

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra rostlinné produkce**



**Biotechnologie versus ekologické zemědělství**

**Biotechnology versus organic farming**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí práce:** Ing. Perla Kuchtová Ph.D.

**Autor:** Ondřej Kutych

© 2013 ČZU v Praze

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji tímto, že jsem svou bakalářskou práci „Biotechnologie versus ekologické zemědělství“ vypracoval samostatně, pod vedením Ing. Perly Kuchtové Ph.D. s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2013

---

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych touto formou poděkoval Ing. Perle Kuchtové Ph.D. za navrnutí a přidělení daného tématu. Dále bych jí velice rád poděkoval za vedení a pomoc při shánění vědecké literatury.

# Biotechnologie versus ekologické zemědělství

---

## SOUHRN

Práce se zabývá oborem rostlinných biotechnologií, které stojí za mnoha úspěchy moderního zemědělství. Jsou zde podrobně rozebrány důležité rostlinné biotechnologie, jejich postupy historie a výsledky. Speciálně se zaměřuje na problematiku transgenních plodin, na techniku jejich vytváření, na jejich rozvoj a rozšíření po světě. Tato technologie rovněž vyvolává mnohé kontroverze a je rozhodně odmítána ekologickými zemědělci. Důvody jejich averze jsou rozebrány a ukazuje se, že ne všechny jsou dostatečně vědecky podložené. Ty nejoprávněnější jsou spíše sociální a ekonomické.

**Klíčová slova:** biotechnologie, rostlinné biotechnologie, transgenní plodiny, indukovaná rezistence, ekologické zemědělství

# Biotechnology versus organic farming

---

## SUMMARY

This work deals with the field of plant biotechnology, which is behind many achievements in modern agriculture. The important plant biotechnologies are analyzed in detail, their history, procedures and results. Work specifically focuses on the issue of transgenic crops, on technology for their making, their development and expansion throughout the world. This technology also raises many controversies and is definitely avoided by ecological farmers. Reasons for their aversion are analyzed and it shows that not all are sufficiently scientifically substantiated. The most important of them are more social and economic, than scientific.

**Key words:** biotechnologies, plant biotechnologies, transgenic plants, induced resistance, organic farming

# OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Cíl práce.....	7
3. Literární rešerše .....	8
3.1 Biotechnologie .....	8
3.1.1 Historie biotechnologie.....	8
3.1.2 Rozdělení biotechnologie .....	8
3.2 Rostlinné biotechnologie .....	10
3.2.1 Vytváření nových genetických variací .....	11
3.2.1.1 Zdvojování chromosomů.....	11
3.2.1.2 Somatická hybridizace.....	12
3.2.1.3 Haploidy a zdvojené haploidy .....	13
3.2.1.4 Odrůdy sterilních rostlin.....	13
3.2.1.5 Mutageneze.....	13
3.2.2 Screening, selekce.....	15
3.2.2.1 Marker assisted selection.....	16
3.2.3 Propagace a tkáňové kultury.....	17
3.2.3.1 Mikropropagace.....	17
3.2.4 Tkáňové kultury.....	17
3.3 Transgenní technologie v rostlinné produkci.....	19
3.3.1.1 Manipulace DNA.....	20
3.3.1.2 Techniky transformace rostlin.....	22
3.3.1.2.1 Přenos zprostředkovaný skrze <i>Agrobacterium</i> .....	22
3.3.1.2.2 Přímé metody přenosu genu.....	23
3.3.1.3 První generace GMO rostlin.....	24
3.3.1.3.1 Tolerance k herbicidům.....	25
3.3.1.3.2 Odolnost proti hmyzu.....	26
3.3.1.4 Druhá generace transgenních plodin .....	27
3.3.1.4.1 Zlatá rýže.....	28
3.3.2 GM plodiny ve světě.....	28
3.4 Ekologické zemědělství versus GM plodiny .....	30
4. Závěr .....	38
5. Zdroje.....	40

## 1. Úvod

Termín biotechnologie poprvé použil maďarský zemědělský inženýr Ereky, aby popsal velkoobjemové mikrobiální výrobní procesy vyvinuté na začátku 20. Století (Murphy, 2011). Pojem biotechnologie může být obtížné přesně definovat, proto je důležité, aby byl přesně vymezen. Např. dle Konvence Biologické Diverzity je „biotechnologie jakákoliv technologická aplikace, která užívá biologické systémy, žijící organismy nebo jejich deriváty k vytváření nebo modifikování produktů nebo procesů pro specifický účel“ (FAO, 2011). Další definicí může být například: použití vědeckých a inženýrských principů při zpracování materiálů biologickými prostředky pro zajišťování zboží a služeb (Fojta, 2006). Nejširší definice v sobě pojímá moderní i tradiční biotechnologie: Využívání biologických organismů nebo jejich derivátů člověkem. Takto lze biotechnologii definovat až moc ze široka a do této definice by se mohlo v podstatě zahrnout i zemědělství jako takové nebo dokonce i lovectví sběračství. Tato definice je pro účely této práce tedy zbytečně rozsáhlá. Tradiční biotechnologie, které už jsou našim potřebám mnohem blíže, jako je fermentace k výrobě alkoholu a užití kvasu při výrobě chleba, už jsou bližší moderní definici, nicméně jelikož jsou spíše produktem metody pokus omyl a ne cílevědomé vědecké práce (Murphy, 2011). Pro účely této práce bude důležitá moderní definice tohoto pojmu uvedená Konvencí Biologické Diverzity. Bude sloužit jako začátek pro postupné podrobnější rozebrání moderních biotechnologií a k propracování se k technologii genetické manipulace rostlin.

Samotná biotechnologie je manipulací s živými systémy. V poslední době bývá často zaměňována s genetickým inženýrstvím, ale většina biotechnologií v sobě žádnou manipulaci s geny nezahrnuje. V práci budou rozebrány ty nejdůležitější rostlinné biotechnologie, které významným způsobem zasáhly do rozvoje zemědělství (Murphy, 2011).

Geneticky modifikované plodiny na sebe v posledních letech přitáhly značnou pozornost ať již kvůli zdravotním nebo environmentálním problémům, které údajně způsobují (Slater a kol., 2008) Zčásti i kvůli těmto problémům je transgenní technologie ve sporu s ekologickým zemědělstvím. Důvody proč tomu tak je, budou rozebrány v poslední třetině této práce.

## **2. Cíl práce**

Cílem práce je definovat a shrnout biotechnologie se zaměřením na ty rostlinné. Charakterizovat ty nejdůležitější z nich a přiblížit jejich využití a význam. Shromáždit dostupné informace o geneticky modifikovaných rostlinách a transgenních technologiích a jejich postavení ve světě. A nakonec posoudit argumenty, které vedou k jejich odmítání ze strany ekologických zemědělců.



### **3. Literární rešerše**

#### **3.1 Biotechnologie**

##### **3.1.1 Historie biotechnologie**

Okolo 50 000 let před naším letopočtem byly položeny základy biotechnologie. Když bylo různými kulturami na světě zjištěno, že pokud se některé rostliny nechají zfermentovat v uzavřené nádobě vzniknou tak alkoholické nápoje (Murphy, 2011).

Dle Jaroslava Foly (2006) lze historii biotechnologie rozdělit do šesti období: Počáteční období do roku 1865 vycházející z tradičních postupů jako je výroba alkoholických nápojů a fermentovaných potravin, sýrů a dalších potravin nebo například užití hub pro léčení ran. Další období, které lze shrnout jako Pasteurovu éru, ve které již bylo užíváno sofistikovanějších a cílevědomějších metod k výrobě alkoholů a ketonů, organických kyselin nebo k aerobnímu čištění odpadních vod. Následuje období moderní průmyslové biotechnologie (1940 – 1960) kdy začíná kultivace mikroorganismů pro výrobu antibiotik a k mikrobiální transformaci steroidů. Období 1960 – 1975: výroba aminokyselin, bílkovin z jednobuněčných organismů, kultivace živočišných buněk pro výrobu antivirových vakcín, imobilizace enzymů a buněk, výroba technických enzymů, k anaerobnímu zpracování odpadních vod a další. Období nových biotechnologií I po roce 1975: monoklonální protilátky, genové inženýrství (lidský inzulín, vakcína proti průjmu dobytka, výroba bioprosesorů a biočipů, konstrukce umělých bílkovin. Nové biotechnologie II po roce 1990 : analýza lidského genomu, náhrada lidských orgánů, genové terapie, nanobiotechnologie

Během 19. století se zvětšovali vědomosti o podstatě organismů a biologických procesů a spolu s rozvojem inženýrství začaly být biotechnologie aplikovány mnohem efektivněji. Z otevřených van byla fermentace přesunuta do uzavřených kontejnerů, kde mohly být biologické procesy mnohem lépe kontrolovány a řízeny, a kde zmizely problémy s kontaminací. Dále započalo cílené množení kmenů užívaných mikroorganismů namísto spoléhání se na nedefinované mikroby (Murphy, 2011).

##### **3.1.2 Rozdělení biotechnologie**

Rozdělit biotechnologie lze např. dle disciplín, které jsou využívány v biologických procesech na: inženýrské, biologické a chemické a jejich vzájemné propojení. A dle realizace: biosyntézou nebo biotransformací. Dle hospodářského využití: zdravotnictví a farmacie,

potravinářské chemické a zemědělské získávání energie a ochraně prostředí (Fojta, 2006). Moderní biotechnologii můžeme dle využití rozdělit na tzv. bílou industriální biotechnologii, červenou lékařskou a zelenou rostlinnou. Toto jsou z hlediska rozsahu využití v současnosti ty nejdůležitější směry. (Murphy, 2011)

### **Industriální biotechnologie**

Industriální biotechnologii lze definovat jako: „ Moderní užití a aplikace biotechnologie pro udržitelnou výrobu biochemikálií, biomateriálů a biopaliv z obnovitelných zdrojů užitím živých buněk a/nebo jejich enzymů“(Murphy, 2011). Zabývá se velkovýrobou užitečných organických látek, které nemohou být vyrobeny pouze využitím čistě chemických procesů. Vyráběny jsou například antibiotika nebo různé enzymy potřebné v potravinářském průmyslu, jako jsou amyláza a lipáza. Kultury jsou drženy ve velkých bioreaktorech nebo fermentorech o kapacitě až 200 000 litrů. Udržování probíhá pomocí automatických, počítačem řízených systémů, které udržují potřebnou teplotu, výživu, pH a dalších, k jejich vývoji potřebných, podmínek. Možnosti odvětví při využívání mikrobiálních kultur k výrobě užitečných látek se značně rozšířili na konci 20. století s příchodem rekombinantních DNA technologií. Některé novější postupy s použitím transgenních mikroorganismů spadají dnes pod tzv. Červenou lékařskou biotechnologii (Murphy, 2011).

