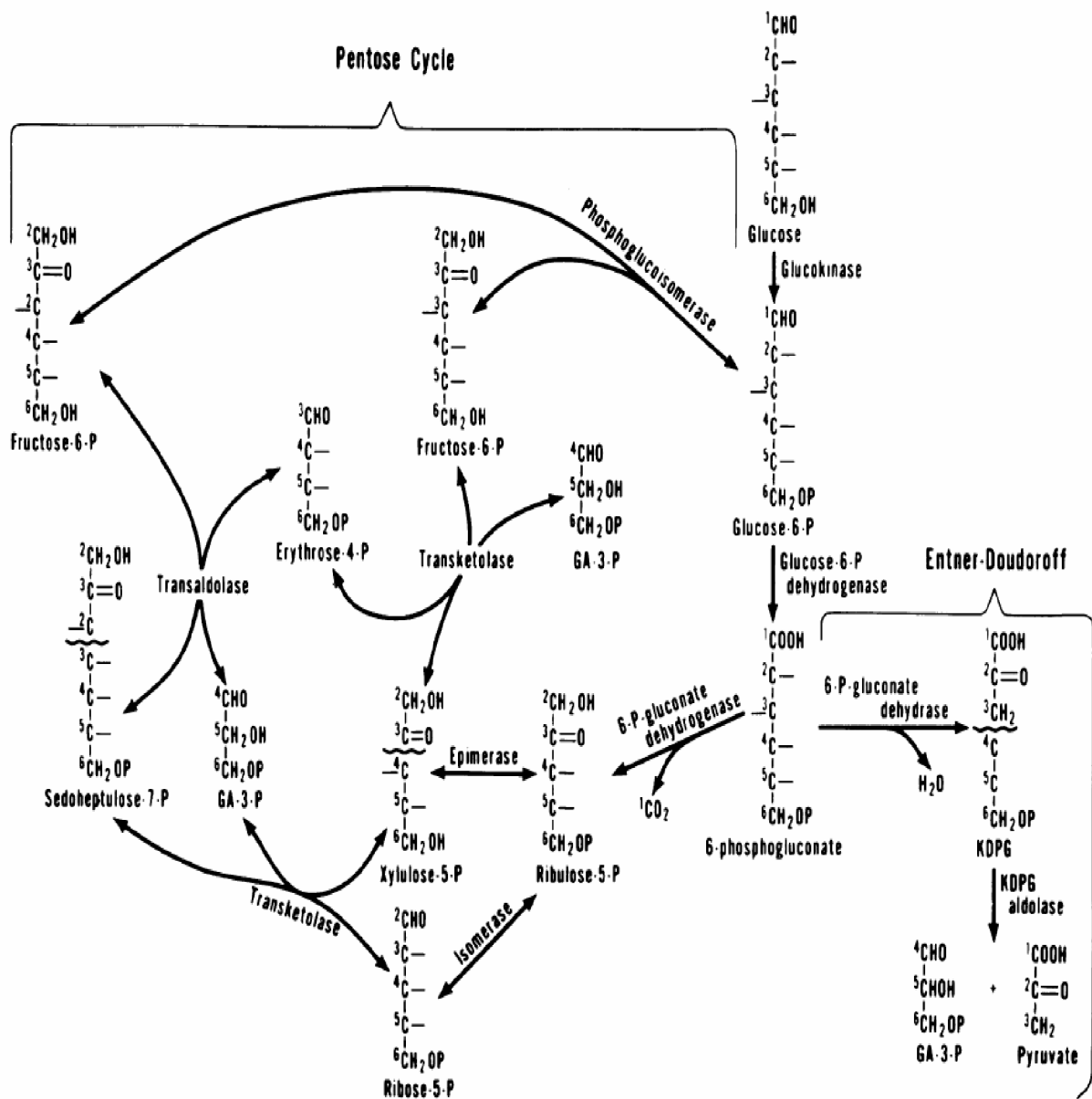
*A. tumefaciens* využíva D-glukózu striktne aeróbnym mechanizmom zahŕňajúcim cestu pentózového cyklu (PC) i Entner-Doudoroffov metabolizmus (ED). Relatívny pomer medzi týmito metabolickými dráhami je 55 % pre ED cestu a 44 % pre PC, tento pomer neovplyvňuje systém syntézy 3-ketoglykozidu. Pomocou rádiorespirometrických a enzymatických analýz je známe, že Embden-Meyerhofova-Parnasova dráha, teda základný anaeróbný katabolický proces, čiže glykolýza, v *A. tumefaciens* nefunguje. Oxidácia pyruvátu, acetátu, sukcinátu a glutamátu naznačuje, že terminálna respirácia zahŕňa cyklus trikarboxylových kyselín, teda Crebsov cyklus, a aj cyklus kyseliny glyoxylovej [17].

V *A. tumefaciens* glykozylované a galaktozylované cukry navodzujú syntézu enzýmu, ktorý jedinečne oxiduje tieto glykozidy na 3-ketoglykozidy. 3-keto zlúčeniny sú očividne prvým medziproduktom alternatívnej cesty metabolizmu cukrov a sú zahrnuté do konverzie D-glukózy na D-ribózu, nie však cestou fosforylácie.

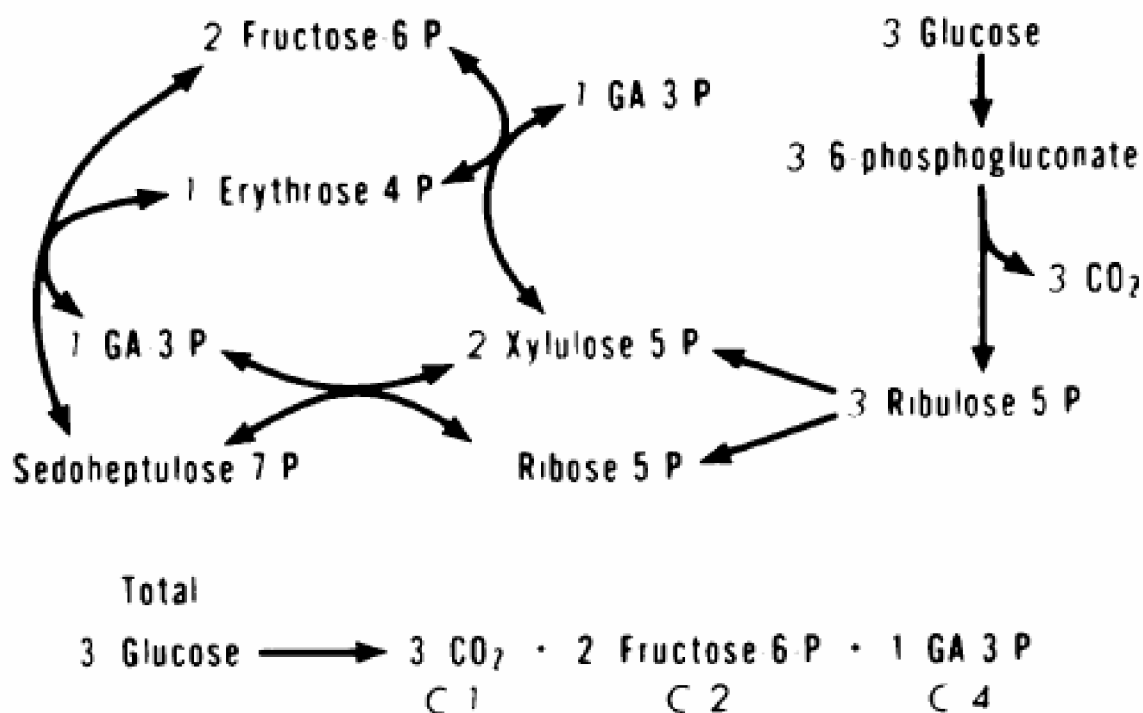
*A. tumefaciens* obsahuje dva druhy 3-ketoglukózu redukujúcich enzýmov. Oba druhy špecificky vyžadujú redukovaný nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát ako donor vodíkov a katalyzujú redukciiu 3-ketoglukózy na glukózu, ale neredukujú 3-ketoglykozidy, ich triviálny názov je 3-ketoglukóza reduktázy. *A. tumefaciens* zhodne obsahuje aj enzým D-glykozid-3-dehydrogenázu, ktorá katalyzuje oxidáciu D-glukózy na 3-ketoglukózu, tento enzým používa ako prostetickú skupinu flavínadenín-dinukleotid a prenáša elektróny z FAD na cytochrómy. Z porovnania vzájomných vlastností je zrejme, že reaktivita 3-ketoglukóza-reduktás je protikladná k reaktivite D-glykozid-3-dehydrogenás vo vzťahu k biochemickým oxidačnoredukčným dejom medzi glukózou a 3-ketoglukózou. Baktérie metabolizujú 3-ketoglukózu odstraňovaním kyslíka. Glukóza je najprv raz oxidovaná na 3-ketoglukózu, potom redukovaná na glukózu pomocou 3-ketoglukóza-reduktázy a následne polymerizovaná do glykogénu. To znamená, že glykozid-3-dehydrogenáza aj 3-ketoglukóza-reduktáza sú esenciálne pre syntézu glykogénu z glukózy v rastúcich bunkách [18].



**Obr. 3.2:** Metabolická dráha *A. tumefaciens*. Cyklus kyseliny citrónovej [17]



Obr. 3.3: Metabolická dráha *A. tumefaciens*. Pentózový cyklus s Entner-Doudoroffovou dráhou [17]



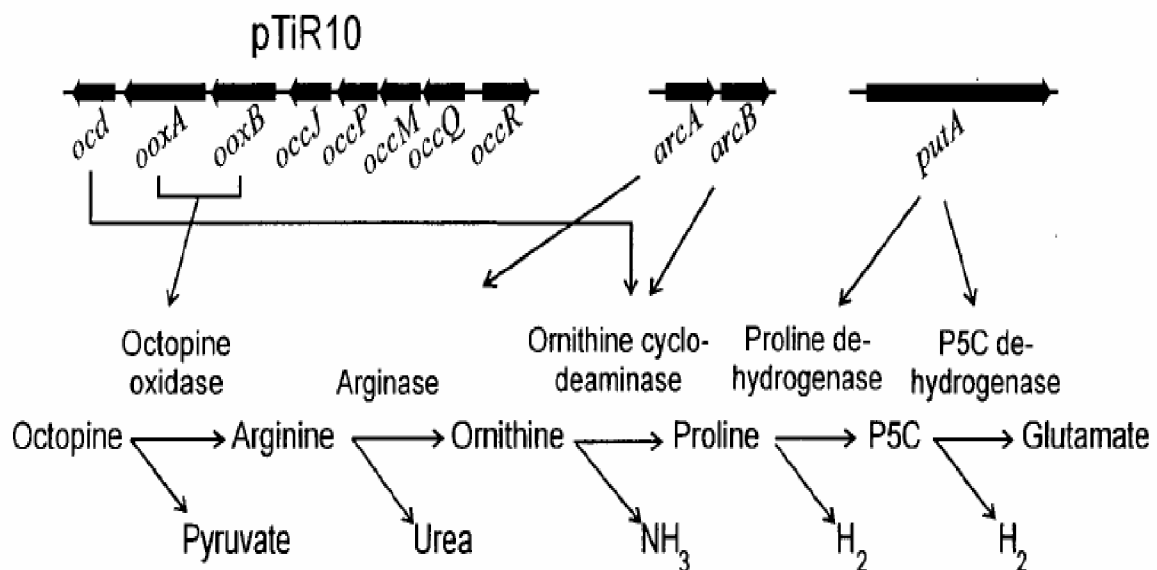
**Obr. 3.4:** Rovnováha uhlíka vychádzajúca z oxidácie troch molekúl glukózy cestou reakcií pentóзовého cykla *A. tumefaciens* [17]

### 3.4.2 Octopínový a nopalínový metabolizmus

Rastlinné nádory vyvolané *A. tumefaciens* v dikotyledonových rastlinách obsahujú nezvyčajné aminokyseliny oktopín N<sup>2</sup>-(D-1-karboxyethyl)-L-arginín a nopalín N<sup>2</sup>-(1,3-dikarboxypropyl)-L-arginín. Produkcia týchto opínov nádormi nie je závislá na tom, ktorá hostiteľská rastlina je využívaná, ale je predurčená bakteriálnym druhom spôsobujúcim nádorové bujnenie. Vo všeobecnosti, nopalín obsahujúce nádory sú vyvolané poddruhom *A. tumefaciens*, ktorý katabolizuje nopalín a ten je syntetizovaný rastlinami z 2-oxoglutarátu a arginínu, a z toho vyplýva, že oktopín produkujúce nádory sú vyvolané infekciou poddruhmi katabolizujúcimi oktopín, pričom oktorín je syntetizovaný z pyruvátu a arginínu. V mnohých prípadoch nádory pokračujú v produkcii týchto opínov aj pri kultivácii v tkanivovej kultúre, kde už nie je prítomné žiadne životaschopné *A. tumefaciens*. Z toho vyplýva, že Ti-plazmid je skutočne asociovaný s virulenciou a tvorbou opínov. Stratu virulencie počas inkubácie spôsobuje zvýšená teplota.

Formovanie opínov a aj tvorba nádorov vyžaduje interakciu medzi proteínmi kódovanými Ti-plazmidom a proteínmi kódovanými v bakteriálnom genóme. Tieto interakcie sa uplatňujú aj v katabolizme oktopínu a nopalínu. Oktopín je premenený na arginín a pyruvát pomocou oktopínovej oxidázy, ktorá je kódovaná v Ti-plazmide oktopínového typu. Podobne je nopalín, ktorý sa syntetizuje v nádoroch indukovaných *A. tumefaciens* nopalínového typu, premenený na arginín a 2-oxoglutarát pomocou nopalínovej oxidázy, ktorá je kódovaná v Ti-plazmide nopalínového typu. Druhým krokom katabolizmu oboch zlúčenín je premena arginínu na ornithin. Za túto premenu je zodpovedný enzým argináza, ktorý sa nachádza aj v poddruhoch *A. tumefaciens*, ktoré neobsahujú Ti-plazmid, to znamená že gén pre arginázu je

umiestnený na bakteriálnom chromozóme, ale je kódovaný aj v Ti-plazmidoch nopalínového typu. Sekvenčná analýza dokazuje, že arginázová aktivita nemôže byť kódovaná oktopínovým Ti-plazmidom. Tretím krokom v katabolizme je premena ornithinu na prolín pomocou ornithin cyklodeaminázy. Tento enzým je kódovaný v oboch typoch Ti-plazmidov. Niektoré poddruhy s chýbajúcim Ti-plazmidom tiež exprimujú tento enzým, ale nie *A. tumefaciens* C58 s vyňatým Ti-plazmidom. Štvrtým krokom katabolizmu je oxidácia prolínu na  $\Delta^1$ -pyrroline-5-karboxylát a jeho ďalšia oxidácia na glutamát, týchto dejov sa zúčastňujú enzýmy prolíndehydrogenáza a P5C-dehydrogenáza, ktoré sú kódované génmi umiestnenými v genóme *A. tumefaciens* mimo Ti-plazmid [19].



Obr. 3.5: Katabolizmus oktopínu riadený príslušnými génmi [19]

## 3.5 Patogenita

### 3.5.1 Rastlinný patogén

Molekulárny a genetický základ pre výber vhodného hostiteľa pre *A. tumefaciens* je nejasný. Skoršie výskumy indikujú, že Ti-plazmid, skôr ako chromozomálne gény, je významnejším genetickým určovateľom pri výbere hostiteľov. Niekoľko virulentných lokusov na Ti-plazmide, vrátane *virC* a *virF*, sa javí byť determinujúcich škálu rastlinných druhov, ktoré môžu byť transformované k tvorbe nádorov. Locus *VirH* sa zdá byť zapojený do schopnosti *Agrobacterium* transformovať kukuricu a iné gény *vir*, vrátane *virG*, prispievajú k hypervirulencii jednotlivých druhov *Agrobacterium* [16].

Momentálne je zrejmé, že predurčenie hostiteľov, ktorých je možné prirodzene infikovať, je viac komplexnejší proces ako sa predpokladalo. Tento proces je pod genetickou kontrolou širokej palety faktorov z baktérií aj hostiteľských rastlín [16].

Pre dikotyledonové rastliny je charakteristické, že v prípade poranenia ich orgánov dochádza k produkcii fenolyckých látok ako je napríklad kyselina 4-hydroxybenzoová,

feruklová, sinapová, lysergová, galová, ďalej katechol, vanilín alebo pyrogalol. Prítomnosť týchto fenolických látok v pôde je príčinou pozitívnej chemotaxie a aktivácie génov virulencie, ktoré nesie práve Ti-plazmid *A. tumefaciens*. Špecifická väzba bakteriálnych buniek je založená na princípe väzby signálnych molekúl na receptorové proteíny bunecných stien. Signálne molekuly sú kódované génmi virulentnej oblasti Ti-plazmidu. Jednotlivé kmene *A. tumefaciens* vykazujú často špecifitu voči rôznym botanickým druhom. Táto špecifita je daná práve variabilitou signálnych molekúl. Následne dochádza k aktivácii ďalších génov zaisťujúcich virulenciu plazmidu. Tieto gény kódujú napríklad endonukleázy, ktoré spôsobujú vznik jednoreťazcových zlomov na špecifických miestach Ti-plazmidu. Po náhodnej integrácii T-DNA oblasti do genómu hostiteľskej bunky dochádza k syntéze auxínov a cytokínov, čo má za následok fenotypové zmeny rastlín [27]. Napriek prirodzenej schopnosti *A. tumefaciens* napadať len dikotyledonové rastliny, je možné T-DNA prenos do monokotyledonových rastlín uskutočniť nepriamo s použitím citlivých reportérových systémov.

Rozširujúci sa záber hostiteľov môže byť podporovaný aj interakciou Ti-plazmidu s agrobakteriálnym chromozómom iného pôvodu. Napríklad, Ti-plazmid *pTiBo542* umiestený prirodzene v *A. tumefaciens* *Bo542* má limitujúcu schopnosť tvorby nádorov voči mnohým druhom strukovitých rastlín, ale ak sa daný Ti-plazmid premiestni do *A. tumefaciens* *C58*, Ti-plazmid *pTiBo542* sa prejaví oveľa silnejšou virulenciou pôsobiaceou na sóju a iné strukovité rastliny. Citlivosť voči transformácii rastlín *A. tumefaciens* má genetickú podstatu minimálne u kurkumy, hrášku, sóji, vinnej révy a rozličných ekotypoch *Arabidopsis thaliana* [16].

V prípade pozitívneho nálezu *A. tumefaciens* v pôde určenej na pestovanie kultúrnych plodín sa odporúča vysádzanie len monokotyledonových rastlín ako kukurica alebo obiloviny po dobu niekoľkých rokov. Ako prevencia môže slúžiť aj pomerne ekonomicky nenáročná aplikácia nepatologického organizmu *Agrobacterium radiobacter* *K84*, ktorý produkuje argocín majúci letálne účinky na patogénne kmene *A. tumefaciens*. Niektoré liečebné účinky vykazujú aj komerčne predávané zmesi 2,4-xylenolu a metakresolu v emulzii olej-voda, ktoré sa priamo nanášajú na nádory, ale táto metóda je kvôli pracnosti a časovej náročnosti málo používaná, tak ako aj drahé zlúčeniny medi a silné oxidanty ako chlórnan sodný [8].

### 3.5.2 Ľudský patogén

*A. tumefaciens* bolo izolované z viacerých ľudských vzoriek, prvýkrát v roku 1967, ale nebola potvrdená patogenita. Od tohto roku bolo hlásených približne dvadsaťdva prípadov klinicky významných infekcií spôsobených *A. tumefaciens*, ktoré vyústili v dva prípady infekcie močového ústrojenstva, päť prípadov zápalov pobrušnice, jednu endokarditídu a štrnásť prípadov bakterémie [20].

