

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra dendrologie a šlechtění lesních dřevin

Perspektivy využití genetického inženýrství ve šlechtění lesních dřevin

Perspective of genetic engineering in forest tree breeding

Vedoucí práce: Prof. Ing. Jaroslav Koblíha, CSc.

Vypracovala: Olga Brantová

2008

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Perspektivy a využití genového inženýrství ve šlechtění lesních dřevin vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne 5.7.2008

Podpis autora práce:

Poděkování

Děkuji panu Prof. Ing. Jaroslavu Koblíhovi, CSc. za vedení diplomové práce.

Abstrakt

V současné době dochází k rychlému rozvoji metod genového inženýrství ve všech odvětvích biologie. Genové inženýrství lesních dřevin umožňuje konstrukci dřevin s požadovaným fenotypem jako je rezistence k herbicidům, dále pak umožňující ušetření nákladů na pěstování a zvýšení produkce dřeva, přizpůsobení vlastností dřeva pro lepší průmyslovou zpracovatelnost a další. To postupně umožní přechod k těžbě pouze na pěstebních polích a tím zachování původních lesních společenstev s jejich přirozenou diverzitou. První pokusy ukazují významný ekologický vliv transgenních dřevin schopných absorbovat a detoxifikovat těžké kovy z prostředí. Transgenní rostliny s vneseným genem rezistence proti patogenům byly již s úspěchem rozšířeny na areál svého původního výskytu. Nebezpečí úniku transgenu do přirozeného prostředí je obvykle eliminováno pomocí sterility pylu, oddálení nebo znemožnění kvetení a výsadbou transformovaných rostlin mimo areál přirozeného výskytu jejich rodičovských populací.

Doposud genovým inženýrstvím nejvíce využívanými dřevinami jsou zástupci rodu *Populus* sp. a *Larix* sp.

V budoucnu se předpokládá další rozvoj genového inženýrství lesních dřevin jak pro oblast průmyslového využití, tak pro zlepšení ekologie prostředí včetně možného podílu na eliminaci skleníkového efektu. Nutnou podmínkou využití širokého přínosu umělé transformace rostlin je však dodržení bezpečnostních pravidel a nenarušení ekologické rovnováhy původních společenstev.

Abstract

Gene engineering presents a rapidly developing branch in today's biology. The benefits of applying biotechnology to forestry are potentially huge. The estimates above suggest that the introduction of only one type of biotechnological innovation, a herbicide-resistant gene, could generate enormous benefits in reduced forest plantation establishment costs and an expansion in the rate of plantation establishment. The increased production would not only generate increased social welfare through lower commodity prices, but would also generate environmental benefits in the form of decreased harvesting pressure on natural forests.

Furthermore, it is well documented that there has been a gradual worldwide shift in industrial wood production from natural forests to plantations. Such a trend could have advantageous effects on native forests and biodiversity in that as harvest pressures are relieved and native forests can be devoted to other purposes, including conservation. The more productive are forest plantations, the more they can deflect harvesting pressures away from natural forests.

Additionally, biotechnology applied to trees offers an additional tool in dealing with specific environmental problems, including land and water protection, as well as presenting the potential to deal more effectively with global warming and atmospheric carbon mitigation.

Up to day the most used are *Populus* sp. and *Larix* sp. in gene engineering. It is suspected large usage of another species in future time both for industry and ecology. However, the necessary requirement for sustainable development is respect to nature equilibrium.

OBSAH

1. ÚVOD	7
1.1 Vývoj genového inženýrství rostlin	7
2. METODY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ U ROSTLIN.....	11
2.1 Genové mapování	12
2.2 Aplikace molekulárních genetických markerů v lesnictví	13
2.3 Klonování do vektoru	14
2.4 Vnášení vektoru do rostlinné buňky	17
2.5 Biotechnologie v lesním inženýrství	Chyba! Záložka není definována.
2.6 In vitro kultivace a selekce	20
3. VÝSLEDKY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ LESNÍCH DŘEVIN	22
3.1 Hybridní populace topolu jako model dřevin.....	23
3.2 Modřín jako model jehličnanů	24
3.3 Vývoj rezistence ke škůdcům a tolerance ke stresu.....	24
3.4 Rezistence k houbovým patogenům.....	25
3.5 Rezistence k bakteriálním chorobám.....	26
3.6 Tolerance ke stresu	27
3.7 Modifikace ligninu	27
3.8 „Phytoremediace“ jako způsob pro zlepšení ekologických kvalit prostředí	29
3.9 Rozmístění geneticky upravených stromů	30
4. DISKUSE.....	33
5. ZÁVĚR	34
6. REFERENCE:	35

1. Úvod

Genové inženýrství, genová modifikace, rekombinantní DNA a genový sestřih („splicing“) jsou termíny užívané v souvislosti s přímou manipulací genů organismů.

Na rozdíl od šlechtění a křížení, které představuje nepřímé metody změny genetické informace, genové inženýrství používá metody přímé změny sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA) jako jsou metody molekulového klonování a transformace. Na základě změny sekvence DNA vzniká nový protein podmiňující vznik požadovaného genotypu.

1.1 Vývoj genového inženýrství rostlin

První úspěšné transformaci rostliny, za kterou je obecně považován rok 1978, kdy vyšla práce dokazující, že při indukci rostlinných nádorů bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* malá část tehdy teprve nedávno zjištěného plazmidu, nazvaného Ti, přechází do rostlinných buněčných jader, předcházelo dosti dlouhé období, v němž se řada vědců pokoušela indukovat a prokázat přenos znaků prostřednictvím DNA, mechanismem obdobným bakteriálním transformacím.

K rychlému rozvoji metod tvorby organismů s upravenými genotypovými znaky však došlo až na počátku sedmdesátých let čímž se otevřely perspektivy uplatnění GMO pro získávání nových odrůd kulturních rostlin s novým ekonomickým i ekologickým potenciálem.

Nové možnosti genového inženýrství otevřela Chiltonová et al. (1977), když našla způsob vnášení cizích genů do rostlinných buněk přírodní cestou. S úspěchem je dodnes

využívána transformace rostlinných buněk pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Existují však i možnosti přímé transformace prostřednictvím samotné DNA. Pomocí vektorů, stejně jako přímou transformací je možné do genomu rostlin vnášet pozměněné geny rostlinné, živočišné, bakteriální i virové. Požadované geny musí pouze obsahovat úseky rozpoznávané rostlinou jako iniciační, regulační a následně jako stop kodón.