### **Lékařská biotechnologie**

Vylepšená industriální biotechnologie široce využívající transgenní mikroorganismy, které se užívají převážně pro lékařské účely. Transgenní mikroorganismy spolu se zvířecími tkáňovými kulturami jsou užívány k výrobě další generace rekombinantních farmaceutik. Například velmi cenné proteiny nebo peptidy jako jsou lidský insulin, krev srážející faktory a vakcíny, které dnes mohou být vyráběny ve velkých množstvích a naprosto sterilně. Dříve byla biotechnologie značně omezena neschopností prokaryot a nižších eukaryot produkovat plné spektrum post translačních modifikací jako je N- glycosylation, přítomný v bílkovinách vyšších živočichů. S užitím transgenních živočišných tkáňových kultur je toto dnes možné. Dříve byly tyto látky odebírány přímo z živých nebo mrtvých zvířat a lidí, což někdy vedlo ke kontaminaci např. viry hepatitidy B nebo HIV, kdy tisíce lidí jako jsou hemofilici, kteří jsou závislí na krev srážejících faktorech, obdrželi kontaminovaný materiál. V současnosti je tomuto zamezováno konstruováním buněk transformovaných příslušnými lidskými geny, takže produkty mohou být vyráběny sterilně a bez kontaminace.

Nejnovější využití červené biotechnologie spočívá v získávání produktů skrze geneticky modifikovaná zvířata. Ty mohou dodávat Rekombinantní proteiny přes mléko nebo vajíčka. Např. kozy ve svém mléce mohou produkovat krev srážející faktory a slepice ve svých vajíčkách protilátky (Murphy, 2011).

### **Rostlinná biotechnologie**

Zelená biotechnologie může být popsána jako využití pokročilých biotechnologických metod při pěstování suchozemských rostlin, řas a nebo cyanobakterií. Stejně jako u obou předchozích může být použita transgenní technologie, ale v žádném případě tomu tak není vždy. Existuje řada pokročilých množitelských metod, které transgenezi neobsahují (Murphy, 2011). Rostlinné biotechnologii bude věnována samostatná kapitola.

Kromě rostlin je v zemědělství užívána biotechnologie i v souvislosti s hospodářskými zvířaty a rybami. O biotechnologii užívané při nakládání s rybami se někdy hovoří jako o takzvané modré biotechnologii. U dobytka se jedná o využívání umělé inseminace, reprodukčního klonování nebo například mikropropagace. U ryb se jedná především o transgenní technologie, které například umožňují rychlejší růst anebo odolnost vůči nemocem a parazitům. Oproti rostlinné biotechnologii jsou biotechnologie související se zvířaty teprve na svém počátku (Murphy, 2011).

### **3.2 Rostlinné biotechnologie**

Škála rostlinných biotechnologií je poměrně rozsáhlá a zdaleka se netýká pouze jejich genetické manipulace. V rostlinné produkci jsou moderní biotechnologie užívány již od počátku dvacátého století (Murphy, 2011). Se základem v tradičních znalostech o rostlinné biologii posílené znalostmi nejprve mendelistické a později molekulární genetiky, docházelo již od začátku dvacátého století k jejich značnému rozvoji a modernizaci. S postupným příchodem sofistikovaných metod jako je indukovaná mutageneze, užití tkáňových kultur až k selekci vybraných znaků na základě molekulární analýzy, došly konvenční biotechnologie na takovou úroveň, že dnes, v 21. století, již ztratilo význam dělení na konvenční a moderní biotechnologii. Transgenní technologie jsou od ostatních odděleny ne až tak kvůli přístupu vědců, jako spíše kvůli přístupu konzumentů a politiků a kvůli legislativním opatřením (FAO, 2011).

V základu se můžou moderní rostlinné biotechnologie rozdělit do několika kategorií. Na vytváření nových genetických variací (vylepšování genomu), selekci, screening

a propagaci (včetně tkáňových kultur). Zvláště mohou být odděleny transgenní postupy, ale patří pod vytváření nových genetických variací, ale bude jim věnováno více v samostatné části práce.

### **3.2.1 Vytváření nových genetických variací**

Do této kategorie můžou být zařazeny následující techniky: zdvojování chromosomů, somatickou hybridizaci, haploidy a zdvojené haploidy, odrůdy sterilních rostlin, mutagenezi, mezidruhovou hybridizaci (vzdálené křížení).

Možnosti vytváření nových genetických variací se v druhé půlce dvacátého století velmi rozrostly s objevem užívání tkáňových kultur a začátkem užívání růstových regulátorů (FAO, 2011). Dalším důležitým krokem bylo užívání mutageneze. S lepší znalostí rozmnožování rostlin bylo také možné začít křížit vzdáleněji příbuzné rostliny. Tato potřeba vyplynula také z toho, že bylo při šlechtění nových odrůd často užíváno inbredních linií, a také díky tomu, že se zužovalo množství pěstovaných odrůd. Proto vyvstala potřeba křížit vzdáleněji příbuzné rostliny (Murphy, 2011). Jelikož vzdálené křížení mezi více příbuznými rostlinami často následují problémy s kompatibilitou jejich genomů, je zapotřebí pomocných metod jako je záchrana embrya, fúze asymetrických buněk, implantace jádra nebo somatická embryogeneze (FAO, 2011).

K nejdůležitějším metodám, které napomáhají vzdálenému křížení, patří chemicky indukované zdvojení chromosomů a záchrana embrya. Zdvojení chromosomů dále umožnilo využívat techniky, jako je somatická hybridizace a haploidní množení (Murphy, 2011).

#### **3.2.1.1 Zdvojování chromosomů**

Zdvojování chromosomů je jedna z nejdůležitějších technik pro vytváření plodných vzdálených hybridů. Ty bývají kvůli vzdálené genetické příbuznosti rodičů často neplodné. Díky odlišnosti chromozomálních sad přejatých od odlišných rodičů, bývá narušeno stabilní párování chromosomů během meiózy. Pokud je ale počet chromozomů uměle zdvojen, jsou rostliny schopny produkovat funkční pyl a vajíčka. Pro zdvojování chromosomů je užíván již od 40. let 20. století kolchicin (rostlinný alkaloid). Ten byl použit na více než 50 druhů rostlin včetně nejběžnějších polních plodin. S jeho využitím byly vytvořeny například odrůdy ovoce bez pecek a somatické hybridy. Později se začaly využívat i jiné látky k zdvojování chromosomů, které všechny působí jako inhibitory mitotického buněčného dělení. U některých druhů bylo využito ke zdvojení chromozomů tkáňových kultur (FAO, 2011). Zdvojení chromosomů bylo také použito ke zlepšení některých vlastností rostlin, jako je

výnos, nutriční kvalita, odolnost nemocem a škůdcům a k větší toleranci k suchu a zasolení (Murphy, 2011).

### 3.2.1.2 Somatická hybridizace

Somatická hybridizace spadá mezi technologie založené na bázi tkáňové kultury (náleží mezi ně také haploidy a zdvojené haploidy, odrůdy sterilních rostlin). Je využívána k introdukci nových genů, někdy i celých chromosomů, do rostlinného genomu od dárcovské rostliny, která by se za normálních okolností nemohla uskutečnit. V 60. a 70. letech 20. století objevení přesných technik mikroinjekce a buněčné fúze umožnilo spojování celých buněk nebo jejich částí k vytvoření sloučené buňky nepříbuzných druhů rostlin. Aby došlo k zdvojení chromosomů, musí být hybridní buňky dále ošetřeny kolchicinem při *in vitro* regeneraci. Tím je stabilizován nový genom a může dojít k další fázi množení a diferenciaci buněk a k růstu nové rostliny (FAO, 2011).

V 70. letech 20. století byly prováděny pokusy s asymetrickou jadernou fúzí, kdy je část jádra buňky díky fragmentaci odebrána a vložena do kompletního jádra jiné buňky. Tato metoda byla užívána i ke křížení rostlinných a živočišných buněk. Tyto pokusy však nikdy nedospěly k regeneraci celého životaschopného jedince. Od 80. let se běžně používá metod somatické hybridizace ke křížení příbuzných rostlin. Tato technika je účinná a byla užita u desítek běžných rostlinných druhů, jako jsou brambory, řepka, citrusy a rajčata. Díky ní bylo umožněno vylepšit například odolnost ke škůdcům a nemocem a velikost plodů (Murphy, 2011).

Kvůli problémům se stabilitou nových kombinací genomu z odlišných druhů byla v průběhu posledních deseti let somatická hybridizace často nahrazována trasgenetickou technologií. Ta má se stabilitou menší problémy, protože je mnohem přesnější. Nicméně je potřeba znát přesně geny, které potřebujeme přenést. Velké množství vlastností rostlin je kontrolováno soustavou genů, které ještě neznáme. Díky vylepšení tkáňových kultur a díky technice molekulárních indikátorů je v poslední době procento vytvoření životaschopného hybridu během klasické somatické hybridizace značně vyšší. Dále také není somatická hybridizace zatížena tolika právními předpisy jako transgeneze. Z těchto důvodů začíná být somatická hybridizace pro mnoho pěstitelů opět zajímavá a její možnosti do budoucna jsou nezanedbatelné (FAO, 2011).