Bakteriostatická citlivosť je rôzna, baktéria vykazuje utváranie niekoľkých antibiotiká inhibujúcich enzýmov, ale bakteriostatická terapia je účinná aj pri minimálnych koncentráciách pri použití ticarcillinu, cefoxitínu, ceftriaxonu, cefotaximu, gentamicínu a ciprofloxacínu s vynikajúcou účinnosťou voči *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* pôsobí patogénne hlavne u ľudí s permanentným katetrom [21].

Od októbra 2007 sa sústreďuje pozornosť na chorobu zvanú Morgellons, pri ktorej je jedným z patogénnych spoločníteľov práve *A. tumefaciens*. Príznaky ochorenia boli popísané



už pred tristo rokmi, ale lekári zaradili pacientov medzi psychicky chorých ľudí s dezilúznou parazitózou, t.j. psychicky narušení ľudia namýšľajúci si napadnutie parazitmi. Symptómy sa však u veľkej skupiny pozorovaných vôbec nelíšili a bolo potvrdené, že ide o infekčné ochorenie s neuropsychiatrickými známami charakteristické vyrastaním vláknitých útvarov z kože a inými dermatologickými príznakmi. Ide teda o systémovú chorobu spájanú s chronickou chorobnou únavou, bolesťou kĺbov a svalov, hlavy, nespavosťou a poklesom funkčnosti imunitného systému, pričom viditeľným manifestom sú mnohonásobné kožné rany špeciálne vo vlasovej oblasti s vývojom zvláštnych vláknien [22].

### **3.6 Symptómy Crown gall disease**

CGD začína vznikom malých zdurenín na stonke alebo koreni, prípadne na iných častiach rastinného tela, ktoré sú umiestnené čo najbližšie k pôde. Mladý nádor, najčastejšie pripomínajúci zatvrdnutú kožu, vzniká následne po poranení a je bielej či žltokrémovej farby guľovitého tvaru. Tak ako nádor starne, tak sa mení jeho tvar, stáva sa nepravidelným a farba sa mení na hnedú až čiernu. Nádor môže byť spojený s povrchom hostiteľa len pomerne úzkym pruhom tkaniva ale môže sa javiť aj ako celkový opuch stonky, nie celkom presne oddelený. Tkanivo nádora je zvyčajne porézne a drobiace sa ale vyskytuje sa aj v drevitej forme na povrchu s útvarmi pripomínajúcimi uzlíky. Na jednej rastline sa môže súčasne nachádzať viac nádorov, ktoré práchnivejú a odhnívajú na povrchu rastliny buď čiastočne alebo celé s možnosťou recidívy v tej istej oblasti každú sezónu. Prídavné symptómy zahŕňajú zakrpatenie, chlorotické listy, zvýšenú citlivosť rastliny voči sekundárnemu parazitovi a na zmeny životného prostredia [8].

#### **3.6.1 Mnohobunečné interakcie *A. tumefaciens***

##### **3.6.1.1 Interakcia medzi bunkami baktérií, *A. tumefaciens*. – *A. tumefaciens***

*A. tumefaciens* je ukázkovým modelom pre štúdium mnohobunkových interakcií. Na základe bunečných interakcií medzi *A. tumefaciens* a hostiteľom bolo zistené, že časť baktérií vyskytujúc sa v pôde, ľuďoch, oceánoch i v chladiacich zariadeniach obyčajne tvorí mnohobunečný biofilm, ktorý pripomína architektonický komplex tvorený skupinami mikrokolónií zlepenými navzájom bakteriálne produkovanou matrix. Biofilm predstavuje ďalší ochranný mechanizmus baktérií, pretože zvyšuje ich odolnosť vo všeobecnosti a voči antibiotickému liečeniu [23].

##### **3.6.1.2 Interakcia medzi *A. tumefaciens* a hostiteľskou bunkou**

Pomocou medzibunečných signalizácií nazývaných „quorum-sensing“ medzi *A. tumefaciens* a rastlinnou bunkou na základe produkcie acylovaného homoserínového laktonu (Acyl HSL), ktorý je prevažujúcim extracelulárnym bakteriálnym signálom, dokáže *A. tumefaciens* spustiť syntézu proteínov potrebných na prepojenie rastlinnej bunky

s bakteriálnou bunkou. Acyl HSL je produkovaný v nízkych koncentráciách, ale ľahlo difunduje cez bakteriálny obal a reguluje horizontálnu výmenu a replikáciu veľkých plazmidov potrebných pre patogenézu a symbiózu s rastlinným hositeľom, jedná sa o fenolickú zlúčeninu [23].

Fenolické látky sú hlavne nachádzané u dikotyledonov, sú vylučované v prípade poškodenia bunkovej steny rastlinnej bunky, a iba veľmi zriedkavo u monokotyledonov. To je dôvodom prečo *A. tumefaciens* paraziticky napadá a geneticky modifikuje prirodzenou cestou monokotyledony iba v niektorých výnimočných prípadoch, napríklad asparágus [7].

*A. tumefaciens* pri interakcii s hositeľskou bunkou začína výstavbu tzv. tunela potrebného na prenos T-vlákná, ktorý súvisí s vnútornou aj s vonkajšou bakteriálnou membránou ako i s plazmatickou membránou hositeľa. Takýto typ transportu sa označuje ako typ IV a je využívaný aj u viacerých ľudských patogénov. Tento proces má podobný mechanizmus ako interakcia bakteriálnych buniek pri konjugácii.

Prekvapujúce je, že jeden proteín dokáže zabezpečiť takmer úplne sformovanie tzv. tunela, teda prepojenia, medzi baktériou a hositeľom. Tento proteín má nezvyčajne široký počet funkcií, zatiaľ je známych šesť. Reč je o proteíne s názvom *VirE2*. Najdôležitejšia funkcia je zrejme tvorba tunela v lipidovej dvojvrstve. Za prvú funkciu môže byť označená jeho schopnosť obaliť T-vlákná, chrániť ho pred degradáciou a priestorovo vhodne usporiadať jeho konfiguráciu na prenos. Druhou funkciou je spájanie sa s proteínom *VirE1* zabezpečujúcim samotný prenos *VirE2*. Treťou schopnosťou je prenos do rastlinnej bunky nezávisle od T-komplexu. Za štvrtú funkciu sa považuje schopnosť formovať póry dostatočne široké na pasáž T-komplexu cez bunecnú plazmatickú membránu a obalenie T-vlákná aj v rastlinnej cytoplazme. Piatou vlastnosťou je interakcia s plazmatickými rastlinnými chaperonmi zacieľujúcou efektívnejšie T-komplex v smere na jadro. Zatiaľ poslednou známou funkciou je interakcia s jadrovými rastlinnými faktormi, ktoré sprostredkovávajú reakciu s chromatinom a uľahčujú integráciu T-DNA [24].

### 3.7 Podrobný popis interakcie *A. tumefaciens* s rastlinnou bunkou

*A. tumefaciens* má výnimočnú schopnosť prenášať časť DNA segmentu tumor indukujúceho plazmidu do jadra buniek hositeľa a infikovať tieto bunky, pričom T-DNA je stabilne integrovaná do genómu hositeľa a prepisovaná [15].

Proces génového transféru sa vyznačuje piatimi nevyhnutnými krokmi: bakteriálna kolonizácia, spustenie bakteriálneho virulentného systému, vytvorenie T-DNA prenosného komplexu, samotný transport T-DNA a začlenenie T-DNA do rastlinného chromozómu [5].

#### 3.7.1 Kolonizácia

Bakteriálna kolonizácia je nevyhnutný a najskorší krok v spustení nádorového bujnenia, kedy sa *A. tumefaciens* prikladá k rastlinnej bunke. Ak vplyvom mutácie baktéria stratí pripojujúcu sa schopnosť, tak stráca aj funkciu tumorovej indukcie. Polysacharidy umiestnené na povrchu agrobacteria hrajú kľúčovú úlohu v kolonizačných procesoch. Jedným z možných preventívnych zásahov voči *A. tumefaciens* môže byť aplikácia roztoku lipopolysacharidov z virulentného kmeňa do tkaniva rastlín pred interakciou s virulentnou

baktériou, tým sa zabráni prilnutiu baktérie k povrchu rastlinnej bunky. Lipopolysacharidy sú integrálnou časťou vonkajšej membrány a pozostávajú z lipid A membránovej kotvy a z O-antigénneho polysacharidu. *A. tumefaciens*, ako aj iné s rastlinami asociované baktérie rodu *Rhizobiaceae*, produkuje tiež kapsulárne polysacharidy, označované ako K-antigény, ktoré postrádajú lipidové zakotvenie a majú silnú aniónovú povahu a sú úzko späté s bunkou. Často práve prilnutie baktérie k hostiteľovi vyvolá navzájom presne zladené zvýšenie produkcie kyslých polysacharidov [5].

### 3.7.2 Spustenie bakteriálneho virulentného systému

*A. tumefaciens* rozmiestňuje veľký počet proteínov a používa niekoľko molekulových mechanizmov k iniciácii a naštartovaniu prvého kroku transformčných procesov.

*VirA* je transmembránový dimérický sensorický proteín, ktorý detekuje signálne molekuly, hlavne malé fenolické zlúčeniny uvoľňované poranenými rastlinami. Signál pre aktiváciu *VirA* začleňuje kyslé pH, fenolické zlúčeniny ako acetosyringone a istú triedu monosacharidov, ktoré pôsobia synergicky s fenolickými zlúčeninami. Proteín *VirA* sa dá štruktúrne dozdeliť do troch domén: periplazmatickú a dve transmembránové domény, značené ako *TM1* a *TM2*, ktoré zohrávajú úlohu ako vysielateľ a prijímač. Periplazmatická doména je dôležitá pre schopnosť monosacharidovej detekcie. Spolu s periplazmatickou doménou priliehajúcou k *TM2* doméne vzniká amfipatická špirála, ktorá má silno hydrofilnú a silno hydrofóbnú oblasť. Takáto štruktúra je charakteristická pre iné transmembránové sensorické proteíny a umožňuje proteínom byť súčasne orientovaný s vnútornou membránou a zakotvený v nej. *TM2* doména je kinázová doména a zohráva rozhodujúcu rolu v aktivácii *VirA* fosforyláciou seba samej na nemennom zvyšku označovanom *His-474* pri odpovedi na signálne molekuly zo strany poranenej rastliny. Monosacharidová detekcia *VirA* je dôležitým zosilňovaním systému a odpovedaním na nízke hodnoty fenolických látok. Indukcia tohto systému je možná iba cez periplazmatický cukor viažuci proteín *ChvE* (glukóza alebo galaktóza), ktorý interaguje s *VirA*.

Aktivovaný *VirA* je schopný preniesť svoj fosfát ku konzervatívnemu aspartátovému zvyšku na cytoplazmatickom DNA viažucom proteíne *VirG*, ktorý funguje ako transkripčný faktor regulujúci expresiu vir génov, keď je fosforylovaný pomocou proteínu *VirA*. Časť na C-konci je zodpovedná za DNA viažucu aktivitu, kým N-koniec je fosforylačná doména prejavujúca homológiu s *VirA* sensorickou doménou.

Aktivita vir systému tiež závisí od vonkajších podmienok a faktorov ako teplota a pH. Pri teplote nad 32 °C oblasť vir génov nie je exprimovaná, pretože dochádza ku konformačným zmenám v stáčaní *VirA* navodzujúcim inaktiváciu jeho vlastností. Účinok teploty na *VirA* je potlačený mutantnými formami *VirG*, značenými ako *VirG<sup>o</sup>*, ktoré aktivujú konštitutívne expresiu génov *vir*. Tieto mutanty ale nie sú schopné pokryť virulentnú kapacitu aká je za normálnej teploty, lebo priestorové usporiadanie ostatných proteínov spolupodielajúcich sa na prenose T-DNA je tiež ovplyvnené vysokou teplotou [5].

### 3.7.3 Vznik T-DNA prenosového komplexu

Aktivácia génov *vir* vedie k vytvoreniu jednovláknovej (ss) molekuly DNA reprezentujúcej kópiu základného T-DNA vlákna. Žiadna iná DNA umiestnená medzi T-DNA hranice nie je prenášaná do rastlinnej bunky a integrovaná do rastlinného genómu. Proteíny *VirD1* a *VirD2* rozpoznávajú hraničné sekvencie T-DNA, jedná sa o endonukleázové aktivity, preto sú schopné nastrihnúť základ reťazca označeného hraničnými úsekmi od zvyšku. Po endonukleázovom odštiepení zostane *VirD2* kovalentne naviazaný k 5'-koncu ssT-reťazca, toto spojenie zabráni exonukleázovému útoku na 5'-koniec ssT-reťazca a rozlíši 5'-koniec ako čelný koniec T-DNA tranférového komplexu. *VirD1* reaguje s obast'ou, kde má ssT-reťazec začítok. Experimentmi *in vitro* bolo dokázané, že prítomnosť *VirD1* je nevyhnutná pre rozštiepenie nadzávitnicového vinutia substrátu proteínom *VirD2*. Súčasné obnovenie odstráneného ssT-reťazca je evolučne spojené s inými bakteriálnymi konjugáčnymi procesmi DNA prenosov, ktoré súvisia s vytváraním jednovláknovej DNA.

Po rozsiahlych mutáciách alebo deléciách na pravej strane T-DNA hraníc nasleduje väčšinou kompletná strata schopnosti T-DNA prenosu, ale mutačné zmeny na ľavej strane vedú len k poklesu prenosovej účinnosti. To znamená, že syntéza T-vlákna je iniciovaná zo strany pravej hraničnej oblasti a prebieha v smere od 5' k 3', môže sa stať, že syntéza bude štartovať z ľavej strany, ale výkonnosť procesu bude oveľa nižšia. Rozdiel je asi spôsobený zaradením zosilovacej sekvencie pred pravú hraničnú oblasť. Tento zosilovač je špecificky rozpoznávaný *VirC1* proteínom, pričom delécia vo *VirC* operóne vedie k zmenšeniu virulencie *A. tumefaciens* [5].

### 3.7.4 Samotný transport T-DNA

Prenosový prostriedok T-DNA k rastlinnému jadru je nazývaný ssT-DNA-proteínový komplex. Cesta prenosu do jadra predstavuje prechod cez tri membrány, bunkovú stenu a intrabunečným priestorom. Najakceptovanejší model prenosu je *ssT-DNA-VirD2* komplex obalený proteínom *VirE2* a proteínom viažucim jednoreťazcovú DNA. Toto kooperatívne spojenie má ochrannú funkciu voči ataku nukleáz a pri natiahnutí tohto komplexu sa dosiahne redukovaný priemer približne dva nanometre, čo uľahčuje prechod cez membránový kanál. Avšak toto spojenie nestabilizuje T-DNA komplex vnútri *A. tumefaciens*.

*VirE2* obsahuje dva signálne úseky pre lokalizáciu rastlinného jadra (NLS) a *VirD2* jeden. Tento fakt značí, že oba proteíny hrajú dôležitú úlohu z hľadiska príjmu komplexu do jadra rastlinnej bunky. Delécia v NLS jedného z tých proteínov vedie síce k redukovanému účinku, ale nie k úplnej strate funkcie, lebo sa prinajmenšom čiastočne dokážu navzájom zastúpiť.

Proteín *VirE1* je esenciálny pre export *VirE2* do rastlinnej bunky, ale jeho presná špecifická funkcia je zatiaľ neznáma. Bakteriálne kmene mutované vo *virE1* nedokážu exportovať proteín *VirE2*, ktorý sa hromadí vo vnútrajšku baktérie. Niektoré mutácie môžu byť doplnené, ak dochádza k spoluinfekcii s kmeňom, ktorý dokáže prenášať *VirE2*. To znamená, že tento proteín môže byť prenášaný nezávisle a že transfér *VirE2* ako súčasť ssT-DNA komplexu nie je nepostrádateľný pri prenosových procesoch, z čoho vyplýva, že je možný aj prenos samotnej, teda nahej, T-DNA do rastlinnej bunky. Takýto transfér načrtáva druhú alternatívnu možnosť prenosu, kedy je prenášaný len neobalený komplex ssT-DNA

s naviazaným proteínom *VirD2* na 5'-koniec a nezávisle na tom *VirE2*, ktorý ssT-DNA komplex obalí až vnútri rastlinnej bunky.

Do transféru DNA sa zapája aj 9,5 kb veľký operón *virB*, ktorý spoluvytvára bunkovú povrchovú štruktúru pre vznik transférového komplexu. Má podobnú charakteristiku ako iné s membránou asociované proteíny. Pri translokácii pôsobí aj *VirD4*, ktorý je ATP-dependetný a nevyhnutný pri prenose, jedná sa o transmembránový proteín umiestnený zväčša na cytoplazmatickej strane membrány. Porovnávacie štúdie ukazujú veľký stupeň homológie medzi operónom *virB* a oblasťami pre transfér v širokom rozsahu plazmidov hostiteľov, čo sa týka genetickej organizácie, nukleotidových sekvencií a proteínových funkcií.

Oba systémy prenosu (klasický aj alternatívny) donášajú do recipientnej hostiteľskej bunky aj nesamostatne prenosný DNA-proteínový komplex. Funkcia prenosu DNA medzi ríšami naznačuje, že T-DNA prenosový aparát a konjugačný systém sú polysúvisiace a pravdepodobne sa vyvinuli zo všeobecne dedičného systému prenosu.

Prevažujúce proteíny *VirB* tvoria membránu vetviace proteínové kanály spájajúce obe membrány. S výnimkou *VirB11* majú všetky mnohonásobné periplazmatické domény. *VirB11* je jediný člen operónu *VirB* nájdený v extracelulárnom prostredí, teda je možné, že niektoré iné proteíny *VirB* mohli byť prerozdelované počas procesu biogenézy a pôsobenia medzibunkového konjugačného kanálu. To by mohlo byť prípadom *VirB2*, proteínu s vyredukovanou funkciou. *VirB2* je prekladaný ako 12 kDa proteín, ktorý je neskôr spracovaný proteolýzou a jeho konečná funkčná forma je pri 7 kDa.

*VirB4* a *VirB11* sú hydrofilné ATP-ázy potrebné pre aktívny DNA prenos. *VirB11* postráda pokračujúcu sekvenciu hydrofóbneho zvyšku formujúceho periplazmatickú doménu. Navzdory týmto štrukturálnym charakteristikám, menej ako jedna tretina z *VirB11* predstavuje jeho rozpustnú frakciu, zatiaľčo zvyšok z tohto proteínu zostáva asociovaný s cytoplazmatickou membránou. Takéto charakteristiky sú netypické pre daný typ proteínov a svedčia o možnej dynamickej koexistencii rôznych konformačných foriem in vivo. *VirB4* úzko súvisí s cytoplazmatickou membránou. Obsahuje dve extracelulárne domény riadiace transmembránovú topológiu tohto proteínu, ktorá pravdepodobne dovoľuje ATP-závislé konformačné zmeny v konjugačnom kanály. Funkčné formy *VirB4* a *VirB11* sú homo- a heterodiméry. Syntéza *VirB4* je dobre riadená s hromadením a distribúciou *VirB3* a iný proteín, *VirB7*, zdá sa byť nevyhnutný pre prispôsobivosť sa prenosového aparátu. *VirB7* interaguje s *VirB9* formujúc heterodiméry a multimérny komplex vyššieho rádu. Syntéza *VirB9* a jeho nepremenné ukladanie závisí od heterodimérnej konformácie naznačujúcej, že *VirB9* samostante môže byť nestabilný a je nevyhnutné spojenie s *VirB7*. V tejto intermolekulárnej konformácii monomérnych podjednotiek sú spojenia prostredníctvom disulfidických mostíkov. *VirB7-VirB9* heterodimér slúži k stabilizácii iných proteínov *Vir* počas zkompletovania funkčných transmembránových kanálov.

