

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Bc. Jan Vajd'ák

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Fenotypizace transgenního jarního ječmene
SCLW-GP-PHYA pěstovaného na dvou lokalitách
v České republice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| Autor: | Bc. Jan Vajd'ák |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2016 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Jan Vajdák |
| Název práce | Fenotypizace transgenního jarního ječmene SCLW-GP-PHYA pěstovaného na dvou lokalitách v České republice |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů Univerzita Palackého v Olomouci |
| Vedoucí práce | Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2017 |

Abstrakt

Ministerstvo životního prostředí ČR udělilo v roce 2012 Univerzitě Palackého v Olomouci povolení k uvádění geneticky modifikovaného jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou produkcí enzymu fytasy do životního prostředí. Tento transgenní ječmen má oproti běžně pěstovaným odrudám ječmene zvýšenou produkci enzymu fytasy v zru. Zvýšená aktivita fytasy umožňuje větší dostupnost a využitelnost fosforu a kationtů, například vápníku, zinku, železa, které z kyseliny fytové uvolňuje enzym fytasa. Transgenní a netransgenní linie ječmene byly pro polní pokusy vysety v České republice na dvou lokalitách, na lokalitě Olomouc a lokalitě Lukavec. Ve sklizených obilkách byla měřena aktivita fytasy a množství volného P_i . Výsledky ukázaly, že rozdíl mezi aktivitou fytasy a množstvím volného P_i u transgenních linií generace T8 a T9 a netransgenních odrud Golden Promise není statisticky průkazný. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn ani mezi lokalitami.

| | |
|---------------|--|
| Klíčová slova | Kyselina fytová, Fytasa, Transgenní ječmen |
| Počet stran | 69 |
| Počet příloh | 2 |
| Jazyk | český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Jan Vajdák |
| Title of thesis | Phenotyping of transgenic barley SCLW-GP-PHYA grown at two localities in the Czech Republic |
| Type of thesis | Dissertation |
| Department | Laboratory of Growth Regulators Palacký University Olomouc |
| Supervisor | Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D. |
| The year of presentation | 2017 |

Abstract

In 2012, Ministry of Environment of the Czech Republic granted Palacký University in Olomouc a license for introducing genetically modified spring barley SCLW-GP-PHYA with increased phytase enzyme into the environment. The transgenic barley shows increased production of phytase in seed, in comparison with commonly grown varieties of barley. Increased phytase activity enables greater availability and usability of phosphorus and cations such as calcium, zinc, iron that is cleaved from the molecule of phytic acid by phytase molecule. The transgenic and the non-transgenic barley lines were sown at field trials in the fields of two sites in the Czech Republic, in the locality in Olomouc and the locality in the village of

Lukavec. Phytase activity and P_i were measured in the harvested grains. The results showed that statistically there was no significant difference between transgenic line soft T8 and T9 generation and nontransgenic variety Golden Promise. A statistically significant difference was not discovered even between localities.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | Phytic acid, phytase, transgenic barley |
| Number of pages | 69 |
| Number of appendices | 2 |
| Language | Czech |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, s pomocí vedoucího práce a citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování vedoucímu diplomové práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D., za její obětavost, rady a pomoc při řešení mého tématu. Mé poděkování patří také Mgr. Tomáši Vlčkovi za rady a praktickou výpomoc s laboratorními experimenty.

Obsah

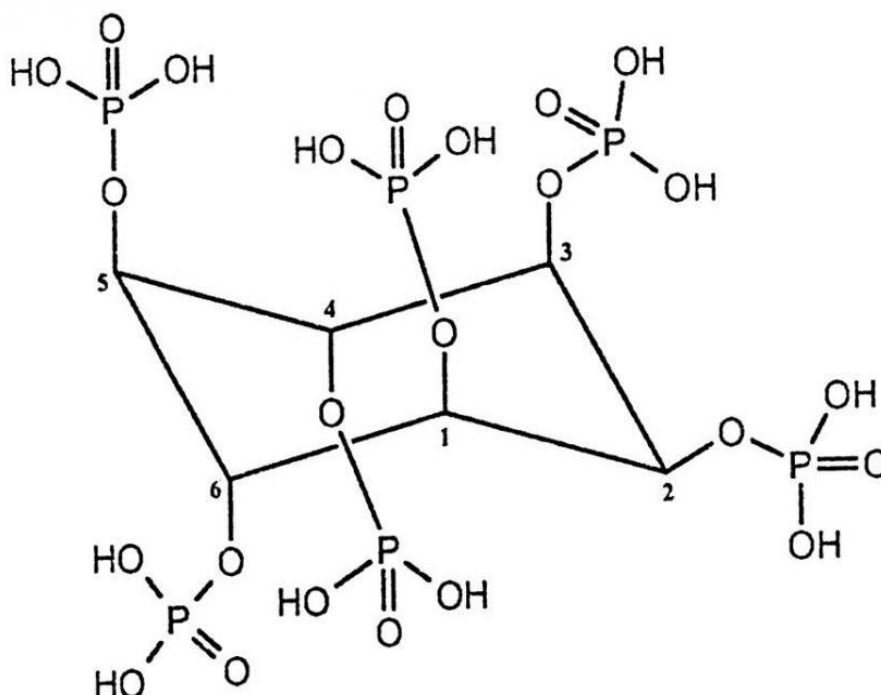
| | |
|--|-----------|
| 1. Současný stav řešené problematiky..... | 10 |
| 1.1.1. Kyselina fytová | 10 |
| 1.1.2. Fytasa | 13 |
| 1.2. Transformace rostlin | 16 |
| 1.2.1. Definice..... | 16 |
| 1.2.2. Metody transformace rostlin | 16 |
| 1.3. Transgenní ječmen se zvýšenou aktivitou fytasy..... | 18 |
| 1.3.1. Úvod | 18 |
| 1.3.2. Fytasa phyA | 18 |
| 1.4. Zákony a regulace genetiky modifikovaných organismů | 18 |
| 1.5. Obecná charakteristika ječmene | 20 |
| 1.5.1. Charakteristika jednotlivých genotypů | 20 |
| 2. Cíle práce | 23 |
| 3. Materiál a metody..... | 24 |
| 3.1. Experimentální rostlinný materiál | 24 |
| 3.2. Charakteristika lokalit pěstování | 24 |
| 3.2.1. Olomouc | 24 |
| 3.2.2. Lukavec..... | 26 |
| 3.3. Polní pokusy..... | 26 |
| 3.3.1. Polní pokusy, lokalita Olomouc 2015..... | 26 |
| 3.3.2. Polní pokusy, lokalita Lukavec 2015 | 27 |
| 3.4.1. Metodika polního pokusu pro Olomouc | 28 |
| 3.4.2. Metodika polního pokusu pro Lukavec..... | 30 |
| 3.5. Použité přístroje | 32 |
| 3.6. Seznam použitých chemikálií..... | 32 |
| 3.7. Stanovení volného P_i | 33 |
| 3.7.1. Chemikálie použité při stanovení volného P _i | 33 |
| 3.7.2. Pracovní postup stanovení obsahu P _i v biologickém materiálu | 34 |
| 3.8. Stanovení aktivity fytasy | 35 |
| 3.8.1. Chemikálie a roztoky pro měření aktivity fytasy | 35 |
| 3.8.2. Příprava roztoků pro měření aktivity fytasy..... | 36 |
| 3.8.3. Pracovní postup stanovení aktivity fytasy v biologickém materiálu..... | 36 |
| 3.8.4. Detekce genu <i>phyA</i> pomocí PCR u jarních ječmenů linie SCLW-GP-PHYA..... | 38 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4. | <i>Výsledky</i> | 39 |
| 4.1. | Stanovení obsahu P_i v obilkách ječmene | 39 |
| 4.1.1. | Lokalita Lukavec 2015 | 39 |
| 4.1.2. | Lokalita Olomouc 2015 | 40 |
| 4.1.3. | Rozdíl obsahu volného P_i na lokalitách Olomouc a Lukavec v roce 2015 | 42 |
| 4.2. | Stanovení aktivity fytasy v obilkách ječmene | 45 |
| 4.2.1. | Lokalita Lukavec 2015 | 45 |
| 4.2.2. | Lokalita Olomouc 2015 | 47 |
| 4.2.3. | Rozdíl aktivity fytasy na lokalitách Olomouc a Lukavec 2015 | 49 |
| 4.2.4. | Korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i | 51 |
| 4.3. | Detekce genu <i>phyA</i> u jarních ječmenů linie SCLW-GP-PHYA | 53 |
| 4.3.1. | Detekce genu <i>phyA</i> u transgenních linií jarního ječmene | 53 |
| 4.3.2. | Detekce genu <i>phyA</i> u DH linií jarního ječmene | 54 |
| 5. | <i>Diskuse</i> | 55 |
| 6. | <i>Závěr</i> | 58 |
| 7. | <i>Seznam zkratk</i> | 59 |
| 8. | <i>Seznam použité literatury</i> | 60 |
| 9. | <i>Přílohy</i> | 66 |
| 9.1. | Výsledky statistických testů | 66 |
| 9.2. | Plánky polních pokusů | 68 |
| 9.2.1. | Plánek polního pokusu v Olomouci | 68 |
| 9.2.2. | Plánek polního pokusu v Lukavci | 69 |

1. Současný stav řešené problematiky

1.1.1. Kyselina fytová

Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát (InsP6) je cyklický alkohol s esterově vázanými fosfátovými skupinami. Pro InsP6 je zaveden obecný název kyselina fytová, viz obrázek 1.

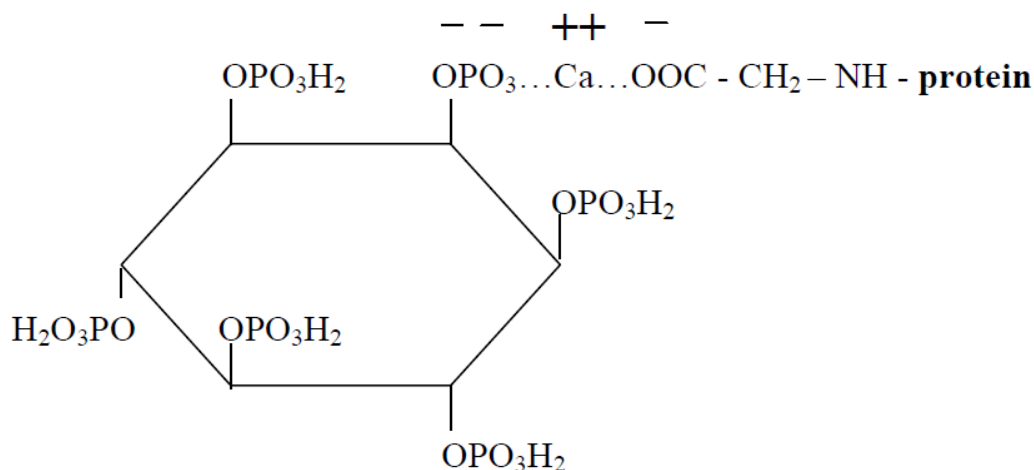


Obrázek 1. Molekula kyseliny fytové

(Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1733&typ=html)

Kyselina fytová je ester myo-inositolu a kyseliny fosforečné. Kyselina fytová je hlavním zdrojem fosfátu v rostlinných semenech, zbylou potřebu fosfátu pokrývají anorganické fosfáty a fosfáty, které jsou vázány v buněčných strukturách, jako jsou například nukleové kyseliny, fosforylované proteiny, ale také lipidy a sacharidy. Například v zrně ječmene se přibližně 65 % fosfátu vyskytuje v podobě solí kyseliny fytové (Vaculová a kol., 2012). Kyselina fytová se vyskytuje v rostlinách, nejvíce je zastoupena v zrnech obilnin a olejnin. Mezi rostliny, které mají největší množství

kyseliny fytové patří: pšenice (0,62–1,35 %), hrách (1,20 %), sója (1–1,4 %), žito (0,97 %), ječmen (0,97–1,16 %), kukuřice (0,89–0,99 %), oves (0,79–1,01 %), rýže (0,34–0,89 %), fazole (0,55–0,51 %), (Reddy a kol., 1982). Například ze zrna kukuřice se celosvětově vyprodukuje přibližně 4,8 milionu tun kyseliny fytové ročně (Shi a kol., 2007). Celkový obsah kyseliny fytové kolísá. Nejvíce je ovlivněn odrůdou a klimatem, dále může být ovlivněn typem půdy, ale také umělými hnojivy. Obsah kyseliny fytové v endospermu je malý, naopak v povrchových vrstvách semene je obsah kyseliny fytové vyšší. Kyselina fytová má anti-nutriční účinky a inhibuje trávicí enzymy, jako je trypsin (Dhole a Reddy, 2015). Mezi další enzymy trávicího traktu, které kyselina fytová inhibuje, patří například pepsin a α -amylasy (Deshpande a Cheryan, 1984). Anti-nutriční účinky kyseliny fytové způsobují u nepřežvýkavých zvířat neschopnost hydrolyzovat při trávení vazbu mezi fosfátem a myo-inositolem. V důsledku toho dochází ke sníženému vstřebávání fosfátu (Guggenbuhl a kol., 2012). Kyselina fytová také interaguje s bazickými aminokyselinami, jako je například arginin lysin a histidin, a také s proteiny, které se vyskytují v semenech rostlin (Shi a kol., 2007). Je známo, že kyselina fytová tvoří komplexy s proteiny, vazbu mezi proteinem a kyselinou fytovou umožňují dvojmocné kationty nejčastěji Ca^{2+} , viz obrázek 2. Tyto interakce ovlivňují strukturu proteinů (Kies a kol., 2006). Je-li v krmné dávce zvýšený obsah Ca, snižuje se rozklad kyseliny fytové v důsledku tvorby nerozpustného fytátu vápenatého. Naopak při snížení obsahu Ca v krmné dávce dochází k lepší stravitelnosti kyseliny fytové (Sandberg a kol., 1993). Pro lepší stravitelnost fosfátů z kyseliny fytové slouží vitamín D₃, neboť tento vitamín je prekurzor hormonu kalcitriolu, který reguluje vstřebávání fosfátů v gastrointestinálním traktu (Edwards a kol., 1993). Kyselina fytová může být důležitá také pro lidské zdraví, jako antioxidant a protinádorové činidlo (Ma a kol., 2013). Antioxidační vlastnost kyseliny fytové je dána především tím, že kyselina fytová váže železo a zabraňuje, aby se účastnilo Fentonovy reakce, při které vznikají hydroxylové radikály. Hydroxylové radikály se řadí mezi reaktivní formy kyslíku, které poškozují všechny biologicky významné molekuly, jako například molekuly DNA. Při vážném poškození DNA může dojít k zahájení procesů kancerogeneze, a proto může kyselina fytová bránit vzniku nádoru. Kromě toho, že kyselina fytová může bránit biologické molekuly před reaktivními formami kyslíku, také může chránit skladované potraviny před oxidačním stresem (Marounek, 2004).



Obr. 2 Interakce kyseliny fytové s proteiny

(Převzato z Marounek, 2004)

Soli kyseliny fytové jsou fytáty (Cheryan, 1980). Fytát je sůl, která se skládá z myo-inositolevého prstence (myo-inositol - 1,2,3,4,5,6 hexakis dihydrogenfosfát) s navázanými minerálními kationty, především hořčíku a draslíku. Fytát, který se nachází v semenech rostlin, je primárním zásobním zdrojem fosfátu a inositolu. Z celkové hmotnosti semene tvoří fytáty 3–6 %. Okolo 70 % fosfátů, které se nacházejí v semenech, se vyskytuje ve formě fytátů (Brinch-Pedersen a kol., 2002). Koncentrace fytátů v semenech může mít vliv na celkovou velikost semen (Dhole a Reddy, 2015). Fytáty jsou v semenech uloženy do globoidů, které jsou součástí vakuol lokalizovaných převážně v aleuronové vrstvě pšenice, ječmene, rýže a u kukuřice v embryu. Zásobní vakuoly se skládají z matrixu, krystaloidů a globoidů. Hlavní částí je matrix, který obklopuje krystaloidy a globoidy. Celkově fytáty představují 40 % obsahu globoidů. Ty mají u ječmene průměr 1–2 μm . Fytáty patří mezi nejhojnější zdroje organického fosforu v půdách, kde musí být rozloženy fytasovými bakteriemi (Jiang a kol., 2001).