### 3.2.1.3 Haploidy a zdvojené haploidy

Haploidy jsou buňky nebo rostliny, které obsahují pouze jeden kompletní set chromozomů. Zdvojené haploidy vytvořené pomocí techniky zdvojování chromosomů jsou nazývány zdvojené haploidy. Existuje několik způsobů jak vytvořit zdvojeného haploida. Skrze *in vivo* metody jako je partenogeneze, pseudogamie nebo eliminace chromosomů po extenzivním křížení. Haploid je následně zdvojen pomocí zdvojování chromosomů. Dále mohou být vytvářeny *in vitro* metodami jako je gynogeneze a androgeneze (Xu, 2010). Jelikož jsou zrnka pylu nebo vajíčka haploidní, je haploidní i kompletní jedinec regenerovaný v *in vitro* kultuře.

Zdvojení haploidů bylo poprvé vytvořeno v 60. letech 20. století s pomocí kolchicinu. Jejich vznik je možný i pomocí termálního šoku a inkubace v jasanovém cukru. Jsou ceněny pro svoji 100 procentní homozygotnost, a proto, že jsou jakékoliv recesivní vlastnosti okamžitě zřejmé. To urychluje selekci čistých linií nesoucích požadovanou rekombinaci vlastností. Nevýhodou je, že musí být testováno velké množství linií. Pomocí této metody bylo vytvořeno mnoho odrůd rostlin, jako je obilí, rýže a tabák, a k vylepšení vlastností jako je odolnost ke škůdcům a chorobám, chuť a výnos (Murphy, 2011.). Ne všechny rostliny se k vytváření zdvojených haploidů hodí. U bobovitých nebyl jejich vývoj doposud úspěšný. (Moo-Young, 2011)

### 3.2.1.4 Odrůdy sterilních rostlin

Manipulace s rostlinami někdy může vyústit v jejich sterilitu. To může být někdy praktické, protože ze strany konzumentů existuje poptávka po plodinách, které neobsahují jádýrka (např.: citrusy, melouny). Jedna z nejefektivnějších a nejlevnějších variant je vytváření polyploidů a triploidů. Tyto rostliny ve většině případů normálně rostou a vytvářejí plody, ale nejsou schopny vytvořit semena. Proto mohou být množeny pouze společností vlastníci jejich parentální linie (FAO, 2011). Triploidní rostliny mívají někdy větší plody, výnosy a jejich plody jsou více uniformní kvůli genetické identitě. Zmíněné výhody se objevují například u komerčně pěstovaných banánů. Další plodiny, u kterých se běžně využívá triploidů jsou kiwi, papája a myšpule japonská (Murphy, 2011).

### 3.2.1.5 Mutageneze

Mutageneze je proces, ve kterém je genetická informace organismu nezvratně změněna. V přírodě k tomuto procesu dochází v důsledku chyb při opravě DNA. Mutageneze může být navozena uměle použitím fyzických, chemických nebo biologických nástrojů. V

souvislosti s množением rostlin byl v 1944 poprvé použit termín mutační množení v souvislosti s indukci a vývoji mutantních linií pro zlepšení pěstovaných rostlin. Mutanti mohou být vytvářeni mnoha způsoby, nicméně v souvislosti se šlechtěním rostlin je termín mutační množení obecně ustálen pro užití fyzikálně a chemicky indikované mutagenese (Shu, a kol., 2012). Poprvé byla tato technika použita v roce 1928 u ječmene (Murphy, 2011). První odrůda rostliny komerčně vytvářená s pomocí indukované mutagenese byl bledě zelený tabák Chlorina, který byl poprvé vysazen v roce 1936 v Indonésii (Shu, a kol., 2012).

Nejběžněji je mutagenese způsobována rozrušováním DNA pomocí chemických látek jako je ethylmetansulfonát nebo zdroji gama radiace. Další metodou je somatoklonální mutagenese. Ta spočívá v tom, že je při *in vitro* kultivaci kultura vystavována různým formám stresů. Může se jednat o teplotní stresy, sucho, vysoké koncentrace solí, nedostatek nebo přebytek nutričních látek, působení růstových regulátorů nebo například infekce. Tyto stresy mohou způsobit mutaci jednotlivých genů, delecii nebo přemístění segmentů DNA, včetně segmentů i celých chromozomů (Murphy, 2011).

Největší limitací je u mutagenese to, že nemohou být přidány žádné nové geny, jako je tomu u transgenese a při vzdáleném křížení. Skoro všechny mutace vyúsťují ve ztrátu funkce genu, a proto je u mutagenese cílem spíše odstranění vlivu nežádoucích genů než zvyšování vlivu genů pro šlechtitele pozitivních (FAO, 2011).

Somatoklonální mutagenese byla využita k zlepšení vlastností jako je výnos, tolerance k nemocem, hmyzu, suchu a přesolení a ke zlepšení nutriční kvality u mnoha kulturních plodin, včetně rýže, kukuřice, brambor, cukrové třtiny a banánů (Murphy, 2011).

V souvislosti s mutagenesí mutačním množением se dnes jeví jako celkově nejperspektivnější moderní metoda takzvaný TILLING (FAO, 2011). TILLING je zkratkou pro Targeting Induced Local Lesion in Genomes, což se překládá jako: Zaměřování indukovaných lokálních chyb v genomu. Tato metoda vychází z postupů reverzní genetiky. Reverzní genetika se zaměřuje na vyhledávání poruch (změn) specifických genů. Metoda TILLINGu kombinuje klasickou mutagenesí a objev vysoko průchodného vyhledávání jednonukleotidových změn. Jedná se o velmi výkonnou a levnou metodu, vhodnou pro velkoobjemový výzkum (Shu a kol., 2012). TILLING může být použit i na monitorování přirozených populací – tzv. ecoTILLING (FAO, 2011). U přirozených populací ovšem vycházejí na povrch nedostatky TILLINGu, a to omezená možnost nalezení nové mutace u výrazně heterozygotních druhů (Slater a kol., 2008).

Mutagenese je v současnosti jedna z mála biotechnologií, která je masivně užívána zejména v zemích třetího světa. Chemicky a radiačně indukované mutagenese jsou ve světě využívány již od 30. let 20. století s tím, že za účasti FAO a mezinárodní komise pro jadernou energii bylo skrze iniciativu Atomy Pro Potravinové Globální Partnerství (IAEA) během 50.ých let ozařování otevřeno pro široké užití zemím třetího světa. Od svých počátků stojí mutagenese za vyšlechtěním více než 2700 odrůd všude po světě (FAO, 2011). Z odrůd, které jsou významné v zemích západního světa je možné uvést například významnou odrůdu řepky Regina II, lnu Redwood 65, a důležité odrůdy ječmenu nesoucí trpasličí geny – Golden Promise a Diamant. Mutagenese je u šlechtitelů velmi oblíbenou metodou, jelikož na rozdíl od transgenetických metod není zatížena tolika legislativními opatřeními a nevyvolává odpor konzumentů (Shu, a kol., 2012).

Na příkladu mutagenese je vidět zajímavá rozdílnost názorů veřejnosti vůči biotechnologiím. Tato metoda přitahuje mnohem méně pozornosti než transgenetické technologie a většina populace si ani neuvědomuje, že díky ní bylo vyšlechtěno tisíce nových odrůd. A přitom je změna genomu při jejím využívání mnohem méně náhodná a kontrolovatelná, než při užívání transgeneze. Za tímto rozparem můžeme hledat širší sociální kontext a také různou dobu, ve které byly obě technologie uvedeny na veřejnost. Mutagenese se začala široce rozmáhat v 60. letech, kdy bylo povědomí a zájem o vědu u veřejnosti značně nižší než v 80. a 90. letech, kdy byla uvedena transgeneze. Dále mutagenese ovlivňuje již existující genetickou variaci rostlin a transgeneze vkládá do genomu nové geny. Jako velmi důležité se jeví také to, že mutagenese byla vymyšlena a aplikována skrze veřejný sektor spíše pro veřejné dobro než pro krátkodobý profit. První generace transgenetických rostlin byla oproti tomu vyvíjena soukromými korporacemi, převážně pro bohaté země a pro výdělek. Tato skutečnost je jistě ovlivněna i tím, že rostliny vyšlechtěné pomocí mutagenese je mnohem těžší patentovat než rostliny vyvinuté pomocí transgeneze. Oboje jsou velmi hlubinné a umělé technologie, nicméně mutagenese se z těchto dvou jeví jako ta hrubší. Dokonce byla Národním Výzkumným Koncilem USA uznána jako nejriskantnější z 12 porovnávaných. Rozdíl jejich vnímání tedy není ani tak vědecký, jako spíše sociální. Se změnou přístupu a užití transgenetických plodin by se v budoucnu mohl změnit (Murphy, 2011).

### **3.2.2 Screening, selekce**

Kýžené genetické varianty musí být možno efektivně rozeznávány, aby mohly být selektovány pro další množení (Murphy, 2011). V tomto ohledu bylo v poslední době objeveno mnoho vylepšení v efektivitě a přesnosti selekce z někdy až tisíců fenotypových



variant vytvořených hybridizací a mutagenezí (FAO, 2011). Základem pro správnou selekci bylo potřeba rozvinout techniku chemické analýzy, aby bylo možno porozumět podstatě chemických procesů a látek v rostlinách a jejich variantách. Do objevení gas-liquid chromatografie byla chemická analýza dlouhodobá práce s poměrně velkými objemy materiálu. Dnes je to otázkou minut. Toto zlepšení je vidět na příkladu řepky olejné, která byla dříve neperspektivní olejnou plodinou, dokud nebyla díky analýze mastných kyselin v jejich semenech vyšlechtěna její vysoko olejnatá odrůda bez obsahu nežádoucí kyseliny erukové (Murphy, 2011). Dnes je díky moderním metodám selekce (automatizované sekvencování, robotizovaná PCR, MAS) možné analyzovat tisíce rostlin denně. Tyto technologie jsou klíčové pro dramatické zlepšování vlastností u širokého okruhu důležitých hospodářských plodin jako je rýže, čirok nebo olejová palma (FAO,2011).