Najprv sú monoméry *VirB9* a *VirB7* exportované do membrány a spracované. Interagujú navzájom do vytvorenia kovalentnej zosieťovanej homodimérnej a následnej heterodimérnej štruktúry. Úloha oboch typov dimérov ako jedinej a nevyhnutnej heterodimérnej štruktúry potrebnej v biogenéze transférového aparátu je široko prijímaná. Postupne je tento heterodimér priradený k vonkajšej membráne, dochádza k reakciám s inými *Vir* proteínmi až do vzniku prenosového kanálu s príspevkom transglykozidázy *VirB1*. Je známe, že proteíny od *VirB2* až po *VirB11* sú nevyhnutné pre DNA transfér naznačujúc, že tieto proteíny sú základnými zložkami prenosového aparátu, kým *VirB1* prispieva k tomuto procesu menej.

Dvomi prídavnými vir operónmi lokalizovanými v oktopínovom Ti-plazmide sú *virF* a *virH*. *VirF* proteín je funkčne zhodný z *VirE2*, ale nie natoľko potrebný. Operón *virH* pozostáva z dvoch génov kodujúcich proteíny *VirH1* a *VirH2*, ktoré nie sú esenciálne, ale môžu zvyšovať úspešnosť transféru a dokážu detoxikovať určité rastlinné zlúčeniny, ktoré môžu ovplyvniť rast baktérií [5].

Po vstupe *VirD2*-T-vlákna do hostiteľskej bunky spojenej najčastejšie so zabalovaním do proteínu *VirE2* a formovaním T-komplexu nasleduje jeho prechod cez cytoplazmu až po dosiahnutie jadra hostiteľa. Keďže cytoplazma je hustou substanciou prepletenu spleťou cytoskeletárnych štruktúr a Brownov pohyb makromolekúl je veľmi sťažený, je zrejmé, že prechod objemného T-komplexu musí byť zabezpečený aktívnym mechanizmom intracelulárneho transportu.

Prenos T-komplexu cytoplazmou hostiteľa je pravdepodobne principiálne zhodný s prenosom mnohých DNA vírusov cez cytoplazmu cicavčích buniek, až na rozdielne proteíny. Znamená to teda, že pri prechode bunkou *Agrobacterium* využíva mikrotubulárny systém s aktívnym pohonom vďaka dyneínovým motorom. Identita týchto motorových proteínov v rastlinných bunkách však nie je presne známa a dľa v súčasnosti prebiehajúcich štúdií sa zdá byť ich podstata závislá od dyneín-viažucich proteínov, ktoré sú v rastlinnej bunke prítomné a spolupracujú so známym proteínom *VIP1*, ktorý sa nachádza v rastlinnej bunke a sprostredkováva rozpoznanie proteínu *VirE2*. Novoobjavený proteín s názvom *DLC3*, ktorý tvorí spojenie medzi *VIP1-VirE2-T-DNA*, je súčasťou novej rodiny molekulových motorov rastlinných buniek, ktoré sú tiež časťou prenosového mechanizmu T-komplexu [25].

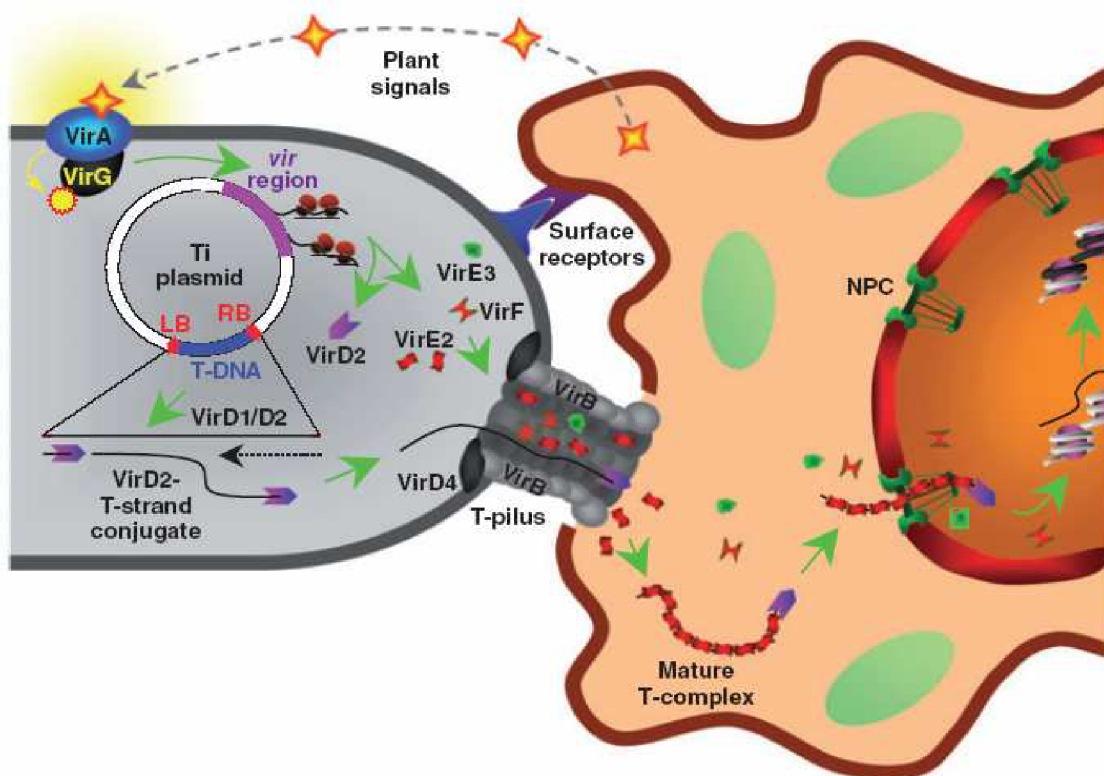
### 3.7.5 Integrácia T-DNA do rastlinného genómu

Vnútri v rastlinnej bunke, ssT-DNA komplex je mierený na jadro prechádzajúc jadrovú membránu. Najpotrebnejšie v tomto procese sú *VirD2* a *VirE2* a môže byť využívaný aj *VirF*. Jaderné lokalizačné signály *VirD2* a *VirE2* hrajú dôležitú rolu pri donáške ssT-DNA komplexu, ktorý je veľký (do 20 kb) nukleoproteínový komplex obsahujúci iba jeden kovalentne pripojený proteín *VirD2* na 5'-konci, ale komplex je prekrytý, resp. zabalený, veľkým počtom *VirE2* molekúl, približne 600 molekúl na 20 kb T-DNA, a každá z nich má dve NLS oblasti. Dve jadro lokalizujúce signálne oblasti *VirE2* sú považované za dôležité pre kontinuálny import ssT-DNA komplexu, pravdepodobne pre udržiavanie oboch strán jadrových pórov neustále otvorených. Jaderný import je sprostredkovaný aj pomocou špeciálnych NLS-viažucich proteínov, ktoré sú prítomné v rastlinnej cytolazme [26].

Konečný krok T-DNA transféru je jeho integrácia do rastlinného genómu. Faktory hostiteľa sú potrebné pre komplementáciu T-DNA molekuly na dvojreťazcovú DNA, pre produkciu zlomov DNA v hostiteľovom genóme a pre spojenie T-DNA s týmito zlomami. Napriek pokročilým výskumom je presný mechanizmus integrácie momentálne ešte nejasný. Skorší model naznačoval všeobecný postup integrácie T-DNA do genómu. Bol uvažovaný ako integračný dej s nelegitímnou rekombináciou (odporujúcou pravidlám). Podľa tohto modelu, je potrebné spárovanie niekoľkých báz, známych ako micro-homologické, pre pre-iniciačný krok medzi T-DNA vláknom spojeným s *VirD2* a rastlinnou DNA. Tieto homologie sú veľmi malé a poskytujú iba minimum špecificity pre rekombinačné procesy s umiestňovaním *VirD2* a pre ligáciu. 3'-koniec alebo priliehajúca sekvencia T-DNA nachádza niekoľko málo podobností s rastlinnou DNA, čo vedie k prvému kontaktu (synapsii)

medzi T-vláknom a rastlinnou DNA za formovania medzery v 3'-5' vlákne (matricové) rastlinnej DNA. Narušená rastlinná DNA je postupne strihaná endonukleázami od 3'-koncevej pozície rozšírenia vlákien rastlinnej DNA a prvý nukleotid 5' sa prikladá k *VirD2-T-DNA*, ktorá je spárovaná s krátkou nukleotidovou sekvenciou na vrchnom (komplementárnom, 5'-3') rastlinnom DNA vlákne. Prečnievajúca 3'-časť T-DNA spolu s narušenou rastlinnou DNA sú odstránené buď endonukleázami alebo 3'-5' exonukleázami. 5'-koniec matricového vlákna je spojený s *VirD2* koncom a ďalší 3'-koniec T-DNA vlákna (spárovaného s rastlinnou DNA celú dobu od prvého kroku integračného procesu) sa spojí s rezom v na spodnom (matricovom) vlákne rastlinnej DNA. Akonáhle je dokončené spojenie T-vlákna v 3'-5' reťazci rastlinnej DNA, tak vplyvom napätia spôsobeného zmenou vnutia dôjde k pretrhnutiu opačného DNA vlákna (komplementárneho). Táto situácia aktivuje opravný mechanizmus rastlinnej bunky a komplementárne vlákno je dosyntetizované používajúc ako templát skôr inzerované T-DNA vlákno [5], [26].

*VirD2* má aktivačnú úlohu v presnej integrácii T-vlákna do rastlinného chromozómu. Uvoľnenie proteínu *VirD2* poskytuje energiu obsiahnutú vo fosfodiesterovej väzbe s prvým nukleotidom T-vlákna poskytujúcim 5'-koniec pre ligáciu do rastlinnej DNA. Táto fosfodiesterová väzba môže poslúžiť ako elektrofilný subtrát pre nukleofilnú 3'-OH skupinu z naštiepenej rastlinnej DNA [5].



**Obr. 3.6:** Cesta integrácie T-DNA z *A. tumefaciens* do hostiteľskej bunky [25]



## 4 BIOTECHNOLOGICKÉ VYUŽITIE *A. TUMEFACIENS*

*A. tumefaciens* sa využíva na nepriamu transformáciu hlavne rastlinných buniek, to znamená, že ako prenášač cudzorodej DNA slúži vektor. Vektorom bývajú obvykle špeciálne bakteriálne plazmidy, hlavne plazmidy gramnegatívnych pôdných baktérií. Nepriame metódy transformácie rastlín patria medzi staršie postupy prenosu genetickej informácie.

Stručný výčet oblastí praktického využitia odrôd rastlín vzniklých genetickými modifikáciami zahŕňa hlavne rezistenciu alebo vysokú toleranciu voči herbicídom, rezistenciu voči hmyzím škodcom, rezistenciu voči vírusovým, bakteriálnym a hubovým chorobám, toleranciu k nepriaznivým abiotickým faktorom, zvýšenú trvanlivosť produktu, navodenie peľovej sterility, produkciu špecifických proteínov včetně vakcín produkovaných rastlinou, produkciu rastlinných olejov so zmeneným zložením a produkciu špecifických sacharidov [27].

### 4.1 Charakteristické znaky modifikácie rastlín

Približne 35 génov *vir* mapuje vonkajšok T-DNA oblasti Ti-plazmidu a kóduje produkty potrebné pre vyčlenenie, transfér a integráciu T-DNA do rastlinného genómu. Vir gény sú značené ako *trans*, čo znamená, že nie je potrebná ich fyzická účasť v T-DNA nato, aby bola T-DNA začlenená do rastlinného genómu.

Hraničné sekvencie, teda 25 bp dlhé nedokonalé repetície ohraničujúce T-DNA, sú potrebné pre transfér T-DNA, pretože obsahujú sekvencie potrebné pre rozpoznanie strán stranovo-špecifickými endonukleázami kódovanými operónom *virD*. Endonukleáza našepuje spodné vlákno DNA z T-DNA označujúc štartovací bod pre transfér. Pravá a ľavá hranica T-DNA sa označujú ako *cis*-regulačné oblasti, ktoré sú fyzicky prikladané ku génom určeným na prenos do rastlinného genómu. Iné *cis*-regulačné oblasti zahŕňajú promotéry a terminátory, ktoré lemujú transgény a regulujú ich expresiu. Všeobecne používané promotéry a terminátory sú gén pre syntézu nopalínu (*NOS*) a promotér vírusu mozaiky karfiolovej (*CaMV 35S*).

Na overenie inkorporácie požadovaného génu do rastlinného genómu slúžia takzvané selekčné markerové gény, ktoré poskytujú rozpoznanie a výber buniek so zabudovaným génom. Tieto špeciálne gény sú súčasťou transgénov. Bakteriálne selekčné markery povoľujú identifikáciu baktérií zmenených vektorom, ktorý je nosičom markeru. Príkladom rastlinných a bakteriálnych selekčných markerov sú hygromycín, fosfotransferáza, kanamycín, streptomycín, gentamycín alebo bleomycín. Princíp selekcie buniek alebo pletív na základe médií s antibiotikami, na ktorých sú schopné vegetovať iba GM bunky sa postupne opúšťa z dôvodu teoretického nebezpečenstva vzniku rezistencie voči antibiotikám a tieto selekčné gény sú nahradzované obvykle génami pre rezistenciu k herbicídom, ako je napríklad glufosinát. V niektorých selekčných systémoch je ako selektívny gén používaný gén pre enzým manózu.

Pri výskume genetických transformácií sú hojne využívané takzvané signálne alebo reportérové gény. Jedná sa o gény, u ktorých ľahko zhodnotiť expresiu z hľadiska kvantity i z hľadiska miesta expresie v rámci organizmu alebo v závislosti na podmienkach, ktoré expresiu indukujú. Jedná sa hlavne o transgén  $\beta$ -glukuronidázu pôvodom z baktérie



*Escherichia coli*, gén pre tvorbu luciferázy zo svetlušiek (*Photinus pyralis*) alebo fluoreskujúci proteín pochádzajúci z medúzy (*Aequorea victoria*).

Odhladiac od T-DNA hraničných sekvencií, väčšina génov z T-DNA môže byť nahradená cudzími génmi majúcimi význam v modifikácii rastlín a tieto gény sú tým pádom prenesené do rastliny. Geneticky modifikovaná T-DNA je vo všeobecnosti uvádzaná ako mutantná T-DNA, skonštruovaná T-DNA či odzbrojená T-DNA, pričom presné definície podmienok zmien v T-DNA a často i samotné zmeny nie sú uvádzané, lebo sú chránené patentom.

Vyššie uvedené elementy sú začlenené do dvoch základných typov vektorov používaných k transformácii širokého spektra rastlín pomocou *A. tumefaciens*. Jedná sa o binárny vektor a ko-integrovaný vektor [27], [28].

#### 4.1.1 Binárny vektor

Objav, že gény *vir* nemusia byť v tom istom plazmide s T-DNA regiónom, aby došlo k jeho prenosu a k inzercii do rastlinného genómu, umožňuje vytváranie systémov, kde región T-DNA a región *vir* sú umiestnené v odlišných plazmidoch. Z toho vyplýva, že v systéme binárneho vektora sú T-DNA a oblasť *vir* uložené v izolovaných plazmidoch z toho istého poddruhu *A. tumefaciens*. Gény *vir* sú lokalizované v Ti-plazmide, ktorý neobsahuje tumor spôsobujúce gény, a T-DNA s génmi, ktoré sú určené na inkorporáciu do genómu hostiteľa, je umiestnené v malej vektorovej molekule. Sú použité dva odlišné plazmidy, konkrétne ide o malý replikon a pomocný plazmid.

Malý replikon so širokým spektrom hostiteľov, ktorý má počiatok replikácie (*ori*) povolujúci údržbu plazmidu v rozsiahlej škále baktérií vrátane *E. coli* a *A. tumefaciens*. Tento plazmid typicky obsahuje cudziu DNA namiesto T-DNA, ľavú a pravú hraničnú sekvenciu T-DNA alebo prinajmenšom pravý hraničný úsek T-DNA, markery pre selekciu a údržbu v *E. coli* a aj v *A. tumefaciens* a selekčné markery pre rastliny.

Pomocný Ti plazmid, poskytnutý *A. tumefaciens*, ktorý postráda celý T-DNA región, ale obsahuje neporušený *vir* region.

Tento vektorový systém je najpoužívanejší, ale sú vyvinuté aj odlišné typy binárnych vektorov k prispôsobeniu sa potrebám v procesoch rastlinných transformácií.

Vo všeobecnosti transformačné procedúry obsahujú tri kroky. Prvým krokom je transfér rekombinantného malého replikonu cestou bakteriálnej konjugácie alebo priamym transférom do *A. tumefaciens*, ktoré obsahuje pomocný Ti-plazmid. Nasleduje spoločná kultivácia rastlinných buniek s *A. tumefaciens* umožňujúca prenos rekombinantnej T-DNA do rastlinného genómu. Posledným krokom je selekcia transformovaných rastlinných buniek za vhodne určených podmienok [28].

#### 4.1.2 Ko-integrovaný vektor

Pomenovanie ko-integrované vektory alebo hybridné Ti-plazmidy patria medzi prvé typy modifikovaných a skonštruovaných Ti-plazmidov vymyslených pre *A. tumefaciens* sprostredkovanú transformáciu, ale dnes už patria medzi menej používané. Sú zostrojené homologickou rekombináciou bakteriálnych plazmidov s T-DNA oblasťou z endogénneho

Ti-plazmidu v *A. tumefaciens*, pričom je žiadaná prítomnosť homologickej oblasti na oboch plazmidoch. V tomto procese sú potrebné tri vektory: odzbrojený agrobakteriálny Ti-plazmid, sprostredkovateľský vektor a pomocný vektor.

Odzbrojený agrobakteriálny Ti-plazmid je Ti-plazmid s T-DNA, v ktorej sú onkogény nahradené exogénnou DNA. Ako príklad možno uviesť sériu vektorov *SEV*, v ktorej pravá hraničná oblasť T-DNA spolu s génmi pre fytohormóny kodujúcimi cytokinín a auxín sú odňaté a nahradené bakteriálnymi génmi s kanamycínovou rezistenciou, zatiaľ čo ľavá hraničná oblasť a malá časť TL originálnej T-DNA vedená ako ľavá vnútorná homológia sú nedotknuté.

Sprostredkovateľskými vektormi sú malé základné plazmidy *pBR322*, čiže vektory z *E. coli*, obsahujúce T-DNA oblasť. Sú používané k predchádzaniu problémov odvodených od prílišnej veľkosti odzbrojených Ti-plazmidov a vďaka tomu, že postrádajú jedinečné reštrikčné miesta. Tieto sprostredkovateľské vektory sú replikované v *E. coli* a prenášané do *A. tumefaciens* pomocou konjugácie. Nedokážu sa replikovať v *A. tumefaciens* a preto nesú DNA segmenty homologické k odzbrojenej T-DNA, aby nastala rekombinácia a ko-integrácia T-DNA štruktúry.

Pomocné vektory sú malé plazmidy udržiavané v *E. coli*, ktoré obsahujú transférové a mobilizačné gény, ktoré povolujú transfér konjugáciu postrádajúceho sprostredkovateľského vektora do *A. tumefaciens*.

Výsledný ko-integračný vektorový plazmid zostrojený in vitro manipuláciou normálne obsahuje vir gény, ľavý a pravý hraničný T-DNA segment, exogénnu DNA zaradenú medzi dve hraničné T-DNA oblasti a rastlinné i bakteriálne selekčné markery [28].