Kyselina fytová je velmi silná 12sytná kyselina s velkou schopností tvořit komplexy s různými kationty. Kationty jako například vápník, hořčík, draslík, železo, zinek jsou důležitými prvky pro tvorbu fytátových komplexů. Tyto kationty, které se vyskytují v potravě, jsou důležitými ukazateli její nutriční hodnoty. Nízká nutriční hodnota potravy je způsobena tím, že záporně nabitý fosfát v kyselině fytové se silně váže na kovové kationty Ca, Fe, K, Mg, Mn a Zn, se kterými tvoří soli (Bohn a kol., 2008), (Ma a kol., 2013). Fytát může mít negativní vliv na zdraví člověka.

V rozvojových zemích dochází ke snížení schopnosti vstřebávání zinku z potravy, tvořené výhradně obilovinami, až o 80 % z celkového množství zinku, který se v potravě nachází. Silné vazby mezi molekulami zinku a fosfátů z kyseliny fytové v semenech pšenice mají za následek snížení biologické dostupnosti zinku pro lidské tělo. Nedostatek zinku v potravě způsobuje poškození imunitního systému, což způsobuje nižší vzrůst dětí a minerální podvýživu (Wang a kol., 2015). Kyselina fytová se v potravinách vyskytuje běžně. Mezi potraviny, které obsahují kyselinu fytovou patří například: pšeničná mouka celozrnná (1,07 % sušiny), žitná mouka celozrnná (0,72 % sušiny), ovesné vločky (0,83 % sušiny), pohanka neloupaná (1,08 % sušiny), jáhly (0,28 % sušiny), chléb celozrnný pšeničný (0,30–0,40 %), luštěniny (0,50–1,50 %) (Špaňo, 1992), (Prošková, 1998).

1.1.2. Fytasa

Pro uvolnění fosfátu z kyseliny fytové slouží specifický enzym myo-inositol hexakisfosfátfosfohydrolasa fosfatasa, který je nazýván fytasa. Fytasa hydrolyzuje fytát na molekulu myo-inositolu a na šest molekul volného fosfátu (Yao a kol., 2012), (Dai a kol., 2011). Hydrolýza fosfátových esterů je považována za kritický proces v energetickém metabolismu a při metabolické regulaci rostlinných buněk.

Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry, zkráceně IUPAC) rozdělila fytasy do tří hlavních skupin podle toho, při kterém uhlíku v myo-inositolovém prstenci fytátu dochází k zahájení hydrolýzy pomocí enzymu fytasy.

- 1) 3-ftyasy (myo-inositolhexakisfosfát-3-fosfohydrolasy, EC 3.1.3.8)
- 2) 6-ftyasy (myo-inositolhexakisfosfát-6-fosfohydrolasy, EC 3.1.3.26)
- 3) 5-ftyasy (myo-inositolhexakisfosfát-5-fosfohydrolasy, EC 3.1.3.72)

Fytasy se dále mohou dělit na základě jejich pH optima do dvou hlavních skupin: kyselé fytasy a alkalické fytasy. Mezi kyselé fytasy můžeme zařadit fytasy z houbového organismu *Aspergillus niger* a mezi alkalické fytasy patří například fytasy vyskytující se v *Lilium longiflorum* (Lilie dlouhokvětá) (Barrientos a kol., 1994).

V přírodě můžeme nalézt tři základní zdroje fytasy (Marounek, 2004), mezi které patří:

- 1) Mikrobiální fytasy
- 2) Fytasy, které se vyskytují ve sliznici střev v gastrointestinálním traktu nepřežvýkavých zvířat
- 3) Rostlinné fytasy

Mikrobiální fytasy nejčastěji najdeme v houbových organismech, jako jsou například: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora thermophila*, *Escherichia coli* (Wyss a kol., 1999). Výskyt enzymů fytasy a kyselých fosfatů byl popsán v řadě semen, včetně obilovin. Fytasa, která se nachází v semenech rostlin, je důležitá pro klíčení. Při něm dochází k buněčné proliferaci, kdy rostlina potřebuje velké množství fosfátu. Fytasy jsou jediné fosfatasy, které jsou schopné uvolnit fosfatové skupiny z kyseliny fytové (Holme a kol., 2012). Aktivita fytasy je závislá na pH prostředí. Rostlinné fytasy mají pH optimum 5,5 a mikrobiální fytasy mají pH optimum 3,5. Některé fytasy mohou mít i dvě pH optima, například fytasa PhyA z *Aspergillus niger* vykazuje dvě pH optima 3,5 a 5,5 (Kim a kol., 2006).

Nepřežvýkavá zvířata, jako jsou vepří, drůbež, ryby mají v gastrointestinálním traktu nízkou aktivitu endogenní fytasy, která by jim pomohla s trávením fytátu (Aureli a kol., 2011). Během přijímání potravy dochází ke snížení pH v žaludku. Při nízkém pH v žaludku dochází k velkému snížení aktivity fytasy, proto fytasa přijatá potravou u nepřežvýkavých zvířat nemá téměř žádnou funkci při trávení fytátu (Brejnholt a kol., 2011). Nejaktivnější trávení fytátu v gastrointestinálním traktu probíhá ve sliznici tenkého střeva na jejím vnitřním povrchu v mukose a jejím kartáčovém lemu, protože se zde vyskytuje velké množství mikroorganismů. Největší aktivita fytasy byla pozorována u potkana. U člověka nemají střevní fytasy téměř žádný význam, protože aktivita fytasy v tenkém střevě u člověka je až 30krát nižší, než aktivita fytasy v tenkém střevě u potkana (Cooper a Gowing, 1983). Nízká aktivita endogenní fytasy u nepřežvýkavých zvířat má několik negativních důsledků:

1) Fosfáty, které se neuvolní z kyseliny fytové obsažené v krmivu zvířat, končí v jejich exkrementech. Například v exkrementech vepřů je obsaženo kolem 20 % fosfátů, které pochází z kyseliny fytové, (Dusková a kol., 2011). Zvýšené množství fosfátů, které se nachází v exkrementech nepřežvýkavých zvířat, může způsobit vážné znečištění životního prostředí (Matsuno a Fujimura, 2014). Laboratorní studie prokázaly, že transgenní vepři, kteří mají zvýšenou expresi bakteriální fytasy v gastrointestinálním traktu, vylučují méně fosfátu v kejdě (Shi a kol., 2007).

2) Anorganický fosfor, který se vyskytuje například ve formě fosfátů, je neobnovitelný. Dostupné zásoby anorganického fosforu na Zemi mohou být při současné spotřebě vyčerpány do konce století (Kim a kol., 2006).

S ohledem na výše uvedená negativa spojená s fytasou, je potřeba najít řešení, které by přineslo lepší využití fytátového fosfátu. Proto v současné době patří tato problematika ke světově významným výzkumným tématům. Jedná se například o zvýšení endogenní aktivity fytasy obilných zrn, a tedy o zlepšení dostupnosti minerálních živin v obilovinách. Je potřeba najít způsob, jak zabránit negativnímu vlivu kyseliny fytové na životní prostředí. Jedním z možných řešení je vytvoření mutantů se sníženou hladinou kyseliny fytové, takzvaných *lpa* mutantů (low-phytic-acid), (Raboy a kol., 2000) nebo také vytvoření transgenních organismů, které mají zvýšenou aktivitu enzymu fytasy (Wan a Lemaux, 1994).

Aktivita fytasy u rostlin se velmi liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy. Nejvyšší aktivita fytasy je u žita 5130 U/kg a pšenice 1193 U/kg. U dalších rostlinných druhů je aktivita následující: ječmen 582 U/kg, hrách 115 U/kg, sója 55 U/kg, oves 42 U/kg, kukuřice 15 U/kg.

Zvýšená aktivita fytasy by mohla být řešením pro zlepšení vstřebávání fosfátu nepřežvýkavými zvířaty. Fytasy by mohly přispět ke snížení množství fosfátu, který je odpadním produktem zemědělských zvířat a velmi znečišťuje životní prostředí, například eutrofizací vod. Na základě toho, že fytasy uvolňují fosfáty z kyseliny fytové, můžeme konstatovat, že fytasy jsou považovány za enzymy šetrné k životnímu prostředí (Dai a kol., 2011). Laboratorní experimenty a polní pokusy opakovaně prokázaly, že 500–1000 jednotek fytasy může nahradit až 1 gram anorganického fosforu, který se přidává do potravin pro nepřežvýkavá zvířata, ale také snížit celkové

vylučování fosforu do životního prostředí až o 30–50 % (Yao a kol., 2012). Fytasy jsou tedy prospěšné dvojnásobně. Za prvé šetří drahé a neobnovitelné zdroje anorganického fosforu a snižují potřebu jeho přidávání do krmiv pro zvířata. Za druhé chrání životní prostředí před znečištěním, které je způsobeno nadměrným vylučováním fosforu do životního prostředí. Pro své pozitivní vlastnosti jsou fytasy po celém světě stále více používány jako prostředek pro doplnění fosfátů do krmiv prasat, drůbeže a dalších nepřežvýkavých zvířat (Yao a kol., 2012).

1.2. Transformace rostlin

1.2.1. Definice

Transformace nebo také transgenozé je proces cíleného vnášení klonovaných genů z jednoho genomu organismu do druhého (Ondřej a Drobník, 2002). Vnesený gen může u rostlin zvýšit rezistenci vůči chorobám a herbicidům, také může zajistit větší toleranci k biotickým a abiotickým stresům, zvýšit výnos a zlepšit kvalitu potravin a krmiv. Vnesený gen může zvýšit tvorbu sekundárních metabolitů rostlin. Transgenní rostliny mohou být rovněž využity jako bioreaktory, například pro výrobu fytasy (Yao a kol., 2012).

1.2.2. Metody transformace rostlin

Metody, které se používají pro transformaci, závisí na biologickém materiálu a účelu transformace. Mezi nejpoužívanější metody transformace rostlin patří transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* a mikroprojektilového přenosu DNA (particle bombardment). Dalšími metodami transformace jsou například fúze protoplastů, elektroporace, mikroinjekce nebo transformace pomocí polyethylenglykolu (Abiri, 2016).

Genetické modifikace můžeme rozdělit na základě toho, jaká DNA byla vnesena do recipientního organismu. Existují čtyři typy genetických modifikací.

1) Transgenní modifikace, kdy do recipientního organismu byla včleněna DNA pocházející z fylogeneticky vzdáleného druhu.

2) Intragenní modifikace, kdy do recipientního organismu byla včleněna DNA pocházející ze stejného druhu, ale s rozdílnými regulačními sekvencemi. To znamená, že vnesený gen má rozdílný promotor a terminátor.

3) Cisgenní modifikace, kdy do recipientního organismu byl včleněn gen pocházející ze stejného druhu. Vkládaný gen je spojen s původními regulačními úseky, s původním promotorem i terminátorem (Holme a kol., 2012).

4) Xenogenní modifikace, kdy do recipientního organismu byla včleněna syntetická DNA.

Transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* je nejrozšířenější metodou transformace rostlin (Ondřej, 2003). Druhou nejrozšířenější metodou je transformace pomocí mikroprojektilového přenosu DNA, která je také nazývána jako metoda biolistická. Metoda byla vyvinuta v roce 1988, kdy s její pomocí byla transformována sója (Christou a kol., 1988) a tabák (Klein a kol., 1988).

V roce 1994 byl pomocí této metody transformován ječmen. Transformovaným pletivem byla nezralá zygotická embrya (Wan a Lemaux, 1994). Principem této metody je vnesení pDNA, která je nanesena na kovové částice (zlaté nebo wolframové) o průměru přibližně 1 μm , které jsou následně pomocí stlačeného helia nastřeleny do pletiva rostliny a které jsou dále kultivovány na médiu se selekční látkou, například antibiotiky (kanamycin nebo hygromycin), ale také herbicidy. Transgenní embrya regenerují v rostliny například tabák (Ondřej a Drobník, 2002). Účinnost této metody je okolo 10 %, je tedy nižší než účinnost metody transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, která se pohybuje okolo 30 % (Komari a Kubo, 1999). Hlavní nevýhodou transformace pomocí mikroprojektilového přenosu DNA je možná integrace mnoha kopií transgenů, což může vést k umlčení nebo ke změně exprese genu. Další nevýhodou je poškození pletiv a buněk mikroprojektily. Metoda transformace pomocí mikroprojektilového přenosu DNA se v praxi využívá pro transformaci obilovin, jako je rýže, kukuřice, pšenice, ječmen a čirok. Historicky byl čirok považován za jednu z nejobtížněji transformovatelných plodin. Čirok se podařilo transformovat metodou mikroprojektilového přenosu DNA až v roce 2014 (Liu a kol., 2014).

1.3. Transgenní ječmen se zvýšenou aktivitou fytasy

1.3.1. Úvod

Mezi rostliny, které mají zvýšenou aktivitu fytasy v semenech, patří pšenice, ječmen, kukuřice, sója a řepka. Zvýšená aktivita fytasy u těchto rostlin byla umožněna pomocí transgenních přístupů, kdy do rostlin byl vnesen gen fytasy izolovaný z mikroorganismů. Studie ukázaly, že rostliny, do kterých byl vložen mikrobiální gen kódující fytasu, mají stejně efektivní odbourávání kyseliny fytové, jako mikrobiální fytasy, které jsou přidávány do krmiv zvířat (Brinch-Pedersen a kol., 2000, 2003), Chen a kol., 2008). Například Holme (Holme a kol., 2012) uvádí, že kontrolní odrůda ječmene měla aktivitu fytasy 1350 FTU/kg. a u transgenního ječmene byla průměrná aktivita fytasy 1841 FTU/kg.

1.3.2. Fytasa phyA

Zemědělci, kteří pěstují transgenní rostliny se zvýšenou aktivitou fytasy, nemusí přidávat mikrobiální fytasy do krmiv zvířat (Holme a kol., 2012).

Jedna z nejznámějších fytas, která se transformuje do rostlin ječmene je fytasa phyA. Fytasa phyA byla izolována z houbového organismu *Aspergillus niger*. Fragment genu *phyA* má velikost 1346 bp. Gen *phyA* tvoří enzymatický protein fytasy, aminokyselinové složení proteinu phyA.

Gen *phyA* byl transformován například do rostlin rýže pomocí mikroprojektilového přenosu DNA (Chen a kol., 2008) nebo do rostlin pšenice (Brinch-Pedersen a kol., 2000).

1.4. Zákony a regulace geneticky modifikovaných organismů

Na základě principu předběžné opatrnosti jsou v EU geneticky modifikované organismy (GMO) regulovány. Ve státech EU byl vytvořen jednotný systém zákonných předpisů, od něhož byly odvozeny zákony a vyhlášky jednotlivých členských států. Nakládat s GMO a genetickými produkty lze pouze na základě oprávnění podle právních předpisů.

Základní právní dokumenty týkající se problematiky GMO, jako jsou například povinnosti při uvádění GMO do životního prostředí či do oběhu nebo při zpracování, označování, sledování, popřípadě prodeji schválených GMO jsou:

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2001/18/ES, o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí,
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/41/ES, o uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy,
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1829/2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech,
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1830/2003, o sledovatelnosti a označování GMO,
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1946/2003, o přeshraničních pohybech GMO.

Nakládání s GMO je v České republice upraveno zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění zákona č. 346/2005, který vychází z evropských směrnic 2001/18/ES a 2009/41/ES. Prováděcím předpisem je vyhláška č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s GMO a genetickými produkty.

GMO jsou také součástí Cartagenského protokolu, jenž se zabývá biologickou bezpečností a který byl sjednán v rámci programu pro životní prostředí (United Nations Environment Programme UNEP) jako první protokol Úmluvy o biologické rozmanitosti. V rámci Cartagenského protokolu byl zřízen Informační systém biologické bezpečnosti (Biosafety Clearing-House), který je mezinárodním zdrojem informací o nakládání s živými modifikovanými organismy a jehož posláním je usnadnit výměnu vědeckých, technických, environmentálních a právních informací týkajících se živých modifikovaných organismů a zkušeností s nimi.