### **3.2.2.1 Marker assisted selection**

MAS je relativně nová metoda, která má obrovský potenciál k rozvoji šlechtění rostlin skrze užití z DNA derivovaných molekulárních indikátorů (FAO, 2011). Patří mezi nejdůležitější techniky při molekulárním množení. Vychází z toho, že si šlechtitel uvědomuje asociaci mezi agronomickými ukazateli a ukazateli genetickými- variace alel a molekulární indikátory. Pro užití MAS jsou dvě nutné podmínky, a to: vytváření genetických map a jejich užití v marker trait asociacion analýze. Dále jsou nutné další podpůrné nástroje k selekci a identifikace rekombinantů s prospěšnými alelami a jejich kombinacemi (Xu, 2010). MAS může být využívána a nápomocná v širokém rámci činností od tradičních šlechtitelských metod, přes odhalování genetického základu užitečných agronomických vlastností (odolnost k suchu, zasolení, škůdcům a nemocem), po spravování genetických bank a diagnóze nemoci.

MAS technologie úzce souvisejí a benefitují s dalšími screening metodami, jako je PCR, DNA hybridizace a DNA sekvencování, ale většina dnešních MAS technologií stojí na základech PCR metod. MAS je užíváno na neustále se zvětšující rámec polních rostlin včetně obilnin a bobů, i k domestikaci nových druhů. Dosud bylo MAS užíváno hlavně v souvislosti s nejvíce výnosnými polními rostlinami, ale v důsledku zapojení veřejného sektoru a různých nezávislých iniciativ byly vymyšleny levnější a jednodušší systémy MAS šlechtění, z čehož mohou profitovat hlavně země třetího světa. Stejně však MAS zůstává relativně nákladnou a technologicky náročnou metodou (FAO, 2011).

### 3.2.3 Propagace a tkáňové kultury

#### 3.2.3.1 Mikropropagace

U rostlin kde je sexuální rozmnožování nepraktické nebo problematické je vegetativní způsob užíván už po tisíce let. Od nedávné minulosti jsou užívány biotechnologie na masovou klonální propagaci elitních linií a zdravého množícího materiálu. V několika posledních desetiletích se technika masového množení stala důležitá zejména u stromů, jejichž život je moc dlouhý na to, aby na ně byly uplatňovány stejné technologie jako na ostatní běžně pěstované rostliny. Velmi malé odstřížky, například z hlíz, jsou *in vitro* kultivovány a regenerovány až dospějí k transferu na pole (FAO, 2011). Z jednoho elitního jedince tak mohou být vytvořeny miliony dalších, celé plantáže. Tato technologie se stala užitečnou hlavně pro tropické rostliny v zemích třetího světa, plodiny jako jsou banány, olejové palmy a sladké brambory. Klonování z elitních jedinců pomohlo mimo jiné vylepšit výnosy a odolnost k nemocem a škůdcům (Murphy, 2011). Množení ze zdravého množícího materiálu získaného mikropropagací pomohlo například při pěstování brambor v Číně, banánu v Keni (FAO, 2011).

#### 3.2.4 Tkáňové kultury

Na vývoji rostlin v tkáňových kulturách je založeno mnoho rostlinných biotechnologií a bez této techniky by nebyly moderní biotechnologie ani možné. Patří mezi ně: somatická hybridizace, zdvojení haploidů, variety sterilních rostlin, mutagenese (FAO,2011., Murphy, 2011). I valná většina metod transformace rostlin pomocí genetických modifikací je závislá na regeneraci rostlin z tkáňové kultury (Slater a kol. 2008). Možnost využívat tkáňové kultury je u rostlinných buněk možná díky dvěma zásadním vlastnostem, a to je totipotence a plasticita (Murphy, 2011; Slater a kol., 2008). U rostlin se během jejich evoluce vyvinula schopnost velmi pružně reagovat na podmínky životního prostředí. Jsou schopny adaptovat své životní procesy (metabolismus, růst a vývoj), aby co nejlépe seděly životnímu prostředí. Tuto vlastnost nazýváme plasticita. Z ní vychází i schopnost rostlin iniciovat buněčné dělení z takřka jakékoliv tkáně a regenerovat tak orgány i celé rostliny. Tato vlastnost je nazývána totipotence (Slater a kol., 2008). Tato regenerace celého organismu znamená, že když je dán správný stimul, může rostlina uplatnit celý svůj genetický potenciál. Někdy je v laboratorních podmínkách obtížné najít ten správný stimul a správné prostředí v kultuře, aby regenerace mohla nastat (Slater a kol., 2008; Murphy, 2011).

Když jsou buňky kultivovány v kulturách *in vitro*, musí být dosaženo všech potřeb ke správnému rozvoji. Ať už výživa v samotném mediu, nebo vnější podmínky jako je teplota a světlo. V kultuře musí být obsaženy veškeré potřebné makro a mikroelementy a zdroj železa. Dále organické suplementy dodávající vitamíny, aminokyseliny a zdroj uhlíku (Slater a kol., 2008). Buňky kultivované *in vitro* mají tendenci k dediferenciaci na buňky podobné základním dělicím pletivům. Abychom dosáhly jejich vývoje na celé rostliny, je nutné jim dodávat různé směsi hormonů a růstových regulátorů (Murphy, 2011). Rostlinné hormony jsou látky, které se přirozeně vyskytují v rostlinných tkáních a regulují růst rostlin. Jsou velmi aktivní i v nepatrných množstvích. Jejich synteticky vyráběné analogy se nazývají růstové regulátory (Mahesh, 2009). Existuje pět hlavních skupin růstových regulátorů a to jsou: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, a etylen. Základní principy užití regulátorů růstu v tkáňové kultuře byly položeny v 50. letech 20. století (Murphy, 2011). Na všechny druhy rostlin nejsou aplikovatelné stejné směsi regulátorů, ale jako nejuniverzálnější se potvrdily auxiny a cytokininy (Slater a kol., 2008).

Kultury jsou iniciovány ze sterilních kousků celé rostliny. Tyto části se nazývají explanty a mohou se získávat z různých částí rostlin, jako jsou listy, kořeny, vzrostné vrcholy nebo ze specifických typů buněk, jako je pyl a endosperm (Murphy, 2011; Slater a kol., 2008). Existuje několik hlavních typů kultur: kalus, buněčná suspenze a protoplastové kultury a embryonální kultura (Murphy, 2011).

Kalus se zakládá z explantů, které na vhodném mediu (nejčastěji agar), s užitím zpravidla cytokininu i auxinu (Slater a kol., 2008), vyroste do neorganizované tkáňové masy parenchymatických buněk. Toto medium bývá stěžejní při transgenetických metodách (Murphy, 2011).

Oproti tuhé struktuře kalusu jsou buněčné suspenze pěstovány v tekutém roztoku. Kalus se přemístí do tekutého prostředí, kde jsou drženy ve stavu trvalého růstu a dělení. Samostatné shluky buněk se oddělí a plavou volně v roztoku. Tento typ kultury se používá nejčastěji k výzkumným účelům (Murphy, 2011; Slater a kol., 2008).

Protoplasty jsou buňky zbaveny své buněčné stěny. Protoplastové kultury se většinou získávají z listových mezofilních buněk nebo z buněčné suspenze. Protoplasty jsou velmi křehké, a je potřeba s nimi nakládat opatrně (Slater a kol., 2008). Protoplasty mohou být umístěny na tuhé medium, kde se rozvinou v kalus a dále mohou zregenerovat celou rostlinu (Murphy, 2011).

## **Embryonální kultura**

Jako explanáty mohou být použity také dospělá a nedospělá embrya. Může jít o formy záchrany embryí, co by nebylo schopné dorůst při vytváření vzdálených hybridů. Embryonální kultura může být také založena z pylu nebo prašníků (Murphy, 2011). Pyl, který obsahuje samčí gametofyt, se nazývá mikrospora. Z té se zakládá mikrosporální kultura, která slouží k vytváření haploidu a zdvojených haploidů (Slater a kol., 2008). Z pylu i prašníků se můžou dále vytvořit dospělá embrya (Murphy, 2011). K regeneraci rostlin se používají buď somatická embryogeneze, nebo organogeneze (Slater a kol. 2008).

### **3.3 Transgenní technologie v rostlinné produkci**

Genetickou modifikací je rozuměno užití moderní biotechnologie za účelem změny genů organismu. Geneticky modifikovaný organismus je rostlina, zvíře, houba či mikroorganismus, který byl geneticky modifikován. Genetické modifikace mohou spočívat ve změně původní DNA daného organismu – metoda cisgenetická, nebo v použití genu z jiného druhu. V tomto případě hovoříme o transgenetické metodě, které se budu dále věnovat (Moo-Young, 2011). Geny mohou být přesunuty z jakéhokoliv druhu organismu. Z rostliny, zvířete, viru, bakterie nebo dokonce mohou být kompletně uměle vytvořeny. Při přesouvání genu se spíše objevují problémy s možností regenerace modifikovaných subjektů v *in vitro* prostředí, než se schopností požadovaný gen přenést (FAO, 2011). Tato relativně nová metoda rozšiřuje možnosti vytváření nových genetických variací mnohem dále než tradiční způsoby křížení, ač její princip je ve své podstatě stejný, jako byl u šlechtění vždy - vytváření více užitečných a produktivních kultivarů rostlin (Xu, 2010). Přenos nových genů mohl být dříve uskutečněn skrze sexuální křížení s podobnou rostlinou. Díky metodě vzdáleného křížení a následného zpětného křížení je možné do cílové rostliny přenést jeden i více genů. S vývojem technik užívajících tkáňové kultury se možnosti získání dalších genů sice zlepšili, nicméně stále se jedná o metody, které spotřebovávají mnoho času a jsou omezeny genetickou vzdáleností křížených rostlin. A i když je transgenní metoda stále náročná a čas spotřebovávající, je rychlejší než ostatní biotechnologie (Murphy, 2011).