Jedním z prvních pokusů bylo vnesení genů pro symbiotickou fixaci vzdušného dusíku získaných z genů bakterií čeledě *Rhizobiaceae* do genomu obilovin a dalších kulturních rostlin. Tím by odpadla nutnost hnojit dusíkatými hnojivy. Současnými metodami se však nepodařilo daný cíl zatím realizovat. Oproti tomu již existuje transgenní rostlina tzv. "zlaté rýže" (Ye et al., 2000), která ve svých obilkách obsahuje beta-karoten (což našlo své uplatnění hlavně v zemích "třetího světa"), má zvýšený obsah železa a příznivě upraveno spektrum aminokyselin v zásobních proteinech. V současné době se začínají objevovat rostliny s upraveným aminokyselinovým složením ve svých proteinech a řada z nich se může stát plnohodnotnou potravinou nahrazující postupně nutnost konzumace živočišných výrobků. První pokusy s pěstováním transgenních rostlin v přírodě (tabáku odolného proti hmyzím škůdcům) byly zaznamenány r. 1986 (Plant Genetics Systems) a první transgenní odrůda (rajčata FlavrSavr s prodlouženou životností plodů) se objevila na trhu r. 1994. Jde o méně než stovku odrůd (www.agbios.com). Současné odrůdy kulturních rostlin tvoří následující druhy (zhruba podle plochy rozšíření): sója, kukuřice, bavlník, řepka, řepa cukrovka, brambor, len, tabák, rajče, papája, meloun, dýně a karafiáty. Do rostlin jsou vneseny tyto hlavní znaky: tolerance k herbicidu, rezistence k hmyzím škůdcům, pylová sterilita pro heterózní šlechtění, rezistence k virovým chorobám, u řepky změna spektra mastných kyselin v oleji semen, u rajčete prodloužená konzumní zralost, u karafiátu prodloužená životnost řezaných květů. Obvykle každá odrůda má jeden z těchto nových znaků, v některých se kombinují dva vnesené znaky.

V počátcích rozvoje genového inženýrství se objevily dvě školy, tzv. evropská škola pod vedením prof. J. Schella a americká škola vedená prof. Mary del Chiltonovou (University of Washington). V roce 1985 vznikla v Gentu biotechnologická společnost Plant Genetic Systems, která se odštěpila od univerzitního zavedeného pracoviště vedená prof. Montagem.

V USA byly vůdčími firmy Calgene a Zeneca, hlavně však biochemická firma Monsanto, která se rychle přeměnila na obrovský biotechnologický komplex a v současnosti ovládá přes 80 % produkce transgenních odrůd.

V současnosti se již transgenní odrůdy pěstují na celkové ploše přes půl milionu čtverečních kilometrů, což by mohlo být považováno jednoznačně za významný úspěch v aplikované vědě. Přesto veřejné mínění a dokonce ani názor biologů na danou otázku není jednotný. Obzvláště v Evropě je veřejné mínění do značné míry ovlivněno názory, které prosazují některé organizace, především Greenpeace, a to, že geneticky modifikované organismy nejsou dostatečně prozkoušeny a mohly by mít nedozírné škodlivé následky pro přírodu, přírodní společenstva a životní prostředí.

Nedůvěra k možnostem bezpečného využití genového inženýrství se objevila hned záhy po prvních aplikacích do praxe. Již r. 1974 vědecké časopisy *Nature* a *Science* uveřejnily tzv. Bergův dopis, v němž hlavní představitel této vědní oblasti, prof. Berg, požadoval zastavení pokusů s geneticky modifikovanými organismy jako potenciálně nebezpečnými a svolání konference, která by rozhodla, jak dále pokračovat. To se stalo a konference rozhodla pokračovat v pokusech za opatření, která minimalizují možné nepříznivé důsledky. Tato opatření se od r. 1975 vyvíjejí a přísně dodržují a stala se základem systému legislativních úprav s geneticky modifikovanými organismy (GMO) i v našich zemích.

V laboratořích univerzit, vědeckých a výzkumných ústavů i biotechnologických firem jsou připraveny transgenní rostliny, které mají některé ze stovek, možná tisíců nových znaků. Některé z nich mohou být prospěšné v zemědělství, jiné ve farmakologii k produkci léčiv nového typu a další v průmyslu k získávání nových materiálů, nahrazujících nejtvrdší kovy nebo umělé hmoty, ale i k získávání kvalitnějšího dřeva nebo nových enzymů pro biotechnologickou produkci. Všechny transgenní rostliny, které mají být pěstovány na polích, v parcích a zahradách a prakticky využívány, se testují na vhodnost k širšímu využití. Pokud by se zjistilo, že z nějakého důvodu jsou nevhodné, budou vyřazeny, ale stále bude mnoho dalších, vhodných. Komplexní průkaz bezpečnosti pro přírodu, přírodní prostředí a zdraví člověka bude vždy podmínkou jejich využití.

Hlavním zaměřením genového inženýrství rostlin zůstává doposud převážně snaha o zlepšení úrody a to na mnoha úrovních ovlivnění. Přečtení geonomu většiny produkčních rostlin včetně produkčních druhů v lesním hospodářství, jako je např. borovice (*Pinus* sp.) nebo smrk (*Picea* sp.) umožňuje ovlivnění jejich hospodářské kvality.

Tyto transgenní stromy poté splňují nároky na rychlejší růst, odolnost ke škůdcům, lepší zpracovatelnost dřeva a mnohé další.

V současné době se biotechnologiemi zabývá nejméně 76 zemí na světě, přičemž největší podíl mají rozvojové země (68%, z toho je nejvíce citací soustředěno do Číny a Indie), USA (14%), Francie (9%) a Kanada (8%) (Wheeler, 2005).

2. Metody genového inženýrství u rostlin

Obecným cílem genového inženýrství je vnesení nové genetické informace do buňky za účelem získání nového genotypu. V první fázi je potřeba identifikovat gen, který je za žádaný fenotyp zodpovědný. V této fázi se uplatňuje genové mapování a identifikace dalších genových markerů segregujících s požadovaným genem. Poté nastupují techniky umožňující daný gen přenést do cílových buněk. Jednou z možností je prostá separace genu z původního genomu pomocí restričních endonukleáz, pokud známe sekvenci genomu ohraničující promotor a stop kodón cílového genu. Jinou možností je umělá syntéza oligonukleotidu sekvenčně odpovídajícího genu a jeho vložení do vektoru. V tomto případě se často používá pouze cDNA, tedy DNA získaná reverzní transkripcí z dané mRNA, která obsahuje pouze exony. Výhodou je hlavně lepší manipulace i tolerance kratší délky sekvence bakterií či virem při klonování. Poté, co je cílový gen získán, jeho sekvence může být zkontrolována pomocí RFLP metody (restriction fragment length polymorfismus) využívající známého restričního místa uvnitř sekvence. Identifikovaný gen je poté propagován pomocí PCR (polymerase chain reaction) a za využití restrikce a ligace pomocí známých enzymů zaklonován do bakteriálního, virového či kvasinkového vektoru. Vektor obsahuje promotor daného organismu, ve kterém má být propagován a obvykle nese i určitý selekční marker umožňující přežití pouze těch buněk, které byly úspěšně transformované. Pro přenos do cílových buněk se u rostlin obvykle využívá schopnost bakterie *Agrobacterium tumefaciens* spontánně infikovat rostlinné buňky svým plazmidem. Jinou možností je např. bombardování buněk mikročasticemi obsahujícími daný vektor. Poté se přistupuje k mikropropagaci (Kobliha, 2002).