Cílem regulace nakládání s GMO je zajištění vysoké úrovně ochrany lidského zdraví, zdraví zvířat, ochrany životního prostředí v souvislosti s geneticky modifikovanými potravinami a krmivy.

(http://www.mzp.cz/cz/evropska_legislativa_gmo)

1.5. Obecná charakteristika ječmene

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednoletá obilnina, pěstuje se jarní nebo ozimá forma. Z botanického hlediska jde o samostatný rod z čeledi lipnicovitých (Poaceae) patřící do třídy jednoděložných rostlin, která čítá v dnešní době 32 druhů, rozdělených do 45 taxonů (Beneš a kol., 2011). Ječmen lze podle počtu chromosomů rozdělit na diploidní, tetraploidní a hexaploidní. Kulturní ječmen je diploidní. Nejvíce pěstovaným druhem ječmene je ječmen setý (*Hordeum vulgare*), (Zimolka, 2006).

Rod *Hordeum* byl jedním z prvních rostlinných rodů, který se začal hospodářsky pěstovat. Celosvětová produkce ječmene je 141 milionů tun ročně (<https://www.statista.com/statistics/271973/world-barley-production-since-2008/>).

Z celosvětové produkce ječmene je 70 % využíváno pro výrobu kvalitního jadrného krmiva, přibližně 27 % produkce je pěstováno pro výrobu sladu a zbytek, asi 3 %, je využíván jako potravina (Zimolka, 2006). Ječné zrnko obsahuje velké množství vitamínů, převážně vitamíny ze skupiny B, například vitamíny B1 a B6. Dále obsahuje kyselinu listovou a pantotenovou. Zrnko ječmene obsahuje minerální látky v organické formě, které jsou využitelné i pro nepřežvýkavá zvířata. Mezi důležité minerální látky, které se nacházejí v ječmeni, patří například fosfor, vápník, draslík, hořčík, železo, měď a selen. Ječmen obsahuje pestrú škálu aminokyselin (Vaculová a kol., 2011). V dnešní době se ječmen začíná využívat jako výživový doplněk stravy, hlavně kvůli hypocholesterolemickému účinku. Dále ječmen obsahuje antioxidanty, a to glykosylisovitexin, lutanarin a také flavonoid saponarin, který má kromě antioxidačních také protinádorové vlastnosti (Dardová, 2015).

1.5.1. Charakteristika jednotlivých genotypů

Jarní ječmen, odrůda Golden Promise

Odrůda jarního ječmene Golden Promise byla registrována v roce 1966, kdy byla u odrůdy Maythorpe vyvolána mutace pomocí gama záření. Byla vyšlechtěna kvalitní raná odrůda s dobrou kvalitou sladu, snadno kombinovatelnými vlastnostmi a vysokou odolností vůči soli. Z odrůdy Golden Promise bylo vyšlechtěno mnoho

dalších odrůd, například Midas (1970), Goldmarker (1975), Minak (1976) a další (Foster, 2001).

Jarní ječmen, odrůda Azit

Odrůda jarního ječmene Azit je česká nesladovnická odrůda, která byla registrována v roce 2008. Tato odrůda má velice kvalitní agronomické znaky, mezi které patří například velké zrno, velká odnoživost, stabilní a vysoký výnos, odolnost vůči padlí travnímu (*Blumeria graminis*) a vysoká odolnost vůči poléhání a lámání stébla. Odrůda Azit se vyznačuje velmi dobrým zdravotním stavem, je upotřebena pro krmné účely, ale také pro pěstování ve všech výrobních oblastech.

(www.limagraincentraleurope.com/docs/products/597_pdf1.pdf)

Transgenní linie jarního ječmene SCLW-GP-PHYA, generace T8 a T9

Transgenní jarní ječmen SCLW-GP-PHYA byl vytvořen v rámci projektů INCO-COPERNICUS ERBIC 15 CT 961011 PL 967086 (1997–2000) a v rámci projektu Výzkumného centra 1M06030 Genomika a proteomika ve šlechtění rostlin (2006–2011), dílčí cíle V002 a V012 byly řešeny ÚEB AV ČR, v. v. i., pracovištěm v Olomouci. Získány byly linie jarního ječmene odrůdy Golden Promise označené SCLW-GP-PHYA, které vykazují zvýšenou aktivitu heterologní fytasy v obilce. Nezralá zygotická embrya jarního ječmene byla transformována biolistickou metodou. Transformace byla provedena dvěma expresními vektory označenými pAL51 a pAMFIT, první plasmid pAMFI obsahoval gen *phyA* z *Aspergillus niger*, který kódoval enzym fytasy, druhý plasmid pAL51 obsahoval selekční gen *bar* pocházející z bakteriálního organismu *Streptomyces hygroscopicus*, vykazující rezistenci k herbicidu BASTA (Pauk, 2011).

Dihaploidní linie

V rámci bakalářské práce (Hanáková, 2012), byla provedena hybridizace mezi krmnou odrůdou Azit a jednou transgenní linií SCLW-GP-PHYA. Hybridizace byla provedena za účelem přenosu transgenu *phyA* do současné vysoce výnosné krmné odrůdy jarního ječmene. U vybraných rostlin generace F1 byly pomocí androgeneze získány pozitivní homozygotní rostliny, které byly po dvě generace pěstovány ve skleníku v uzavřeném prostředí.

2. Cíle práce

- 1) Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
- 2) Stanovení aktivity fytasy u transgenních linií jarního ječmene SCLW-GP-PHYA pěstovaných na lokalitě Olomouc a Lukavec.
- 3) Stanovení volného fosforu u transgenních linií jarního ječmene SCLW-GP-PHYA pěstovaných na lokalitě Olomouc a Lukavec.
- 4) Statistické hodnocení výsledků.

3. Materiál a metody

3.1. Experimentální rostlinný materiál

V rámci diplomové práce byl použit tento experimentální materiál. Jarní ječmen odrůdy Golden promise, Azit a transgenní linie SCLW-GP-PHYA, které byly vybrány a označeny 880-4 a 1015-7. Mezi experimentální materiál byly i dihaploidní linie odvození od hybridů 1015-7 x Azit. Tyto linie a odrůdy jarního ječmene byly pěstovány v roce 2015 na dvou lokalitách: Olomouc (Ol) a Lukavec (Luk).

3.2. Charakteristika lokalit pěstování

3.2.1. Olomouc

Lokalita Olomouc se nachází v oblasti Hornomoravského úvalu v nadmořské výšce 219 m n. m., viz obrázek 3. Klimaticky leží v teplé oblasti, přecházející v oblast mírně teplou. Lokalita je charakteristická převahou štěrkových a písčitých půd a v menším zastoupení se zde nachází i hnědozemě. Jedná se o půdy středně těžké. V roce 2015 byly za sledované období od měsíce dubna do měsíce září úhrnné srážky 234 mm a průměrná teplota 15,54°C.

(<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty>,

http://www.mzp.cz/cz/pudni_mapy)



Obrázek 3. Fotografie lokality Olomouc

www.limagraincentraleurope.com/docs/products/597_pdf1.pdf

3.2.2. Lukavec

Lokalita Lukavec se nachází v nadmořské výšce 567 m n. m. na území kraje Vysočina ležícím v oblasti Českomoravské vrchoviny, viz obrázek 4. Podnebí je zde mírně teplé, půda je převážně hnědá, kyselá, středně těžká. V roce 2015 byly za sledované období od měsíce dubna do měsíce září úhrnné srážky 350 mm a průměrná teplota 15,38°C.

(<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty>),

(<http://gynome.nmmn.cz/gisvysociny/index.php?ln=cz&id=5&cat=c&typ=menu>)



Obrázek 4. Fotografie lokality Lukavec

3.3. Polní pokusy

3.3.1. Polní pokusy, lokalita Olomouc 2015

V roce 2015 bylo na dvanácti pokusných parcelách v obci Olomouc vyseto sedm transgenních linií (čtyři linie 1015-7 a tři linie 880-4), dihaploidní linie a kontrolní odrůdy jarního ječmene (Golden Promise, Azit), viz tabulka 1. Plánky pokusného pole, viz příloha 2.

Tabulka 1. Popis výsevu transgenních linií a kontrolních odrůd jarního ječmene.

| Číslo pole | Transgenní linie a kontrolní odrůdy | Linie potomstva |
|------------|-------------------------------------|-----------------|
| 1 | Golden Promise | - |
| 2 | 1015-7 | Lukavec 2012 |
| 3 | 1015-7 | Olomouc 2012 |
| 4 | 1015-7 | Lukavec 2013 |
| 5 | 1015-7 | Olomouc 2012 |
| 6 | Golden Promise | - |
| 7 | 880-4 | Lukavec 2013 |
| 8 | 880-4 | Lukavec 2012 |
| 9 | 880-4 | Olomouc 2012 |
| 10 | DH směs | - |
| 11 | DH | - |
| 12 | Azit | - |

3.3.2. Polní pokusy, lokalita Lukavec 2015

V roce 2015 bylo na deseti parcelách v obci Lukavec vyseto sedm transgenních linií (čtyři linie 1015-7 a tři linie 880-4) a kontrolní odrůdy jarního ječmene (Golden Promise, Azit), viz tabulka 2. Plánky pokusného pole, viz příloha 2.

Tabulka 2. Popis výsevu transgenních linií a kontrolních odrůd jarního ječmene.

| Číslo pole | Transgenní linie a kontrolní odrůdy | Linie potomstva |
|------------|-------------------------------------|-----------------|
| 1 | Golden Promise | - |
| 2 | 1015-7 | Lukavec 2013 |
| 3 | 1015-7 | Olomouc 2013 |
| 4 | 1015-7 | Lukavec 2013 |
| 5 | 1015-7 | Olomouc 2012 |
| 6 | Golden Promise | - |
| 7 | 880-4 | Lukavec 2013 |
| 8 | 880-4 | Lukavec 2012 |
| 9 | 880-4 | Olomouc 2012 |
| 10 | Azit | - |

3.4. Metodika polních pokusů pro rok 2015

3.4.1. Metodika polního pokusu pro Olomouc

Uvedení geneticky modifikovaného ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou aktivitou fytasy v zrna do životního prostředí, povolení 35905/ENV/12.

- **Obec:** Olomouc-Holice
- **Pozemek:** Holice u Olomouce 641227, parcela č. 1721/13
- **Druh pozemku:** orná půda, celková výměra byla 1966 m².
- **Příprava pozemku před založením pokusu:** pokusné plochy byly připraveny podle současných agrotechnických postupů pěstování jarního ječmene v dané oblasti.
- **Založení pokusu:** v roce 2015 byla plocha pro pokusné uvedení do životního prostředí 770,64 m² včetně obsevu, z toho GMO rostliny byly pěstovány na ploše 453,6 m². GMO rostliny byly vysety na 12 parcelách o rozměrech 1,2 m x 21 m. Celkový počet vysetých GMO rostlin byl 60 480 (200 na m²) na ploše

302,4 m². Osivo bylo na pozemek přeneseno v dvojité nádobě, která je schopna zabránit úniku přepravovaného geneticky modifikovaného materiálu, nádoby byly označeny nápisem: „Obsahuje geneticky modifikovaný materiál (jarní ječmen SCLW-GP-PHYA). Není určeno ke konzumaci, krmení! Zákaz předávání neoprávněným osobám!“ Semena GMO rostlin byla seta pomocí secího stroje proškolenými pracovníky PřF UP pod dohledem odborného poradce. Celkem bylo vyseto 12 parcel (označených 1–12), z toho 9 transgenních linií SCLW-GP-PHYA, každá parcela představovala potomstvo jednotlivé linie generace T9 a byla vyseta pouze v jednom opakování. Na třech parcelách byly vysety kontrolní, netransformované odrůdy, viz tabulka 2. Vyseté parcely byly označeny jmenovkami s kódovým označením potomstev rostlin a jejich označení bylo zakresleno v plánu pokusu, viz příloha 2. Přístupové a izolační uličky byly ošetřovány stejně jako pokusné parcely. Okamžitě po výsevu pokusných parcel bylo provedeno oplocení pokusného pozemku a obsev ochranným porostem jarního ječmene v šíři 3,4 m. Kolem celého pokusu byly rozmístěny výstražné cedule s nápisem „POZOR – GMO – NEVSTUPOVAT – NEZKRMOVAT – CHEMICKY OŠETŘENO Není určeno ke konzumaci, krmení! Zákaz předávání neoprávněným osobám!“. Evidence polního pokusu byla samostatně vedena v polním deníku. Všechny zásahy provedené na pokusné ploše a všechny údaje o provedených sledováních a hodnocení, včetně údajů týkajících se setí, byly protokolárně zaznamenány a byly součástí polního deníku.

- **Ošetřování porostu během vegetace:** v průběhu vývojové fáze počátek odnožování (BBCH 21-23) byla všechna transgenní potomstva ošetřena herbicidem Basta 15 v koncentraci 0,3 % s cílem selekce transgenních rostlin a likvidace plevelných rostlin.

- **Odběry vzorků:** po 21 dnech po provedené selekci přípravkem Basta 15 byl proveden odběr vzorku listů z vybraných rostlin. U každé rostliny bylo z nejmladšího listu odebráno přibližně 100 mg rostlinné hmoty. Odebraná hmota byla vložena do plastových zkumavek, označena kódovým označením a neprodleně zamražena v tekutém dusíku. Odebrané vzorky byly použity k molekulárním analýzám.

- **Provedená sledování:**

Fenologické sledování: byl sledován a zaznamenáván nástup nejdůležitějších vývojových fází jednotlivých potomstev (doba vzházení, počátek odnožování, metání).

Sledování štěpných poměrů v potomstvech: před provedením selekce přípravkem Basta 15 byl zaznamenán počet a zdravotní stav vzešlých rostlin a po 14 až 21 dnech po provedené selekci přípravkem Basta 15 byl proveden odpočet přeživších rostlin.

- **Sklizení zrna:** sklizeň byla provedena proškolenými pracovníky PřF UP Olomouc pod dozorem odborného poradce za použití maloparcelkového kombajnu. Sklizené zrna bylo ukládáno do označených plátěných pytlů po jednotlivých liniích potomstev. Ze sklizeného zrna byla měřena v laboratoři GMO PřF UP Olomouc aktivita fytasy a dostupného fosforu (molybdenan/vanadičnanovou metodou).

- **Posklizňové ošetření pozemku:** po ukončení pokusu byla všechna zbývající rostlinná hmota, včetně obsevu konvenčního jarního ječmene, zničena rozdrčením a zapravením do půdy orbou.

3.4.2. Metodika polního pokusu pro Lukavec

Uvedení geneticky modifikovaného ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou aktivitou fytasy v zrna do životního prostředí, povolení 42029/ENV/11.

- **Obec:** Lukavec u Pacova
- **Pozemek:** Lukavec u Pacova 688 771 parcela č. 2779
- **Druh pozemku:** orná půda, celková výměra byla 4446 m².
- **Příprava pozemku před založením pokusu:** pokusné plochy byly připraveny podle současných agrotechnických postupů pěstování jarního ječmene v dané oblasti.

Založení pokusu: plocha pro pokusné uvedení do životního prostředí byla v roce 2015 300 m², z toho GMO rostliny byly pěstovány na ploše 150 m². GMO materiál byl na stanoviště přivezen v den setí a nebyl v místě pokusné lokality skladován. Semena GMO rostlin byla seta pomocí ručního jednořádkového secího stroje proškolenými pracovníky pokusné stanice pod dohledem odborného pracovníka

společnosti AGRA GROUP, a.s. Každá parcela představuje potomstvo jediné linie generace T9 (označené 1–16). Vyseté parcely byly označeny jmenovkami s kódovým označením potomstev rostlin, viz tabulka 3. Původní netransgenní srovnávací kontrolní odrůda Golden Promise byla vyseta ve čtyřech opakováních. Vyseté parcely a jejich označení byly zakresleny v plánu pokusu, viz příloha 2. Přístupové a izolační uličky byly ošetřovány stejně jako pokusné parcely. Okamžitě po výsevu pokusných parcel bylo provedeno oplocení pokusného pozemku a obsev ochranným porostem jarního ječmene v šíři 2 m kolem celého pokusu. Dále byly rozmístěny výstražné cedule s nápisem „POZOR – GMO – NEVSTUPOVAT – NEZKRMOVAT – CHEMICKY OŠETŘENO Není určeno ke konzumaci, krmení! Zákaz předávání neoprávněným osobám!“ Všechny údaje týkající se setí byly zaznamenány do protokolů a jsou součástí polního deníku.