I když se termín GMO užívá jen v souvislosti s transgenními metodami, dalo by se říci, že už od počátků domestikace divokých druhů svým způsobem dochází ke genetickým modifikacím. Nicméně transgenní technologie je již po mnoho let velmi řešeným tématem (Mahesh, 2009). Většina metod transgeneze závisí na využívání tkáňových kultur. Pro získání geneticky modifikované rostliny je zapotřebí, aby byla celá rostlina zregenerována

z izolovaných buněk nebo tkání, které byly geneticky modifikovány. Tato regenerace musí probíhat *in vitro*, aby bylo zajištěno optimální prostředí pro její vysokou rychlost. Od začátku je potřeba vytvořit dostatečně snadno a rychle velký počet regenerovatelných buněk, na kterých může být aplikována transgeneze. Nicméně rychlost regenerace nemusí nutně korespondovat s úspěšností transgeneze (Slater a kol., 2008). Mohou být použity různé typy kultur. Organogeneze a embryogeneze jsou indukovány rozdílnými kombinacemi růstových regulátorů a rozhodně neexistuje nějaká univerzální technika pro všechny možné případy, takže musí být postupy upravovány individuálně pro každý rod, druh, odrůdu i tkáň (Xu, 2010).

### **3.3.1.1 Manipulace DNA**

Mezi nástroje nutné k manipulaci s geny patří restriční geny, DNA ligázy a další enzymy modifikující DNA. Jejich objevení stojí u vzniku genetického inženýrství. Slouží k manipulaci genů tím, že přesekávají, modifikují a spojují genetický materiál. Všechny patří mezi enzymy, které mají velmi důležitou roli ve fyziologii buněk. Restriční enzymy jsou známé také jako restriční endonukleázy a jsou schopny rozstříhnout dvoušroubovici DNA. Mezi další důležité enzymy patří fosfatáza – hydrolyticky odstraňuje fosfátové skupiny z DNA molekuly, taq polymeráza – syntetizující delší STRETCHES DNA, nukleázy, které se dělí na DNázy – očišťující kontaminovanou DNA, RNázy – rozdělují vazby mezi dvěma sousedícími nukleotidy, reverzní transkriptázy – syntetizují DNA z RNA a třídí RNA a DNA, ligázy – hrají v genetickém inženýrství klíčovou roli – umožňují spojování fragmentů DNA

#### **Elektroforéza nukleových kyselin**

Jedná se o techniku, ve které jsou pomocí elektrického pole na základě rozdílné velikosti rozkládány nukleové kyseliny i proteiny. Míra migrace v elektrickém poli závisí na poli, celkovém náboji a velikosti molekul. Fosfátové skupiny jsou nabitě negativně. Nabité molekuly jsou tudíž přitahovány k pozitivním terminálům přímo úměrně k počtu jejich fosfátových skupin.

#### **Blotting**

Nejvýznamnější typ blottingu je Southernův blotting. Velmi užitečná metoda pro analýzu genové struktury a exprese genů. Je to jedna z nejdůležitějších metod užívaných v molekulární biologii. DNA je rozstřížena pomocí restričního enzymu, následně vložena do gelu a filtrována přes filtrační papír a membránu. DNA se na membráně zachytí a s využitím radioaktivně označené DNA sondy, která se naváže na komplementární sekvenci, je

detekována pomocí autoradiografie. Southernův blotting je užitečný pro zjištění uspořádání genů, identifikaci nových genů a identifikaci strukturálně příbuzných genů mezi druhy. Existují ještě dvě další významné typy blottingu a to tzv. northern blotting a western blotting.

## **PCR**

Polymerase chain reaction – při genetickém inženýrství je potřeba získat množství cílové DNA ke studiu genové struktury, funkce a k její manipulaci. Tato nebuněčná metoda pomocí enzymů amplifikuje zkoumanou DNA. Je potřeba znát jen malý počet nukleotidů na začátku a na konci sekvence DNA, kterou potřebujeme amplifikovat. Na základě této vědomosti jsou syntetizovány komplementární oligonukleotidy, které se používají jako primery při enzymatické amplifikaci cílové sekvence DNA (Mahesh, 2009).

Toto jsou jedny z nejdůležitějších technik k manipulaci DNA, bez kterých by nebylo možné genetické modifikace provádět. Existuje ještě mnoho dalších, ale obsáhnout i je by zdaleka překročilo meze i účel této práce. Tyto ale zmiňuji alespoň pro představu, jak probíhá práce s DNA. Dalšími důležitými technikami, které budou zmíněny, jsou: vytváření genových knihoven, sondy nukleové kyseliny, neradioaktivní označování a sondování DNA, sekvencování DNA regulace transkripce u eukaryot (Mahesh, 2009).

Vědci jsou schopni pomocí již zmiňovaných enzymů v podstatě vystříhnout a vlepít DNA z jednoho místa na druhé. Jedna z cest, kterou rostlina přesouvá DNA do hostitelské buňky, jsou plazmidy. Použitím vystříhovací metody jsou do plazmidů dostávány cizí geny. Tento cizí gen může být takový, o jehož funkčnosti už víme – třeba odolnost ke škůdci. Tento modifikovaný plazmid se dále injektuje do bakteriální kultury, kde vstoupí do buněk a vytvoří miliony kopií. Tato metoda je užívána k amplifikaci kopií potřebných genů. Dnes k tomuto účelu bývá užívána spíše metoda PCR.

Expresí genů u eukaryotních organismů je regulována nekódujícími regiony, jako jsou promotory a terminátory, které ohraničují transkribovaný úsek genu. Z toho důvodu musí být v plazmidu přítomna sekvence promotéru, aby mohl transgen správně fungovat. V některých případech se mohou užívat i promotéry, které nepocházejí z rostlin – například jeden z nejpoužívanějších promotérů pochází z mozaikového viru.

Transgeny se nejčastěji vkládají do rostlin za účelem exprese nových bílkovin. Například u Bt hmyzu rezistentních transgenních plodin jsou díky genu z bakterie vytvářeny bílkoviny toxické pro hmyz. Někdy jsou přidávány kopie již existujících

genů, aby se posílila exprese těchto genů. Tato multiplikace stejných genů může vést i k potlačení účinnosti daného genu – postup nazývaný kosuprese. U petúnií byly oba tyto postupy použity k manipulaci s barvou květů.

Další metodou k potlačení určitého genu je užití anti mediátorového genu. Většina genů je kódována mediátorovým řetězcem DNA, který je přepsán do kódující mRNA, z ní je přeložen do bílkoviny. Když je k ní přiložen komplementární anti mediátorový řetězec mRNA, spojí se oba dohromady a často tak zamezí exprese cílového genu. Tato metoda byla použita u první komerčně využitě rostliny FlavrSavr rajčete v roce 1992. Bylo omezeno vytváření buněčné stěny rozkládajícího enzymu, a tudíž bylo možné rajčata déle skladovat a lépe převážet (Murphy, 2011).

### **3.3.1.2 Techniky transformace rostlin**

Transformací rozumíme dědičnou změnu v buňce nebo organismu zapříčiněnou vpravením cizí DNA (Xu, 2010). Transformace rostlin závisí na stabilním vpravování transgenů do genomu rostlin (Slater a kol., 2008). Nejběžněji se dá říci, že cizí DNA nejdříve musí vstoupit do buňky proniknutím přes buněčné stěny a plazmatické membrány, a poté dospět až do jádra, kde se integruje do zde přítomných chromosomů (Xu, 2010). Metody můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Z těch nepřímých je nejpoužívanější užití patogenní bakterie dvouděložných rostlin *Agrobacterium Tumefaciens*, k vpravení transgenů do rostlinného genomu. U přímých metod se jedná o fyzický transfer genů přímo do buněk cílové rostliny. Nejběžnější přímou metodou je biolistika (Slater a kol., 2008). Při technice nestálé transgenní exprese je pro dopravu exogenu možné využít různé virové vektory. Tato technika se využívá, pokud není potřeba změnit natrvalo genom rostliny. Rostlina pak může produkovat nějakou látkou důležitou látku, jako jsou lidské protilátky, a když už není dále potřeba, jednoduše se mohou odstranit infikované části rostliny (Murphy, 2011).

#### **3.3.1.2.1 Přenos zprostředkovaný skrze *Agrobacterium***

*Agrobacterium* je jediná známá bakterie, která v přírodě funguje jako genetický inženýr. *Agrobacterium* transformuje nejen rostliny, ale také další eukaryota, jako jsou houby, a dokonce i lidské buňky (Mahesh, 2009). Jedná se o gram- negativní půdní bakterii, žijící v rhizosféře (Slater a kol., 2008), která je schopná vpravit svou DNA do chromosomu infikované rostliny a přeměnit její buněčný mechanismus tak, aby napomáhal jejímu rozmnožování (Mahesh, 2009). Do rostliny se dostává skrze poškozenou tkáň, a po infekci stojí za vytvářením nádorové tkáně. Nemoc, kterou tímto způsobuje, se nazývá bakteriální nádorovitost (anglicky Crown-gall disease). Tvoření nádorů závisí na Ti plasmidu, který je

přítomen v bakterii. Ten je přenesen z bakterie do buňky rostliny, kde jeho T-DNA splyne s genomem hostitelské rostliny. Ta začne produkovat přemíru hormonů auxinu a cytokininu a rostlinných metabolitů, opinů a agropinů. Produkce rostlinných hormonů způsobí masivní rozrůstání rostliny, a tím zformuje nádor. Opiny dále slouží bakterii jako zdroj uhlíku a agropiny jako zdroj energie (Slater a kol., 2008).

Aby mohlo *Agrobacterium* sloužit jako vektor trasgenů, bylo z T-DNA odstraněno místo, které kóduje vznik nádorů. To bývá nahrazováno transgenem, který je potřeba dostat do cílové rostliny. Obvykle se tak děje vložením do klonovací sekvence, která je zabudována v Ti plasmidu. Transgen je vsouván spolu s volitelnými indikátory. Nakonec je s pomocí T-DNA integrován do rostlinných chromozomů (Xu, 2010). Jelikož je *Agrobacterium* patogenem dvouděložných rostlin, vyskytují se problémy s transformací jednoděložných (Slater a kol., 2008). Nicméně stejně je úspěšně využíván u obou těchto skupin - u dvouděložných např. u sóji a rajčat, u jednoděložných u obilnin a banánů. Transformace pomocí *Agrobacteria* má několik výhod nad jinými metodami (např. nad biolistikou): schopnost přesouvat velké segmenty DNA s minimálním přeskupováním, menší počet kopií přesouvaného transgenů, vyšší efektivita a nižší cena (Xu, 2010).