2.1 Genové mapování

Molekulární markery jsou dle definice odvozené přímou analýzou genetických polymorfismů v sekvenci DNA. Doposud byla většina markerů studovaných u dřevin převážně biochemickými markery, jako byla např. přítomnost monoterpenů a isozymů. Tyto markery poskytovaly možnost k vylepšení vlastností dřevin a dodnes jsou často využívány. Nevýhodou je však jejich malý počet a tak i pravděpodobnost nalezení markeru blízkého hledanému lokusu je malá. Proto se začíná stále hojněji využívat molekulárních markerů na bázi sekvence DNA. Používanými metodami je nejčastěji RFLP (restriction fragment length polymorphism) a RAPD (random amplified polymorphic DNA).

RFLP jsou jednoduché mendelovské genetické markery, které se projevují počtem a délkou DNA fragmentů generovaných restričními enzymy. Rozdíly v délce a počtu fragmentů jsou důsledkem mutací jako je inserce či delece jednoho či několika nukletidů v restričních místech. Tím RFLP umožňuje přímé srovnání genetického materiálu jednotlivých rostlin bez genové exprese, která je často tkáňově nebo environmentálně podmíněna.

RFLP mají několik výhod oproti tradičnímu systému markerů:

- a) jsou ko-dominantní
- b) vykazují minimální pleiotropní efekt
- c) jsou nezávislé na faktorech prostředí
- d) mohou poskytnout velké množství markerů
- e) jsou vývojově stabilní a vykazují normální Mendelovskou dědičnost

RFLP mapy byly vyvinuty pro některé významné plodiny a jejich pomocí byla potvrzena evoluční příbuznost jedle Douglasovy (*Pseudotsuga menziesii*) a modřínu (*Larix occidentalis*) (Kobliha, 2002).

Technika RAPD je založena na PCR (polymerase chain reaction) a překonává tím nedostatky metody RFLP, která je obecně náročná na materiál i dobu hybridizace. Jedná se o metodu, kdy jsou navrženy specifické primery pro určitou oblast DNA a ta se amplifikuje pouze v případě, že danou sekvenci, ke které jsou primery komplementární, skutečně obsahuje. (Identifikuje se jako svítící band na gelu po obarvení bromdeoxyuridinem pod UV světlem). Je však nutno mít na zřeteli, že pomocí této metody není možné obvykle odlišit homozygoty od heterozygotů v daném znaku, pokud není precizně vyvážen počet cyklů PCR (kvantitativní PCR).

2.2 Aplikace molekulárních genetických markerů v lesnictví

Molekulární genetické markery jsou běžně používány pro:

- a) identifikaci rodičovských jedinců při určování původu semenného nebo dceřiného materiálu
- b) ověření kontrolovaného křížení
- c) odhad kontaminace pylu

Pro určení rodičovských jedinců a pro odhad genetické variability bývá stále užíváno isozymových markerů. Ty jsou však nedostatečné z důvodu jejich nízké variability. Dále právě rychlá genotypizace a selekce nejlepšího materiálu ještě dlouho před vývojem prvních fenotypových znaků je velikou výhodou v lesnictví z důvodu dlouhé generační doby stromů. V současné době je potřeba identifikovat pevné selekční markery spojené s výhodnými růstovými, ekologickými a ekonomickými znaky pro další rychlý rozvoj lesnických biotechnologií.

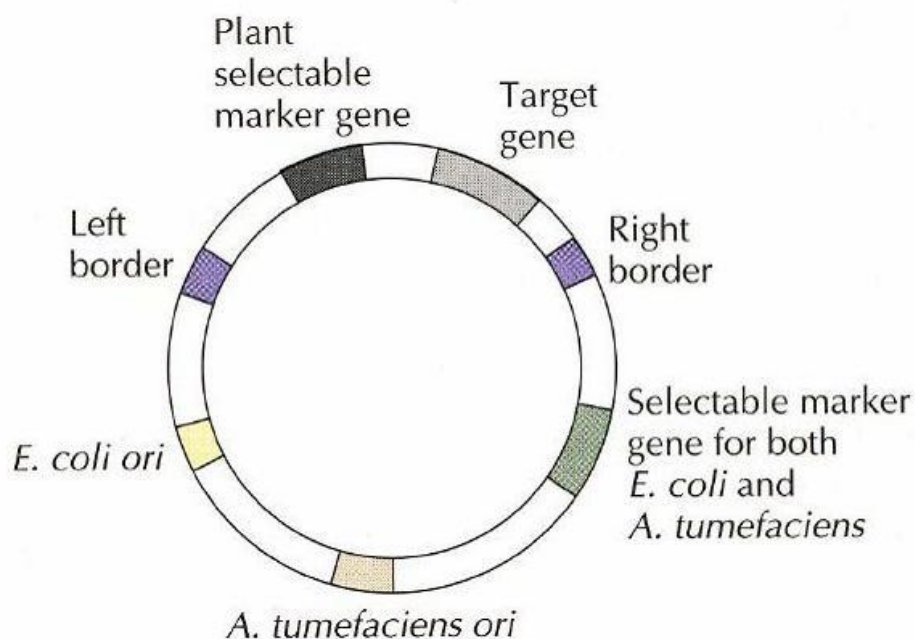
2.3 Klonování do vektoru

Na základě identifikace požadovaného genu je potřeba zvolit vhodný plasmid pro pozdější propagaci v bakteriální kultuře (nesoucí *ori* rozeznávaný danou bakterií). Plasmidový vektor obsahuje restrikční místo pro vložení cílové sekvence, obvykle je uvedena optimální velikost vkládaného úseku, dále pak selekční marker a sekvence rozpoznávané bakterií i následně rostlinnou buňkou.

Tab.1: Běžně užívané restriktázy s vyznačeným místem štěpení a organismem původu
(Upraveno dle http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme)

TABLE 8.1 Ten Commonly Used Restriction Enzymes		
Enzyme	Sequence of Recognition Site	Microbial Origin
<i>TaqI</i>	5' TCGA 3' 3' AGCT 5'	<i>Thermus aquaticus</i> YTI
<i>RsaI</i>	5' GTAC 3' 3' CATG 5'	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
<i>Sau3AI</i>	5' GATC 3' 3' CTAG 5'	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
<i>EcoRI</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'	<i>Escherichia coli</i>
<i>BamHI</i>	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
<i>HindIII</i>	5' AAGCTT 3' 3' TTAGCA 5'	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>KpnI</i>	5' GGTACC 3' 3' CCATGG 5'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
<i>Clal</i>	5' ATCGAT 3' 3' TAGCTA 5'	<i>Caryophanon latum</i>
<i>BssHII</i>	5' GCGGCC 3' 3' CGCCGC 5'	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>NotI</i>	5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5'	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>

V genovém inženýrství rostlin se často využívá schopnosti *Agrobacterium tumefaciens* spontánně transformovat rostlinné buňky. Pro tento účel bývá s výhodou užíván tzv. binární plasmid, který je propagován v na agaru dobře rostoucí kultuře *E.coli* a následně přenesen do kolonií *Agrobacterium tumefaciens* zbavených vlastního Ti plasmidu. Plasmid je schématicky znázorněn na obr. 1.