- **Ošetřování porostu během vegetace:** v průběhu vývojové fáze počátku odnožování (BBCH 21-23) byla všechna transgenní potomstva ošetřena herbicidem Basta 15 v koncentraci 0,3 % s cílem selekce transgenních rostlin a likvidace plevelných rostlin.

- **Odběry vzorků:** po 21 dnech po provedené selekci přípravkem Basta 15 byl proveden odběr vzorku listů z vybraných rostlin. U každé rostliny bylo z nejmladšího listu odebráno přibližně 100 mg rostlinné hmoty. Odebraná hmota byla vložena do plastových zkumavek, označena kódovým označením a neprodleně zamrazena v suchém ledu. Odebrané vzorky byly použity k molekulárním analýzám.

- **Provedená sledování:**

Fenologické sledování: byl sledován a zaznamenáván nástup nejdůležitějších vývojových fází jednotlivých potomstev (doba vzcházení, počátek odnožování, metání).

Sledování štěpných poměrů v potomstvech: před provedením selekce přípravkem Basta 15 byl zaznamenán počet a zdravotní stav vzešlých rostlin a po 14 až 21 dnech po provedené selekci přípravkem Basta 15 byl proveden odpočet přeživších rostlin.

- **Sklizeň zrna:** sklizeň byla provedena proškolenými pracovníky PS Olomouc pod dozorem odborně způsobilých a proškolených pracovníků AGRA GROUP, a.s., a odborného poradce. Sklizeň byla provedena pomocí maloparcelkového kombajnu. Sklizené zrno bylo ukládáno do označených papírových sáčků po jednotlivých potomstvech každé z linií. Ze sklizeného zrna

bylo v laboratoři GMO PřF UP Olomouc stanovena aktivita fytasy a dostupného fosforu (molybdenan/vanadičnanovou metodou).

- **Posklizňové ošetření pozemku:** na konci pokusu byla všechna zbývající rostlinná hmota, včetně obsevu konvenčního jarního ječmene, zničena rozdrčením a zapravením do půdy orbou.

3.5. Použité přístroje

Synergy 2 Multi-Mode Reader spektrofotometr

Retsch MM 301 homogenizátor

Eppendorf 5418 Microcentrifuge stolní centrifuga

Yellow Line OS 5 Basic orbitální třepačka

UV Transiluminátor Syngene G-Box

PTC-200 cycler

3.6. Seznam použitých chemikálií

$C_6H_8O_2$ – kyselina askorbová

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – molybdenan amonný

H_2SO_4 – kyselina sírová

K_2HPO_4 – hydrogenfosforečnan draselný

HCl – kyselina chlorovodíková

H_2O – destilovaná voda

NH_3 - amoniak

HNO_3 – kyselina dusičná

KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnan draselný

$C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6 \cdot H_2O$ – fytát sodný

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – heptamolybdenan amonný

$\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) – octan sodný

NH_4VO_3 – vanadičnan amonný

polyoxyethylensorbitanmonolaurát - Tween

3.7. Stanovení volného P_i

Metoda pro stanovení obsahu P_i je založena na reakci P_i (nacházejícího se v biologickém materiálu) s Chenovým činidlem, které je na bázi molybdenanu amonného, kyseliny sírové a kyseliny askorbové (Chen a kol., 1956). Při reakci vzniká kyselina fosfomolybdenová, která se redukuje na molybdenovou modř. Následně je spektrofotometricky stanovena absorbance a na základě kalibrační křivky je kvantifikován obsah fosfátu. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze dvou na sobě nezávislých měření.

3.7.1. Chemikálie použité při stanovení volného P_i

Seznam chemikálií použitých pro stanovení volného P_i , viz tabulka 3.

Tabulka 3. Chemikálie použité pro stanovení volného P_i .

| Chemikálie | Koncentrace |
|--|-------------------------|
| $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ – kyselina askorbová | 10% roztok |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – molybdenan amonný | 2,5% roztok |
| H_2SO_4 – kyselina sírová | 16% roztok |
| K_2HPO_4 – hydrogenfosforečnan draselný | - |
| HCl – kyselina chlorovodíková | 0,4 mol·l ⁻¹ |
| H_2O destilovaná | - |

Příprava Chenova činidla:

- 1) 2 díly dd H_2O
- 2) 1 díl 10% kyseliny askorbové
- 3) 1 díl 2,5% molybdenanu amonného
- 4) 1 díl 16% kyseliny sírové

Příprava fosfátového standardu:

hydrogenfosforečnan draselný 1,74 g/l.

3.7.2. Pracovní postup stanovení obsahu P_i v biologickém materiálu

- 1) Homogenizace 12 obilek v kulovém mlýnku (Retsch MM 301) při frekvenci 27/s po dobu 3 min.
- 2) K navážce 75 mg homogenizovaných obilek byl přidán 1 ml $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové.
- 3) Extrakce přes noc při 4°C .
- 4) Extrakce vzorků. Protřepání a centrifugace 5 min při 10 000 rpm.
- 5) Příprava standardních vzorků dle tabulky 4 pro stanovení kalibrační křivky.
- 6) Naneseno pipetováním 90 μl destilované vody do 96jamkové desky.
- 7) Přidáno 10 μl extraktu vzorku, každý vzorek v duplikátu a přidáno 100 μl Chenova činidla do všech jamek.
- 9) Uložení reakční směsi do temné komory s následnou inkubací 2 hod.
- 10) Spektrofotometricky stanovena hodnota absorbance při vlnové délce 822 nm.
- 11) Vyhodnocení dat v programu MS Excel. Na základě hodnot absorbancí standardních vzorků byla sestrojena kalibrační křivka a vypočtena rovnice lineární regrese.
- 12) Na základě rovnice lineární regrese byl vypočten obsah fosfátu ve vzorku.

Tabulka 4: Příprava standardních vzorků pro stanovení kalibrační křivky.

| Standard číslo | K_2HPO_4 [μl] | Extrakčního roztok [μl] | H_2O [μl] | P_i [mg/g] |
|----------------|---|--|---|-----------------|
| 1 | 0 | 10 | 90 | 0 |
| 2 | 5 | 10 | 85 | 4,81 |
| 3 | 15 | 10 | 75 | 14,43 |
| 4 | 30 | 10 | 60 | 28,86 |
| 5 | 45 | 10 | 45 | 43,29 |

3.8. Stanovení aktivity fytasy

Pro stanovení aktivity fytasy se používá metoda, která je založena na tvorbě komplexu mezi fosfátem uvolněným účinkem fytasy z molekuly kyseliny fytové, a molybdenan-vanadičnanovým činidlem. Spektrofotometricky je měřena absorbance vznikajícího komplexu při vlnové délce 415 nm, na základě kalibrační křivky je kvantifikována aktivita fytasy, kdy je vypočítáno množství P_i reagujícího s molybdenem-vanadičnanovým činidlem. Celkový obsah fosfátu, který je uvolněn z kyseliny fytové působením fytasy, je vypočítán odečtením počátečního obsahu P_i od obsahu po 30 minutové inkubaci, kdy vypočteme obsah fosfátu, jež se uvolní z kyseliny fytové působením fytasy. Množství enzymu, které uvolní $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ anorganického P_i z fytátu sodného za 1 min při pH 5,5 a teplotě 37°C , je stanoveno jednotkou FTU, která vyjadřuje aktivitu enzymu. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří na sobě nezávislých měření.

3.8.1. Chemikálie a roztoky pro měření aktivity fytasy

- 1) NH_3 – amoniak 25% roztok
- 2) HCl – kyselina chlorovodíková 25% roztok
- 3) HNO_3 – kyselina dusičná 22% roztok
- 4) KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnan draselný
- 5) $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_{12}\text{O}_{24}\text{P}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – fytát sodný Sigma (kat. č. 68388)
- 6) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – heptamolybdenan amonnýtra
- 7) $(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ – octan sodný
- 8) Tween 20 10% roztok
- 9) NH_4VO_3 – vanadičnan amonný
- 10) H_2O destilovaná

3.8.2. Příprava roztoků pro měření aktivity fytasy

1) Acetátový pufr 1

octan sodný 34 g/l s úpravou pH na 5,5.

2) Acetátový pufr 2

octan sodný 34 g/l s úpravou pH na 5,5 a přidáním 100 μ l Tweenu 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát).

3) Extrakční pufr

roztok 0,01% Tweenu.

4) Fytátový roztok

fyttát sodný 8 g/l s úpravou pH na 5,5.

5) Molybdenanové činidlo

heptamolybdenan amonný 100g/l s přidáním 250 μ l roztoku amoniaku.

6) Vanadičnanové činidlo

příprava vanadičnanu amonného 2,3 g/l při teplotě 50–60°C s přidáním 440 μ l kyseliny dusičné.

7) STOP činidlo

1 díl vanadičnanového činidla smíchat s 1 dílem molybdenanového činidla a s přidáním 2 dílů 22% kyseliny dusičné.

8) Standardní fosfátový roztok

2,7 % dihydrogenfosforečnan draselného rozpustit v acetátovém pufru 2.

3.8.3. Pracovní postup stanovení aktivity fytasy v biologickém materiálu

A) Postup přípravy a měření vzorků

1) Drcení 12 zrn transgenního ječmene linie SCLW-GP-PHYA v přístroji (kulový mlýnek Retsch MM 301) po dobu 3 min při frekvenci 27/s.

2) 100 mg homogenizovaných zrn bylo rozpuštěno v 1 ml extrakčního pufru. Vzniklá suspenze byla třepána po dobu 40 min na horizontální třepače při

frekvenci 560/s a následná separace extraktu od matrice pomocí centrifugace po dobu 3 min při 9 500 rpm.

3) 100 μ l extraktu bylo odebráno do tří mikrokumavek o objemu 2 ml. Dvě mikrokumavky byly určeny pro paralelní měření a jedna mikrokumavka pro srovnávací vzorek (blank). Následně bylo přidáno 300 μ l acetátového pufru 2 a směs byla protřepána inkubována po dobu 3 min.

4) Do mikrokumavky, ve které se nacházely srovnávací vzorky, bylo přidáno 800 μ l STOP činidla a 800 μ l fytátového substrátu. Směs byla promíchána a ponechána po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následná centrifugace probíhala po dobu 3 minut při 9 500 rpm.

5) Pro paralelní měření bylo do vzorků v mikrokumavkách přidáno 800 μ l fytátového roztoku a směs byla promíchána a inkubována po dobu 30 minut při 37 °C. Následně bylo přidáno 800 μ l STOP činidla. Všechny vzorky byly promíchány a vyvíjeny po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Centrifugace proběhla po dobu 5 minut při 9 500 rpm.

6) Absorbance všech vzorků byla stanovena při vlnové délce 415 nm.

B) Postup přípravy a měření standardů

1) Pro každou koncentraci byly připraveny 2 paralelní vzorky pro měření a 1 blank.

2) Roztok standardního zásobního fosfátu byl naředěn acetátovým pufrům 2 na koncentraci 0,24 – 7 μ mol·ml⁻¹.

3) Do 2 ml mikrokumavek bylo napipetováno 360 μ l acetátového pufru 2 a 40 μ l standardu o známé koncentraci. Do blanku bylo přidáno jen 400 μ l acetátového pufru 2.

4) Ke všem standardům i blanku bylo přidáno 800 μ l fytátového roztoku a 800 μ l STOP činidla. Směs byla promíchána a inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následná centrifugace probíhala po dobu 3 minut při 9 500 rpm.

5) Byla měřena absorbance při vlnové délce 415 nm a z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka pomocí programu MS Excel.

6) Z kalibrační křivky byla sestavena rovnice lineární regrese, ze které byl vypočítán obsah uvolněného fosfátu.

7) Z množství uvolněného fosfátu byla vypočítána aktivita fytasy.

3.8.4. Detekce genu *phyA* pomocí PCR u jarních ječmenů linie SCLW-GP-PHYA

Přítomnost heterologního genu *phyA* byla detekována u jarních ječmenů linie SCLW-GP-PHYA. Z mladých rostlin jarního ječmene na olomoucké lokalitě byly odebrány plodové lístky do 2 ml mikrozkušavek eppendorf a následně uskladněny v tekutém dusíku. Ze vzorků mladých lístků jarního ječmene byla izolována DNA dle pracovního postupu (Edwards a kol., 1991). Následnou PCR analýzou byla ověřena přítomnost genu *phyA*. Byl použit pár specifických primerů PhyF 21 mer 5'-GGC AGT CCC CGC CTC GAG AAA-3' a PhyR 21 mer 5'- AAA CAC TCC GCC CAA TCA CCC-3'. Po PCR analýze byl amplifikovaný fragment elektroforeticky separován a následně detekován pomocí UV transiluminátoru. Podmínky, ve kterých probíhaly PCR analýzy, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Podmínky PCR při detekci genu *phyA*.

| Cyklus | Teplota | Čas |
|--------------------------|----------------|------------|
| Počáteční denaturace | 93°C | 60 s |
| Denaturace opakování 40x | 91°C | 15 s |
| Annealing opakován 40x | 55°C | 30 s |
| Elongace opakována 40x | 72°C | 60 s |
| Závěrečná elongace | 72°C | 4 min+ |

4. Výsledky

4.1. Stanovení obsahu P_i v obilkách ječmene

4.1.1. Lokalita Lukavec 2015

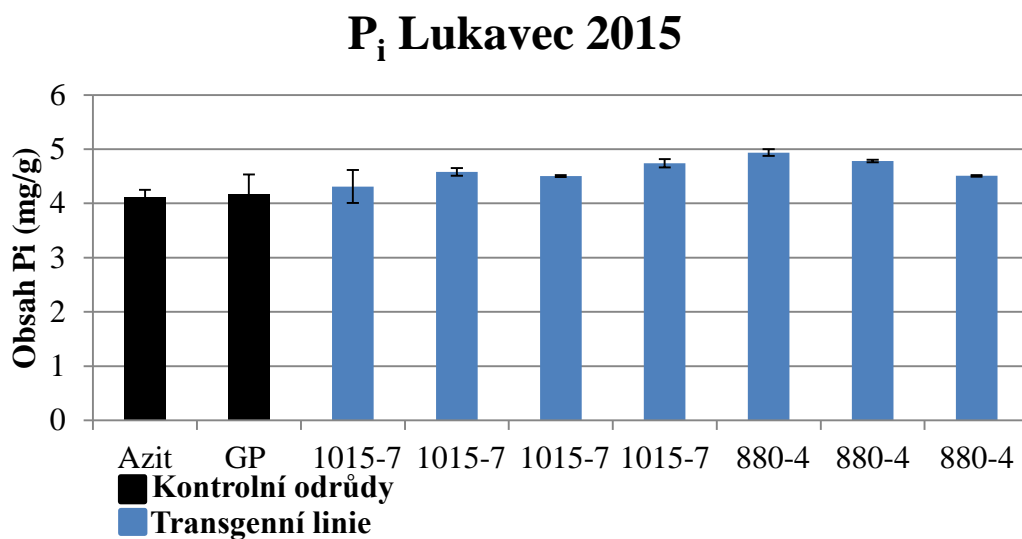
Dne 14. srpna 2015 bylo na lokalitě Lukavec sklizeno osivo jarního ječmene ze sedmi transgenních linií SCLW-GP-PHYA a z kontrolních odrůd jarního ječmene (Azit, Golden Promise). Obsah P_i v zrně byl měřen tři měsíce po sklizni. U transgenních linií byl rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou obsahu volného P_i u měřených vzorků 0,62 mg/g. Rozdíl mezi transgenními liniemi a kontrolními odrůdami byl 0,37 mg/g. Nejmenší obsah P_i měla z transgenních linií linie 1015-7 (osivo Lukavec 2013) 4,31 mg/g ($\pm 0,30$). Nejvyšší obsah P_i měla z transgenních linií linie 880-4 (osivo Lukavec 2013) 4,93 mg/g ($\pm 0,06$), viz tabulka 6.