## 4.2 Typy tkanív vhodné na transformáciu

Účinnosť T-DNA prenosu *A. tumefaciens* do rastlín je značne premenlivá, nie iba v rámci rastlinných druhov a kultivarov, ale tiež v rámci tkanív. Rozličné postupy pre transformáciu rastlín sprostredkovanú *A. tumefaciens* používajú listy, vrcholy výhonkov, korene, prvé lístky na stonke mladých semenných rastlín, čiže kotyledony, semienka a kalusy odvodené z rôznych častí rastliny. V iných metódach, transformované tkanivo nie je oddelené od rastliny, ale zostáva vo svojom prirodzenom životnom prostredí, teda transformácia sa uskutočňuje in planta.

Patentmi doporučených špeciálne určených a vhodných tkanív na transformáciu je pomerne málo, pretože rozsah ochrany patentov je dosť široký. Niektoré kľúčové patenty ale poskytujú dostatočne širokú škálu informácií ohľadom technológií z výskumnej oblasti. Tvrdenia v zverejnených patentoch zvyčajne nie sú presne obmedzené na typ alebo druh transformovateľných rastlín. Viacmenej ale pravdepodobne každá rastlina spadá do škály už prijatých vynálezov na transformáciu pomocou *A. tumefaciens*.

Japan Tobacco je majiteľom dvoch patentov na území Austrálie a USA na transformáciu kalusov. Austrálsky patent obsahuje informácie o transformácii tkaniva *A. tumefaciens*, pričom tkanivo môže byť odobraté z hocijakej časti monokotyledonovej rastliny v štádiu jeho nediferencovanosti alebo odobraného práve v čase diferencovania sa. Americký patent limituje transformovateľný kalus do maximálne siedmich dní dĺžky života tkaniva, to znamená, že tkanivo nesmie byť staršie ako sedem dní.

Ďalším možným typom tkaniva na transformovanie pomocou *A. tumefaciens* je nezrelé embryo monokotyledonovej rastliny pred diferenciáciou tkaniva, majiteľom patentu je opäť austrálska časť firmy Japan Tobacco. Európsky patent obsahuje tie isté informácie ako austrálsky.

Držiteľom zaujímavého patentu je Oddelenie agrikultúry Spojených štátov amerických (USDA). Patent pojednáva o transformácii peľu. Týmto transformovaným peľom sa opeľuje druhá rastlina, aby vznikli transgénne semienka, ktorých vyklíčením sa získa transgénna rastlina.

Texas A & M Univerzita je garantom amerického patentu, ktorý nebol prijatý v Európe ani v Austrálii, na transformáciu odstránených klíčkov apikálneho tkaniva cestou inokulácie tkaniva s *A. tumefaciens*.

Na *in planta* transformáciu majú registrované patentované aplikácie tri rozličné entity. Cotton Inc., Rhobio a Performance Plants patria vynálezy transformácií rastlinného tkaniva *A. tumefaciens* v jeho prirodzenom prostredí. Performance Plants patentová aplikácia avšak bola už dvakrát zamietnutá. Cotton Inc. má patent na transformáciu pomocou neihlového injekčného zariadenia dopravujúceho *A. tumefaciens* do kvetinového alebo meristémového tkaniva. Kvetinová transformácia je hlavne *in planta* metóda, ktorá sa stala veľmi populárnou v transformácii *Arabidopsis thaliana*, jednej z najznámejších modelových rastlín v genetických štúdiách. Táto metóda je vhodná aj pre transformáciu monokotyledonových rastlín. V patente, ktorý vlastní spoločnosť Paradigm Genetics Inc., sa uvádza metóda transformácie kvetinového tkaniva aj priame ošetrenie kvetov.

Posledným záujmovým typom rastlinného tkaniva je transformácia semienok. Jeden patent vlastní čínske biotechnologické výskumné centrum a obsahuje všeobecné tvrdenia na aplikáciu *A. tumefaciens* ku klíčiacej semienkam bez ďalšieho ošetrenia semienok. Kórejská firma Scigen Harvest Co Ltd. Vyvinula nápodobnú metódu používajúcu ihlou poranené semienka ako cieľovú tkanivovú kultúru v kombinácii s *A. tumefaciens* [28].

### 4.3 Možnosti zvýšenia transformačnej efektivity

Tak ako v iných technológiach rastlinnej transformácie, aj transformácia *A. tumefaciens* zahŕňa mnoho faktorov ovplyvňujúcich úspech alebo zlyhanie transféru záujmového génu do rastliny a jeho následnú stabilnú integráciu a expresiu. Rozdielne faktory môžu ovplyvniť transformáciu rozlične, v závislosti od rastlinného druhu.

Medzi aspekty transformácie ovplyvňujúce jej úspech patrí vek rastliny, výber tkaniva na transformáciu, výber kmeňa *A. tumefaciens*, časový rozsah i podmienky pre inokuláciu tkaniva s *A. tumefaciens* a nekrózia rastlinného tkaniva zapríčinená *A. tumefaciens*.

Dľa všeobecného pravidla platí, že mladé rastliny sa ľahšie transformujú ako staršie. Nárast *A. tumefaciens* na médiu musí brať ohľad na transformovanú rastlinu, pretože pri nadmernom raste *A. tumefaciens* sa znižuje šanca na regeneráciu kompletnej rastliny z transformovaného tkaniva.

Inhibícia nekrózy spôsobenej *A. tumefaciens* je možná metódou liečenia rastlinného tkaniva tepelným šokom, chemickou inhibíciou a expresiou génových produktov v transformovaných rastlinách, ktoré inhibujú nekrózu. Nadmerný rast *A. tumefaciens* má negatívny vplyv na stupeň prežitia transformovaných rastlinných buniek a negatívny vplyv má aj zvýšenie počtu kopíí T-DNA inzerovaných do transformovaných rastlín. Zabrániť sa

tomu dá využitím auxotrofného mutanta *A. tumefaciens*, ktorý dovoľuje kontrolovať jeho vlastný rast obmedzovaním definovaných živín. Je možné použiť i zlúčeniny obsahujúce ťažké kovy a antibiotiká, ktoré kontrolujú rýchlosť rastu.

Redukcia váhy transformovanej rastliny uľahčuje DNA transfér a podporuje vývoj a rast tvorby kalusu. Uskutočňuje sa extrakciou vlhkosti z rastliny. Zdokonaľovaniu transformácie napomáha aj vystavenie cieľového tkaniva ultrazvuku pred ponorom, počas ponoru a po ponorení tkaniva do suspenzie s *A. tumefaciens*.

Na zvýšenie úspechu transformácie sa využíva i vákuový prienik *A. tumefaciens* do rastliny. *A. tumefaciens* dosahuje intímnejší kontakt s bunkami rastliny, keď je vystavené vákuu. Táto metóda sa aplikuje in planta, teda sa vyhne *in vitro* kultivácii a regeneračnému kroku [28].

## **4.4 Genetická transformácia organizmov nepatriacich medzi typické poľnohospodárske plodiny**

### **4.4.1 Morské riasy**

Riasy sú organizmy relatívne nediferencované, ktoré na rozdiel od rastlín nemajú pravé korene, listy, kvety ani semená. Nachádzajú sa v mori. Ich veľkosť je od mikroskopických jednobunecných foriem po veľké makroskopické formy dlhé až sedemdesiat metrov. Väčšinou sú fotosyntetizujúce, obsahujú prídavné pigmenty a majú pohyblivé alebo nepohyblivé spóry.

Morské riasy sa využívajú ako potrava, na výrobu agaru, do tlačiarenských atramentov, v kozmetickom priemysle, ako insekticídy, v USA ako stabilizátory zmrzliny a teda ako suspenzné prostriedky v mliečnych nápojoch, a vo farmaceutickom priemysle.

Stabilná metóda pre genetickú transformáciu mnohobunecných rias, ktorá definuje riasy ako neangiospermné fotosyntetizujúce eukaryotické organizmy žijúce v oceánoch alebo slaných vodách, pozostáva z poranenia kutikuly riasy, inkorporácie záujmových génov využitím *A. tumefaciens* ako gény prenášajúceho systému za čo najkratšie vystavenie rias neslanému vodnému médiu, teda za čas potrebný k efektnej transformácii niekoľkých buniek rias. *A. tumefaciens* môže niesť jeden alebo viac génov pre zavedenie do recipientnej bunky riasy. Transgénne druhy morských rias sú schopné expresie DNA sekvencie kódujúcej antigény patogénnych mikroorganizmov schopných vyvolať odpoveď ľudského imunitného systému, alebo iného živočicha, po orálnej aplikácii materiálu z morských rias. Ďalej majú transgénne druhy rias oveľa vyššiu rezistenciu voči morským hubám ako nemodifikované druhy a sú schopné produkovať zlúčeniny podporujúce zdravie [28].

### **4.4.2 Ihličnany**

Ihličnany sú hlavnou skupinou nahosemenných rastlín. Dožívajú sa viac ako sto rokov a prežívajú aj na neúrodných studených suchých pôdach. Borovice sú dôležité pre produkty zahrňajúce drevo, terpentín a požívateľné semená. Produkty odvodené od terpentínu sa

využívajú v pafrémovníctve, vo farmácii na uľahčenie vykašliavania a udielajú typickú vôňu mnohým produktom.

*A. tumefaciens* použité na transformáciu diferencovaného tkaniva borovice sa dá zvoliť z pomedzi kmeňov spôsobujúcich CGD alebo z ko-integrovaných Ti-plazmidov alebo zo systému binárnych vektorov, podmienkou je schopnosť daného kmeňa spôsobovať CGD čo najväčšiemu záberu rastlín. Na spolukultiváciu s *A. tumefaciens* sa používajú bunky sadeníc, časti listov alebo hypokotyllov. Genetická transformácia ihličnanov, teda nahosemenných dvojklíčnolistých rastlín, prebieha obdobne ako u klasicky *A. tumefaciens* napadaných krytosemenných dikotyledonových raslín [28].

### 4.4.3 Fungi

#### 4.4.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* je kvasinka, teda organizmus z ríše húb, s ktorým sa ľahko manipuluje, je dostupná pre príjem vektorov a je rýchlo rastúci organizmus. Má mnohostranné využitie v potravinárstve a biotechnologických odvetviach.

*A. tumefaciens* je schopné prenosu vlastnej T-DNA aj do kvasiniek, nie len do rastlín. Esenciálnymi sú vir gény Ti-plazmidu, ktoré sprostredkovávajú transfér T-DNA. V prípade umelovytvorenej ko-kultivačnej zmesi *A. tumefaciens* a kvasiniek nie je plazmidová T-DNA prijatá kvasinkami *S. cerevisiae*, z toho vyplýva, že transfér prebieha iba cestou aktívneho procesu za prítomnosti systému *vir A. tumefaciens*.

Analýzou transgénnych kvasiniek je zistené, že T-DNA cykly sa utvárajú v kvasinke s precíznou fúziou medzi ľavým a pravým hraničným úsekom T-DNA. Integrácia T-DNA do genómu *S. cerevisiae* sa odohráva cestou homologickej rekombinácie. To tvorí kontrast s integráciou do rastlinného genómu, kde je integrácia T-DNA preferovaná cestou ilegítimnej rekombinácie. Výsledky štúdií potvrdzujú, že proces integrácie T-DNA je predovšetkým predurčený hositeľskými faktormi a že záber hositeľov *A. tumefaciens* môže byť ešte širší ako sa predpokladalo.

Transformácia kvasiniek pomocou replikačného vektora je oveľa efektívnejšia ako pri použití integračného vektora, preto sa používa skonštruovaný binárny vektor *pRAL7101*. Tento plazmid obsahuje kvasinkové selekčné gény a replikačný počiatok *S. cerevisiae* označený  $2\mu$ , tieto štruktúry sú umiestnené medzi ľavú a pravú hraničnú sekvenciu binárneho vektora *pBIN19*. Binárny vektor *pRAL7101* je schopný prenosu vďaka inkorporácii do pomocného kmeňa *A. tumefaciens* *LBA1100*, ktorý nesie gény *vir* kódujúce transférový systém T-DNA.

Aktivácia génov *vir* je možná *in vitro* inkubáciou daného kmeňa v médiu s nízkym pH obsahujúcim fenolický induktor. Inkubácia *S. cerevisiae* v tomto médiu nepôsobuje inhibíciu rastu kvasiniek ani nemá na ne letálne účinky. Zmes kvasinkových buniek a *A. tumefaciens* preživa aj pri koncentrácii glukózy pod 5 mM. Na overenie úspechu kultivácie sa používa kvasinkový kmeň, ktorý je haploidný s negatívnym ureázoovým testom, po správnej inkorporácii úseku T-DNA sa kvasinky stávajú ureázopozitívne, pričom pozitívny ureázový test je stabilný.

Transformácia *S. cerevisiae* sprostredkovaná *A. tumefaciens*, ktorá napodobňuje prenos T-DNA z *A. tumefaciens* do rastlín a nie je použitý konjugáčny transfér celého binárneho vektora, má frekvenciu iba  $10^{-6}$  transformovaných buniek na jedného zgenerovaného recipienta. Táto frekvencia poukazuje na potrebu veľa rovnakých virulentných génov *A. tumefaciens*, ktoré sú vyžadované pre rastlinnú transformáciu.

T-DNA zdieľajúca homológiu s genómom kvasinky sa preferenčne integruje pomocou homologickej rekombinácie (HR), ale ak chýba homologický úsek DNA interakcia prebieha cez nehomologickú rekombináciu (NHR) pozorovanú aj u rastlín. Toto indikuje, že proces T-DNA integrácie je predovšetkým určený enzymatickým aparátom hostiteľa. Model pre nehomologickú integráciu poukazuje na potrebu prítomnosti génov kvasinky, ktoré sú spojené s opravami zlomov dvojvláknovej DNA, s udržiavaním dĺžky teloméry, s transkripčným utlmovaním asociovaným s telomérou, meiotickou rekombináciou a s niektorými typmi homologickej rekombinácie, avšak počas T-DNA integrácie cestou NHR nie sú potrebné gény zohrávajúce jedinečnú úlohu v HR. Integrácia T-DNA HR je závislá na géne *Rad52* a tiež je potrebný gén *Rad51*, ktoré sú jedinečné kvasinkové gény pre HR. Absencia vyššie spomínaných génov kvasinky súvisiacich s HR neovplyvňuje úspešnosť integrácie cestou NHR.

Pri porovnaní genómov *S. cerevisiae* a T-DNA sa javí byť najviac homologickou oblasťou *locus PDA1* na T-DNA a región *locus BMH2* na chromozóme IV u kvasinky, je prítomná 76% homológia na 371 bp dlhej oblasti. Gén *PDA1* kóduje podjednotku *E1 $\alpha$*  pyruvát dehydrogenázového komplexu, ktorý nie je esenciálnym génom v kvasinke [29], [30], [31].

#### 4.4.3.2 *Agaricus bisporus*

Modifikovaná metóda *A. tumefaciens* sprostredkovanej transformácie huby *Agaricus bisporus* je vysoko účinná, pretože zahŕňa spolukultiváciu *A. tumefaciens* s tkanivom plodnice *A. bisporus* a používa vektor s homologickým promotérom, namiesto predtým používanej kultivácie s basidiospórami. Vyberajú sa plodnice blízko maturácie. Táto metóda ponúka nové výhliadky pre genetickú manipuláciu s touto komerčne významnou hubou.

Vysoko efektívna, vhodná a rýchla genetická metóda transformácie huby *A. bisporus* má základ v metóde pre transformáciu *S. cerevisiae*. Nedostupnosť výkonného genetického transférového systému bola jedinou a najväčšou prekážkou vylučujúcou použitie molekulárneho prístupu ku genetickému zlepšovaniu jedlých húb. Napriek značnému záujmu o vývoj transformačnej schémy nebola žiadna metóda vo všeobecnosti používaná, lebo mala nízku efektivitu a postrádala užitočnosť a pohodlie.

Pre transformačné pokusy sa používa *A. tumefaciens* narastené v 5 ml média obsahujúceho kanamycín s koncentráciou 50  $\mu\text{g/ml}$  po dobu dvoch dní pri 28 °C. Jeden mililiter tejto čistej kultúry sa preniesie do 100 ml média s kanamycínom a nechá rásť cez noc. Po scentrifugovaní baktérií a ich suspendáciou v médiu s 200  $\mu\text{M}$  acetosyringonu sa pridajú k suspenzii s indukovanými baktériami kúsky tkaniva plodnice pomocou vákuovej infiltrácie. Selekcia transgénneho tkaniva sa robí pomocou média obsahujúceho hygromycín. Úspešnosť transformácie sa pohybuje medzi 30 až 40 %. Pri použití agro-transformácie s tkanivom spór bola úspešnosť iba  $3 \cdot 10^{-5}$  %, pravdepodobne v dôsledku použitia spór, ktoré majú veľmi krátku dobu klíčenia a použitie heterologického promotéra. Vhodnosť výberu

tkaniva a promotéra sú jediné kritické body transformácie. Táto transformačná technika poskytuje praktickú metódu užívania transgénej technológie v genetickom zlepšovaní kvality komerčne dôležitých húb a prezentuje dôležitú zásobáreň pre molekulárnu genetickú analýzu biologických dejov u húb [32].

#### 4.4.3.3 Dimorfné huby

Systémové dimorfné huby *Blastomyces dermatitidis* a *Histoplasma capsulatum* sú živočíšne patogény, ktoré obývajú ako vlákňité sporulujúce plesne vlhké miesta s vysokou koncentráciou organických látok. V pľúcach hostiteľa vdychnuté spóry dozrejú do štádia pučiacich kvasiniek a infekcia sa môže rozšíriť do iných telesných tkanív. Fáza zmeny z plesne na kvasinku, a naspäť, môže byť nadovená aj laboratórne v rozpätí od 22 do 37 °C. Aj keď sú imunokompetentní hostitelia citliví k infekcii, tak najväčšie nebezpečenstvo hrozí predovšetkým pre pacientov s AIDS. V oboch prípadoch, či už *B. dermatitidis* alebo *H. capsulatum*, sú známe dôležité viulénčné faktory, proteíny i gény.

Vďaka objavu, že stačí pridať hubové selekčné markery do T-DNA a indukovať gény *vir A. tumefaciens* špeciálnymi podmienkami média, je možné geneticky modifikovať pomocou klasických binárnych vektorov používaných pre vývoj transgénnych rastlín aj rôzne druhy húb, napríklad *Saccharomyces cerevisiae* a *Coccidioides immitis*.

Kvasinkové bunky *B. dermatitidis* aj *H. capsulatum*, spolu s kľúčiacimi konídiami *B. dermatitidis*, sú transformovateľné cestou *A. tumefaciens* s použitím hygromycínovej rezistencie pre selekciu. Transformačná frekvencia je jedna transgéna kvasinka na sto kvasinkových buniek, čo predstavuje vysokú efektivitu. Pri použití selekcie rodičovských kmeňov pomocou uracilu je efektivita ešte o päť až desaťkrát vyššia ako pri hygromycíne. Analýza Southernovým prenosom indikuje, že u 80 % transformantov sa transférovaná DNA zabuduje do chromozomálnej DNA na jedinečné unikátne miesto genómu.

Avšak ani táto metóda nie je bezproblémová, úspešná je aplikácia len pre homokaryotické podmienky, aby bol udržaný recesívny fenotyp. V prípade hetekaryotických kvasiniek prevládne divoký typ jadier a huby nadobúdajú opäť pôvodný divoký fenotyp. To znamená, že táto metóda je kľúčová pre homokaryotické potomstvo [33].

#### 4.4.4 HeLa bunky

HeLa bunky sú prakticky nesmrteľné bunky z nádoru krčka maternice pomenované po pacientke Henriette Lacksovej, ktorá mala cervikálnu rakovinu. Cervikálnu rakovinu spôsobujú hlavne papilomavírusy.