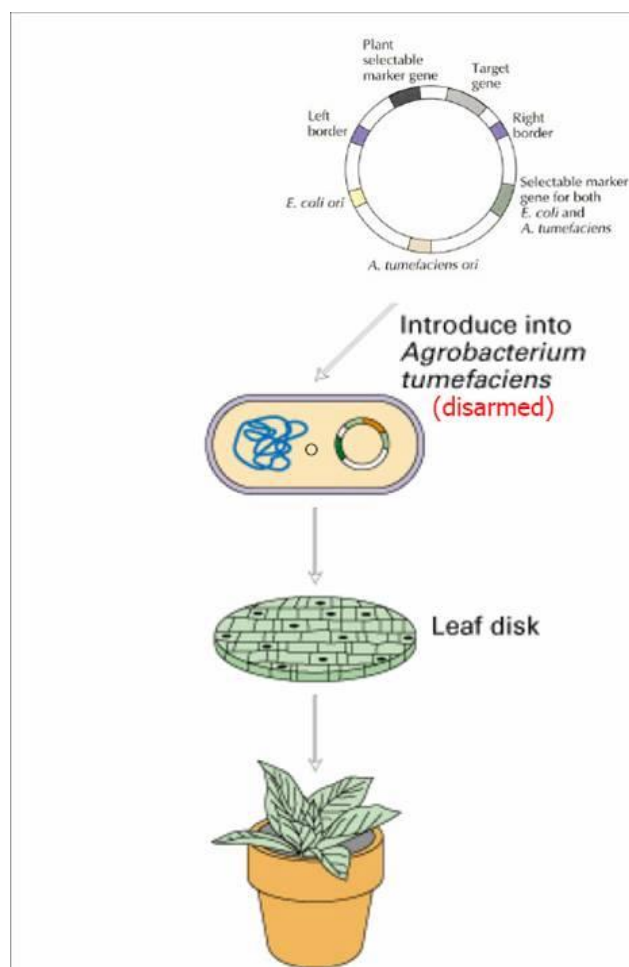


Obr.1: Binární plasmid se dvěma počátky replikace, pro *E.coli* a pro *A.tumefaciens*, místem vložení cílového genu a sekvencí selekčního markeru (Upraveno dle: <http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/g1/848.html>)

Cílovým genem může být přídatná genetická informace udělující rostlině nové fenotypové vlastnosti, jako např. schopnost detoxifikovat rtuťnaté kationty pomocí specifického enzymu. Jinou, stále častěji užívanou metodou může být vnesení genu pro tzv. antisense mRNA tvořící doublehelix s mRNA vytypovaného genu, jehož projev má

být utišen. Buňka takto vytvořenou dvoušroubovici mRNA rozpozná jako cizorodou a degraduje ji. Tím je zabráněno translaci do proteinu a fenotypovému projevu.

Na obr.2 je schématicky znázorněn postup vkládání cílové sekvence do zvoleného plasmidu, jeho propagace v bakteriální kultuře a následná transformace rostliny.



Obr.2: Schéma postupu transformace rostlin: Vytvořený plasmid s cílovou sekvencí je vnesen do kompetentního bakteriálního kmene, který je zbaven vlastních transformačních plasmidů. Následně je infikována rostlina. (Upraveno dle: http://www.gmo-safety.eu/en/gene_transfer/new_methods/35.docu.html)

2.4 Vnášení vektoru do rostlinné buňky

Přímá transformace rostlin pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* je jen jednou, i když vysoce účinnou, metodou přenosu namnoženého a sekvenačně nebo pomocí RFLP či RAPD metody ověřeného vektoru do cílové rostliny.

V Tab.2 jsou shrnuty další používané metody a stručný komentář k možnostem jejich využití:

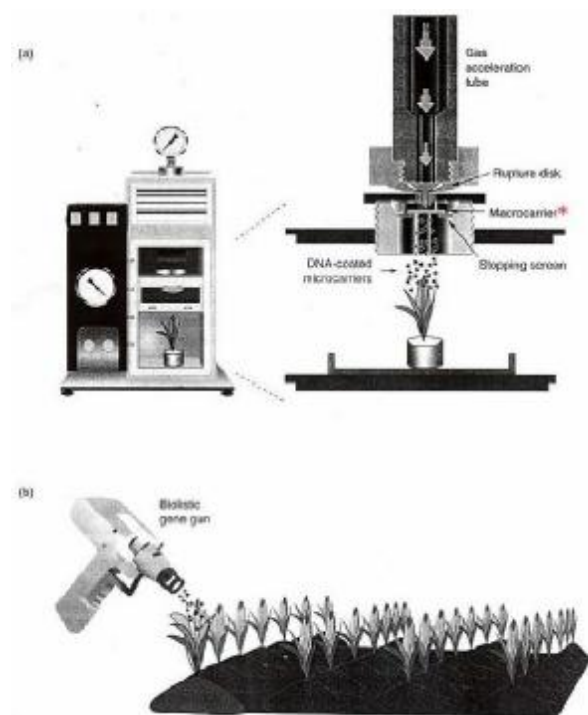
Tab.2: Metody používané pro vnášení plasmidu do cílových rostlinných buněk:

(Upraveno dle: www.volny.cz/xkostka/vyuka/tab.117.html)

METODA	KOMENTÁŘ
Ti plasmidem zprostředkovaný přenos	Vysoce efektivní, ne však u všech rostlin
Bombardování mikroprojektilem	Jednoduché a efektivní, použitelné pro široké spektrum rostlin
Virové vektory	Ne příliš efektivní
Přímý genový přenos do protoplastů rostlin	Pouze některé protoplasty jsou schopné regenerace a růstu v celou rostlinu
Mikroinjekce	Obtížné a pomalé
Elektroporace	Limitované na protoplasty schopné regenerace, tam efektivní
Liposomální fúze	Limitované na protoplasty schopné regenerace

Další možností vnesení požadované genetické informace do rostlin je mikroprojektilové bombardování. Bylo s úspěchem použito např. při vnášení genů nesoucích rezistenci k těžkým kovům do dřevin, jak popsal ve své studii např. Merkle (Merkle et al., 2006). Mikroprojektilové bombardování může být využito nepřímo, jako mechanismus povrchového poranění rostliny za účelem následného zvýšení efektivity stabilní transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Bidney et al., 1992). Častěji využívané je mikroprojektilové bombardování přímé, kdy jsou rostliny transformovány pomocí DNA nanesené na zlatých (kovových) mikroparticulách. Ty jsou urychlené pomocí přetlaku Helia a emitované přímo na listy rostlin, jejichž vrchní vrstvou pronikají a dostávají se do cytoplasmy buněk (Nigel et al., 2002)

V současné době se využívají dva typy mikroprojektilů, jak je znázorněno na obr.3.