Kontrolní odrůda Azit měla obsah P_i 4,11 mg/g ($\pm 0,30$) a obsah P_i u kontrolních odrůd Golden Promise byl 4,10 mg/g ($\pm 0,30$), viz obrázek 5.

Tabulka 6. Obsah volného P_i v zrně u netransgenních kontrolních odrůd a transgenních linií pěstovaných na lokalitě Lukavec v roce 2015.

| Kontrolní netransgenní odrůdy | | |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Odrůdy | | Obsah P_i (mg/g) |
| Azit | | 4,11 \pm 0,35 |
| Golden Promise | | 4,10 \pm 0,14 |
| Transgenní linie SCLW-GP-PHYA | | |
| Linie | Potomstvo sklizně: lokalita, rok | Obsah P_i (mg/g) |
| | Lukavec 2013 | 4,31 \pm 0,30 |
| 1015-7 | Olomouc 2013 | 4,57 \pm 0,07 |
| | Lukavec 2013 | 4,50 \pm 0,01, |
| | Olomouc 2012 | 4,74 \pm 0,07 |
| | Lukavec 2013 | 4,93 \pm 0,06 |
| 880-4 | Lukavec 2012 | 4,77 \pm 0,02 |
| | Olomouc 2012 | 4,50 \pm 0,01 |

Hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých měření s vyjádřením směrodatné odchylky.



Obrázek 5. Grafické porovnání obsahu volného P_i v zrně u netransgenních kontrolních odrůd a transgenních linií pěstovaných na lokalitě Lukavec v roce 2015 s vyznačenou směrodatnou odchylkou GP - Golden Promise

4.1.2. Lokalita Olomouc 2015

Dne 6. srpna 2015 bylo na lokalitě Olomouc sklizeno osivo jarního ječmene ze sedmi transgenních linií SCLW-GP-PHYA, ze čtyř dihaploidních linií (DH) a z kontrolních odrůd jarního ječmene (Azit, Golden Promise). Obsah P_i v zrně byl měřen tři měsíce po sklizni, viz obrázek 6. Rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou obsahu volného P_i byl u měřených vzorků transgenních linií 1,41 mg/g. Rozdíl mezi transgenními liniemi a kontrolními odrůdami byl 0,26 mg/g. Nejmenší obsah P_i měla z transgenních linií linie DH 51 3,56 mg/g (± 0,30). Nejvyšší obsah P_i z transgenních linií měla linie DH 4 4,97 (± 0,46), viz tabulka 7.

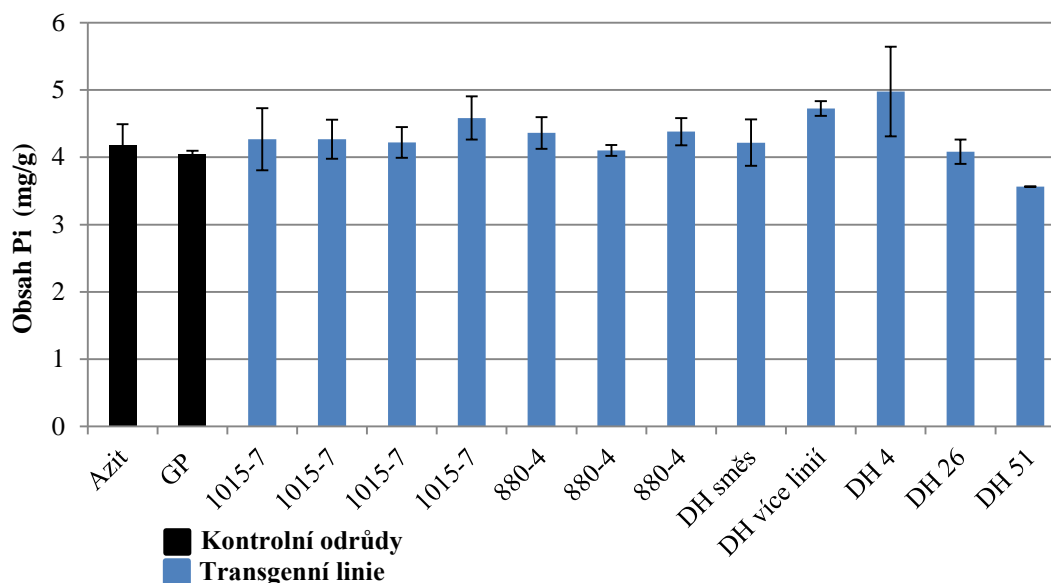
Kontrolní odrůda Azit měla obsah P_i 4,18 mg/g (± 0,30) a obsah P_i u kontrolní odrůdy Golden Promise byl 4,04 mg/g (± 0,30), viz obrázek 6.

Tabulka 7. Obsah volného P_i ve vzorcích z lokality Olomouc.

| Kontrolní netransgenní odrůdy | | |
|--------------------------------------|---|-----------------------------------|
| Odrůdy | | Obsah P_i (mg/g) |
| Azit | | 4,18 ± 0,30 |
| Golden Promise | | 4,04 ± 0,04 |
| Transgenní linie SCLW-GP-PHYA | | |
| Linie | Potomstvo sklizně: lokalita, rok | Obsah P_i (mg/g) |
| | Lukavec 2012 | 4,20 ± 0,46 |
| 1015-7 | Olomouc 2013 | 4,26 ± 0,28 |
| | Lukavec 2013 | 4,21 ± 0,29 |
| | Olomouc 2012 | 4,58 ± 0,32 |
| | Lukavec 2013 | 4,36 ± 0,23 |
| 880-4 | Lukavec 2013 | 4,10 ± 0,08 |
| | Olomouc 2012 | 4,38 ± 0,20 |
| Dihaploidní linie | | Obsah P_i (mg/g) |
| DH směs | | 4,21 ± 0,34 |
| DH 4 | | 4,72 ± 0,10 |
| DH více linií | | 4,97 ± 0,46 |
| DH 26 | | 3,70 ± 0,18 |
| DH 51 | | 3,56 ± 0,01 |

Hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých měření s vyjádřením směrodatné odchylky.

Pi Olomouc 2015



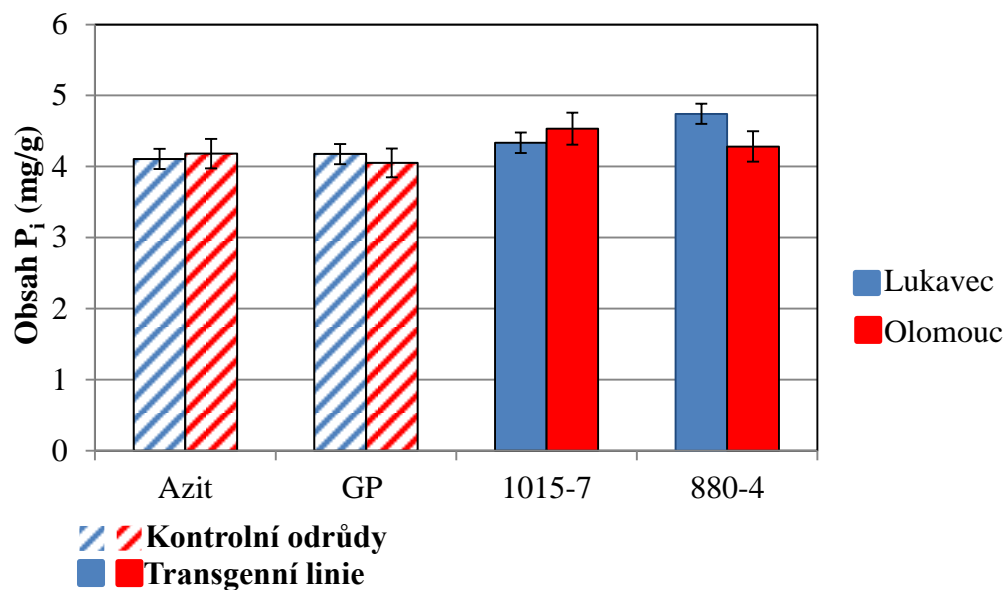
Obrázek 6. Grafické porovnání množství volného P_i ze vzorků z lokality Olomouc s vyznačenou směrodatnou odchylkou GP- Golden Promise. DH- Dihaploidní linie

4.1.3. Rozdíl obsahu volného P_i na lokalitách Olomouc a Lukavec v roce 2015

Průměrný obsah volného P_i ve vzorku obilek jarního ječmene na lokalitě Olomouc byl u transgenních linií 4,38 mg/g ($\pm 0,23$), viz obrázek 7. Na lokalitě Lukavec byl průměrný obsah volného P_i ve vzorku obilek u transgenních linií 4,51 mg/g ($\pm 0,18$). Rozdíl průměrného obsahu P_i u transgenních linií mezi lokalitami byl pouze 0,13 mg/g. Na lokalitě Lukavec byl průměrný obsah P_i u transgenních linií 1015-7 4,33 mg/g ($\pm 0,11$). Na lokalitě Olomouc byl průměrný obsah P_i u transgenních linií 1015-7 4,53 mg/g ($\pm 0,35$), viz obrázek 8. U transgenních linií 880-4 byl průměrný obsah P_i na lokalitě Lukavec stanoven na 4,74 mg/g ($\pm 0,03$). U transgenních linií 880-4 byl průměrný obsah P_i na lokalitě Olomouc stanoven na 4,28 mg/g ($\pm 0,17$), viz tabulka 8.

U kontrolních odrůd byl průměrný obsah P_i na lokalitě Lukavec 4,14 mg/g ($\pm 0,24$) a na lokalitě Olomouc byl průměrný obsah P_i 4,11 mg/g ($\pm 0,14$).

Množství P_i



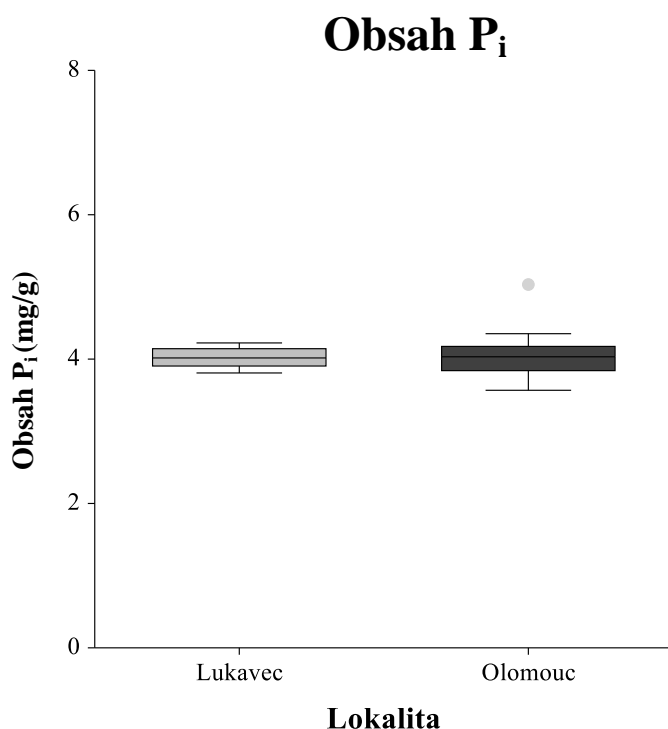
Obrázek 7. Grafické porovnání množství volného P_i ve vzorcích z lokality Olomouc a z lokality Lukavec s vyznačenou směrodatnou odchylkou GP– Golden Promise

Tabulka 8. Obsah volného P_i ve vzorcích z lokality Olomouc a Lukavec.

| Kontrolní netransgenční odrůdy | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------|--|
| Odrůdy | Obsah P_i (mg/g) | | |
| | Lukavec | Olomouc | |
| Azit | 4,11 ± 0,35 | 4,18 ± 0,30 | |
| Golden Promise | 4,10 ± 0,14 | 4,04 ± 0,04 | |

| Transgenční linie SCLW-GP-PHYA | | | |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Linie | Potomstvo | sklizeň: | Obsah P_i (mg/g) |
| | lokalita rok | | Lukavec Olomouc |
| 1015-7 | Lukavec 2013 | | 4,31 ± 0,30 4,20 ± 0,46 |
| | Olomouc 2013 | | 4,57 ± 0,07 4,26 ± 0,28 |
| | Lukavec 2013 | | 4,50 ± 0,01, 4,21 ± 0,29 |
| | Olomouc 2012 | | 4,74 ± 0,07 4,58 ± 0,32 |
| 880-4 | Lukavec 2013 | | 4,93 ± 0,06 4,36 ± 0,23 |
| | Lukavec 2012 | | 4,77 ± 0,02 4,10 ± 0,08 |
| | Olomouc 2012 | | 4,50 ± 0,01 4,38 ± 0,20 |

Hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých měření s vyjádřením směrodatné odchylky.



Obrázek 8. Grafické porovnání průměrných hodnot volného P_i na lokalitách Lukavec a Olomouc 2015

4.2. Stanovení aktivity fytasy v obilkách ječmene

4.2.1. Lokalita Lukavec 2015

Dne 14. srpna 2015 bylo na lokalitě Lukavec sklizeno osivo jarního ječmene ze sedmi transgenních linií SCLW-GP-PHYA a z kontrolních odrůd jarního ječmene (Azit, Golden Promise) s cílem měření aktivity fytasy v zrna, viz tabulka 9. Nejvyšší aktivita fytasy u transgenní linie byla u linie 1015-7 (osivo Olomouc 2013) 0,624 FTU/g ($\pm 0,16$). Nejnižší aktivita fytasy, která byla naměřena u transgenní linie, byla u linie 880-4 (osivo Olomouc 2012) 0,477 FTU/g ($\pm 0,07$), viz obrázek 9.

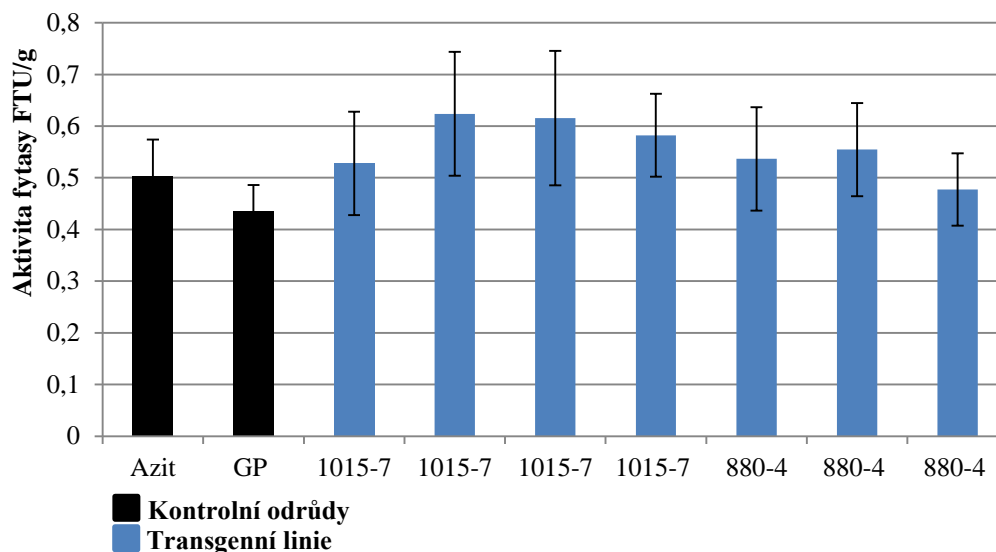
Kontrolní odrůda Azit měla aktivitu fytasy 0,504 FTU/g ($\pm 0,07$) a aktivita fytasy u kontrolní odrůdy Golden Promise byla 0,463 FTU/g ($\pm 0,05$).