Bolo dokázané, že *A. tumefaciens* je schopné infikovať a transformovať aj živočíšne bunky, pričom výskumy boli robené aj na HeLa bunkách.

Bunky *A. tumefaciens* sa prikladajú k HeLa bunkám a viažu sa na ne v závislosti od prítomnosti génov *chvA* a *chvB*, ktoré sú potrebné aj pre bakteriálne priloženie k rastlinnej bunke. Vo všeobecnosti, patogénne baktérie majú podobný prikladací systém k rastlinným alebo živočíšnym hostiteľom. Napríklad rastlinný vitronektínviažúci proteín pravdepodobne funguje ako bunkový receptor hostiteľa užívaný Agrobacteriom a tak isto cicavčie vitronektíny hrajú úlohu v kolonizácii hostiteľa mnohými patogénnymi baktériami ako sú

streptokoky, *Staphylococcus aureus* a ďalšie. Teda aj napriek naviazaniu *A. tumefaciens* na hostiteľa samostné naviazanie nevypovedá o špecifickom rozpoznaní hostiteľa patogénom, to je dané iba schopnosťou *A. tumefaciens* stabilne transformovať ľudské, respektívne živočíšne, bunky. Niektoré genetické transformácie boli demonštrované priamou produkciou transgénnych cicavčích bunecných línií rezistentných k neomycínu po koinkubácii s *A. tumefaciens*.

Sekvenčná analýza po spojení DNA z binárneho vektora *pNeo* a HeLa DNA ukazuje, že proces integrácie sa odohráva na pravom hraničnom úseku T-DNA, čo podporuje predstavu, že *A. tumefaciens* transformuje HeLa bunky mechanizmom podobným k tomu, čo sa využíva pri transformácii rastlín. *A. tumefaciens* sprostredkovaná transformácia HeLa buniek teda naozaj vyžaduje aktivitu génov *vir* potrebných aj pre transformáciu rastlín. Obzvlášť mutácie v génoch *virA*, *virB*, *virG*, *virD* a *virE*, ktoré spôsobia avirulenciu v rastlinných hostiteľoch, majú za následok zlyhanie pri transformácii HeLa buniek. Počas infekcie hostiteľa *A. tumefaciens* tieto gény hrajú kritickú rolu.

*A. tumefaciens* pravdepodobne využíva ten istý rastlinný transformujúci proteínový mechanizmus aj pri HeLa bunkách. Zaujímavou skutočnosťou je, že Agrobacteriom sprostredkovaná transformácia cicavčích buniek sa odohráva aj pri 37 °C, čo u rastlín vedie k reversibilnej inhibícii *VirA*.

Nárast buniek *A. tumefaciens* na špeciálnom médiu sa praktikuje pri 28 °C, kedy sú gény *vir* veľmi dobre exprimované a takto pripravené bunky *A. tumefaciens* sú pripravené hneď na transformáciu dovoľujúcu T-DNA transfér pri vyšších teplotách. Výsledky však nasvedčujú tomu, že i neindukované bunky *A. tumefaciens* sú schopné stále transformovať HeLa bunky, ale s oveľa nižšou efektívnosťou.

Táto skutočnosť sa deje z viacerých príčin, napríklad môže dôjsť k indukcii génov *vir* fenolovým červeným pH indikátorom prítomným v rastovom médiu HeLa buniek. Okrem toho môže k transformačnému procesu prispievať príjem *A. tumefaciens* cestou endocytózy, čo je na génoch *vir* nezávislý proces.

Fakt, že *A. tumefaciens* nesúce gény pre neomycínovú rezistenciu v jeho T-DNA a vytvorenie stabilnej línie HeLa buniek odolných voči neomycínu iba rozširuje potenciálny hostiteľský záber *A. tumefaciens* od rastlín, kvasiniek, vláknitých húb až po cicavčie bunky. *A. tumefaciens* a s ním súvisiace kmene ďalej naznačujú možné spolupôsobenie v mnohých ľudských ochoreniach [34], [35].

#### 4.4.5 Vývoj plodín atakujúcich ľudské ochorenia

Geneticky modifikované rajčiaky obsahujúce stráviteľné vakcíny by mohli byť využité v boji proti dvom celosvetovo najletálnejším vírusom, HIV a HBV. Cieľom je vytvorenie cenovo čo najdostupnejšej vakcíny proti HIV a proti vírusu hepatitídy B (HBV) za využitia plodín, ktoré by mohli ľahko rásť a spracovávať sa v krajinách, kde je to najpotrebnejšie. Žiadna z doteraz potenciálnych vakcín proti HIV nebola prekazateľne účinná vo všetkých prípadoch a proti HBV už vakcína existuje, ale je príliš drahá na použitie v chudobných krajinách.

Pomocou *A. tumefaciens* je možné dopraviť do rastliny rajčiny syntetickú kombináciu DNA fragmentov HIV aj HBV. Tieto fragmenty génov zahŕňajú rozličné HIV proteíny a gény pre HBV proteíny, slúžiace ako HBV povrchové antigény. Rastlina potom produkuje



proteíny, a tak ako v prípade orálnej vakcíny proti detskej obrne, po zjedení rajčiny tieto proteíny nabádajú telo k tvorbe protilátok proti vírusom. Myši kŕmené roztokom s obsahom rajčinového sušeného pretlaku vyvinuli vo vysokej koncentrácii protilátky nachádzajúce sa v ich krvi proti obojm vírusom. Rovnako dôležitý je fakt, že protilátky boli zamerané aj na slizničnom povrchu, ktorý je cestou vniku vírusov do tela pri sexuálnom kontakte [36].

Zemiaky sú jedna z najdôležitejších ne-obilných plodín, poskytujúcich až polovičnú ročnú produkciu všetkých ľuľkovitých a koreňových zelenín. Zemiaky ponúkajú niekoľko výhod pre produkciu povrchového antigénu HBV (*HbsAg*), ktoré zahŕňajú schopnosť genetickej transformácie prostredníctvom *A. tumefaciens* s relatívne krátkym transformačným a regeneračným časom. Najvyššia expresná úroveň bola zaznamenaná na 16 µg *HbsAg* na gram zemiakového ľuľku. Oproti mnohým výhodám je ale najväčšou nevýhodou, že surové zemiaky nie sú stráviteľné pre ľudí a varením sa antigénne štruktúry HBV negradujú. Medzi ďalšie plodiny spadajúce pod tento výskum patrí tabak, listová zelenina a babáky [37].

#### 4.5 Typy GM plodín

Pokiaľ ide o typy génov, o ktoré sú GM odrody oproti bežným obohacované, v masovom merítku sú pestované predovšetkým materiály odolné voči neselektívnym herbicídum a hmyzím škodcom. V druhom prípade sú využívané predovšetkým Bt technológie využívajúce niektoré gény darcovskej baktérie *Bacillus thuringiensis*. Zatiaľ menšieho rozšírenia zaznamenali stratégie ochrany rastlín proti vírusovým chorobám, ktoré sú úspešne využívané napríklad u papáje. U repky našiel pre výrobu heterózných osív uplatnenie systém génov *bamasa-Barstar* pre navodenie samčej sterility rastlín a obnovu fertility. U rovnakého objektu boli s úspechom vyskúšané stratégie zamerané na dosiahnutie zmien v zložení mastných kyselín a olejov, napríklad zvýšenie obsahu kyseliny erukovej, laurovej, steárovej a γ-linolenovej. Obdobne boli pre technologické účely získané línie zemiakov s nízkym podielom amylozy a vysokým obsahom amylopektínu a naopak. Žiadosť o pestovanie týchto línií zemiakov v krajinách EU už bola predložená kompetentným orgánom.

Pre navodenie tolerancie rastlín voči herbicídum sú najčastejšie využívané transgény podmieňujúce odolnosť ku glyfosátu (gény *cp4epsps* a *GOX*) a fosfotricínu (gény *bar* a *pat*), menej k chlorsulfuronu a bromoxynilu. V rámci Bt technológií sa v praxi uplatnili rôzne varianty génov *Cry* odvodené od niekoľkých kmeňov *B. thuringiensis*.

Zatiaľ v menšej miere sú využívané systémy založené na potlačení prejavu niektorých génov či tvorby vírusových častíc na princípe syntézy protizmyslových nukleových kyselín [38].

#### 4.6 Transformácie dikotyledonových rastlín

Dvojkľúčolisté rastliny sú druhou najväčšou skupinou rastlín z angiospermnej populácie rastlín, na prvom mieste sú jednokľúčolisté rastliny.

Jedná sa o krytosemenné kvitnúce rastliny. Odhliadnuc od obilnín a tráv patriacich do monokotyledonovej skupiny, väčšina ovocia, koreňín, koreňovej a hľuzovej zeleniny, ktorá

predstavuje veľmi dôležitú časť jedálnička je klasifikovaná ako dikotyledony. Do tejto skupiny patria aj strukoviny, káva, kaka, rozmanité kvetiny, olejiny a dreviny.

*A. tumefaciens* sprostredkovaných všeobecných transformačných metód pre dikotyledony je menej ako pre transformáciu monokotyledonov. Niekoľko patentov však obsahuje popis všeobecných transformácií dikotyledonov, ktoré sú hlavne smerované k používaniu ko-integračných a binárnych vektorov pre vnášanie cudzej DNA do rastliny [28].

#### 4.6.1 Sója

Sója je dôležitá jednoročná semenná strukovina pestovaná kvôli produkcii oleja a proteínov. Vývoj génovovej transférovej techniky pre sóju je ostro sledovaný, požaduje sa produkcia kultivarov so zlepšenými vlastnosťami ako je odolnosť voči stresu a ochoreniam, zvýšená nutričná hodnota a tiež tolerancia k špecifickým herbicídum. Transfér a expresia cudzích génov taktiež uľahčuje štúdium génovej expresie. Sója sa javí byť extrémne odolná voči transformačným metódam.

Transgénná sója je produkovaná používaním niekoľkých transformačných techník, ale žiadna z nich sa nestala prakticky využívanou pre pestovanie tejto rastliny. Iba niekoľko laboratórií má viac ako ojedinelé úspechy. Transformačný dej môže byť považovaný za úspešný, iba ak je spojený s regeneračným dejom, ktorý je účinný a cenovo dostupný. Techniky pre účinné zavedenie cudzích génov do genómu sóje sú limitované schopnosťou regeneračného procesu zahŕňajúceho aj genetickú transformáciu.

Existuje veľký počet procedúr pre vnesenie cudzieho génu do genómu sóje. Sú tradične založené na použití *in vitro* kultivovaných kľúčnych listoch, protoplastoch, meristematickom tkanive a suspenzných kultúrach s bunkami v rastovo-vývojovej fáze. Tieto transformačné techniky sa líšia v efektívite od 0,4 % pri časticovom ostreľovaní až do 23 % pri elektroporácii.

Tieto metódy sú drahé, vyžadujú čas a špeciálne vedomosti, aby sa dosiahol zisk stabilnej transgéennej rastliny narastenej v skleníku. Použitím odlišnej metódy bola získaná transformovaná rastlina, ktorá je nezávislá od problémov spojených s tkanivovou kultúrou. Netkanivový kultivačný prístup k transformácii sprostredkovanej *A. tumefaciens* bol prvýkrát zaznamenaný Feldmannom a Marksom používajúcich kľúčiacu semená *Arabidopsis thaliana*. Táto metóda bola vylepšená a aplikovaná na celú rastlinu, ale efektívnosť bola len 0,7 %.

Potvrdenie genetickej modifikácie môže byť problematické s hocijakou technikou, ale použitím reportérového systému sa zjednodušuje analýza transformovaných rastlín. Najväčšie zjednodušenie selekcie a kontroly transformovaných rastlín je dosiahnuté pri použití indikátorového génu, ktorý kóduje enzým nenachádzajúceho sa v študovanom organizme. Mnoho reportérových génov, ktoré sa používajú, sú prepisované aj v *A. tumefaciens* a to je problém, použitím  $\beta$ -glukuronidázového intrónu dovoľuje expresiu markerového enzýmu GUS v rastline, ale nie v prokaryotickom organizme ako je *A. tumefaciens*. Expresia génu pre GUS v *A. tumefaciens* je prerušená vložením rastlinného intrónu do bakteriálneho génu kódujúceho GUS.

Transformačný proces využíva modifikovanú vákuovú infiltráciu metódu. Semienka sóje sú sterilizované päť minút v 3,5% roztoku NaOCl, umyté dvakrát v sterilnej vode a ponechané klíčeniu v sterilnom 0,8% vodnom agare pri 29 °C v tme dva dni. Vyklíčené

semienka sú triedené na transformáciu dľa rôznych vývojových štádií. Vyklíčené semienka použité pre transformáciu majú viditeľný korienok a rašiaci vrchol, ľahko odnímateľný plášť a nepatrné kotyledony.

*A. tumefaciens* s plazmidom s *GUS INT* sa kultivuje pri 27 °C in 100 ml Luria-Bertani mäsopeptonovom agare doplnené o 150 µg/ml rifampicínu a 100 µg/ml kanamycínu do absorbancie rovnej 0,5 pri vlnovej dĺžke 600 nm. Do média sa pridáva aj acetosyringone (0,01 mg/ml) asi deň pred transformáciou. Scentrifugované bunky sa resuspendujú do destilovanej vody s prídavkom neolejového zmáčacieho činidla. Čiastočne vyklíčené semienka sa vákuovo infiltrujú so suspenziou *A. tumefaciens* so zmáčacím agentom po dobu asi 20 minút pri tlaku 80 kPa. Ošetrované semienka sa inkubujú ďalších 24 hodín s agrobakteriálnou suspenziou pri 25 °C, potom sa zasadia do vermiculitu (prírodný minerál expandujúci pri pôsobení tepla) a ponechajú sa rásť v skleníku. Vyklíčené rastliny s prvými plne sa objavenými trojlístkami sa presadia do pôdnej zmesi, denne sa zavlažujú a ošetrujú sa v štrnásťdenných intervaloch pomocou 4 g/l nutričnej zmesi. Touto metódou sa dajú pripraviť GM rastliny sóje s vyššou efektívnosťou ako pri biolistickej metóde [39].

Jedna z najúspešnejších metód je transformácia sójového kotyledonového kolienka, teda nodusu, ktorá má základ v prenose DNA cestou *A. tumefaciens* to regenerovateľných axilárnych buniek meristémového tkaniva z kotyledonového nodusu. V súčasnosti sú hlásené ďalšie vylepšovania tejto metódy a produkcia transgénnych výhonkov s pridaním thiolových zlúčenín, ako sú L-cysteín, dithiothreitol a sodium thiosulfate, k pevnému ko-kultivačnému médiu. Táto metóda dosahuje transformačnej efektivity až 16,4 %. Je skoro nezávislá od genotypu sóje a kmeňa *A. tumefaciens*, rovnako ako je nezávislá od binárneho vektoru. To vedie k prístupu k vylepšenej *A. tumefaciens* sprostredkovanou modifikácii sójových buniek z kotyledonového vrcholčeku ako k metóde všeobecne použiteľnej. Štúdia dokazuje, že thiolové zlúčeniny efektívne zvyšujú frekvenciu transformovaných buniek, špeciálne pre niektoré genotypy ako sója Nannong88-1. Zároveň bol vyvinutý účinný selečný systém na základe hygromycínu B pre rýchlu kontrolu transgénnych výhonkov [40].

#### 4.6.2 Bavlna

Majiteľmi patentov a patentových aplikácií ohľadom metód pre transformáciu bavlníka cestou *A. tumefaciens* je päť spoločností.

Spoločnosť Monsanto má udelené dva patenty v USA a jeden v EU. Je orientovaný na transformáciu nezrelých rastlín bavlníka. Tento patent je z roku 1986 a bol udelený ako prvý v danej oblasti. Hlavnými bodmi patentu sú transformácia hypokotyledonových tkanív bavlníka, vloženie najmenej dvoch sekvencií vrátane cudzieho chimerického génu a génu pre rezistanciu. Americký patent popisuje aj kompletnú regeneráciu GM rastliny.

Ďalšie patenty uvádzajú ako transformovateľné tkanivo tkanivo získané zo sadeníc bavlníka rastúcich v tme a z kalusových útvarov, ktoré majú indukovaný vývoj použitím média bez hormónov. Dobré transformovať sa dajú aj meristémové bunky apikálneho hrotu výhonku a koreňový kalus [28].

Pri transformácii meristémových buniek apikálneho hrotu výhonku sú dôležité tri faktory. Ide o prítomnosť aktívne sa deliacich buniek v rastlinnom vrchole, použitie supervirulentného kmeňa *A. tumefaciens* a indukcia virulencie, tretím faktorom je úroveň antibiotickej selekcie prispôbená úrovni promotérovej aktivity v inokulačných bunkách

meristémového tkaniva vrcholu a veľkosť explantátu. Bavlníky sú samoopel'ovacie rastliny a v podmienkach skleníka je pri tejto metóde izolácia GM rastlín v prvej generácii R<sub>1</sub> približne až 75 % [41].

### 4.6.3 Repka olejná

Dňa 31. 8. 2005 bola Komisiou 2005/635/EC kladne rozhodnutá žiadosť o povolenie dovozu a spracovania repky olejnej GT73, žiadateľom bola spoločnosť Monsanto Holandsko. Repka nie je určená pre pestovanie v krajinách EU. Obsah žiadosti zverejnila Európska komisia dňa 22. 1. 2003 a hodnotiaca správa holandského kompetentného orgánu bola zverejnená tak isto dňa 22. 1. 2003.

Gentickou modifikáciou bola docielená tolerancia k herbicídum s účinnou látkou glyfosátom. Transgénná repka GT73 sa transformuje využitím *A. tumefaciens* a jeho vektoru *PV-BNGT04*. Pre toleranciu ku glyfosátu sa vkladajú gény epsps z *A. tumefaciens* *CP4* a *goxv247* pôvodom z *Ochrobactrum anthropi* kmeň *LBAA*. Repka línie GT73 neobsahuje markerové gény rezistencie k antibiotikám [42], [43].

Repka olejná je plodina všeobecne používaná na zisk oleja v EU, Kanade a Indii. Vzhľadom na vysokú priemyselnú dôležitosť je repka často zahrňaná do výskumov GM plodín. Existuje iba niekoľko skutočne úspešných genetických transformácií repky olejnej.

V roku 1992 bol objavený prvý transformačný postup pre hypokotyledon repky olejnej. Veľmi problematická je ale regenerácia GM výhonkov, čo bolo hlavnou prekážkou, ktorá zdržala výskum v osemdesiatych rokoch. V súčasnosti, je už ale vzpurnosť regeneračného procesu prekonaná použitím dusičnanu strieborného v kultivačnom médiu počas regenerácie výhonkov hypokotyledonových a kotyledonových explantátov.

V roku 1999 bola objavená úspešná transformačná metóda použitá pre zrelú rastlinu, pričom boli odskúšané rozličné faktory, ktoré môžu mať vplyv na regeneráciu a transformačnú kapacitu repky olejnej. Využívajú sa bunky zo stonky nesúcej kvet. Jeden z najkrytickejších bodov transformácie je zdroj rastliny pre transformáciu. Najvhodnejšie sú rýchlo rastúce meristémové bunky umiestnené v hornej internodálnej časti stonky nesúcej kvet pred kvitnutím a začiatkom rozťahovania sa okvetia. Segment odvodený z vrchnej časti 20 až 50 mm dlhého internodálneho úseku je najkompatibilnejší pre regeneráciu výhonku a transformáciu *A. tumefaciens*. Regenerácia a transformačná kapacita dosahuje niekedy až 100 % pre individuálne rastliny. Najvyššiu transformačnú kapacitu má *A. tumefaciens* kmeň *LBA4404*, ktorý dosahuje 40 až 90 % efektívnosť v závislosti od jednotlivých kultivarov.