Obr.3: Transformace rostlin pomocí mikroprojektilu: Kovové mikročástice nesoucí plasmid s cílovou sekvencí jsou pod tlakem vystřelovány z mikroprojektilu a pronikají do cytoplasmy nebo až do jádra rostliny (Upraveno podle: sky.scnu.edu.cn/.../chaper7/6.htm, http://www.kursus.kvl.dk/shares/plgenomics/plgenomics2006/_background/week39/Plante%20transformation.pdf)

2.5 In vitro kultivace a selekce

Na metody genového inženýrství navazují za účelem další propagace transformovaných rostlin metody in vitro kultur a posléze výsadby na chráněná pole. V současné době jsou v širším měřítku však využívány pouze pro udržení a množení druhů rostlin s požadovanými genotypovými vlastnostmi vyskytujícími se volně v přírodě. Přesto jsou do budoucna metodou nezbytnou pro úspěšné pěstování transformovaných rostlin.

První komerčně využitá mikropropagace (rozmnožování rostlin pomocí tkáňových kultur) proběhla na Novém Zélandě za účelem rozšíření území výskytu borovice montereyské (*Pinus radiata*). Ta v současnosti zaujímá kolem 30% z celkové zásoby dřeva Tasmánie. Metoda mikropropagace se dále uplatnila i v pěstování dalších dřevin jako je hybrid topolu a eucalyptu.

V současnosti jsou všechny mikropropagační programy velkého rozsahu limitovány na kultivaci rostlin z juvenilních pletiv z vrcholových nebo postraních pupenů. Uvedená metoda se potýká s několika relativně závažnými problémy.

Prvním z nich je vysoká laboratorní náročnost, která v konečném důsledku silně zvyšuje cenu takto získaných rostlin. Dále je pozorován pomalejší růst explantátů než semenáčků stejného druhu a rostliny mají tendenci rychleji stárnout.

S ohledem na výše zmíněné problémy je nutné dobře zvážit, která rostlina se skutečně hodí pro užití v mikropropagaci a nové rostliny jsou tak nalézány jen obtížně.

Ačkoliv uvedená metoda není zatím rutinně využívána, i přes řadu zmíněných nevýhod má zřejmě silný potenciál do budoucna, jak dokazují např. úspěšné pokusy s řadou ohrožených listnatých dřevin majících na našem území jen endemický výskyt (Malá *et al.*, 1999).

V oblasti pěstování jehličnanů jsou naděje vkládány do somatické emryogeneze, která nabízí téměř neomezenou možnost množení jedinců ze somatických pletiv vybraných semenáčků. Přesto, že tato metoda už má za sebou dlouhý vývoj, pěstování dospělých rostlin se zatím v masovém měřítku nedaří.

Převážná část biotechnologií v lesnictví je v současné době soustředěna do laboratoří s přidruženými pokusnými poli a stanicemi. Přesto je zřejmé, že stále přibývá nových komerčních aplikací v biotechnologiích, které se dostávají rychle do praxe (Wheeler, 2005).

3. Výsledky genového inženýrství lesních dřevin

Za pomoci genového inženýrství jsou vytvářeny transgenní stromy obsahující nové geny a vykazující tak jiné vlastnosti, než měla původní rostlina. Za pomoci řízené metageneze nebo technologie rekombinantní DNA jsou do nových rostlin přenášeny požadované geny v čase mnohem kratším, než by tomu bylo při metodách klasického křížení.

V současné době jsou technologie genového inženýrství lesních dřevin zaměřeny poněkud více na zvýšení jejich produktivity a to v mnoha dosti širokých aspektech jako jsou:

- a) Rychlý růst
- b) Zlepšení kvality dřevních vláken pro pozdější zpracování
- c) Rezistence ke znečištěnému prostředí a dále zvýšení schopnosti stromů odstraňovat škodliviny v prostředí
- d) Zvýšená rezistence ke škůdcům a nemocem
- e) Schopnost růstu i ve stresových podmínkách jako je sucho, zamokření, chlad či zasolená půda

Výsledkem jsou stromy s vyšší produkční kvalitou pěstované pro dřevozpracující průmysl a za účelem zlepšení ekologických podmínek znečištěného prostředí. Zároveň nedochází ke spotřebě původních lesních společenstev.

Transgenní rostliny jsou vytvářeny vnesením nového nebo pozměněného genu do rostlinné buňky. Pro možnost rychlé identifikace přítomnosti daného genu ještě před jeho fenotypovým projevem slouží markery vnášené zároveň s požadovaným genem. Takovým markerem může být např. sekvence obsahující nové restriční místo nebo kódující snadno identifikovatelný protein.

Prvním geneticky modifikovaným stromem byl topol (*Populus*) v roce 1986 a dosud zůstává nejvíce užívanou dřevinou pro genové modifikace (47% ze všech pokusů o transgenezi je provedeno na rodu *Populus*). Dále jsou v pokusných pracích a studiích využívány rody *Pinus* (19%), *Eucalyptus* (7 %), *Liquidambar* (5 %) a *Picea* (5 %). Stejně tak i pokusná pole jsou z největší části osázena uvedenými druhy (Wheeler, 2005).

3.1 Hybridní klony topolu jako model dřevin

V genovém inženýrství dřevin je dlouhodobě používán topol (*Populus*) jako modelová rostlina splňující řadu podmínek pro užití při genových manipulacích. Mezi ně patří jeho ekonomická využitelnost, dobrá manipulovatelnost in vitro, přístupnost pro transformaci pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a výskyt genů v přirozených populacích topolů nesoucích toleranci k herbicidům.

Genetické transformace topolů sahají do 80.let minulého století. První transformace topolu H11 (*P. trichokarpa* x *P. deltoides*) proběhla pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (kmen A281, A384). První transformace dřeviny agronomicky zajímavým genem nesoucím rezistenci k glyfosátovému herbicidu byla rovněž uskutečněna na topolu NC-5339 (*P. alba* x *grandidentata*) za pomoci bakterie *A. tumefaciens* (kmen C58/587/85). Další hybridizace se prováděly pomocí bakterií *A. rhizogenes*, kmen R1600 (Phythoud et al., 1987). Transformaci pomocí bakteriálních kmenů rodu *Agrobacterium* byly podrobeny různé druhy a variety topolu s různou úspěšností, která závisela především na vhodnosti kombinace hostitelských genotypů a následně na metodách kultivace a selekce in vitro.