Tabulka 9. Aktivita fytasy v zrně u netransgenických kontrolních odrůd a transgenických linií pěstovaných na lokalitě Lukavec v roce 2015.

| Kontrolní netransgenické odrůdy | | |
|--|--|--------------|
| Odrůdy | | FTU/g |
| Azit | | 0,504 ± 0,07 |
| Golden Promise | | 0,463 ± 0,05 |
| Transgenické linie SCLW-GP-PHYA | | |
| Linie | Potomstvo sklizně: lokalita rok | FTU/g |
| 1015-7 | Lukavec 2013 | 0,528 ± 0,13 |
| | Olomouc 2013 | 0,624 ± 0,16 |
| | Lukavec 2013 | 0,615 ± 0,17 |
| | Olomouc 2012 | 0,582 ± 0,08 |
| 880-4 | Lukavec 2013 | 0,537 ± 0,05 |
| | Lukavec 2012 | 0,555 ± 0,07 |
| | Olomouc 2012 | 0,477 ± 0,07 |

Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

Aktivita fytasy Lukavec 2015



Obrázek 9. Grafické porovnání aktivity fytasy ve vzorcích z lokality Lukavec s vyznačenou směrodatnou odchylkou GP– Golden Promise

4.2.2. Lokalita Olomouc 2015

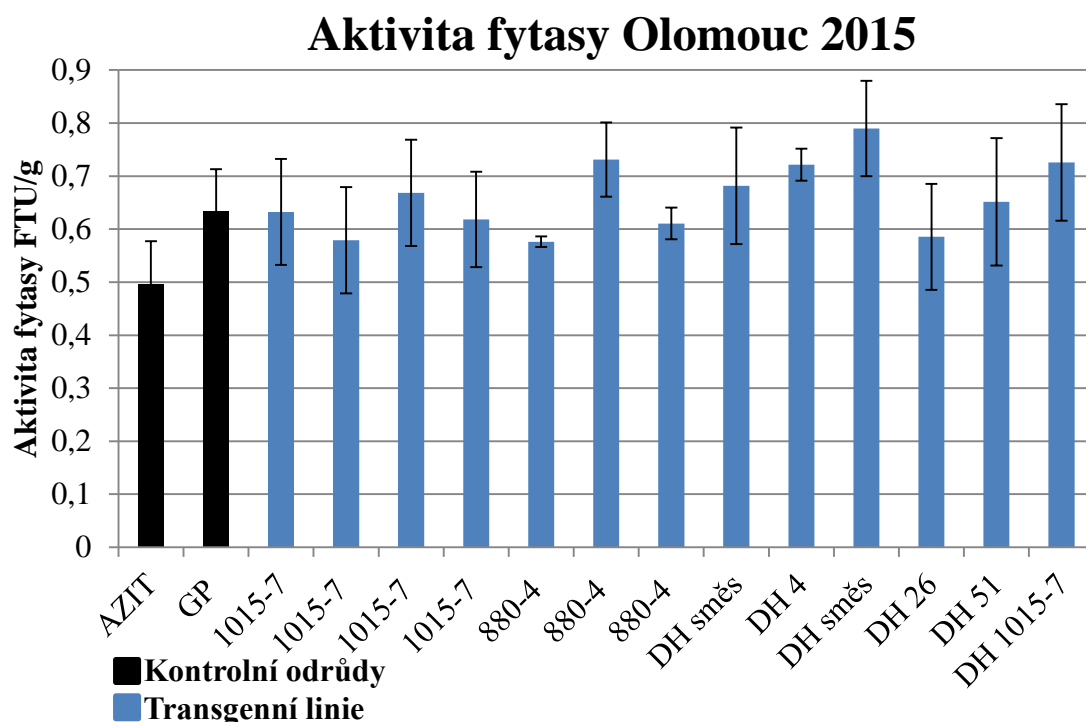
Dne 6. srpna 2015 bylo na lokalitě Olomouc sklizeno osivo jarního ječmene ze sedmi transgenních linií SCLW-GP-PHYA, ze čtyř dihaploidních linií (DH) a z kontrolních odrůd jarního ječmene (Azit, Golden Promise) s cílem měření aktivity fytasy v zrně, viz obrázek 10. Nejvyšší aktivita u transgenních linií byla naměřena u vzorku DH směsi 0,79 FTU/g ($\pm 0,09$). Z transgenních linií byla nejmenší aktivita fytasy měřena u linie 1015-7 (osivo Olomouc 2013) 0,579 FTU/g ($\pm 0,131$) a linie 880-4 (osivo Lukavec 2013) 0,576 FTU/g ($\pm 0,01$), viz tabulka 10.

Kontrolní odrůda Azit měla aktivitu fytasy 0,497 FTU/g ($\pm 0,08$) a aktivita fytasy u kontrolní odrůdy Golden Promise byla 0,633 FTU/g ($\pm 0,08$).

Tabulka 10. Aktivita fytasy ve vzorcích z lokality Olomouc.

| Kontrolní netransgenní odrůdy | | |
|--------------------------------------|--|--------------|
| Odrůdy | | FTU/g |
| Azit | | 0,497 ± 0,08 |
| Golden Promise | | 0,633 ± 0,08 |
| Transgenní linie SCLW-GP-PHYA | | |
| Linie | Potomstvo sklizně: lokalita rok | FTU/g |
| 1015-7 | Lukavec 2012 | 0,632 ± 0,13 |
| | Olomouc 2013 | 0,579 ± 0,13 |
| | Lukavec 2013 | 0,668 ± 0,10 |
| | Olomouc 2012 | 0,618 ± 0,12 |
| | Lukavec 2013 | 0,576 ± 0,01 |
| 880-4 | Lukavec 2013 | 0,731 ± 0,07 |
| | Olomouc 2012 | 0,611 ± 0,03 |
| Dihaploidní linie | | FTU/g |
| DH směs | | 0,681 ± 0,14 |
| DH | | 0,721 ± 0,03 |
| DH více linií | | 0,790 ± 0,09 |
| DH 26 | | 0,586 ± 0,11 |
| DH 51 | | 0,651 ± 0,15 |
| DH 1015-7 | | 0,726 ± 0,14 |

Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

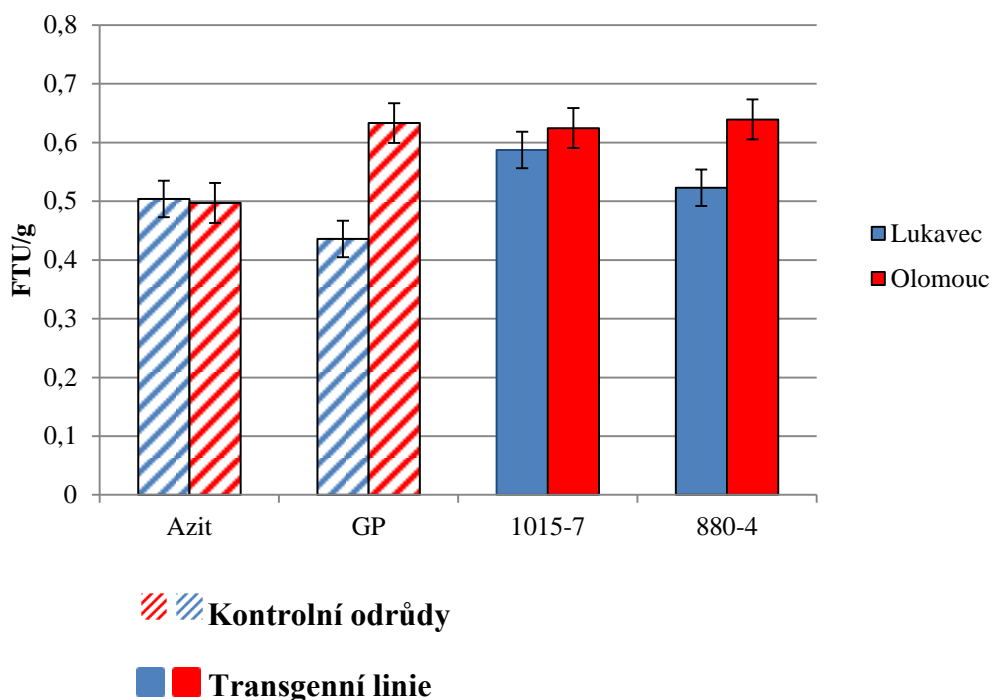


Obrázek 10. Grafické porovnání aktivity fytasy ve vzorcích z lokality Olomouc s vyznačenou směrodatnou odchylkou. GP – Golden Promise. DH – Dihaploidní linie.

4.2.3. Rozdíl aktivity fytasy na lokalitách Olomouc a Lukavec 2015

Průměrná aktivita fytasy u transgenních linií jarního ječmene na lokalitě Olomouc byla 0,659 FTU/g ($\pm 0,09$). Na lokalitě Lukavec byla průměrná aktivita fytasy u transgenních linií 0,559 FTU/g ($\pm 0,12$), viz obrázek 12. Z transgenních linií měla největší aktivitu transgenní linie 880-4 (osivo Lukavec 2012) 0,731 FTU/g ($\pm 0,07$) a nejmenší aktivitu měla linie 880-4 (osivo Olomouc 2012) 0,477 FTU/g ($\pm 0,07$). Na lokalitě Olomouc byla aktivita fytasy u kontrolní odrůdy Azit 0,497 FTU/g ($\pm 0,08$) a na lokalitě Lukavec byla aktivita fytasy u kontrolní odrůdy Azit 0,504 FTU/g ($\pm 0,07$), viz tabulka 11. Kontrolní odrůda Golden Promise z lokality Olomouc měla největší aktivitu fytasy 0,633 FTU/g ze všech pěstovaných kontrolních odrůd, viz obrázek 11.

Aktivita fytasy

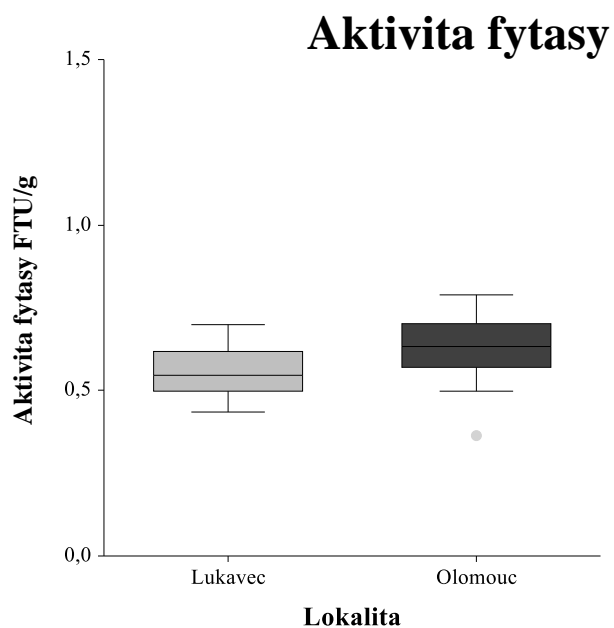


Obrázek 11. Grafické porovnání aktivity fytasy ve vzorcích z lokality Olomouc a z lokality Lukavec s vyznačenou směrodatnou odchylkou. GP – Golden Promise.

Tabulka 11. Aktivita fytasy ze vzorků z lokality Olomouc a Lukavec.

| Kontrolní netransgenní odrůdy | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| Odrůdy | | FTU/g Lukavec | FTU/g Olomouc |
| Azit | | 0,504 ± 0,07 | 0,497 ± 0,08 |
| Golden Promise | | 0,463 ± 0,05 | 0,633 ± 0,08 |
| Transgenní linie SCLW-GP-PHYA | | | |
| Linie | Potomstvo sklizně: lokalita rok | FTU/g Lukavec | FTU/g Olomouc |
| | Lukavec 2013 | 0,528 ± 0,13 | 0,632 ± 0,13 |
| | Olomouc 2013 | 0,624 ± 0,16 | 0,579 ± 0,13 |
| 1015-7 | Lukavec 2013 | 0,615 ± 0,17 | 0,668 ± 0,1 |
| | Olomouc 2012 | 0,582 ± 0,08 | 0,618 ± 0,12 |
| | Lukavec 2013 | 0,537 ± 0,15 | 0,576 ± 0,01 |
| | 880-4 | | |
| | Lukavec 2012 | 0,555 ± 0,13 | 0,731 ± 0,07 |
| | Olomouc 2012 | 0,477 ± 0,07 | 0,611 ± 0,03 |
| Průměr | | 0,556 ± 0,12 | 0,623 ± 0,09 |

Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

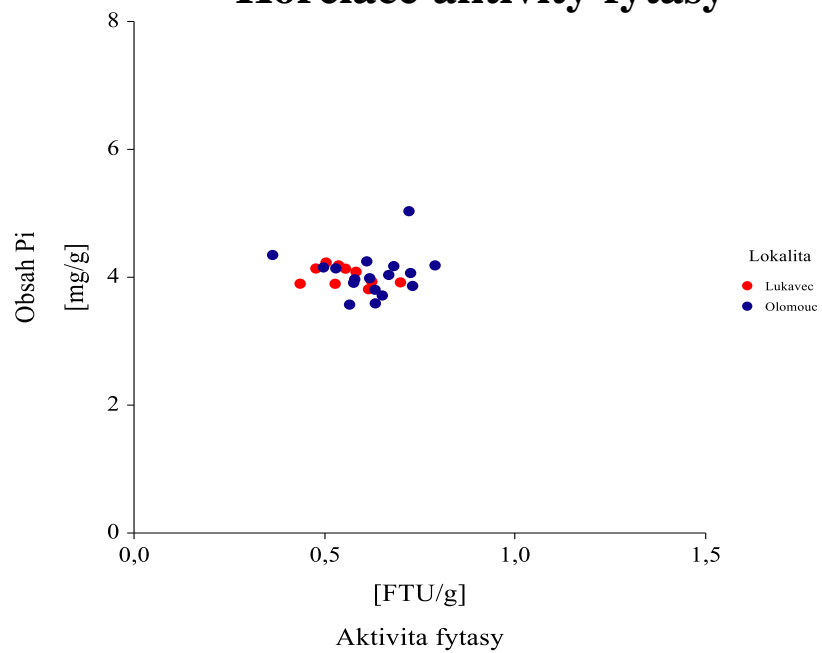


Obrázek 12: Grafické porovnání aktivity fytasy na lokalitách Lukavec a Olomouc.

4.2.4. Korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i

U měřených vzorků z obilí jarního ječmene pěstovaného na lokalitě Olomouc a Lukavec nebyla nalezena korelace (korelace 0,0015 při 27 vzorcích ječmene jarního) mezi množstvím P_i a aktivitou fytasy, viz obrázek 13.

Korelace aktivity fytasy

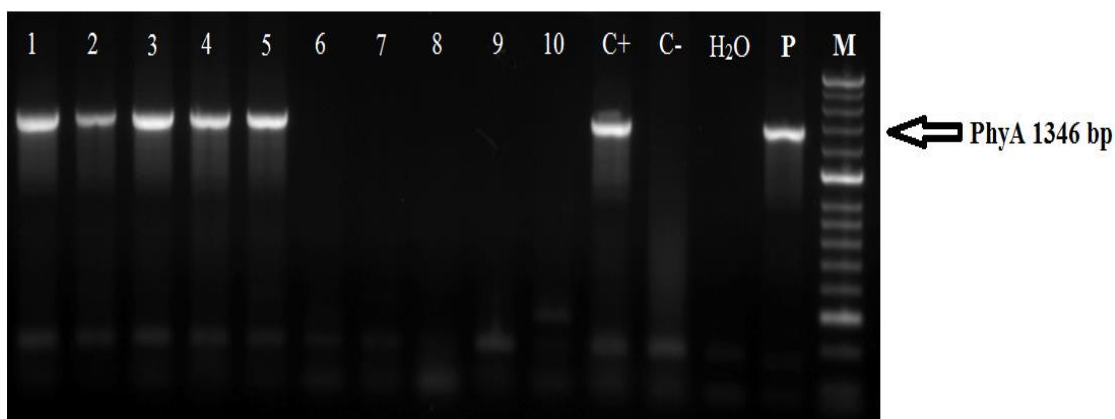


Obrázek 13: Korelační diagram popisující vztah mezi aktivitou fytasy a množstvím P_i měřených ve vzorcích z lokality Olomouc a Lukavec v roce 2015.