Táto úspešná transformácia sa dá popísať v niekoľkých krokoch. Časť vhodnej internodálnej sekcie sa sterilizuje a odstrihnu sa segmenty, ktoré sú umiestnené v horizontálnej polohe do agarového kultivačného média, mäsopeptónový agar s prídavkom dusičnanu strieborného. Po jednodňovej kultivácii sú segmenty ponorené do mäsopeptónového roztoku inokulovaného zvoleným kmeňom *A. tumefaciens*, ktorý nesie minimálne jeden cudzí gén na uvedenie do buniek repky olejnej. Nadbytočná tekutina na ponorených segmentoch je odsatá filtračným papierom a explantáty sú umiestnené v horizontálnej polohe v ko-kultivačnom médiu obohatenom o hormóny, optimálne s acetosyringónom. Spolukultivácia trvá dva dni, aby bola transformácia efektívna. Potom sa ko-kultivačné segmenty umyjú a zbavia *A. tumefaciens* a následne sú hneď umiestnené vo vertikálnej pozícii bazálnou stranou dole na vhodný agar pre selekciu antibiotikami. Selekcia

trvá tri až šesť týždňov s použitím kanamycínu alebo hygromycínu. Následne sú stonkové segmenty umiestnené do regeneračného média obohateného o hormóny a zregenerované transgénné výhonky sa separujú. Rast trvá približne jeden mesiac na vhodnom médiu s hormónmi [44].

## 4.7 Transformácia monokotyledonových raslín

Jednoklíčnolisté rastliny tvoria veľkú skupinu angiospermných rastlín, teda kvitnúcich rastlín s chránenými semenami. Sú to listnaté rastliny s súběžnými žilnatými listami a majú embryo s jedným kotyledonom. Najdôležitejšie základné plodiny sveta, ako sú obilniny, vrátane pšenice, jačmeňa, ryže, kukurice, čiroku, ovsu, raže a prosa, sú monokotyledony. Patria medzi ne aj iné plodiny využívané v potravinárstve, ako je cibuľa, cesnak, banán, sladké zemiaky a asparágus.

*A. tumefaciens* sprostredkovaná transformácia komerčne dôležitých monokotyledonov bola prvýkrát dosiahnutá na ryži a kukurici v strede deväťdesiatych rokov. Nasledujúc tieto úspechy boli úspešne transformované aj iné monokotyledonové plodiny a zdokonalovanie použitých techník viedlo k vylepšeniu regeneračnej schopnosti transformovaného tkaniva monokotyledonov. Metódy transformácie monokotyledonov je možno rozdeliť na všeobecné bez ohľadu na vektorový typ použitý na transformáciu a na špeciálne upravené metódy. Špeciálne metódy sú určené buď pre daný okruh rastlín, trávnaté porasty alebo obilniny, či sa týkajú jednotlivých rastlín.

Vlastníkmi patentov pre všeobecné metódy transformácie ľubovoľných monokotyledonových rastlín sú Japan Tobacco (Japonsko), Rhône-Poulenc Agro (Francúzsko), University of Guelph (Kanada), Paradigm Genetics (USA), Department of Primary Industries of Queensland (Austrália) a National Institute of Agrobiological Resources (Japonsko). Hlavný rozdiel medzi týmito patentmi je v počiatočnom tkanive rastlín alebo explantátu použitého na transformačné procesy a v aplikácii prídavných ošetrení, tak ako je vákuová infiltrácia alebo prídavok fenolických zlúčenín pre uľahčenie transformácie.

Japan Tobacco má patent na transformáciu monokotyledonových kalusov počas diferenciačného štádia a transformáciu štitka nezrelého embrya pred diferenciáciou. Tieto patenty prijaté USA, Európou a Austráliou pokrývajú transformáciu monokotyledonového tkaniva, ktoré je v širokej miere všeobecne používané [28].

### 4.7.1 Obilniny

Obilniny vlastnia prevládajúcu úlohu vo výžive ľudí. Potravinové zabezpečenie ľudstva v budúcnosti sa nedosiahne, ak sa významnejšie nezvýši produkcia obilnín. Preto sa v súčasnosti genetické manipulácie stávajú dôležitým nástrojom pre kultiváciu obilnín s vylepšenými požadovanými vlastnosťami. Napriek výraznému úspechu v genetických transformáciách obilnín, jedna z hlavných technických výziev transformácie je objav metód vedúcich k produkcii vyššej miery obilnín obyčajne sa prejavujúcich stabilnou a presnou transgennou expresiou bez vedľajších genetických poškodení.

*A. tumefaciens* systém a priamy genetický trasfér cestou mikroprojektilového ostrelovania sú úspešne používané v genetickej transformácii obilnín. Mikroprojektilové

ostrelovanie spôsobilo prevrat na poli genetických modifikácií obilnín, ale hlavnou nevýhodou tohto systému je značná variabilita videná v stabilite, integrácii a expresii prenášaných transgénov. *A. tumefaciens* sprostredkovaný transformačný systém (AMTS), na druhej strane, uľahčuje presnú integráciu malého počtu génových kopíí do rastlinného genómu a vyznačuje sa vyšším stupňom stability pre transgény. Teda vnášanie cudzích génov cestou AMTS sa práve stáva rutinnou technikou, aj keď sú stále prítomné vážne prekážky s AMTS pre niektoré významnejšie obilniny. Niektoré faktory majúce vplyv na AMTS pre obilniny boli preskúvané a objasnené. V súčasnosti identifikácia a molekulová charakteristika rastlinných génov zapojených do úspešnej agrobakteriálnej transformácie rozbieha nové prístupy k lepšiemu pochopeniu rastlinných odoziev na infekciu *A. tumefaciens*. Niektoré informácie pomôžu objaviť metódy k zlepšeniu transformačnej frekvencie ekonomicky dôležitých rastlinných druhov, vrátane obilnín.

V roku 1994 bol poskytnutý nepochybný dôkaz o stabilnej transformácii Japonskej ryže pomocou *A. tumefaciens* po molekulovej aj genetickej analýze veľkého počtu nasledovných generácií. Táto správa otvorila možnosti využitia *A. tumefaciens* na genetickú transformáciu vzdorovitých obilných rastlín. Superbinárny vektor v *A. tumefaciens* kmeň *LBA4404* sa preukázal byť najefektívnejším pre transformáciu všetkých troch kultivarov testovanej ryže. AMTS ryže sa javí ako spoľahlivá a vysoko reproduktívna metóda pre prenos génov do genómu ryže. Tento úspech podnecuje pre využitie danej metódy aj pre transformovanie iných agronomicky dôležitých druhov plodín, ako sú kukurica, jačmeň a pšenica. Úspešná transformácia pšenice a jačmeňa nasledovala čoskoro, ale pokrok bol pomalší. Od prvej správy o transformácii pšenice využitím *A. tumefaciens* sa skúmajú a upravujú rozličné faktory ovplyvňujúce T-DNA prenos. Použitie surfaktantu a vysušovacieho ošetrenia počas ko-kultivácie významne zvýšili T-DNA prenos. Mnoho laboratórií na svete hlási úspechy produkcie transgénneho jačmeňa, ale hlavná správa AMT jačmeňa je obmedzená iba na model genotypu „golden promise“ a „Ingri“, je potrebné ďalšie úsilie na rozšírenie AMTS pre najlepšie kultivary jačmeňa.

Stabilita dedičnosti a expresia cudzích génov sú kriticky dôležité v aplikácii geneticky zmenených obilnín do poľnohospodárstva. Mnohé faktory môžu prispievať k obmenám transgénnej expresie, vrátane variácií indukovaných tkanivovou kultúrou, ďalej počet transgénnych kopíí, transgénne mutácie a génové tlmenie. Tlmenie génov sa môže odohrať v transkripčnej a posttranskripčnej fáze a tento jav je často spojený s vysokým počtom transgénnych kopíí. Zvýšená promotérová aktivita je teda korelovaná hypermetyláciou a zrušením génovej transkripcie v monokotyledonových aj dikotyledonových druhoch rastlín. Bez pochybnosti problém tlmenia transgénov zvyšuje vážne starosti týkajúce sa selekcie transgénnych línií pre plodiny vylepšené o špecifické vlastnosti. Práve preto sa teraz javí byť rozhodujúce bezpečné testovanie úrovni génovej expresie v mnohých generáciách transgénnych línií nesúcich gény dôležité z ekonomického pohľadu [45].

#### **4.7.1.1 Pšenica**

Prvá správa o rýchlej transformačnej metóde pre pšenicu cestou *A. tumefaciens* je z roku 1997. Výsledky dokazovali, že T-DNA bola stabilne integrovaná do genómu pšenice a prenášaná na potomstvo. Regenerovaných bolo viac ako sto nezávislých transformantov.

Štúdiá transformácie pšenice, ryže a kukurice sprostredkovaná *A. tumefaciens* poskytla silnú podporu faktu, že monokotyledonové rastliny môžu byť transformované tak ako dikotyledony pomocou *A. tumefaciens* za manipulácie s rozličnými faktormi, ako je inokulácia, kombinácia kmeňov *A. tumefaciens* a plazmidov. Stabilná transformácia mohla byť dosiahnutá z neregenerovateľnej suspenzie kultivovaných pšeničných buniek a z regenerovateľných nezrelých embryí a embryonálnych kalusov. Transgénne rastliny boli úspešne produkované zo všetkých regenerovaných použitých explantátov. Rozličné faktory ovplyvňovali T-DNA prenos a úspešnosť stabilnej transformácie. Inokulačné a ko-kultivačné podmienky môžu byť menené tak, aby prežili správne rastlinné bunky.

Rozdielne tkanivá alebo bunky vykazujú odlišné vlohy k prežitiu po infikovaní *A. tumefaciens*, napríklad predpestované nezrelé embryá a embryonálne kalusy, ktoré sú kultivované počas periódy až do inokulácie, sa javia byť lepšie prežívajúce ako čerstvo izolované nedozreté embryá. Okrem toho vyššia koncentrácia buniek *A. tumefaciens* aj surfaktantov môže byť tak isto použitá pre inokuláciu týchto explantátov. Acetosyringon a glukóza sa môže pridať do inokulátu a ko-kultivačného média, predovšetkým, keď sa používajú čerstvé embryonálne bunky. Účinnosť prenosu T-DNA významne poklesla, keď nebol prítomný acetosyringon. K stabilnej transformácii pšeničných buniek je však za potreby práve iba acetosyringon a glukóza, na rozdiel od podobných postupov pri transformácii ryže a kukurice. Rozdielne tkanivá a bunecné typy majú rozdielnu spôsobilosť pre agrobakteriálnu infekciu.

Surfaktanty prítomné v inokulačnom médiu boli jedny z najdôležitejších faktorov. Dva surfaktanty, Silwet a pluronic F68, boli pokladané za majúce pozitívny efekt na prenos T-DNA. Možným vysvetlením pre efekt surfaktantov k zvýšenému T-DNA prenosu môže byť vznik buniek, ktorých povrchové napätie je priaznivo naklonené k prilnutiu *A. tumefaciens* na povrch bunky pšenice. Pri ostatných surfaktantoch ako Tween 20 a Triton X dochádza i pri malých množstvách v inokulačnom médiu k príliš toxickému pôsobeniu na pšeničné tkanivo. Takýto transformačný systém bol účinný a požadovaný iba dva až tri mesiace od inokulácie až do prenosu rastlín do pôdy. Transformačná výkonnosť bola viac ako 4 %. Väčšina štúdií v tom čase publikovala biolistické metódy transformácie vyžadujúce dlhé kultivačné a regeneračné obdobie pre tkanivá s transformačnou úspešnosťou 0,1 až 5,7 % [46].

#### 4.7.1.2 Čirok

Napriek úspechom AMT čirku (*Sorghum*) je čirok najneúspešnejšie manipulovateľnou tkanivovou kultúrou pre AMT. Optimalizácia parametrov, ktoré sú považované za rozhodujúce pre transformáciu obilnín a preverovanie vysoko kompetentných explantátov a genotypov by mohla rozšíriť rozsah pre genetickú transformáciu.

V lete roku 2003 bol prijatý patent v Austrálii a USA na transformáciu čirku cestou *A. tumefaciens*, ďalšia patentová aplikácia bola podaná v Juhoafrickej republike (JAR). Počiatočne prijatý patent mal menej obmedzené práva ako ten súčasný. Tkanivo čirku určené k transformácii je teraz obmedzené k určitej skupine tkanív a koncentrácia buniek *A. tumefaciens* v suspenzii je stála. Ďalším limitujúcim faktorom prijatého objavu je počet kópií sekvencií, ktoré sa vkladajú do genómu bunky čirku. Používa sa tkanivo z nezrelého embrya ako cieľ pre *A. tumefaciens*. Génová kazeta musí obsahovať gén, ktorý preukazuje odolnosť k selekčnému agentovi. Okremtoho musí médium počas kultivácie obsahovať

antibiotiká k eliminácii baktérií tak ako aj selekčný agent. Hlavným obmedzením je, že nesmie byť prítomných viac ako päť kopíí vkladaneho cudzieho génu v genóme. Mnohonásobné kopie integrovanej cudzej DNA sú všeobecne neprijateľné [28].

#### 4.7.2 Ryža

Počiatkové experimenty s transformáciou ryže boli zahájené okolo roku 1990 používajúc *A. tumefaciens*. Spočiatku mala táto transformácia nízke hodnoty efektivity. Následne nato roku 1994 bola vyvinutá metóda dl'a Hieia a kolektívu, ktorá mala vysokú transformačnú efektivitu. Transformácia bola robená cestou *A. tumefaciens* s produkciou úrodných transgénných rastlín s plnou schopnosťou dedičnosti cudzích vnesených génov. Táto metóda je dodnes používaná v širokom rozsahu mnohými laboratóriami. AMT má niekoľko výhod vrátane vysokej transformačnej účinnosti, schopnosti prenosu mohutných úsekov DNA s minimálnym preusporiadavaním, integrácie relatívne nízkeho počtu transgénných kopíí a s nízkymi experimentálnymi nákladmi.

Polnohospodársky využiteľné gény transportovateľné do ryže cestou AMT sú gény pre zvýšenú stresovú toleranciu, gény zlepšujúce fotosyntetickú efektivitu a gény na zvýšenie nutričnej kvality semien ryže [47].

#### 4.7.3 Kukurica

Polné pokusy s geneticky modifikovanou kukuricou sa robili v USA od roku 1997 a v Európe od roku 1999. V EU najznámejšia GM kukurica NK603 od spoločnosti Monsanto bola povolená na dovoz a spracovanie rozhodnutím Komisie 2004/643/EC dňa 19. 7. 2004, španielsky kompetentný orgán vydal povolenie v októbri 2004 a Španielsko je zároveň najväčším spracovávateľom GM kukurice v EU. Žiadosť bola podaná žiadateľom Monsanto Španielsko a zverejnená Európskou komisiou 22. 1. 2003. Pre používanie ako potraviny v ČR bola schválená podľa nariadenia 258/97 dňa 3. 3. 2005.

Podstata genetickej modifikácie tejto kukurice je vnesenie génu pre toleranciu k herbicídu glyfosátu (N-fosfonometylglycin, napríklad známa ako Roundup). Z hľadiska vnesenia inzertu sa jedná o konštrukciu dvoch za sebou radených, ale mierne odlišných génov pre enzým, ktorý riadi syntézu aromatických aminokyselín. Gén sa v prírode vyskytuje univerzálne v baktériách, hubách a zelených rastlinách, ale chýba u cicavcov. Daný gén kóduje enzým *EPSPS* (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfosyntázu).

Zvláštnosťou tohto enzýmu je, že je síce kódovaný v DNA jadre a syntetizovaný v cytoplazme, ale potom sa presúva do chloroplastov a tam umožňuje pre rastliny úplne nepostrádateľnú chemickú reakciu. Enzým je citlivý k herbicídu glyfosátu, a práve to je princípom pôsobenia všeobecne používaných výrobkov s touto účinnou látkou. Po pôsobení herbicídu dochádza k zastaveniu syntézy aromatických aminokyselín. Preto rastliny nie sú schopné syntetizovať nové bielkoviny a rýchlo hynú. Poradie aminokyselín v bielkovinovej molekule vlastného enzýmu *EPSPS* je u všetkých uvedených skupín organizmov veľmi podobné.

V prírode ale existujú aj formy génu, ktoré riadia produkciu nepatrne odlišného enzýmu, necitlivého ku glyfosátu. Je možné indukovať takúto mutáciu aj u kultúrnych rastlín,



ale stojí to mnoho práce a peňazí. Reálnejšie je preniesť do kultúrnych rastlín už existujúcu formu génu pre enzým *EPSPS* necitlivý ku glyfosátu. Chcený gén *cp4epsps* bol izolovaný napríklad z *A. tumefaciens* kmeň *CP4*. Regulačné úseky bakteriálneho génu však neumožňujú jeho prejav v rastlinách, preto musí byť nahradený rastlinnými regulačnými úsekmi.

V konštrukcii inzertu, ktorá je použitá v GM kukurici NK603, je transgén pre enzým *EPSPS*, tolerantný ku glyfosátu, pre istotu dokonca v dvoch mierne odlišných formách vedľa seba. Prvý gén má promotor génu pre dôležitú štruktúrnú bielkovinu všetkých buniek – aktín z dedičného základu ryže. Ten aktivuje prejav génu *cp4epsps* vo všetkých bunkách GM rastliny. Za promotérom génu pre aktín je ešte nutný technický úsek DNA – prvý intron génu pre aktín. Potom nasleduje úsek DNA, ktorý nesie genetickú informáciu pre úsek bielkoviny sprostredkovávajúci prenos enzýmu *EPSPS* z cytoplazmy do chloroplastov. Tento úsek je z dedičnej informácie modelovej genetickej rastliny *Arabidopsis thaliana*. Potom bezprostredne nasleduje úsek DNA z baktérie *A. tumefaciens*, ktorý kóduje vlastný enzým *EPSPS* a terminačný úsek iného génu, označovaného *nos*, ktorý je tak isto z *A. tumefaciens*. Celá konštrukcia génu sa skladá z modulov, ktoré boli technikami génového inžinierstva pripravené všeobecne už pred rokom 1990. Druhý gén pre enzým *EPSPS*, ktorý za ním nasleduje, sa líši promotórom, intrónom a kódujúcou sekvenciou pre enzým *EPSPS*. Je použitý mnohokrát osvedčený promotor *e35S*, spôsobujúci tak isto silný prejav génu vo všetkých bunkách rastliny. Pochádza z vírusu mozaiky karfiolu, ale pre zosilnenie funkcie bol jeden jeho úsek, nazvaný zosilovač, zdvojený. Nasledujúci intrón je intrónom génu *hsp70* kukurice. Odlišnosť kódujúcej sekvencie pre enzým *EPSPS* je v zmene dvoch nukleotidov dvojitlákovej DNA, to znamená, že gén kóduje bielkovinu s jednou zmenenou aminokyselinou oproti predchádzajúcemu enzýmu, ale má rovnakú enzýmovú aktivitu. Týmto zdvojením rôznych foriem génov *EPSPS* a spôsobu ich regulácie je zaistená spoľahlivosť prejavu znaku za rôznych podmienok.

Výsledná GM odroda kukurice je tolerantná k postrekom herbicídov Roundup v koncentráciách, ktoré bezpečne likvidujú plevel. Podrobnými štúdiami sa dokázalo, že ani gén ani odlišná forma enzýmu nepôsobí zmeny žiadaných znakov, ako je tolerancia k uvedenému herbicídu. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín doložil experimentálnymi údajmi, že nebola nájdená žiadna imunologická ani štruktúrna podobnosť proteínu transgéennej kukurice NK603 so známymi aktívnymi proteínmi, alergénmi a toxínmi, ktoré by predstavovali zdravotní riziko. Proteín *EPSPS* je labilný pri tepelnom spracovaní potravín a pri nízkom pH, je veľmi rýchlo degradovaný pri modelovom trávení [48].