Úspěšně byly postupně zavedeny genové konstrukty zvyšující toleranci topolů k herbicidu Roundup™. Avšak v současné době je další použitelnost takto

transformovaných rostlin pro další agronomické účely nejasná z důvodu problematické sociální přijatelnosti. Stejně tak aplikace geneticky transformovaných rostlin pro vylepšení kvantitativních znaků je problematická. Např. použití teorie metabolické kontroly pro modifikaci jediného genu z multilokusové dráhy je velmi omezené.

3.2 Modřín jako model jehličnanů

Pro podobně výhodné vlastnosti jaké má topol, začal být užíván modřín (*Larix* sp.) jako modelový zástupce jehličnatých dřevin. Je relativně snadné regenerovat modříný z různých zdrojů v podmínkách in vitro, stejně tak jsou i schopné podstoupit transformaci pomocí bakterie rodu *Agrobacterium*. Rovněž byl vytvořen transgenní modřín nesoucí toleranci k glyphosfátovému herbicidu (AroA) a gen pro rezistenci vůči hmyzím škůdcům (BT toxin) za použití *Agrobacterium rhizogenes*. Exprese AroA a BT toxinu byla potvrzena metodou Northern blotu a následná translace do proteinů EPSP a BT toxinů prokázala Western blotová analýza. Provedené pokusy ukázaly možnost stabilní transfekce modřínu evropského za pomoci genového přenosu z *Agrobacterium rhizogenes* (Kobliha, 2002).

3.3 Vývoj rezistence ke škůdcům a tolerance ke stresu

Lesní stromy jsou často velmi náchylné ke hmyzím škůdcům a křížení za účelem získání rezistence je velmi dlouhodobým úkolem. Biotechnologické metody introdukce rezistence ke hmyzím škůdcům využívají efektivní transformace a regenerace řady druhů

lesních dřevin. V současné době bylo transformováno několik druhů topolů geny nesoucími rezistenci k hmyzu, především k bekyni velkohlavé. Existuje několik zpráv o úspěšné transformaci topolů endotoxinovým (BT) genem pomocí bakterie *Bacillus thuringiensis*. BT gen byl dále zaveden i do hybridních topolů odvozených od *P. alba* x *P. grandidentata*, a *P. trichocarpa* za užití elektroporace. Tolerance byla získána hlavně ke hmyzu řádu Lepidoptera.

Stejný gen, BT, byl úspěšně zaveden i do Modřínu Evropského, vektorem byla opět bakterie *Agrobacterium rhizogenes*, dále pak do jilmu (*Ulmus "pioneer"*) a do *Liquidamber styracifolia*.

Funkce genu BT spočívá v jeho kódování malého polypeptidu, který inhibuje trávicí enzym Lepidopter. Jako první byl popsán u brambor a následně nalezen v litech řady dalších rostlin.

3.4 Rezistence k houbovým patogenům

V popředí zájmu genových manipulací jsou v současnosti dvě hlavní choroby. Jedná se o kaštanovou plíseň a grafiózu jilmů. Obě choroby devastují jak přirozené populace kaštanů a jilmů, tak i uměle pěstované. Ačkoli geny rezistence byly nalezeny u některých rostlinných druhů, nebyly objeveny u lesních dřevin. Přesto byly vyvinuty nové metody kontroly těchto patogenů. Kaštanová plíseň je způsobována virulentním kmenem *Cryphonectria parasitica*. Bylo zjištěno, že přítomnost dsRNA virového genomu v dané houbě způsobuje její hypovirulenci. Toho bylo využito při klonování hypovirulentního kmenu *C. parasitica*, kdy po zavedení dsRNA do virulentního kmenu houby došlo k utlumení její virulence a transformaci na nedevastující hypovirulentní formu. Uvedená

technologie představuje výhodnou metodu biologické kontroly různých patogenních druhů hub.

Jilmy (*Ulmus* sp.) představují důležitou součást lesního biotopu, hrází rybníků, větrolamů společenství alejí po celém světě. Grafioza jilmů zdevastovala jejich populace v celé Evropě a Severní Americe. Pokusy o křížení odolných asijských poddruhů s americkými jilmy selhaly v důsledku nízké genomové kompatibility a vysoké náchylnosti amerického jilmu k chorobě.

Pomocí ustanovených molekulárně-biologických metod byly nalezeny a izolovány geny odpovídající za rezistenci a schopnost obrany stromů proti grafioze. Ty byly následně vneseny do kandidátních druhů jilmů za získání požadovaného genotypu (Kobliha, 2002).

3.5 Rezistence k bakteriálním chorobám

Některé ekonomicky důležité dřeviny mají vysokou nákazu k bakteriální chorobě označované jako „crown gall disease“ způsobované kmeny bakterie *Acrobacterium tumefaciens*. Hybridní topoly odvozené od *P. sieboldii* x *P. grandidentata* mají mnoho ekonomicky důležitých kvalit jako je rychlý růst a dobré klíčící schopnosti, ale jsou náchylné k infekci. Z důvodu značné infekčnosti působí tato choroba značné ekonomické ztráty po celém světě.

Nový způsob kontroly choroby byl objeven v Japonsku, kdy vědci zavedly antisense oncogen ze samotného kmene bakterie *Acrobacterium*. Po zavedení antisense genu hormonu IAA a cytokininu z kmene *Agrobacterium* do hybridních topolů byla získána jejich úplná rezistence ke „crown gall“ chorobě (Kobliha, 2002).

3.6 Tolerance ke stresu

Fotochemické oxidanty včetně ozonu jsou významným stresorem ve velké části průmyslového světa. Toxicita ozónu je spojována s poklesem růstu, nárůstem mortality stromů a tím danými intra i interdruhovými změnami ve stavech lesů. Na buněčné úrovni se oxidativní stres projevuje destrukcí membrán, chloroplastů a následně i RUBISCa. To následně vede k další náchylnosti k napadení patogeny. Významným obraným mechanismem buňky je produkce „scavenegru“ volných radikálů a to zejména superoxidodismutázy (SOD) a glutathionreduktázy vracující do oběhu oxidovaný glutathion. Výzkumy probíhají hlavně na tabáku (*Nicotiana tabacum*) a bylo zjištěno, že transfekce genem pro chloroplastovou SOD zvýšilo odolnost vůči vlivu ozónu. Tím se otevírá cesta pro nový způsob transformace lesních dřevin za účelem zvýšení jejich tolerance oxidativního stresu.

3.7 Modifikace ligninu

Genové inženýrství zlepšující vlastnosti ligninu pro průmyslové využití je v současné době velmi slibnou metodou umožňující zvýšit efektivitu zpracování dřeva.