Postupy při transformaci pomocí *Agrobacteria* se dají shrnout do několika kroků: identifikace vyhovujícího explantu, kultivace s *Agrobacteriem*, usmrcení bakterie pomocí antibiotika, výběr transformovaných buněk a nakonec regenerace celé rostliny. Detaily experimentu se mohou velmi lišit v závislosti na druhu rostliny, kterou je potřeba transformovat a na kmenu bakterie, který je využíván. Při transformaci rostlin, které nejsou přirozeným cílem bakterie, je nutno občas použít speciální tzv. supervirulentní kmeny. Kromě transformace přes tkáňovou kulturu je možná i transformace rostliny přímo. Rostliny jsou namáčeny v kulturách *Agrobacteria* a následně se nechají vysemenit. Jedná se o poměrně neefektivní metodu (Slater a kol., 2008).

#### **3.3.1.2.2 Přímé metody přenosu genu**

Nejpoužívanější metoda, která je k přímému přenosu používána, se nazývá biolistika (Xu, 2010). Existují i další metody jako je elektroporace, absorpce DNA do protoplastu a silikon karbidová vlákna, ale nejsou široce využívány pro komerční druhy rostlin (Murphy, 2011). Metody přímého přenosu jsou nejčastěji užívány v souvislosti s transformací obilnin, u kterých je transformace s pomocí *Agrobacteria* obtížná (Slater a kol., 2008).

#### **Biolistika**



Jedná se o techniku bombardování mikroprojektily, známou také jako částicové bombardování. Užívají se částice ušlechtilých kovů, jako je wolfram a zlato, obalené DNA, které jsou obvykle poháněny natlakovaným héliem. Částice jsou vystřelovány ze speciální „pušky“ vysokou rychlostí přímo na cílový materiál, kterým může být buněčný roztok, kalus, meristém, protoplast nebo nedospělé embryo – části, ze kterých může zregenerovat celá rostlina. Rychlost částic je dost velká na to, aby prorazila skrz buněčnou stěnu bez působení velkých škod. Když se částice dostanou až k buněčnému jádru, může dojít k včlenění DNA do chromozomu rostliny. Biolistika nemá žádné biologické limity, co se týče druhů rostlin. Je aplikovatelná na různé druhy tkání a je ideální pro transformaci organel (Xu, 2010). Od svého vývinu v roce 1987 je částicové bombardování klíčové pro přeměnu obilnin. Stálo u vzniku prvních komerčně pěstovaných GMO rostlin, jako je Bt kukuřice (Slater a kol., 2008).

Metody přímé i nepřímé mají své nevýhody. V obou případech je exogenní DNA vsouvána nahodile a několik kopií může být vsunuto na stejné místo. Biolistika i Agrobakteriální metoda jsou poměrně neefektivní při dosahování vsunutí jednotlivých genů, při tom aby byl garantován předvídatelný fenotyp. V současné době jsou ve výzkumu metody, které toto budou moci splnit. Jedná se například o vysílání chromozomů a cílené vsunutí transgenů. (Murphy, 2011).

### **3.3.1.3 První generace GMO rostlin**

První GMO rostliny byly vyprodukovány na počátku 80. let minulého století, kdy bylo objeveno jak dosáhnout stabilního vložení syntetického transgenů do rostlinného genomu a jak regenerovat celou rostlinu z jedné modifikované buňky.

GMO rostliny jsou komerčně využívány od počátku 90. let. Extenzivní komercializace zasáhla hlavně rostliny šlechtěné na toleranci k herbicidům: sója, kukuřice a bavlna a na odolnost vůči hmyzu: hlavně kukuřice a bavlna. Tyto dvě vlastnosti byly v některých případech i zkombinovány. Bylo vyšlechtěno také množství jiných transgenních rostlin: papája, rýže, rajčata, paprika, alfa alfa, petúnie a dýně (Moo-Young, 2011). Od začátku byl jasný obrovský ekonomický a šlechtitelský potenciál geneticky modifikovaných rostlin. Vzniklo mnoho společností, nicméně komerční úspěch potkal zejména již zavedené agrochemické giganty v čele s Monsantoem a Bayerem. První větší úspěchy znamenalo až zavedení dvou hlavních transgenních vlastností na trh, a to tolerance k herbicidům a odolnost k hmyzu. Od roku 1996 až do začátku 21. století komodity s těmito vlastnostmi zabíraly více

než 50 milionů hektarů na několika kontinentech, včetně s oběma Amerikami. K dalším velkým úspěchům GMO rostlin patří k virům resistantní papája uvedená v roce 1998 na Havaji. V 90. letech 20. století proběhl díky virové infekci obrovský úpadek pěstování papáji. V roce 1998 byla na trh uvedena její modifikovaná resistantní verze. Z úpadku produkce mezi roky 1992 – 1998 (z 25 000 tun na méně jak 12 000) se Havaj vzpamatovala zvýšením nad 20 000 tun (Murphy, 2011).

Dále budou rozebrány jen tolerance k herbicidům a Bt plodiny jelikož drtivá většina všech ploch GMO plodin na světě je osázena právě rostlinami buď s jednou z těchto modifikací, nebo jejich kombinacemi.

### **3.3.1.3.1 Tolerance k herbicidům**

Postup vytváření tolerance k herbicidům se může řídit rozdílnými strategiemi.

**Zvýšená exprese cílového proteinu:** Pokud je herbicid specifický inhibitor určitého enzymu, zvýšená produkce tohoto enzymu může překonat inhibici. Toho může být dosaženo integrací násobením kopií genu, který ho vyrábí, nebo použitím silného promotéru plus zesilovače překládání k zesílení exprese tohoto genu.

**Mutace cílového proteinu:** Najít rezistentní protein, který by mohl substituovat funkci proteinu v rostlině, a vpravit ho do rostliny. Může být využito několik rezistentních proteinů naráz.

**Detoxifikace herbicidu s využitím genu s cizího zdroje:** Detoxifikace spočívá v přeměně herbicidu do méně toxické formy a jeho vyloučení z těla rostliny. Například herbicid Roundup může detoxifikovat enzym oxidoreduktáza nebo N-Acetyltransferázu, herbicid Buctril enzym nitriláza.

**Posílení přirozené detoxifikace rostliny:** Spočívá ve zlepšení přirozených obraných schopností rostliny proti toxickým sloučeninám. Vyžaduje velmi podrobnou znalost detoxifikačních cest a mechanismů rozeznávání těchto sloučenin u rostliny (Slater a kol., 2008).

Biotechnologický postup při vytváření tolerance je relativně přímý, jelikož se většinou řídí jen jedním genem. Takřka všechny odrůdy rostlin pěstovaných na počátku 21. století byly tolerantní buď ke Glyfosfátu (Roundup od společnosti Monsanto) nebo glufosinátu (Basta a další od společnosti Bayer) (Murphy, 2011).

### **Tolerance glyfosfátu**

Glyfosfát je širokospektrý herbicid, který je velmi efektivní k drtivé většině nejproblémovějších plevelů na světě. Je to jednoduchý derivát glycinu a slouží jako schopný inhibitor EPSPS. Enzym EPSPS je klíčovým enzymem při tvorbě aromatických aminokyselin fenyloalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Inhibice tvorby těchto aminokyselin má výrazný účinek na rychlost růstu a dělení, na tvorbu ligninu a také na biosyntézu auxinu. Proto není s podivem, že má glyfosfát na rostliny takový velký účinek.

Na odolnost vůči glyfosfátu jsou rostliny manipulovány následujícími způsoby. Zvýšenou expresí rostlinného EPSPS genu. Vkládáním zmutovaných EPSPS genů. Pro mnoho herbicidně tolerantních rostlin z produkce Monsanto se používá strategie vsunutí změněného genu z *Agrobacteria Tumefaciens*. Jedná se o sóju, bavlnu a řepku olejku. Poslední strategií je posilování detoxikace heterologními geny. Monsantoem byl izolován gen z půdní bakterie *Ochrabactrum anthropi*, který vyrábí enzym glyfosfát oxidázu. Ten byl úspěšně vpraven do řepky. Nicméně tato strategie nebývá užívána jen sama o sobě a je kombinována s rezistentním genem z *Agrobacteria*.

#### **Tolerance ke glufosinátu**

Glufosinát je oproti glyfosfátu, který je efektivní hlavně na trávy, spíše zaměřen na širokolisté plevele. Glufosinát je mezi herbicidy poměrně unikátní v tom, že pochází z přírodního produktu. Získává se z tripeptidu, produkovaném některými druhy *Streptomyces*. Glufosinát je často aplikován s amoniou solí jako glufosinát amonium. Účinek glufosinátu spočívá v inhibici syntézy glutaminu. Pokud je tvorba glutaminu inhibována, začíná hromadění amoniaku až do toxických hladin, což hromadně zabije rostlinné buňky. Další účinky spočívají v narušení fotosyntézy.

Ochrana proti tomuto herbicidu je získávána ze stejného zdroje, z jakého je získávána jeho účinnost. Streptomycety obsahují detoxifikační gen, který je po úpravě vpravován do modifikovaných rostlin. Tento postup je aplikován na řepku a kukuřici (Slater a kol., 2008).

GMO rostliny s tolerancí k Roundupu jsou označovány jako RoundupReady a jejich rozšíření je mnohem větší než u konkurenčních LibertyLink rostlin tolerantních vůči glufosinátu (Murphy, 2011).

#### **3.3.1.3.2 Odolnost proti hmyzu**

K vytváření odolnosti proti hmyzím škůdcům existují dva důležité přístupy. Z toho je opravdu významný pouze ten první a to využití schopností *Bacillus thuringiensis*. Druhý

způsob spočívající v kopírování přírodního postupu rostlin v obraně proti škůdcům, se zatím neosvědčil, a zůstává především v laboratořích i proto, že zatím může ohrožovat zdravotní bezpečnost potravin.