V decemri 2006 bol vydaný posudok hodnotenia rizík pre kukuricu NK603, ktorý potvrdzuje nezávadnosť potravín a krmív odvodených od danej kukurice a jej podstatnú zhodu s kukuricou tradičnou, tak ako doložila v žiadosti aj spoločnosť Monsanto v rámci nariadenia Európskej komisie č. 258/97 a notifikácie C/ES/00/01 dľa Smernice 2001/18/EC. Potenciál prenosu génov z NK603 do divoko rastúcich príbuzných druhov je v Európe nulový, potenciálna expozícia necieľových organizmov vzhľadom k proteínu *CP4 EPSPS* a k jeho vlastnostiam nevytvára mechanizmus, ktorý by mohol spôsobiť nejaké nežiadúce účinky. NK603 je bezpečná a má rovnakú výživovú hodnotu ako každá iná kukurica, jej vplyv na životné prostredie v miestach jej uvádzania do životného prostredia v podobe plánovaných poľných pokusov nie je odlišný od vplyvu súčasne agronomických postupov spojených s pestovaním tradičnej kukurice. To však nevyklučuje povinnosť sledovania výdrolu v nasledujúcich rokoch [49].

## 5 STATISTIKA, LEGISLATIVA, PERSPEKTÍVA

### 5.1 Legislatíva

#### 5.1.1 Sledovateľnosť a značenie

Sledovateľnosť GMO je daná nariadením Európskeho parlamentu a Rady číslo 1830/2003, značenie potravín je dané nariadením číslo 1829/2003. Na obale alebo v sprievodnej dokumentácii musia byť uvedené slová „tento výrobok obsahuje geneticky modifikované organizmy“, alebo napríklad v prípade GM kukurice „tento výrobok obsahuje geneticky modifikovanú kukuricu“. Ďalej musí byť na obale alebo v sprievodnej dokumentácii značenie slovami „nie je určené pre pestovanie“, ak má napríklad GM kukurica povolenie len na dovoz a spracovanie. Každá GM plodina má svoj jednoznačný identifikačný kód, v prípade kukurice NK603 to je MON-00603-6, v prípade repky olejnej GT73 to je MON-00073-7. Platnosť povolenia pre uvádzanie na trh je obvykle desať rokov.

Značenie geneticky modifikovaných potravín v EU sa robí v súlade s Európskym právnym predpisom 90/220/EWG. Značenie je používané iba v prípade, ak potravina obsahuje cudzie gény, proteíny alebo DNA, alebo ak z potraviny boli odňaté cudzie gény technologickým procesom alebo čistením, ale došlo k zmene v niektorých častiach tak, že je rozdielna v porovnaní s potravinou prirodzene sa vyskytujúcou v prírode. Ak v potrave neostali žiadne cudzie gény pri spracovaní nie je značená ako GMO food, napríklad sójový olej nie je značený ako GMO potravina, pretože rafináciou boli odňaté všetky modifikované gény [7], [48].

#### 5.1.2 Monitoring možných účinkov na životné prostredie a zdravie

Každý držiteľ povolenia na dovoz, spracovanie, prípadne pestovanie GM plodín v EU je povinný dodávať kontrolné vzorky a referenčný materiál.

V priebehu doby platnosti povolenia k uvádzaniu do obehu je držiteľ povolenia zodpovedný za robenie monitoringu, ktorého plán je uvedený v žiadosti, so zameraním na možné nepriaznivé účinky na zdravie ľudí, zvierat a životné prostredie behom manipulácie a používania produktu. Držiteľ povolenia je povinný pravidelne predkladať Európskej komisii a kompetentným orgánom členských štátov správy o výsledkoch monitoringu.

Držiteľ povolenia informuje dotýkané subjekty (dovozcov, spracovateľov, obchodníkov a užívateľov) o podmienkach bezpečného použitia, vlastnostiach produktu a prevádzkovaní monitoringu.

Súčasťou schválenia každej GM plodiny pre použitie v potravinách je i detekčná metóda validovaná referenčným laboratóriom EK k zisťovaniu prítomnosti materiálu pochádzajúceho z danej GM plodiny [ 48].

## 5.2 Štatistika pestovania GM plodín

Od roku 1996 došlo k neobvyklému nárastu pestovateľských plôch GM plodín a to i napriek tomu, že využitie transgénnych materiálov v mnohých krajinách obmedzujú negatívne stanoviská či dokonca moratória na pestovanie a dovoz komodít obsahujúcich GM suroviny. Podľa údajov medzinárodnej organizácie International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) celosvetové plochy transgénnych plodín za rok 2006 dosiahli výmery 102 miliónov hektárov. Zatiaľčo medziročný nárast plôch GM plodín v rokoch 2004 a 2005 činil 9 miliónov hektárov a teda navýšenie o 11 %, o rok neskôr už 12 miliónov hektárov. Počet farmárov pestujúcich transgénne odrody presiahol v roku 2006 rekordnú hranicu desiatich miliónov. Súčasne sa zvýšil i počet krajín, ktoré tieto produkty moderných biotechnológií pestovali na terajších 22 krajín. Medzi nimi je i Česká Republika. Medzi staronovými a novými pestovateľskými krajinami sú od roku 2005 štyri členské štáty EÚ a to Francúzsko, Portugalsko, Slovensko a Česká Republika. Prvé dve krajiny sa k využívaniu GM technológií v poľnohospodárskej výrobe vrátili po štyroch a piatich rokoch moratória, ale ČR a SR pristúpili k bežnému pestovaniu GM plodín, konkrétne Bt kukurice, poprvýkrát. V súčasnej dobe je v rámci EÚ schválené komerčné pestovanie niektorých z GM plodín už v šiestich štátoch (Španielsko, Portugalsko, Francúzsko, Nemecko, Česká republika a Slovensko).

Medzi najväčších celosvetových pestovateľov patrí tradične USA, ktoré v roku 2006 využívali GM plodiny už na 54,6 miliónoch hektárov, nasleduje Argentína, Brazília, Kanada a Čína. Najvyššie tempo prírastku pestovateľských plôch GM plodín zaznamenávajú v posledných rokoch hlavne krajiny tretieho sveta, hlavne India s trojnásobným medziročným nárastom plôch v posledných troch rokoch, ďalej Filipíny, JAR a Paraguaj. Súčasná štatistika uvádza medzi pestovateľmi už jedenásť rozvojových krajín, oproti jedenástim vyspelým krajinám. Okrem toho je v ďalších 29 krajinách stávajúca legislatíva umožňujúca dovoz GM surovín pre potravinárske účely a krmivárske účely a prevádzkovanie poľných pokusov s transgénymi materiálmi.

Väčšinu celosvetových osevných plôch s GM plodinami v roku 2006, obdobne ako v predchádzajúcich rokoch, zaujímali štyri hlavné plodiny: sója (58,6 milióna hektárov), kukurica (25,2 milióna hektárov), bavlník (13,4 milióna hektárov) a repka olejná (4,8 milióna hektárov). V podstatne menšej miere sa zatiaľ pestujú ďalšie GM plodiny ako melóny a papája. V posledných rokoch dochádza k zvýšenému nárastu najmä osevných plôch s GM sójou odolnou voči herbicídum. V niektorých štátoch významne prevyšuje jej pestovanie nad klasickou nemodifikovanou sójou. V Argentíne v roku 2005 bola využitá veškerá plocha na pestovanie sóje na pestovanie odrôd odolných voči herbicídum a v USA v posledných dvoch rokoch až 90 % veškerých plôch sóje boli osätej HT a BT odrodami. A tak je dnes až 60 % celosvetovej produkcie pochádza z geneticky upravenej sóji, ktorá je na trhu lacnejšia [38].

## 5.3 České skúsenosti s GM rastlinami

V Českej republike sa výskumom GM rastlín zaoberá niekoľko inštitúcií. Od konca deväťdesiatych rokov prebiehajú poľné pokusy s rôznymi GM plodinami, najmä kukuricou, zemiakmi a od roku 2002 aj s repkou olejnou. Testovaná je kukurica odolná voči zavíjačovi kukuričnému, kukurica tolerantná k širokospektrým herbicídum, zemiaky so zmeneným

zložením škrobu určené pre technické použitie, nie pre potravinársky škrob alebo zemiaky s modifikáciou zameranou na dlhšiu skladovateľnosť pri nízkych teplotách. Prejednáva sa o polné pokusy so zemiakmi odolnými voči plesniam. Okrem overovania agrotechnických parametrov v polných podmienkach pokusy slúžia i k zisťovaniu možných rizík pre životné prostredie. Z rôznej výmery pokusných plôch sa dá vyčítať, že v niektorých prípadoch ide skôr o výskumné projekty, ktoré čaká ešte dlhá cesta k využitiu výsledkov v praxi.

Dňa 14. 12. 2006 bola doručená na MŽP žiadosť o povolenie uvádzania do životného prostredia GM kukuricu NK603 a hybridu NK603 × MON 810. Dňa 26. 3. 2007 bolo udelené povolenie k uvádzaniu Roundup ready kukurice 2 a hybridu YieldGard Corn Borer s Roundupo Ready kukuricou 2 (NK603 × MON 810) do životného prostredia v ČR. Dané rozhodnutie nabralo právnu moc dňa 17. 4. 2007. Ministerstvo životného prostredia, odbor enviromentálnych rizík, ako správny úrad príslušný podľa § 5 zákona číslo 78/2004 Sb., rozhodlo o nakladaní s geneticky modifikovanými organizmami a genetickými produktmi, v znení zákona číslo 346/2005 Sb. a § 10 zákona číslo 500/2004 Sb., správny rád, v znení neskorších predpisov, kladne vo veci žiadosti Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i., so sídlom Drnovská 507, 161 06 Praha 6, o povolení k uvádzaniu Roundup ready kukurice 2 a hybridu YieldGard Corn Borer s Roundupo Ready kukuricou 2 (NK603 × MON 810) do životného prostredia v ČR.

Na základe tohto povolenia uvádzania danej GM plodiny v porovnaní s inými povoleniami je zrejmé, že výskumný proces GM plodín uvedených do životného prostredia je komplikovaný proces, ktorý je ošetrovaný presnými vymedzeniami a definíciami. Každé takéto povolenie obsahuje presne definované špecifikácie GM organizmu, špecifikácie genetickej modifikácie, výsledky hodnotenia rizík, podmienky nakladania s daným GM organizmom, ďalšie podmienky nakladania stanovené podľa § 5 odstavca 10 zákona, účel nakladania, požiadavky na označenie, presné miesto uvádzania do životného prostredia, požiadavky na monitoring a podávanie správ o jeho výsledkoch, dobu platnosti povolenia žiadosti. Ku každej žiadosti sa musí vyjadriť Ministerstvo životného prostredia, Ministerstvo poľnohospodárstva a Ministerstvo zdravotníctva. Žiadosť v elektronickej podobe musí byť zaslaná k posúdeniu Českej komisii pre nakladanie s geneticky modifikovanými organizmami a genetickými produktmi a určeným odborným posudzovateľom.

Každé nakladanie s GMO môže prebiehať iba za predpokladu dodržiavania prísnych opatrení k zabráneniu úniku GMO do životného prostredia, musí byť zaistený bezpečný transport, vhodne zvolený pokusný pozemok, zachovanie izolačnej vzdialenosti od najbližšieho poľa s príbuznou nemodifikovanou plodinou, spolu s ďalšími opatreniami k zabráneniu šírenia peľu, semien, poprípade hl'úz.

V zatiaľ uskutočnených rozhodnutiach týkajúcich sa GM zemiakov stanovilo MŽP izolačnú vzdialenosť 10 metrov, pričom táto plocha musí byť udržiavaná bez porastu, u GM kukurice to je 200 metrov od najbližšej konvenčnej kukurice a najmenej 600 metrov od kukurice pestovanej v režime ekologického poľnohospodárstva. Žiadna mimoriadna udalosť pri polných pokusoch doteraz nenastala [48], [50].

#### **5.4 Budúci vývoj v oblasti GM plodín.**

V súčasnej dobe je patrné, že už nastupuje takzvaná druhá generácia GM plodín, teda takých, ktoré združujú dve či viac nových znakov, ktoré boli vložené do ich dedičnej

informácie technikami génového inžinierstva. Jedná sa hlavne o kombinácie rôznych odolností k herbicídom s odolnosťou k hmyzím škodcom, prípadne združeným odolnostiam k viacerým škodcom. Geneticky upravené odrody druhej generácie zaujímali v roku 2006 už zhruba 20 % veškerých GM plodín, v USA dokonca 28 %.

Predstavy odborníkov predpokladajú, že z počiatočného mierneho prínosu pestovania GM plodín pre krajiny tretieho sveta, pestujúce GM plodiny vo veľkej miere, sa v druhom desaťročí (2008 – 2015) stane pestovanie GM plodín významným nástrojom k dosiahnutiu požadovaného cieľa zníženia celosvetovej chudoby o 50 % v roku 2015.

Na druhej strane je potešiteľné, že vedľa úsilia o získanie potrebných poznatkov „know-how“ ako z oblasti základného výskumu, z ktorého sa odvíjajú možnosti využitia „nových“ génov pochádzajúcich z vhodných darcovských organizmov a ich vloženie do dedičnej výbavy bežných i netradičných plodín, tak aplikovaného prínosu do praxe, sa stále viac na medzinárodnej úrovni rozvíja spolupráca smerujúca k zaisteniu čo najbezpečnejšieho pestovania GM plodín, ich spracovávaní, obchodu a dopravy. Z iniciatívy mnohých medzinárodných organizácií sú zakladané medzinárodné a informačné siete, iniciovaný vznik a konzultované spoločné i národné legislatívy v oblasti nakladania s GM organizmami. Vďaka týmto krokom došlo i cez trvajúce rozdielne náhľady k určitému zblíženiu názorov na prijímané opatrenia medzi USA a EU, tak ako i ďalšími krajinami. Mnoho štátov už ratifikovalo významné dokumenty, ktoré súvisia s nakladaním s GM organizmami, ako sú Cartagenský protokol o biologickej bezpečnosti a ďalšie. V blízkej budúcnosti možno očakávať širšie uplatnenie ako už klasických GM plodín, tak i plodín s novými znakmi, najmä v oblasti priemyselného využitia, obnoviteľných zdrojov energie, zdravotníctva a zvláštnych potravín [38].

## 6 ZÁVER

Medzi technológie používané na genetické manipulácie plodín patrí hlavne „shot-gun“ technika a transformácia sprostredkovaná *A. tumefaciens*. „Shot-gun“ je biolistická technika založená na princípe naviazania DNA na mikročastice vzácneho kovu a jej následná inkorporácia do rastlinnej bunky pomocou takzvaného biolistického dela, výhodou je, že DNA nemusí byť vnášaná iba do nediferencovaných rastlinných buniek a zároveň sa dá použiť aj pre monokotyledonové rastliny bez obmedzenia a špeciálnych úprav. Môže byť použitá na transformáciu všetkých druhov rastlinných, živočíšnych, bakteriálnych buniek a buniek húb. Je menej náročná na prácu ako metóda využívajúca *A. tumefaciens*. Zavedenie DNA do hostiteľskej bunky je menej komplikované a umožňuje zaviesť súčasne viac ako desať rozdielnych génov. Napriek tomu ale metóda ostreľovania bunky časticami drahých kovov s naviazanou DNA má veľmi nízku účinnosť.

*A. tumefaciens* je schopné vpravenia DNA do hostiteľskej bunky iba v prípade, ak má hostiteľská bunka poranenú bunkovú stenu a vylučuje fenolické zlúčeniny. Regenerácia rastlín, ktorých bunky majú enzymaticky natrávenú či inak poškodenú bunkovú stenu je veľmi ťažká. Po prídavku fenolických zlúčenín, napríklad syringonu, do pôdy či živného média určeného na spolukultiváciu, nemusí dôjsť k poškodeniu bunkovej steny a môžu byť modifikované aj dôležité monokotyledony cestou použitia *A. tumefaciens*. Jednoklíčnolisté rastliny vylučujú fenolické látky iba výnimočne, aj čo sa týka situácie pri poškodení ich bunkovej steny. Napriek všetkým nedostatkom *A. tumefaciens* pri modifikácii buniek rastlín je ale stále metódou s najvyššou úspešnosťou.

V aplikácii *A. tumefaciens* sa uplatňuje ponaučenie, že všetko zlé je na niečo dobré. Tak sa z pôdneho rastlinného patologického organizmu stáva prirodzený genetický inžinier slúžiaci v prospech vedy a vývoja ľudstva. Táto paradoxná baktéria sa javí byť zásadná v otázkach nedostatku potravín v treťom svete.

V súčasnosti s narastajúcim pochopením ako funguje *A. tumefaciens*, vzrastá aj oblasť jeho výskumu, predovšetkým mechanizmus, ktorým je T-DNA premiestňovaná do rastlinnej bunky a presne ako je spojená s proteínmi bakteriálnej virulencie. Toto pochopenie nie je zásadné iba pre biotechnologické aplikácie *A. tumefaciens*, ale má tiež dôsledky na porozumenie funkčnosti ľudských patogénov spojených so štvrtým typom sekrečného systému.

Dnes je už dostupné obrovské bohatstvo v podobe vedomostí o rastlinných faktoroch používaných *A. tumefaciens* k zaisteniu transportu T-DNA cez bunkovú stenu, membránu, cytoplazmu a až po finálnu integráciu do génomu hostiteľa a preto s vylepšovaním podmienok kultivácie, aplikácie i následnej regenerácie geneticky pozmenených organizmov, rastie účinnosť tejto metódy modifikácie organizmov.

Asi najťažšia prekážka čeliaca pokroku vo výskume transgénnych rastlín pomocou *A. tumefaciens* nie je technického charakteru, ale politického. Rozhodnutia, ktoré tvarujú budúcnosť rastlinného výskumu, sú hlavne koncepty, ktoré sú krajinami celého sveta vytvárané ohľadom novej legislatívy na kontrolovanie rozvoja transgénnych plodín. Zdokonaľovanie transformačných protokolov je praktickým pokrokom.

Inou hlavnou vodiacou silou pre progres smerom ku GM plodinám je tlak daný stále rastúcou svetovou populáciou ľudí. Je odhadnuté, že v priebehu ďalších päťdesiatich rokov

vzrastie svetová populácia zo šiestich na deväť miliárd ľudí. Tento argument je, ale často enviromentalistami zobrazovaný ako formálna služba, ktorá hlavne zakrýva chamtivosť priemyslu. Iný aspekt hovorí, že je dosť potravín pripadajúcich na každého obyvateľa, ale najskôr treba zabrániť problémom s korupciou, distribúciou a potláčaním rozvoja krajín tretieho sveta. Pomocou *A. tumefaciens* je možné urobiť národy v Afrike samostatnými z hľadiska farmárčenia a zabezpečenia dostatočného množstva potravy, pretože sú vyvinuté vhodné modifikácie na potrebnú odolnosť plodín, ale všetko závisí od politickej korektnosti, vonkajšej industriálnej hnacej sily a inkorporácie biotechnologických vymožeností do daných krajín. Je treba dodať, že priemyselné spoločnosti budú robiť všetko preto, aby mali najväčší profit.

Podobne to je aj v prípade „Golden Rice“, teda ryže obohatenej cestou *A. tumefaciens* o prekurzor vitamínu A. Farmári, pestujúci danú odrodu ryže, potrebujú zaplatiť poplatok „iba“ výrobcovi, ktorý je ročne stanovený na desaťtisíc dolárov. Nutrične obohatená GM ryža, tak môže pozitívne pomôcť spotrebiteľom v otázke oslepnutia v dôsledku nedostatku vitamínu A v rozvojových krajinách, malému spektru farmárov a spoločnosti, ktorá vyvinula túto technológiu.