Potencionální spolupráce genového inženýrství a průmyslu spočívá převážně na zefektivnění využití dřevní drtě a následně jejího užití v papírenství, které závisí na efektivitě oddělení ligninu a celulózy. Jednou z možností jak zlepšit efektivitu zpracování dřeva je redukce obsahu ligninu ve dřevě nebo změna jeho kvality. Právě genetické manipulace s enzymy v biosyntetické dráze ligninu jsou velmi zajímavou možností pro zlepšení zpracovatelnosti dřeva. Obecně lesní dřeviny obsahují kolem 15-30% ligninu

v suché váze dřeva, který se po ekonomicky i časově velmi náročném oddělení stává pouze dřevním odpadem. Druhy dřevin s redukováným množstvím ligninu nebo jeho snazší odstranitelností se tak stanou velice ekonomicky i ekologicky výhodnou surovinou.

Biotechnologie se v současnosti zaměřují na transformaci guaiacyl ligninu do guaiacyl-syringylového typu. Geny kódující bi-specific O-methyltransferase (Bi-OMT) a 5-hydroxylázu ferulové kyseliny (FASH) jsou inkorporovány do dráhy syntézy guaiacyl ligninu.

To zahrnuje klonování těchto daných genů z rostlin, u nichž se vyskytují, jako zdrojová rostlina byl vybrán topol (*Populus tremuloides*) a jsou následně přeneseny v podobě cDNA do cílových jehličnanů, kde se v přirozené formě nevyskytují. V současné době se však genová modifikace ligninu potýká s řadou překážek jako je ne zcela jasné začlenění nově vložených genů do správných míst dráhy syntézy ligninu, dále pak se vyskytují komplikace spojené s nepříliš vhodnými způsoby genového přenosu a následné obtížné regeneraci rostlin. Prozatím jediným úspěšně modifikovaným typem jehličnanu zůstává modřín.

Oproti tomu, výraznějších úspěchů je dosahováno při redukci obsahu ligninu pomocí transformace rostlinných buněk. Pro úspěšné dosažení cíle stačí úspěšné klonování a zavedení jednoho nového genu do rostliny. Úspěchu je dosahováno i na základě velké přirozené tolerance nižších množství ligninu ve dřevě bez negativních dopadů na růst a vývoj dřeviny (Převzato z Kobliha, 2002)

Genetická redukce ligninu může být dosažena utlumením exprese genu pro enzym zodpovědný za syntézu prekurzorů polymerace ligninu. U kukuřice bylo zjištěno, že snížení produkce ligninu až na 50% původního množství neovlivňuje život rostliny.

Jak vyplývá z výše zmíněného, technika utišování genové exprese pomocí siRNA má velké pole působnosti v rostlinné biologii a to zejména tam, kde je potřeba jemně regulovat množství vznikajícího proteinu a „knockout“ genu by byl na rozdíl od jeho „knocdownu“ pro rostlinu fatální.

3.8 „Phytoremediace“ jako způsob pro zlepšení ekologických kvalit prostředí

Pojem „Phytoremediace“ označuje schopnost rostlin vstřebávat, degradovat a odstraňovat škodliviny z prostředí, zejména pak z půdy a vody. Mezi používané rostliny patří převážně byliny jako je slunečnice, kakost a v současnosti už řada dalších druhů bylin. Jejich nevýhodou je však nízká produkce biomasy a tím i pomalejší odstranění škodlivin z prostředí. Jako velmi vhodné se pro rekultivaci oblastí zamořených převážně těžkými kovy ukazují lesní dřeviny (Merkle, 2006). Jejich výhodou je velká produkce biomasy schopné zachycovat nebezpečné sloučeniny a přeměňovat je na méně toxické. Výhodou je i vyvinutý kořenový systém pronikající do hloubky zamořené půdy. Modelovým příkladem konstrukce transgenní dřeviny s remediačním potenciálem může být izolace bakteriálního genu MerA, který umožňuje bakteriím přeměňovat rtuťnatý ion na méně toxickou formu elementární rtuti. Jako první byl tento gen vnesen do rostlin rodu *Arabidopsis* (Rugh et al., 1996), kde byla ověřena rezistence rostliny k rtuťnatým iontům. Následně byl modifikovaný gen vnesen do žlutého topolu (*Liriodendron tulipifera*) pomocí metody mikroprojektilového bombardéru a získaná tak rezistentní dřevina (Rugh et al., 1998). Avšak žlutý topol není adaptován pro růst v zamokřených oblastech, kde kontaminace rtuť bývá nejvýraznější. Proto byl pro další vývoj zvolen *Populus*, rychle

rostoucí lesní druh snášejí podmáčené půdy. Populus byl už dříve už dříve popsán jako druh vhodný pro detoxifikaci prostředí a redukci půdní eroze (Dix et al., 1997). Navíc byl Populus popsán jako vhodný pro in vitro propagaci a užití v genovém inženýrství (Han et al., 2000). Merklova studie (Merkle, 2006) prokázala možnost konstrukce transgenní dřeviny (*P.deltoides*) za užití techniky transformace listových explantátů pomocí kmenu *Agrobacterium*. Takto vytvořené dřeviny byly vsazeny na stanoviště zamořená rtutí, kde nevykazovaly změny růstu v porovnání s dřevinami na nezamořených oblastech a analýza obsahu rtuti v jejich listech prokázala nárůst o 1/3 – 1/2 v porovnání s kontrolním souborem netransformovaných rostlin. Listy obsahující takto absorbovanou rtuť mají dále schopnost ji odpařit, což nebylo pozorováno u kontrolního souboru netransformovaných rostlin. Detoxifikace po zamoření rtutí navázanou na metylovou skupinu (MeHg), která je pro organismy ještě více toxická než rtuťnaté ionty byla vyzkoušena na modelu transgenní rostliny rodu *Arabidopsis* po vnesení bakteriálního genu *merB* umožňujícího konverzi MeHg na rtuťnatý kation (Bizily et al., 1999). Pokusy s kotransfekcí obou genů *merA* i *merB* ukázaly, že takto modifikované rostliny vykazují vyšší toleranci k prostředí zamořeném metylrtutí (Bizily et al., 2000). Topoly transformované geny *merA/B* prokázaly vyšší účinnost přeměny metylrtuti na elementární výparu schopnou rtuť než dřeviny nesoucí pouze jeden z genů (Lyyra et al., in preparation). Obdobné pokusy probíhají v současné době i s dřevinami nesoucími gen pro detoxifikaci území zamořených arzenem (γ -glutamylsyntetáza, γ ESC) za využití topolů (Merkle, 2006).

3.9 Výsadba geneticky modifikovaných stromů

V současné době nejsou publikovány žádné zprávy o rozsáhlejších plochách osazených geneticky modifikovanými stromy. Výjimku tvoří snad malé pole transgenních hybridů

topolů v Iowě (USA). A právě tyto polní testy jsou klíčové pro zvážení skutečné použitelnosti transgenních dřevin při pěstování ve volné přírodě, protože jak známo, podmínky v pěstebních sklenících se od skutečných polních značně odlišují.