4.3. Detekce genu *phyA* u jarních ječmenů linie SCLW-GP-PHYA

4.3.1. Detekce genu *phyA* u transgenních linií jarního ječmene

U všech transgenních linií pěstovaných na lokalitě Olomouc byla prováděna PCR analýza na detekci genu *phyA*, viz obrázek 14. U transgenních linií 1015 – 7 (potomstvo OL 2013), 1015 – 7 (potomstvo LUK 2013) a 880 – 4 (potomstvo LUK 2013) byl detekován gen *phyA* u všech analyzovaných rostlin, viz tabulka 12.



Obrázek 14. Elektroforetogram PCR produktů. Vzorky 1–5 pozitivní linie DH 1015 - 7. Vzorky 6–10 negativní linie DH 4. C+ - pozitivní kontrola, C- negativní kontrola P - plazmid, M - marker molekulové hmotnosti.

Tabulka 12. Detekce genu *phyA* u transgenních linií jarního ječmene.

| Linie potomstva | Počet rostlin | Počet pozitivních rostlin |
|---------------------|---------------|---------------------------|
| 1015 – 7 (LUK 2012) | 10 | 6 |
| 1015 – 7 (OL 2013) | 10 | 10 |
| 1015 – 7 (LUK 2013) | 10 | 10 |
| 1015 – 7 (OL 2012) | 10 | 9 |
| 880 – 4 (LUK 2013) | 10 | 10 |
| 880 – 4 (LUK 2012) | 10 | 9 |
| DH směs | 10 | 1 |
| DH | 10 | 9 |

LUK - Lukavec, OL - Olomouc

4.3.2. Detekce genu *phyA* u DH linií jarního ječmene

U všech DH linií z lokality Olomouc byla prováděna PCR analýza na detekci genu *phyA*. U DH linií 12/5, 15/1, 5/1 byl gen *phyA* detekován u všech analyzovaných rostlin. U ostatních linií byl gen *phyA* detekován jen u několika rostlin nebo u žádné rostliny, viz tabulka 13.

Tabulka 13. Detekce genu *phyA* u DH linií jarního ječmene.

| DH linie | Počet rostlin | Počet pozitivních rostlin |
|----------|---------------|---------------------------|
| 12/5 | 2 | 2 |
| 15/1 | 2 | 2 |
| 3/3 | 2 | 1 |
| 1015-7 | 5 | 5 |
| 4 | 5 | 0 |
| 6/4 | 2 | 0 |
| 5/1 | 2 | 2 |
| 5/2/10 | 2 | 1 |
| 4/4 | 2 | 1 |
| 18/5 | 2 | 1 |
| 5/1 | 2 | 1 |
| 9/3 | 2 | 1 |
| 2/4 | 2 | 1 |
| 9/1 | 2 | 0 |
| 16/2 | 2 | 1 |
| 9/4 | 2 | 1 |
| 5/2/10 | 2 | 1 |

5. Diskuse

Při řešení problematiky kyseliny fytové u nepřežvýkavých zvířat existují dva přístupy pro lepší využitelnost minerálů a kationtů obsažené v obilkách jarního ječmene. První přístup se zaměřuje na vytvoření mutantů se sníženou hladinou kyseliny fytové, takzvaných *lpa* mutantů, které jsou charakteristické sníženým obsahem kyseliny fytové, a zároveň zvýšeným obsahem anorganického P_i v semenech rostlin (Larson a kol., 1998). Larson a kol. (1998) vytvořil *lpa* mutanty ječmene, jenž měli zvýšený obsah P_i při snížené hladině kyseliny fytové a v roce 2000 vytvořil *lpa* mutanty u kukuřice (Raboy a kol., 2000). V práci Vaculové (2012) se potvrdila hypotéza, že *lpa* mutanti mají při zvýšeném obsahu P_i v semenech jarního ječmene sníženou hladinu kyseliny fytové.

Druhým přístupem je vytváření transgenních rostlin, do nichž je vnášen gen pro fytasu, tvorbu heterologního enzymu fytasy. Pauk (2011) ve své práci měřil aktivitu fytasy jak u transgenních linií jarního ječmene SCLW-GP-PHYA v generaci T3 a T4, tak i u kontrolních odrůd jarního ječmene. Výsledky ukázaly, že transgenní ječmen má zvýšenou produkci enzymu fytasy v zrna, aktivita fytasy u vzorků odebraných z kontrolních rostlin byla naměřena v průměru 0,98 FTU/g a u transgenních rostlin byla aktivita fytasy naměřena v průměru 1,82 FTU/g.

Ministerstvo životního prostředí ČR udělilo dne 3. května 2012 Univerzitě Palackého v Olomouci povolení k uvádění geneticky modifikovaného jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou produkcí enzymu fytasy do životního prostředí.

Cílem diplomové práce bylo stanovit aktivitu fytasy a obsah volného P_i u transgenní linie jarního ječmene SCLW-GP-PHYA generace T8 a T9, které byly v roce 2015 pěstovány na lokalitách Olomouc a Lukavec a srovnat tyto hodnoty s odrůdou Golden Promise a Atribut. Rozdíl průměrného obsahu P_i mezi lokalitami byl u transgenních linií pouze 0,13 mg/g. Transgenní linie jarního ječmene SCLW-GP-PHYA pěstované na lokalitě Olomouc měly v průměru menší obsah P_i v zrna 4,38 mg/g ve srovnání s průměrnými transgenními liniemi, které byly pěstovány na lokalitě Lukavec, kde byl průměrný obsah P_i v zrna 4,51 mg/g. Z výsledků nemůžeme jednoznačně určit, na které lokalitě je větší obsah P_i , protože ve výsledných hodnotách je velký rozptyl měření. Na olomoucké lokalitě byla průměrná odchylka měření

$\pm 0,28$ mg/g, a rozdíl mezi lokalitami byl pouze 0,13 mg/g. Výsledky měření průměrné aktivity fytasy u transgenních linií v znu ukázaly, že aktivita fytasy byla větší na lokalitě Olomouc 0,659 FTU/g než na lokalitě Lukavec, kde byla aktivita fytasy 0,559 FTU/g. Ani u aktivity fytasy nemůžeme jednoznačně určit, na které lokalitě byla větší u transgenních linií, protože ve výsledných hodnotách je velký rozptyl měření. Na lokalitě Lukavec byla průměrná odchylka měření $\pm 0,12$ FTU/g, a rozdíl mezi lokalitami byl pouze 0,08 FTU/g. Odchylky měření mohly být způsobeny nepřesným měřením.

Také Vlčko (2015) ve své diplomové práci stanovoval aktivitu fytasy a obsah volného P_i v transgenních liniích jarního ječmene SCLW-GP-PHYA u generace T7 a T8 na lokalitách Olomouc a Lukavec v roce 2014. Výsledky uvedené v jeho práci ukázaly, že větší obsah volného P_i 4,5 mg/g byl naměřen na lokalitě Olomouc. Na lokalitě Lukavec byl obsah volného P_i naměřen pouze 2,9 mg/g. Rovněž ve své práci uvedl, že větší aktiva fytasy 0,73 FTU/g byla naměřena na lokalitě Lukavec než na lokalitě Olomouc, kde byla naměřena aktivita fytasy 0,58 FTU/g. Porovnáním měřené aktivity fytasy ze vzorků jednotlivých lokalit (Olomouc, Lukavec) byla zjištěna větší aktivita fytasy ve vzorcích z lokality Lukavec. Ale zároveň byl v roce 2014 na olomoucké lokalitě naměřen větší obsah volných fosfátů. Tyto výsledky jsou v rozporu s hypotézou, která uvádí, že větší aktivita fytasy v zrně obilovin má za následek i větší obsah volného P_i v obilovinách (Yao a kol., 2012, Verwoerd a kol., 1995). Výsledky z jednotlivých studií nám dále ukazují sníženou aktivitu fytasy, kdy v roce 2011 Pauk (2011) naměřil ve vzorku 1015-7 aktivitu fytasy 1,85 FTU/g. V roce 2015 byla průměrná aktivita na olomoucké lokalitě u transgenní linie 1015-7 0,62 FTU/g. Můžeme pozorovat postupné meziroční snižování průměrné aktivity fytasy ve vzorcích transgenní linie 1015-7 (1015) pěstované na lokalitě Olomouc.

Rozdílnost ve výše uvedených výsledcích aktivity fytasy, u níž dochází k poklesu mezi jednotlivými roky a lokalitami, může být způsobena nestejnými přírodními podmínkami, které byly v daném roce na jednotlivých lokalitách zaznamenány v období vegetační doby jarního ječmene (duben–srpen). V roce 2010 byly průměrné teploty vzduchu: lokalita Lukavec 14,34 °C, lokalita Olomouc 14,72 °C a úhrnné množství srážek: lokalita Lukavec 104,6 mm, lokalita Olomouc 119,2 mm. V roce 2014 byly průměrné teploty vzduchu: lokalita Lukavec 13,42 °C, lokalita

Olomouc 13,78 °C a úhrnné množství srážek: lokalita Lukavec 378 mm, lokalita Olomouc 376 mm. V roce 2015 za stejné období jako v roce 2010 a 2014 byly průměrné teploty vzduchu: lokalita Lukavec 15,38 °C, lokalita Olomouc 15,54 °C a úhrnné srážky: lokalita Lukavec 350 mm, lokalita Olomouc 234 mm.

Je možné, že přírodní podmínky mají daleko větší vliv na aktivitu fytasy a množství volného P_i v zrnech obilovin než změna genetické informace rostlin, jak uvádí Kim (Kim a kol, 2002). Podobně jako přírodní podmínky a lokalita pěstování může mít další vliv na aktivitu fytasy a množství obsahu P_i i druh a množství použitého hnojiva na jednotlivých lokalitách. Mezi další důvody snižování aktivity fytasy můžeme zařadit postupné umlčování vloženého heterologního genu *phyA* v transgenní linii jarního ječmene SCLW-GP-PHYA.

Při analýze PCR transgenních linií jarního ječmene SCLW-GP-PHYA byla prováděna detekce přítomnosti genu *phyA* v biologickém materiálu jarního ječmene, který byl pěstován na lokalitě Olomouc. PCR detekce transgenu *phyA* v osmé generaci potvrdila přítomnost zájmového genu *phyA*. Výsledky ukazují, že u transgenních linií 1015 -7a 880 - 4 byl detekován gen *phyA*. Do budoucna by bylo přínosné analyzovat heterologní gen *phyA* na úrovni mRNA a proteinu a stanovit hladinu exprese.

6. Závěr

Vnášením genu *phyA* z *Aspergillus niger* do odrůdy jarního ječmene Golden Promise byla vytvořena transgenní linie SCLW-GP-PHYA, která má zvýšenou aktivitu fytasy.

Přítomnost heterologního genu *phyA* u jarních ječmenů byla sledována na polích v lokalitách Olomouc a Lukavec. Na základě měření nebylo jednoznačně prokázáno, že větší aktivita fytasy v zrně obilovin má vždy za následek větší obsah volného P_i v obilovinách. Rozdílné přírodní podmínky sledovaných lokalit mají vliv na aktivitu fytasy *phyA* v transgenních liniích jarního ječmene SCLW-GP-PHYA. Je potřeba vyšlechtit takovou rostlinnou linii, u níž bude aktivita fytasy více rezistentní vůči změnám přírodních podmínek při pěstování.

Rozdílnost a snižování aktivity fytasy u transgenních linií jarního ječmene může být v časovém průběhu způsobena zvýšenou schopností rostliny regulovat expresi vloženého heterologního genu *phyA*. Pro zvýšení aktivity fytasy rostlin je potřeba omezit schopnost regulace exprese vloženého heterologního genu *phyA*, tím dojde k lepší využitelnosti volného P_i .

7. Seznam zkratek

DH– dihaploidní

FTU – fixed treatment unit

GP – Golden Promise

InsP6 - myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát

lpa _ low phytic acid

LUK – Lukavec

OL – Olomouc

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

pDNA – plazmidová DNA

PhyA – fytasa izolovaná z *Aspergillus niger*

P_i – fosfát, fosforečnan H₂PO₄⁻

PS – Pokusná stanice

8. Seznam použité literatury

Abiri R., Valdiani A., Maziah M., Shaharuddin N. A., Sahebi M., Yusof Z. N., Atabaki N., Talei D., (2016) A Critical Review of the Concept of Transgenic Plants: Insights into Pharmaceutical Biotechnology and Molecular Farming. *Current Issues in Molecular Biology* 18, 21-42.

Aureli R., Umar Faruk M., Cechová I., Elvig-Joergensen S. G., Fru F., Broz., (2011) The Efficacy of a Novel Microbial 6-Phytase Expressed in *Aspergillus oryzae* on the Performance and Phosphorus Utilization on Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science* 10, 160-168.

Barrientos L., Scott J. J., Murthy P. P. N., (1994) Specificity of Hydrolysis of Phytic Acid by Alkaline Phytase from Lily Pollen. *Plant Physiology* 106, 1489-1495.

Beneš J., Šálková T., Vaněček Z., (2011) Původ a nejstarší historie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) na Předním východě: pohled archeobotaniky. *Kvasný průmysl* 57, 121-122.

Bohn L., Meyer A. S., Rasmusen S. K., (2008) Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9, 165-191.

Brejnholt S. M., Dionisio G., Glitsoe V., Skov L. K., Brinch-Pedersen H., (2011) The degradation of phytate by microbial and wheat phytases is dependent on the phytate matrix and the phytase origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1398-1405.

Brinch-Pedersen H., Olesen A., Rasmussen S. K., Holm P. B., (2000) Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Molecular Breeding* 6, 196-206.

Brinch-Pedersen H., Sørensen L. D., Holm P. B., (2002) Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in plant science* 7, 118-25.

Dai F., Qiu L., Ye L., Wu D., Zhou M., Zhang G., (2011) Identification of a Phytase Gene in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLOS ONE* 6, e18829.

Cooper, J. R., Gowing, H. S., (1983) Mammalian small intestinal phytase (EC 3.1.3.8). *British Journal of Nutrition* 50, 673-678.

Dardová M., (2015) Technologie pěstování a hnojení ječmene (*Hordeum*) s cílem maximální kvality a produktu a jeho využití pro výrobu doplňku stravy „zeleného ječmene“. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Deshpande S. S, Cheryan M., (1984). Effects of phytic acid divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. *Journal of Food Science* 49, 516-519.

Dhole V. J., Reddy K. S., (2015) Genetic variation for phytic acid content in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *The Crop Journal* 3, 157-162.

Duskova, D., Marounek, M., Brezina, P., (2001) Determination of phytic acid in feeds and faeces of pigs and poultry by capillary isotachopheresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 36-41.

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349.

Edwards, H. M., (1993) Dietary 1,2,5-dihydrocholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *The Journal of Nutrition* 123, 567-577

Forster B., P., (2001) Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica* 120, 317-328.

Guggenbuhl P., Torrallardona D., Cechova I., Simões Nunes C., Waché Y., Fru F., Broz J., (2012) The Efficacy of a Novel Microbial 6-phytase Expressed in *Aspergillus Oryzae* on the Performance and Phosphorus Utilization in Swine. *Journal of Animal Science Advances* 2, 438-452.

Hanáková M., (2012) Využití transgenních linií ječmene SCLW-GP-PHYA ve šlechtění. Bakalářská práce, Mendelova univerzita v Brně.

Holme I. B., Dionisio G., Brinch-Pedersen H., Wendt T., Madsen C. K., Vince E., Holm P. B., (2012) Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnology Journal* 10, 237-247.

Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H., (1956) Microdeterminations of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28, 1756-1758.