Súčasný výskumný ohnisko zahŕňa využitie *A. tumefaciens* pri biodegradácii plastov rastlinami, vakcinácii proti najznámejším civilizačným ochoreniam cestou požívania GM rastlín a pri vyvíjaní rastlín ako ukazovateľov toxínov v životnom prostredí. S veľkými nádejami by mohlo byť *A. tumefaciens* kľúčom k ďalšiemu poľnohospodárskemu progresu. Môže to nastať len vtedy, keď sa bude viesť regulárna a konštruktívna diskusia o legislatívnom riešení pre eticky, zdravotne a politicky sporné otázky, ktoré pravdepodobne zohrávajú veľmi vplyvnú úlohu na vývoj našej spoločnosti [51].

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* [online database]. Mishima: Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan. National Institute of Genetics, 2007. Dostupné z URL <<http://txsearch.ddbj.nig.ac.jp/txsearch/txsearch.TXSearch>>.
- [2] *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* [online database]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine, 2008. Dostupné z URL <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.
- [3] Weir, B.: New Zeland Rhizobia [online]. 2007, last revision 12th November 2007 [cit. 15. 1. 2008]. Dostupné z: <<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/not-rhizobia.html>>.
- [4] Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H.: A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with a emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51, pp. 89-103. ISSN 1466-5026.
- [5] Riva, G. A., Gonzales-Cabrera, J., Vasquez-Padron, R., Ayra-Pardo, C.: *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool fot plant transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 1998, vol. 1, no. 3 [cit. 20.1.2008]. Dostupný na www: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/1/1.PDF>. ISSN 0717-3458.
- [6] Shell, J., Koncz, C.: *The Ti-plasmid and Plant Molecular Biology*. [PDF document]. Köln (Germany): Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 2005 [cit. 20.1.2008]. Dostupný z: <[http://www.mpiz-koeln.mpg.de/downloads/Coupland\\_Csaba/Schell\\_Koncz\\_2000.pdf](http://www.mpiz-koeln.mpg.de/downloads/Coupland_Csaba/Schell_Koncz_2000.pdf)>
- [7] Wilm, K. H. <author@OurFood.com> *Our Food. Database of Food and related Science*. [PDF document]. Germany, March 2008 [cit. 12. 4. 2008]. Dostupné z: <<http://www.ourfood.com/OurFood.pdf>>.
- [8] Collins, A. <[aacollin@unity.ncsu.edu](mailto:aacollin@unity.ncsu.edu)> *Soilborne Plant Pathogens. Agrobacterium tumefaciens*. [HTML document]. Raleigh (North Carolina, U.S.): NC State University, Department of Plant Pathology, Spring 2001 [cit. 12. 4. 2008]. Dostupné z: <<http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/profile.html>>.
- [9] Aysan, Y., Sahin, F., Mirik, M., Donmez, M., Tekman, H.: First report of crown gall of apricot (*Prunus armeniaca*) caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. *New disease report* [online]. 2003, vol. 7 [cit. 10. 12. 2007]. Dostupné na www: <http://www.bspp.org.uk/ndr/july2003/2003-20.asp>.
- [10] Tempé, J., Petit, A., Holsters, M., van Montagu, M., Schell, J.: Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 1977, vol. 74. no. 7 [cit. 10. 2. 2008]. Dostupné na www: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/74/7/2848>.



- [11] Weller, S. A., Stead, D. E.: Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2002, vol. 92 [cit. 10. 12. 2007]. Dostupné na [www: http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2002.01506.x?cookieSet=1](http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2002.01506.x?cookieSet=1).
- [12] Sudarshana, P., McClean, A., Kluepfel, D.: *Development of a culture-independent real-time PCR assay for detection of Agrobacterium tumefaciens in soil*. [PDF document]. United States Department of Agriculture: Agricultural Research Service, Walnut Research Conference, August 2006 [cit. 10.12.2007]. Dostupné z: [http://walnutresearch.ucdavis.edu/2005/2005\\_347.pdf](http://walnutresearch.ucdavis.edu/2005/2005_347.pdf).
- [13] *Comprehensive Microbial Resource (CMP)* [online database]. Rockville: JCVI Microbial Sequence Center, 2002. Dostupné z URL <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=ntat01>.
- [14] Zupan, J., Ward, D., Yambrzski, P.: Inter-kingdom DNA transfer decoded. *Nature Biotechnology* [online]. 2002, vol. 20 [cit. 20.1.2008]. Dostupné na [www: http://www.nature.com/nbt/archive/categ\\_nv\\_022002.html?message=remove](http://www.nature.com/nbt/archive/categ_nv_022002.html?message=remove).
- [15] McClean, P. <[phillip.mcclean@ndsu.nodak.edu](mailto:phillip.mcclean@ndsu.nodak.edu)> *Analyzing Plant Gene Expression with Transgenic Plants*. [HTML document]. Fargo (North Dakota, USA): North Dakota State University, 1998 [cit. 20. 1. 2008]. Dostupné z : <http://www.cc.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/transgenic/transgenic2.htm>.
- [16] Gelvin, S. B.: *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, March 2003, vol. 67, no. 1 [cit. 20. 1. 2008]. Dostupné na [www: http://mmbr.asm.org/cgi/content/abstract/67/1/16](http://mmbr.asm.org/cgi/content/abstract/67/1/16). ISSN 1092-2172.
- [17] Arthur, L. O., Bulla, L. A., St. Julian, G., Nakamura, L. K.: Carbohydrate metabolism in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 1973, vol. 116, no. 1 [cit. 14. 3. 2008]. Dostupné na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=246423](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=246423).
- [18] Hayano, K., Tsubouchi, Y., Fukui, S.: 3-Ketoglucose Reductase of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 1973, vol. 113, no. 2 [cit. 28. 3. 2008]. Dostupné na [www: http://jb.asm.org/cgi/reprint/113/2/652.pdf](http://jb.asm.org/cgi/reprint/113/2/652.pdf).
- [19] Montoya, A. L., Chilton, M.-D., Gordon, M. P., Sciaky, D., Nester, E. W.: Octopine and Nopaline Metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and Crown Gall Tumor Cells: Role of Plasmid Gene. *Journal of Bacteriology*, 1977, vol. 129, no. 1 [cit. 2. 4. 2008]. Dostupné na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=234901](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=234901).
- [20] Edmond, M. B., Riddler, S. A., Baxter, C. M., Wickland, B. M., Pasculle, A. W.: *Agrobacterium radiobacter*: A recently recognized opportunistic pathogen. *Clinical Infectious Disease*, 1993, vol. 16, pp. 388-391. Dostupné na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452950](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452950).
- [21] Martinez, J. L., Martinez-Suarez, J., Culebras, E., Perez-Diaz, J.C., Baquero, F.: Antibiotic inactivating enzymes from a clinical isolate of *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1989, vol. 23, pp. 283-284. Dostupné na [www: http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/citation/23/2/283](http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/citation/23/2/283).

- [22] Savelz, V. R., Stricker, R. B.: Morgellons disease: the mystery unfolds. *Expert Review of Dermatology*, 2007, vol. 2, no. 5, pp. 585-591. ISSN 1746-9872.
- [23] Fuqua, C.: *Multicellular Interactions of Bacteria*. [HTML document]. Bloomington (Indiana, USA): Biology Faculty, Indiana University, January 2008 [cit. 18. 1. 2008]. Dostupné z: <<http://www.bio.indiana.edu/facultyresearch/faculty/Fuqua.html>>.
- [24] Ward, D. V., Zambryski, P. C. [zambrysk@nature.berkeley.edu](mailto:zambrysk@nature.berkeley.edu) The six functions of *Agrobacterium VirE2*. *PNAS* [online]. January 2001, vol. 98, no. 2 [cit. 21. 12. 2007]. Dostupné na www: <http://www.pnas.org/cgi/content/short/98/2/385>.
- [25] Citovsky, V. H., Kozlovsky, S. V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A., Tyfira, T.: Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology* [online]. 2007, vol. 9, no. 1 [cit. 21. 12. 2007]. Dostupné na www: <http://www.ingentaconnect.com/content/bsc/cmi/2007/00000009/00000001/art00002>.
- [26] Citovsky, V. H. <[vitaly.citovsky@stonybrook.edu](mailto:vitaly.citovsky@stonybrook.edu)> *Vitaly H. Citovsky Current Research Project*. [HTML document]. Berkeley: Department biochemistry and cell biology, University of California, 2008 [cit. 12. 4. 2008]. Dostupné z: <<http://www.mindfully.org/GE/Vitaly-Citovsky-Projects.htm>>.
- [27] Vejl, P.: Geneticky modifikovaný organismus z pohledu genetiky a šlechtění. In *Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí, Praha, máj 2007* [online]. 2007 [cit. 19. 3. 2008]. Dostupné na www: [http://81.0.228.70/attachments/sbornik\\_GMO\\_2007.pdf](http://81.0.228.70/attachments/sbornik_GMO_2007.pdf).
- [28] Roa-Rodriguez, C., Nottenburg, C. <[cambiaIP@cambia.org](mailto:cambiaIP@cambia.org)> *Agrobacterium-mediated transformation of plants*. [PDF document]. Canberra (Australia): CAMBIA Intellectual Property Resource, July 2003 [cit. 19. 3. 2008]. Dostupné z: <[http://www.cougarlaw.com/linked\\_files/AMT\\_v3.pdf](http://www.cougarlaw.com/linked_files/AMT_v3.pdf)>.
- [29] Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P. J. J.: Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 1995, vol. 14, no. 13 [cit. 14. 3. 2008]. Dostupné na www: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394382>.
- [30] van Attikum, H., Hooykaas, P. J. J.: Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* [online]. 2003, vol. 31, no. 3 [cit. 19. 3. 2008]. Dostupný na www: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/3/826>.
- [31] Piers, K. L., Heath, J. D., Liang, X., Stephens, K. M., Nester, E. W.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *PNAS* [online]. 1996, vol. 93. Dostupný na www: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/93/4/1613>.
- [32] Chen, X., Stone, M., Schlagnhauer, C., Romaine, C. P.: A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and environmental microbiology* [online]. October 2000, vol. 66, no. 10 [cit. 19. 3. 2008]. Dostupný na www: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92332>.

[33] Sullivan, T. D., Rooney, P. J., Klein, B. S.: Agrobacterium tumefaciens integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryotic cell*, 2002, vol. 1, no. 6, pp. 895-905. ISSN 1535-9778.

[34] Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V.: Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium. *PNAS* [online]. 2001, vol. 98., no. 4 [cit. 21. 3. 2008]. Dostupný na www: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=29349>.

[35] Hanur, V. S.: Genetic transformation of human cells by a soil phytopathogen presents common molecular strategies. *Current science* [online]. October 2004, vol. 84, no. 7 [cit. 21. 3. 2008]. Dostupný na www: <http://www.ias.ac.in/currsci/oct102004/856.pdf>.

[36] Coghlan, A.: Killer tomatoes attack human disease. *New Scientist* [online]. June 2006, no. 2557 [cit. 20. 4. 2008]. Dostupný na www: <http://www.newscientist.com/article/mg19125584.600-killer-tomatoes-attack-human-diseases.html>.

[37] Sunil Kumar, G. B., Ganapathi, T. R., Bapat, V. A.: Production of Hepatitis B Surface Antigen in Recombinant Plant System: An Update. *Biotechnology Progress* [online]. 2007, vol. 23, no. 3 [cit. 20. 4. 2008]. Dostupný na www: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/sample.cgi/bipret/2007/23/i03/html/bp0602754.html>.

[38] Rakouský, S., Hraška, M.: Transgénne plodiny – realita a perspektívy. In *Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí, Praha, máj 2007* [online]. 2007 [cit. 19. 3. 2008]. Dostupné na www: [http://81.0.228.70/attachments/sbornik\\_GMO\\_2007.pdf](http://81.0.228.70/attachments/sbornik_GMO_2007.pdf).

[39] de Ronde, J. A., Cress, W. A., van der Mescht, A.: Agrobacterium-mediated transformation of soybeans (*Glycine max*) seed with the  $\beta$ -glucuronidase marker gene. *South African Journal of Science* 97 [online]. 2001, october [cit. 20. 3. 2008]. Dostupné na www: [http://search.sabinet.co.za/images/ejour/sajsci/sajsci\\_v97\\_n9\\_a19a.pdf](http://search.sabinet.co.za/images/ejour/sajsci/sajsci_v97_n9_a19a.pdf).

[40] Xinping, Y., Deyue, Y.: Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with Agrobacterium tumefaciens. *African Journal of Biotechnology*, October 2006, vol. 5, no. 20, pp. 1989-1993. ISSN 1684-5315.

[41] Gould, J. H., Magallanes-Cedeno, M.: Adaptation of Cotton Shoot Apex Culture to Agrobacterium-Mediate Transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 1998 [cit. 12. 3. 2008]. Dostupné na: <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ispmb/ispmb16/16283-3.pdf>.

[42] Ostrý, V., Ruprich, J., Doubková, Z., Ondřej, M.: *Potraviny na bázi geneticky modifikovaných organizmů*. [PDF dokument]. Brno (Česká republika): Státní zdravotní ústav, duben 2003 [cit. 12. 4. 2008]. Dostupný z: [http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/GMO\\_2003\\_4\\_deklas.pdf](http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/GMO_2003_4_deklas.pdf).

[43] Dimas, S.: Commission. *Official Journal of the European Union* [online]. 2005, March [cit. 12. 4. 2008]. Dostupné na www: [http://www.europabio.org/InfoOperators/GT73/Monsanto%20GT73%20import%20approval\\_310805.pdf](http://www.europabio.org/InfoOperators/GT73/Monsanto%20GT73%20import%20approval_310805.pdf)

[http://www.env.cz/AIS/web-pub.nsf/\\$pid/MZPMVF4N8Q9J/\\$FILE/oer-repkaGT73-20060410.pdf](http://www.env.cz/AIS/web-pub.nsf/$pid/MZPMVF4N8Q9J/$FILE/oer-repkaGT73-20060410.pdf).

[44] Helsinki University Licensing LTD. Agrobacterium-mediated transformation of turnip rape. Inventors: Viktor Kuvshinov, Kimmo Koivu, Anna Kanerva, Eija Pehu. IAN PCT/FI1998/000730. IPC C12N 15/82. International application published under the Patent Cooperation Treaty (PCT). IPN WO/1999/14349. 25. 3. 1999. Dostupné z: <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1999014349>>.

[45] Shrawat, A. K. <[ashrawat@ualberta.ca](mailto:ashrawat@ualberta.ca)> *Genetic transformation of cereals mediated by Agrobacterium: Potential and problems*. [HTML document]. Edmonton (Canada): Laboratory of Molecular Genetics, Department of Biological Science, University of Alberta, February 2007 [cit. 15. 4. 2008]. Dostupný z: <<http://www.isb.vt.edu/articles/feb0703.htm>>.

[46] Cheng, M., Fry, J. E., Pang, Sh., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W., Wan, Y.: Genetic Transformation of Wheat Mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Physiology* [online]. 1997, vol. 115 [cit. 15. 4. 2008]. Dostupný na www: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/115/3/971>.

[47] Malabika, R., Rajinder, K. J., Rohila, J. S., Wu, R.: Production of agronomically superior transgenic rice plants using Agrobacterium transformation methods: Present status and future perspectives. *Current Science* [online]. 2000, vol. 79, no. 7 [cit. 15. 4. 2008]. Dostupný na www: <http://www.iisc.ernet.in/currsci/oct102000/954.pdf>.

[48] Vecera, M. <[posta@env.cz](mailto:posta@env.cz)> *Registr povolených geneticky modifikovaných organismů* [HTML a PDF dokument]. Praha (Česká republika): Ministerstvo životního prostředí, květen 2007 [cit. 20. 4. 2008]. Dostupný z: <<http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/9a6263196f09b0a9c1256e7e0038efc2/17ab07b65d8356a1c12572aa003d1a0f?OpenDocument>> <[http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/\\$pid/MZPMVFJMV4RJ/\\$file/oer-4675ENV07\\_CZU\\_rozhodnuti\\_20070511.pdf](http://www.env.cz/www/env-gmo.nsf/$pid/MZPMVFJMV4RJ/$file/oer-4675ENV07_CZU_rozhodnuti_20070511.pdf)>.

[49] Singer, M.: *Posudek z hodnocení rizika*. [DOC dokument]. Ministerstvo životního prostředí, ČR, prosinec 2006 [cit. 20. 4. 2008]. Dostupný z: <<http://www.enviro.gov.sk/servlets/files/15687>>.

[50] Doubková, Z.: České zkušenosti s GM rostlinami – přehled polních pokusů. In *Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí, Praha, máj 2007* [online]. 2007 [cit. 19. 3. 2008]. Dostupné na www: [http://81.0.228.70/attachments/sbornik\\_GMO\\_2007.pdf](http://81.0.228.70/attachments/sbornik_GMO_2007.pdf).

[51] Valentine, L.: Agrobacterium tumefaciens and Plant: The David and Goliath of Modern Genetics. *Plant Physiology* [online]. November 2003, vol. 133 [cit. 20. 4. 2008]. Dostupný z: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/133/3/948>>.

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

ABC	periplazmatické väzbové proteíny
Acyl HSL	acylovaný homoserínový lakton
AMT	<i>A. tumefaciens</i> sprostredkovaná transformácia
AMTS	Agrobacterium-mediated transformation system ( <i>A. tumefaciens</i> sprostredkovaný transformčný systém)
bp	párov báz
Bt	technológia technológia používajúce <i>Bacillus thuringiensis</i>
CGD	Crown gall disease (doslovný slovenský preklad neexistuje, užíva sa pojem krčkovitosť rastlín)
ED	Entner-Duodoroffova metabolická dráha
GM	geneticky modifikovaný
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
GUS	$\beta$ -glukuronidáza
GUS INT	$\beta$ -glukuronidázový intrón
HbsAg	povrchový antigén hepatitídy typu B
HR	homologická rekombinácia
kDa	kilodalton (1 kDa je približná váha tisíc vodíkových atómov)
KTJ	kolónia tvoriaca jednotku
MŽP	Ministerstvo životného prostredia
NHR	nehomologická rekombinácia
NLS	signál lokalizujúci rastlinné jadro (nucleus localization signal)
NOS	gén pre syntézu nopalínu
ORF	čítací rámec (open ring frame)
ORI	replikačný počiatok
PC	pentózový cyklus
ssDNA	jednovláknová molekula DNA (single strand DNA)
TC	centrálny úsek oktopínovej T-DNA
TIP	tumor indukujúca podstata (tumor inducing plasmid)
TL	ľavý segment oktopínovej T-DNA
TM	transmembránová doména proteínu VirA
TR	pravý segment oktopínovej T-DNA

## 9 Zoznam obrázkov

Obr. 3.1: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> [8] .....	11
Obr. 3.2: Metabolická dráha <i>A. tumefaciens</i> . Cyklus kyseliny citrónovej [17] .....	15
Obr. 3.3: Metabolická dráha <i>A. tumefaciens</i> . Pentózový cyklus s Entner-Doudoroffovou dráhou [17] .....	16
Obr. 3.4: Rovnováha uhlíka vychádzajúca z oxidácie troch molekúl glukózy cestou reakcií pentózového cyklu <i>A. tumefaciens</i> [17] .....	17
Obr. 3.5: Katabolizmus oktopínu riadený príslušnými génmi [19] .....	18
Obr. 3.6: Cesta integrácie T-DNA z <i>A. tumefaciens</i> do hostiteľskej bunky [25].....	26