Důvodem, proč nejsou pole zakládána je zřejmě řada opatření pro nakládání s GMO a jejich výsadby do přírody, byť na chráněné místo. V současné době se genetickými modifikacemi lesních dřevin zabývá 35 zemí, z nichž 15 se omezuje pouze na laboratorní výzkum a výsadbu do skleníků, 16 pak oznámilo existenci pokusných polí. Tato pokusná pole ve volné přírodě jsou většinou velmi malá (s 12 – 2850 vysazenými rostlinami) a mají jen krátké trvání, většinou jsou likvidována před produkcí pylu nebo semenného materiálu. Komerčně využívané plantáže transgenních dřevin jsou dosud výhradou Číny (Wheeler, 2005).

Hlavními argumenty proti pěstování transgenních rostlin jsou:

- 1) nebezpečí kontaminace přirozených populací pylem transgenních rostlin
- 2) Únik transgenních rostlin do okolního prostředí a tím kontaminace přirozených stanovišť
- 3) Transgenní rostliny nesoucí určitou selekční výhodu, jako např. jedním genem podmíněná rezistence proti škůdci, mohou velmi snadno zvítězit v konkurenci přirozených společenstev a tím postupně zcela převládnout

Aby nebyly dané důvody odmítání polních experimentů naplněny, jsou transgenní rostliny dále upravovány např. současným vnášením genů pro sterilitu, pro prodloužení juvenilní periody bez kvetení a dalšími, což však velmi znesnadňuje práci.

Jako nejslibnější se jeví pokusy se zavedením genů pro samčí sterilitu u běžných druhů a pro sterilitu samčí i samičí u druhů s lehce šířitelnými semeny.

Další zkoušenou metodou jsou inducibilní promotory genů pro rezistenci proti škůdcům, což se jeví rovněž jako možná strategie neohrožující ekologii volně rostoucích druhů.

4. Diskuse

Genové inženýrství je mladým, rychle se rozvíjejícím oborem ve všech odvětvích biologie. V rostlinných technologiích se již setkáváme s řadou geneticky pozměných plodin nesoucích rezistenci vůči patogenům, což prodlužuje jejich trvanlivost, přinášejících větší úrodu i za méně příznivých podmínek, syntetizujících aminokyseliny s potenciálem pokrýt jejich nedostatek v určitých oblastech. Připravují se plodiny obsahující antigeny jako očkovací látky a velká škála dalších.

Obdobný rozvoj zaznamenává i genové inženýrství lesních rostlin, přestože příprava transgenních dřevin je ztěžována pomalejším růstem explantátů ve srovnání s nedřevnatějícími rostlinami a delší časovou škálou do projevu plného fenotypu a konečného uplatnění se vlivem delší doby do dosažení dospělosti u dřevin.

Jsou konstruovány dřeviny nesoucí rezistenci k patogenům, čímž snižují zátěž prostředí umělými fungicidy a insekticidy. Pomocí transgenních jilmů Amerických byl znovu osídlen biotop východního lesa v USA, stejně jako byl opětovně rozšířen Americký kaštan na území, ze kterých již pod silným tlakem patogenů ustoupil (Kobliha, 2002).

Vnesení genů rezistence vůči herbicidům umožní značné zvýšení produkce ekonomicky zajímavých dřevin, čímž nejen klesnou ceny komodit, ale bude umožněn přechod k těžbě téměř výlučně na pěstebních polích. To umožní zachování původních lesů a obnovu jejich ekologické rovnováhy.

Genové inženýrství v oblasti lesních dřevin dále umožňuje přímé zlepšování životního prostředí a vlivem schopnosti některých modifikovaných dřevin vstřebávat, detoxifikovat a odstraňovat těžké kovy z půdy a vody, v budoucnosti snad i snižovat dopad skleníkového efektu vlivem zvýšené spotřeby oxidu uhličitého.

5. Závěr

Ekologický i ekonomický význam genového inženýrství a biotechnologií v lesnictví má enormní potenciál. Rozšíření dřevin nesoucích rezistenci k herbicidům může jen v USA ušetřit ročně až 1 billion \$.

V současnosti je na biotechnologie útočeno pro jejich potencionální zdravotní a environmetální riziko. Avšak zdá se, že aplikace biotechnologií do lesního inženýrství postrádá určité aspekty týkající se zavádění biotechnologií do jiných odvětví biologie. Např. přímý vliv na zdraví a prostředí se zdá být mírný až snad zanedbatelný. Jako jedno z hlavních se jeví riziko poškození životního prostředí vlivem přenosu cizích genů do přirozených společenstev. Jednoduchým řešením zde může být oddálení nebo znemožnění kvetení stejně jako např. pylová sterilita. Riziko je možné dále eliminovat výsadbou geneticky modifikovaných dřevin mimo areál jejich přirozeného výskytu a tím zabránit možné hybridizaci s domácí populací.

Pro možnost trvalého čerpání stále se rozšiřující škály výhod plného rozvoje genetického inženýrství je zároveň nutné dbát na nedotknutelnost ekologické rovnováhy přirozených společenstev.

6. Reference:

- 1) Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L, Huffman G.: Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol.* 1992 Jan;18(2):301-13.
- 2) Bizily SP. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology* 18 (2000) 213–217.
- 3) Bizily SP. Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1999) 96 6808–6813.
- 4) Chilton, M.-D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E.W.: Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: The Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell*, 11, 1977, p. 263 – 271.
- 5) Koblíha J.: Modern forest tree breeding in the light of foreign experiences. Study texts, Faculty of forestry, Czech university of agriculture in Prague, 2002, 191p.
- 6) Lyyra, S., A. Lima and S.A. Merkle. In vitro regeneration of *Salix nigra* via adventitious shoots. *Tree Physiol.* (in press).
- 7) Malá J., Cvrčková H., Máchová P. Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 1999, č. 04
- 8) Merkle, S.A. Engineering forest trees with heavy metal resistance genes for phytoremediation. *SILVAE GENETICA*, 2006, VOL 55; ISSU 6, pages 263-268

- 9) Nigel J. Taylor, Claude M. Fauquet. Microparticle Bombardment as a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology DNA and Cell Biology. December 1, 2002, 21(12): 963-977.
- 10) Rugh, C., Dayton Wilde, H., Stack, N., Thompson, D.M., Summers A.O., and Meagher, R.B., (1996): Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:3182-3187.
- 11) Rugh, Clayton L., Wilde, H. Dayton, Stack, Nicole M., Thompson, Deborah Martin, Summers, Anne O., and Meagher, Richard B. (1996). Mercuric ion reduction and the resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial mer A gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93 (8), 3182-3187.
- 12) Wheeler, N.: Forest biotechnology (executive summary), 2005, FAO, 137p.
- 13) Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, C., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I.: Engineering the Provitamin A (β -Carotenoid-free) Rice Endosperm. Science, 287, 2000, p. 303 – 305.