- Chen R., Xue G., Chen P., Yao B., Yang W., Ma Q., Fan Y., Zhao Z., Tarczynski M. C., Shi J., (2008) Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gen. *Transgenic Research* 17, 633-643.
- Cheryan M., (1980) Phytic acid interactions in food systems. *Food Science and Nutrition* 13, 297-335.
- Christou P., McCabe D., Swain W. F., (1988) Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. *Plant Physiology* 87, 671-674.
- Jiang L., Phillips T. E., Hamm Ch. A., Drozdowicz Y. M., Rea P. A., Meashima M., Rogers S. W., Rogers J. C., (2001) The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *The Journal of Cell Biology* 155, 991-1002.
- Kim J. C., Mullan B. P., Selle P. H., Pluske J. R., (2002) Levels of total phosphorus, phytatephosphorus, and phytase activity in three varieties of Western Australian wheats in response to growing region, growing season, and storage. *Australian Journal of Agricultural Research* 53, 12, 1361-1366.
- Kim T., Mullaney E. J., Porres J. M., Roneker K. R., Crowe S., Rice S., Ko T., Ullah A. H. J., Daly C. B., Welch R., Lei X.G., (2006) Shifting the pH Profile of *Aspergillus niger* PhyA Phytase To Match the Stomach pH Enhances Its Effectiveness as an Animal Feed Additive. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4397-4403.
- Kies A. K., De Jonge L. H., Kemme P. A., Jongbloed A. W., (2006) Interaction between Protein, Phytate, and Microbial Phytase. *In Vitro Studies* 54, 1753-1758.
- Komari T., Kubo T., (1999) Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Improvement of Cereal Crops* 5, 43-82. ISBN 978-94-0 1 0-6016-5
- Klein T. M., Happer E. C., Svab Z., Sanford J. C., Fromm Fromm M. E., Maliga P., (1988) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 8502-8505.
- Larson S. R., Young K. A., Cook A., Blake T. K., Raboy V., (1998) Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 141-146.

- Liu C., Campbell B. C., Godwin I. D., (2014) Sorghum Genetic Transformation by Particle Bombardment. *Methods in Molecular Biology* 1099, 219-234.
- Ma D., Zuo Y., Sun D., Wang Ch., Guo., (2013) Characterization of the TaMIPS gene from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and changes in its expression pattern with phytic acid accumulation in seeds during grain filling. *Journal of Cereal Science* 57, 437-443.
- Marounek M., (2004) Význam kyseliny fytové ve výživě zvířat a lidí a důsledky její přítomnosti v krmivech. VÚTV Praha – Uhřetěves, (online dostupné na internetu: <http://www.vuzv.cz/old/vyziva/studie10.rtf> , citováno 1.11 2016).
- Matsuno K., Fujimura T., (2014) Induction of phytic acid synthesis by abscisic acid in suspension-cultured cells of rice. *Plant Science* 217-218, 152-157.
- Ondřej M., Drobník J., (2002) *Transgenoze rostlin*. ISBN 80-200-0958-2.
- Ondřej M., (2003) *Transgenní organismy, genové inženýrství a biotechnologie*. *Životní Prostředí* 37,61-63.
- Pauk A., (2011) *Expres genu phyA a studium aktivity fytázy a transgenních rostlinách ječmene*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Prošková A., (1998) Stanovení obsahu kyseliny fytové v potravinářských surovinách rostlinného původu. *Czech Journal of Food Sciences* 16, 215-220
- Raboy V., Gerbasi P. F., Young K. A., Stoneberg S. D., Pickett S. G., Bauman A. T., Murthy P.P.N., Sheridan W.F. Ertl D.S., (2000) Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiology* 124, 355-368.
- Reddy N. R., Sathe S. K., Salunkhe D. K., (1982) Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research* 28, 1-92.
- Sandberg, A. S., Larsen, T., Sandström, B., (1993) High dietary calcium level decreases colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet. *The Journal of Nutrition* 123, 559-566.
- Shi J., Wang H., Schellin K., Li B., Faller M., Stoop J. M., Meeley R. B., Ertl D. S., Ranch J. P., Glassman K. (2007) Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology* 25, 930-937.

- Špaňo M., (1992) Isotachoforetické stanovení kyseliny fytové. diplomová práce, VŠCHT Praha
- Vaculová K., Balounková M., Sedláčková I., Kvasnička F., Mikulíková R., Běláková S., Benešová K., Pouch M., Ehrenbergerová J., (2011) Metodika prebreedingu ječmene jarního s diferencovaným obsahem přirozených škodlivých látek v zrně pro šlechtění odrůd nesladovnického typu. Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž. ISBN: 978-80-904594-9-6
- Vaculová K., Balounová M., Kvasnička F., Sedláčková I., Ehrenbergerová J., Václavíková E., Pouch M., (2012) Variabilita obsahu kyseliny fytové v zrně ječmene. Kvasný průmysl 58, 100-108.
- Verwoerd T., C., van Paridon P., A., Ooyen A., J., J., Lent J., W., M., Hoekema A., Pen J., (1995) Stable Accumulation of *Aspergillus niger* Phytase in Transgenic Tobacco Leaves. *Plant Physiology* 109, 1199-1205.
- Vlčko T., (2015) Charakteristika transgenního ječmene SCLW-GP- PHYA. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Wan Y., Lemaux P. G., (1994) Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants. *Plant Physiology* 104, 37-48.
- Wang Z., Liu Q., Pan F., Yuan L., Yin X., (2015) Effects of increasing rates of zinc fertilization on phytic acid and phytic acid/zinc molar ratio in zinc bio-fortified wheat. *Field Crops Research* 184, 54-61.
- Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehman M., Loon A. P. G., (1999) Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 367-373.
- Yao M. Z., Zhang Y. H., LU W. L., Hu M. Q., Wang W., Liang A. H., (2012) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological application. *Journal of Applied Microbiology* 112, 1-14.
- Zimolka J., (2006) Ječmen - formy a užitkové směry v České republice. 145, 15-52, ISBN 80-867-2618-5.

Internetové zdroje:

Územní teploty

(dostupné online dne 1. 8. 2016: <http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty>)

Půdní podmínky kraje Vysočina

(dostupné online dne 20. 7. 2016:

gynome.nmmn.cz/gisvysociny/index.php?ln=cz&id=5&cat=c&typ=menu)

Půdní mapy

(dostupné online 21. 7. 2016: http://www.mzp.cz/cz/pudni_mapy)

Jarní ječmen Azit

(dostupné online dne 16. 7. 2016:

www.limagraincentraleurope.com/docs/products/597_pdf1)

Obrázek kyseliny fytové

(dostupné online dne 30. 6. 2016:

http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1733&typ=html)

Evropská legislativa GMO

(dostupné online dne 22. 7. 2016: http://www.mzp.cz/cz/evropska_legislativa_gmo)

Celosvětová produkce ječmene

(dostupné online dne 1. 11 2016: <https://www.statista.com/statistics/271973/world-barley-production-since-2008/>).

9. Přílohy

Příloha 1: Výsledky statistických testů

Příloha 2: Plánky polních pokusů

9.1. Výsledky statistických testů

Dvou-výběrový t-test pro vyhodnocení v obsahu P_i u vzorků ječmene jarního z lokality Olomouc a Lukavec.

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah P_i mezi vzorky ze dvou lokalit se neliší)

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C6=Lukavec) - (C6=Olomouc)

| Alternative Hypothesis | Mean Difference | Standard Error of Difference | T-Statistic | d.f. | Prob Level | Reject H0 at $\alpha = 0,050$ |
|------------------------|-----------------|------------------------------|-------------|------|------------|-------------------------------|
| $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$ | -0,0234088 | 0,1131828 | -0,2068 | 25 | 0,83782 | No |

Dvou-výběrový t-test pro vyhodnocení rozdílu v aktivitě fytasy u vzorků jarního ječmene z lokality Olomouc a Lukavec.

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah P_i mezi vzorky ze dvou lokalit se neliší)

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C6=Lukavec) - (C6=Olomouc)

| Alternative Hypothesis | Mean Difference | Standard Error of Difference | T-Statistic | d.f. | Prob Level | Reject H0 at $\alpha = 0,050$ |
|------------------------|-----------------|------------------------------|-------------|------|------------|-------------------------------|
| $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$ | -0,06638899 | 0,03733673 | -1,7781 | 25 | 0,08755 | No |

Korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i

Linear Regression Report

Dataset Untitled

Y = C4 X = C5

Regression Estimation Section

| Parameter | Intercept B(0) | Slope B(1) |
|------------------------------|----------------|------------|
| Regression Coefficients | 4,0358 | 0,0042 |
| Lower 95,0% Confidence Limit | 3,3233 | -1,1733 |
| Upper 95,0% Confidence Limit | 4,7482 | 1,1817 |
| Standard Error | 0,3459 | 0,5717 |

| | | |
|----------------------------------|------------|-----------|
| Standardized Coefficient | 0,0000 | 0,0015 |
| T Value | 11,6667 | 0,0073 |
| Prob Level (T Test) | 0,0000 | 0,9942 |
| Reject H0 (Alpha = 0,0500) | Yes | No |
| Power (Alpha = 0,0500) | 1,0000 | 0,0500 |
| Regression of Y on X | 4,0358 | 0,0042 |
| Inverse Regression from X on Y | -1163,7839 | 1954,7017 |
| Orthogonal Regression of Y and X | -1020,8735 | 1715,4981 |

Notes:

The above report shows the least-squares estimates of the intercept and slope followed by the corresponding standard errors, confidence intervals, and hypothesis tests. Note that these results are based on several assumptions that should be validated before they are used.

Estimated Model

(4.03578653102051) + (0.00418052789041212) * (C5)

Analysis of Variance Section

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F-Ratio | Prob Level | Power (5,0%) |
|------------|----|----------------|--------------|---------|------------|--------------|
| Intercept | 1 | 440,309 | 440,309 | | | |
| Slope | 1 | 4,319951E-06 | 4,319951E-06 | 0,0001 | 0,9942 | 0,0500 |
| Error | 25 | 2,019888 | 0,08079551 | | | |
| Adj. Total | 26 | 2,019892 | 0,07768816 | | | |
| Total | 27 | 442,3289 | | | | |

s = Square Root (0,08079551) = 0,2842455

Notes:

The above report shows the F-Ratio for testing whether the slope is zero, the degrees of freedom, and the mean square error. The mean square error, which estimates the variance of the residuals, is used extensively in the calculation of hypothesis tests and confidence intervals.

16.6.2016 13:54:56 4

Linear Regression Report

Dataset Untitled

Y = C4 X = C5

Tests of Assumptions Section

| Assumption/Test | Test Value | Prob Level | Is the Assumption Reasonable at the 0,2000 Level of Significance? |
|--|------------|------------|---|
| Residuals follow Normal Distribution? | | | |
| Shapiro Wilk | 0,8751 | 0,003771 | No |
| Anderson Darling | 0,7977 | 0,038824 | No |
| D'Agostino Skewness | 2,9848 | 0,002838 | No |
| D'Agostino Kurtosis | 3,1163 | 0,001831 | No |
| D'Agostino Omnibus | 18,6203 | 0,000091 | No |
| Constant Residual Variance? | | | |
| Modified Levene Test | 0,6923 | 0,413257 | Yes |
| Relationship is a Straight Line? | | | |
| Lack of Linear Fit F(0, 0) Test | 0,0000 | 0,000000 | No |

No Serial Correlation?

Evaluate the Serial-Correlation report and the Durbin-Watson test if you have

equal-spaced, time series data.

Notes:

A 'Yes' means there is not enough evidence to make this assumption seem unreasonable. This lack of evidence may be because the sample size is too small, the assumptions of the test itself are not met, or the assumption is valid.

A 'No' means that the assumption is not reasonable. However, since these tests are related to sample size, you should assess the role of sample size in the tests by also evaluating the appropriate plots and graphs. A large dataset (say $N > 500$) will often fail at least one of the normality tests because it is hard to find a large dataset that is perfectly normal.

Normality and Constant Residual Variance:

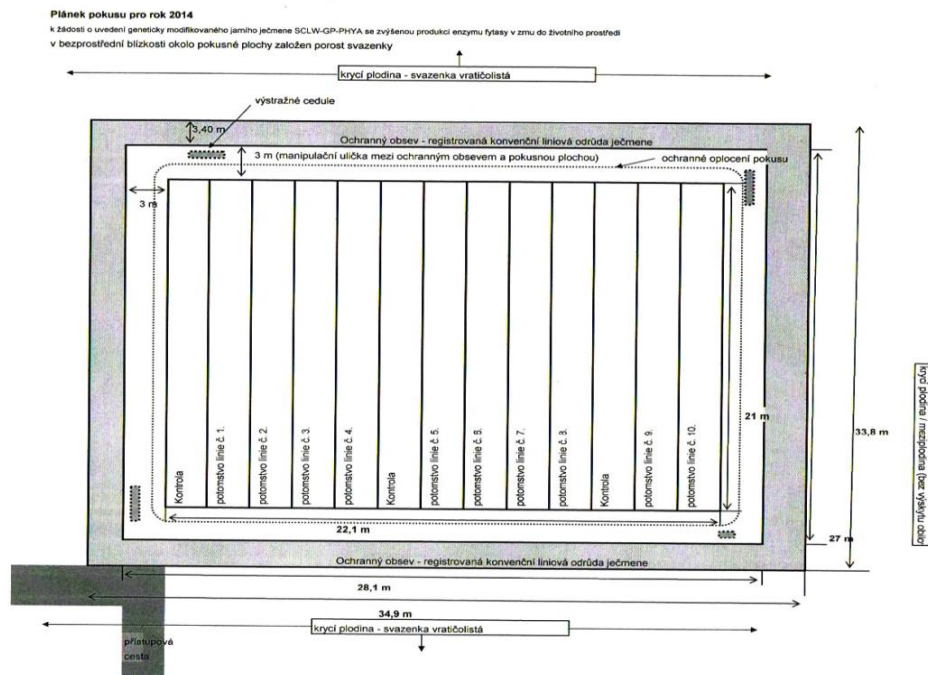
Possible remedies for the failure of these assumptions include using a transformation of Y such as the log or square root, correcting data-recording errors found by looking into outliers, adding additional independent variables, using robust regression, or using bootstrap methods.

Straight-Line:

Possible remedies for the failure of this assumption include using nonlinear regression or polynomial regression.

9.2. Plánky polních pokusů

9.2.1. Plánek polního pokusu v Olomouci

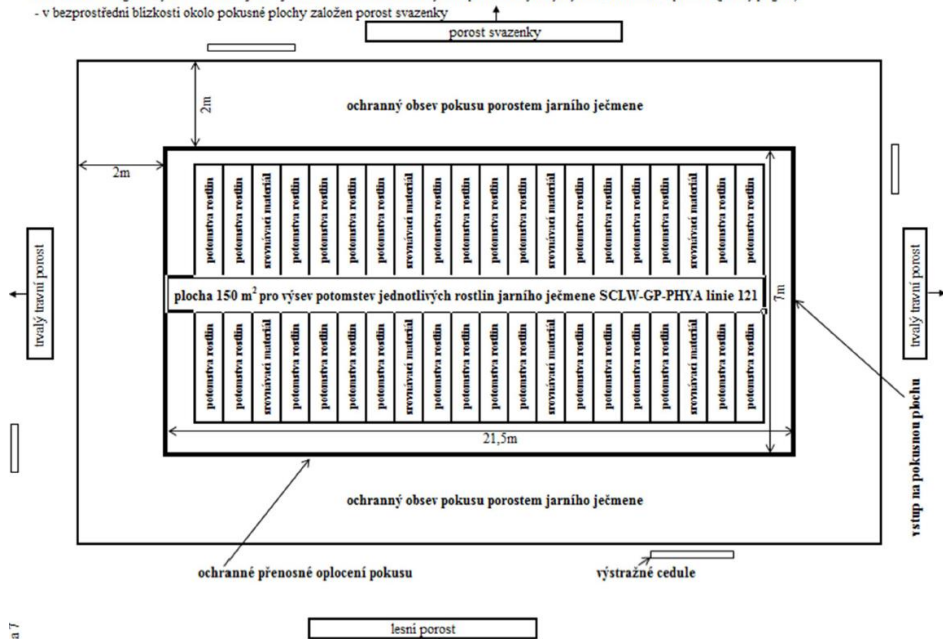


9.2.2. Plánek polního pokusu v Lukavci

Plánek pokusu pro rok 2015

k žádosti o uvedení geneticky modifikovaného jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou produkcí enzymu fytasy v zrně do životního prostředí (pěstební program).

- v bezprostřední blízkosti okolo pokusné plochy založen porost svazenky



Příloha 7

* srovnávací materiál: netransgenní původní odrůda Golden Promise