### **Přístup *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* (dále už jen jako Bt) je gram-pozitivní půdní bakterie. Postřiky s jeho obsahem jsou již přes 30 let využívány v organickém zemědělství, nicméně jeho užití v souvislosti GM plodinami je otázkou až poslední doby (Murphy, 2011).

Bt vlastní užitečné geny, které kódují tvorbu celé řady insekticidních proteinů cry 1 – 51. Cry proteiny interagují se střevem hmyzí larvy. Po pozření se krystaly proteinů rozpouštějí ve střevě a jejich fragmenty interagují s citlivými receptory ve střevním epitelu. Otevírají se pro kationty selektivní póry a dochází k příjmu kationtů a následné osmotické lýze a destrukci střevních stěn.

Různé druhy hmyzu reagují rozdílně na různé typy Cry proteinů, a proto je potřeba využívat jejich různé podrody (Slater a kol. 2008). U savců nedochází k aktivaci toxinů, a proto jsou jimi nedotčeni (Murphy, 2011).

Modifikace umožňující produkci Bt toxinů je relativně jednoduchý. V podstatě stačí vpravit cry gen do rostliny, nicméně je potřeba zajistit dostatečnou expresi genu, a to až 100 násobnou oproti její přirozené formě. Používají se různé typy promotérů, exprese probíhá v různých typech orgánů (Slater a kol., 2008).

Od roku 1996 je na trhu mnoho Bt plodin, které pochází od mnoha firem, ale nejaktivnější na tomto poli je opět Monsanto. Nejrozšířenější Bt plodiny jsou kukuřice a bavlna, které jsou pěstovány po celém světě (Murphy, 2011).

#### **3.3.1.4 Druhá generace transgenních plodin**

U další generace GM plodin se můžeme setkat i s členitějším dělením, než pouze na druhou generaci, a to podle typu využití až na 5 dalších (Otáhllová, 2011). Práce se bude držet pouze označení druhá generace, protože se v literatuře vyskytuje nejčastěji.

U druhé generace geneticky modifikovaných rostlin se užívá metod manipulace s metabolismem rostlin k vylepšení exprese enzymů nebo dodání úplně nových. Mezi nejvýznamnější cíle patří: zvyšování obsahu bílkovin a jejich kvality, zvyšování obsahu vitamínů a minerálů, odstraňování antinutričních látek a modifikování obsahu tuků (Van, 2009). Tyto vlastnosti se týkají výživové hodnoty a jsou oproti první generaci užitečné hlavně

pro konečného konzumenta. První generace byla výhodná spíše pro pěstitele. Další generace, ale samozřejmě zahrnuje i modifikování vlastností, které pomůžou i producentům. Významnou část z nich tvoří rostliny odolné vůči rozličným abiotickým stresům: tolerance k chladu, suchu, zasolení a nedostatku světla. Tyto stresové faktory mohou v některých případech vést až k 70 procentním ztrátám na výnosech (Otáhlová, 2011). Spektrum nových modifikací je ale mnohem širší a zahrnuje také rostliny s vyšší technickou kvalitou, vhodné jako zdroje obnovitelných surovin, s vlastnostmi pozitivně ovlivňující tvorbu rostlinných biopaliv, a v neposlední řadě také rostliny určené pro výrobu léčiv a speciálních chemických látek.

Tato generace plodin již není zdaleka doménou jen obřích nadnárodních koncernů, ale je intenzivně vyvíjena i v režii jak samotných států (Čína, Indie), tak různých nadací. Tyto výzkumy mohou vést k výrazné pomoci mnoha zemím třetího světa, ať už se jedná o rostliny odolné k abiotickým stresům (rýže, maniok, kukuřice) nebo o rostliny fortifikované o důležité mikronutrienty (rýže, čirok, maniok). Mezi největší dosavadní úspěchy na tomto poli lze považovat vývoj tzv. Zlaté rýže, která obsahuje beta-karoten sloužící jako zdroj vitamínu A (Roudná, 2008).

#### **3.3.1.4.1 Zlatá rýže**

Podle odhadů až 124 milionů dětí na světě trpí nedostatkem vitamínu A, a zlepšení jeho příjmu by mohlo zabránit 1 – 5 milionům úmrtí mezi kojenci a předškolními dětmi. Jako možné řešení se jeví introdukce *psy* genu, kódujícího enzym fytoensyntázu do rostlin na tento vitamin deficientní. Enzym je prekurzorem lykopenu, který je následně konvertován na karotenoidy. Tato strategie se ukázala jako úspěšná při přenosu *psy* genu do zlaté rýže, kde vede k ukládání provitaminu A v endospermu (Dunwell, 2009). 8 let trvající vývoj zlaté rýže byl spolu financován Rockefellerovou nadací a Evropskou unií. Potřebné geny byly izolovány z narcisu a bakterie rodu *Erwinia*. (Van, 2009). Zlatá rýže je již podrobována polním pokusům na Filipínách (Roudná, 2008).

#### **3.3.2 GM plodiny ve světě**

Genetická modifikace rostlin je nejrychleji přijatá rostlinná technologie v nedávné minulosti. Od doby, kdy v roce 1996 vstoupila na trh, se plocha jejich využívání do roku 2008 rozšířila 74x . (James, 2010). Kolem roku 2010 se meziroční nárůst ploch ustálil na 10 procentech (Roudná MZE 2011). V roce 2008 bylo v 26 státech pěstováno přes 120 milionů

hektarů GM plodin, a toto číslo nadále stoupá (Moo-Young, 2011). V roce 2010 vzrostl počet zemí pěstujících transgenní plodiny na 29. Sestupné seřazení zemí podle milionů osázených hektarů GM plodinami v roce 2010: USA (66,8), Brazílie (25,4), Argentina (22,9), Indie (9,4), Kanada (8,8), Čína (3,5), Paraguay (2,6), Pákistán (2,4), Jižní Afrika (2,2), Uruguay, Bolívie, Austrálie, Filipíny, Burkina Faso, Barma, Španělsko, Mexiko, Kolumbie, Honduras, Chile, Portugalsko, Česká republika, Polsko, Egypt, Slovensko, Kostarika, Rumunsko, Švédsko a Německo (Roudná, 2011).

Mezi země co nejvíce pěstují transgenní plodiny se řadí: USA, Argentina, Brazílie, Kanada, Indie a Čína. Vedoucí úlohu zauímají USA, kde bylo v roce 2007 pěstováno 57,7 milionů hektarů GM plodin, což byla polovina celosvětové plochy. 43 procent GM plodin bylo pěstováno v rozvojových zemích.

Nejrozšířenější GM plodinou na světě je sója, dále kukuřice, bavlna a řepka. Nejvyužívanější typ genetické modifikace je tolerance k herbicidům (Xu, 2010). V roce 2008 99,5 procent GM plodin tvořily odrůdy kukuřice, sóji, řepky a bavlny. U těchto čtyřech rostlin se užívala z 63 procent k herbicidům tolerantních rostlin, 15 procent hmyzu odolných a 22 procent neslo obě tyto vlastnosti (James, 2010).

V USA se 85 % ploch s kukuřicí osazuje jejími GM odrůdami. Výnosy sóji a kukuřice se od počátku pěstování transgenních plodin zvedly o 68 milionů tun u sóji, u kukuřice o 62 milionů tun. Ve spojených státech se zvedla produkce kukuřice o 36 %, sóji o 12% a bavlny o 31%. V indickém státě Maharashtra zvedlo pěstování Bt bavlny výdělky farmářů o 43 % v roce 2002 a o 63% v roce 2003. V USA se díky užívání hmyzu odolných GM plodin od roku 1996 do roku 2008 snížila spotřeba insekticidů, a to o 87-89% u kukuřice a o 18-22% u bavlny. V Indii se snížil počet postřiků insekticidy na GM bavlnu o 63% v roce 2002, a o 77% v roce 2003 (Moo-Young, 2011).

Na Africkém kontinentě se zatím transgenní plodiny komerčně pěstují pouze v JAR, Burkině Faso a v Egyptě. V dalších několika zemích probíhají pokusné výsadby. V brzké budoucnosti se dá očekávat rozšíření do dalších zemí (Andrová, 2011).

V evropské unii je z geneticky modifikovaných rostlin povoleno pouze pěstování Bt kukuřice MON810 a technických brambor Amphora. Plocha, na které jsou GM plodiny vysazeny, zaujímala v roce 2011 přes 114 000 hektarů. V EU je pro GMO problematický odbyt a četná legislativní omezení. V České republice zabíraly plochy s GM plodinami cca 8000 hektarů v roce 2012, a to jen Bt kukuřice (Stratilová, 2012).

### 3.4 Ekologické zemědělství versus GM plodiny

Ekologické zemědělství je forma hospodaření praktikující šetrný přístup k životnímu prostředí. Ekologičtí zemědělci se straní používání chemických a umělých látek, jako jsou syntetická hnojiva, chemické pesticidy a herbicidy a růstové regulátory. Snaží se respektovat přirozené přírodní koloběhy a zachovávat biodiverzitu. Nedílnou součástí je i etické zacházení s chovanými zvířaty (Bioinstiut, 2013). Cílem je včetně ochrany životního prostředí také napomáhat rozvoji venkova (Ministerstvo zemědělství, 2012). Kromě již zmiňovaných zakázaných látek platí v ekologickém zemědělství přísný zákaz používání jakýchkoliv geneticky modifikovaných organismů, ať už v rostlinné nebo živočišné produkci. Z oblasti biotechnologií platí ještě zákaz klonování a embryotransferu u chovaných zvířat (Bioinstiut, 2013). Tyto zákazy mají spolu s podrobnými požadavky na ekologickou produkci základ v legislativě a jejich nedodržení se trestá (Ministerstvo zemědělství, 2012).

V České republice se ekologická produkce řídí následující legislativou: Nařízení Rady (ES) č. 834/2007 ze dne 28. června 2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů a k němu prováděcím předpisem: Nařízení Komise (ES) č. 889/2008 ze dne 5. září 2008, kterým se stanovují prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007 o ekologické produkci (Bioinstitut, 2013).

Dle právních předpisů o ekologickém zemědělství se GMO nesmí užívat v žádném případě v jakékoliv následující formě: potraviny, krmivo, činidla, přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, pomocné půdní látky, osivo, vegetativní rozmnožovací materiál, mikroorganismy a zvířata v ekologické produkci. Přípustné jsou pouze minimální hodnoty obsahu GMO, které zaručují, že GMO v ekologických produktech bude přimícháno pouze náhodně a v případech, které nejsou ovlivnitelné (Ministerstvo zemědělství, 2012). Toto množství je jak u ekologických, tak i konvenčních produktů stanoveno na maximálně 0,9 procent (Roudná, 2011).

Předpisy řeší případnou možnost kontaminace ekologického pozemku pylem z GM plodin pěstovaných v jeho blízkosti. Za dostatečné oddělení se považuje vzdálenost u kukuřice minimálně 200 metrů a u sóji alespoň 20 metrů (Roudná, 2011). Jedinou výjimku ze zákazu tvoří veterinární léčivé přípravky vyrobené s pomocí GMO, které mohou být v případě nutnosti použity. Zemědělci se ve vyhýbání používání GMO produktů musí spoléhat na to, že dle předpisů EU musí být výrobky vyrobené s použitím GMO označeny a musí vycházet z toho, že pokud takto označeny nejsou, tak GMO neobsahují. Pokud nakupují suroviny

(například krmivo) od konvenčních zemědělců, musí požádat o potvrzení, že tyto neobsahují žádné GMO. V platných předpisech nejsou řešeny důvody pro tento zákaz a zmiňují pouze neslučitelnost GMO s ekologickou produkcí a z odporu potencionálních spotřebitelů ekologické produkce (Ministerstvo zemědělství, 2012).

Jaké jsou důvody proč eko spotřebitelé odmítají genetické modifikace? Jejich důvody budou předloženy z brožury českého bioinstitutu „GMO a ekologické zemědělství“, kde jsou tyto důvody shrnuty. Dále budou konfrontovány s vědeckou literaturou.

### **GMO mohou způsobovat alergie**

Existuje riziko alergenní reakce na GM plodiny u modifikovaných plodin, které nesou gen z organismu, na který je spotřebitel alergický. Sója, do které byl vložen gen z para ořechu, může vyvolat alergickou reakci u lidí alergických na para ořechy. Genetičtí inženýři tvrdili, že gen, který byl vložen, nekóduje žádný známý alergen. Další případ se objevil u hrachu geneticky modifikovaném v Austrálii na odolnost vůči zrnokazu hrachovému. U testovaných myší se objevila alergická reakce ve formě astmatických záchvatů (Bioinstitut, 2008).

Vkládání nových proteinů do jídla nese riziko vyvolání alergické reakce u lidí, kteří jsou na vnášený protein citliví. Neexistuje jednoduchý test na zhodnocení rizik v souvislosti s novými geny v GMO. Místo toho byla navržena následující analýza. Jednotlivé kroky srovnávají sekvence homologní ke známým alergenům, specifické nebo cílené snímky krevního séra na vzájemné reakce imunoglobulinu E se známými alergeny, studie stravitelnosti proteinů v simulovaných žaludečních a střevních tekutinách a testy na zvířatech (Poulsen, 2004). Při výzkumu za použití tohoto postupu nebyly objeveny žádné nové alergie související s introdukcí nových proteinů (D'Agnolo, 2005).

### **Toxické vlastnosti GM plodin**

U Bt kukuřice MON 863 byly údajně ve Francii odhaleny toxické účinky na játra a ledviny u testovaných potkanů. Monsanto původně nechtělo ani zveřejnit studii a jejich vlastním testováním a zveřejnilo je až po soudní žalobě. Po přezkoumání jejich výsledků francouzskými experty byla odhalena její škodlivost. Jejich výsledky byly však zpochybněny a čeká se na další výzkum (Bioinstitut, 2008).



Toxicita MON 863 resistantní k bázlivci kukuřičnému nebyla dalšími výzkumy prokázána (Roudná, 2008).

### **Zvýšení spotřeby pesticidů**

Ekologická organizace Přátelé země podle studií z USA, JAR, Brazílie, Číny a dalších zemí zjistila, že používání GM plodin tolerantních k herbicidům může zvýšit jejich spotřebu. Tyto rostliny jsou manipulovány tak, aby na ně mohl být aplikován postřik od stejné společnosti, která je vyšlechtila. Dle amerického střediska pro výzkum vědy a životního prostředí došlo v USA v letech 1996 – 2003 ke zvýšení spotřeby herbicidů o více než 22 milionů tun. Jednalo se o oblast 200 milionů hektarů, kde jsou pěstovány GM kukuřice, sója a bavlna. Spotřeba tam nejdříve klesla a následně se rapidně zvýšila. Dle autora stojí za problémem především pěstování k herbicidům tolerantní GM sóji (Bioinstitut, 2008).

I když v literatuře bývá zmiňováno snížení užití pesticidů díky GM plodinám (Slater a kol.; James, 2010). Existují studie, dle kterých se děje pravý opak. Dr. Charles Brenbrook uvádí, že v USA spotřeba herbicidů vrostla o 239 milionů kg ve srovnání s tím, jaká by byla spotřeba herbicidů, kdyby neexistovali Ht plodiny. Z velké části to je z důsledku rozšíření plevelů rezistentních k glyfosfátu. Většinou je za to zodpovědná dobře zdokumentovaná zvýšená spotřeba glyfosfátu na hektar. Spotřeba pesticidů se od uvedení GM rostlin zvýšila o 183 milionů kilogramů (7 procent). Studie zmiňuje, že by se technologie redukce plevelů vyvíjely jiným směrem, pokud by nebyly vyvinuty Ht rostliny. A to spíše k pre a post emergentní aplikaci malých dávek více druhů pesticidů. Dále naznačuje, že jsou potřeba změny v pěstování tří nejvýznamnějších GM plodin, aby bylo dosaženo nejprve stabilizace a po té snížení množství aplikovaných herbicidů, a že je potřeba dramaticky snížit rozlohu pěstovaných RoundupReady rostlin (Benbrook, 2012).

### **Vznik superplevelů**

Superlevel není pojem s jasnou definicí. Mohou tak být označovány přímo GMO rostliny odolné vůči herbicidům rostoucí na polích s jinými plodinami. Mohou to být plevele, které svou odolnost získaly přirozeně vlivem přirozené selekce. Dále se může jednat o plevele, které se pomocí pylu zkřížily s pylem pěstovaných GM plodin. To se může stát třeba u řepky a jí příbuzných plevelů. Samotná GM řepka se může dle Kanadských studií stát významným plevelem (Bioinstitut, 2008).

Vývoj superplevelů nesouvisí pouze s GM plodinami. Všude, kde je opakovaně používán jeden a ten samý herbicid, vzrůstá selekční tlak na plevele na vytvoření rezistence.

Masivní vysazování k herbicidům tolerantních (dále jen Ht) rostlin a opakované užití stejného herbicidu zvyšuje riziko vzniku superplevelu. Navíc se gen pro odolnost k herbicidům také může šířit do populací plevelů, a to následujícími způsoby: 1. Ht rostlina se v rámci rotace rostlin, i mimo ní, může sama stát plevelem. 2. Pyl z Ht rostlin může oplodnit příbuzné plevele a vytvořit tak Ht hybrida. 3. Existuje možnost, že se pomocí viru rozšíří Ht gen do dalších druhů rostlin. K tomu, že by k tomuto horizontálnímu přenosu genů docházelo, zatím neexistují takřka žádné důkazy.

Problém u prvního případu může nastat v situaci, kdy jsou plevelné Ht plodiny likvidovány stejným herbicidem jako ostatní plevele. Existuje ale široká škála herbicidů, které se dají použít místo něj. Při šíření pylu si je třeba uvědomit, které rostliny jsou samosprašné, a které jsou cizosprašné. U cizosprašných je riziko samozřejmě mnohem větší. Nejrizikovějšími plodinami z tohoto pohledu se jeví řepka olejka a cukrová řepa, protože oba tyto druhy jsou cizosprašné a u obou z nich existují plevele, které jsou k nim příbuzné. Proto je nutno pro každou rostlinu zvlášť zhodnotit potenciální odtok genů a vzdálenost, na kterou pyl může putovat a určit minimální nárazníkovou zónu, aby nedocházelo ke křížení s příbuznými plevele. Dosavadní studie byly bohužel vypracovávány jen na malých pokusných plochách. Pokus s řepkou na větším území zjistil, že její pyl může putovat mnohem dále, než se myslelo. Nicméně tok genů k nereizistentním rostlinám byl stejně minimální (Slater a kol., 2008).

Jelikož výzkumy prokázaly vznik nebezpečnějších plevelů tokem genů z Ht plodin, jeví se největším rizikem spíše vznik rezistence následkem používání stále stejných herbicidů. Nejpoužívanějšími jsou glyfosfát a glufosinát. Většina Ht GM plodin jsou šlechtěny na resistenci proti těmto dvěma, a proto vedou GM plodiny k vytváření superplevelů spíše nepřímo (Murphy, 2011).

### **Vznik nových chorob**

Při pěstování GM rostlin odolných vůči virům může dojít k několika typům případných rizik. Zejména proto, že odolnost vůči virům je často řešena pomocí vkládání genů z virů, proti kterým má být rostlina rezistentní.

Tyto rizika jsou: rekombinace mezi vloženými geny a geny viru napadajícího rostlinu, interakce mezi látkami syntetizovanými rostlinou a virem a přenos genu vloženého do rostliny na vir rostlinu napadající. Existuje riziko, že mohou vzniknout nové viry a virové kmeny, které budou ještě nebezpečnější než viry původní (Bioinstitut, 2008).

V souvislosti s tímto tématem existuje jen velmi malé množství zdrojů. Dá se tedy usoudit, že látka je zatím neprozkoumaná. Zde uvádění zdroj referuje o nevytvoření nových virů, nicméně vzhledem k nedostatku informací nelze vyvozovat, že by možnost vytvoření nových virů neexistovala.

Byl proveden test se šířením genů z k virům tolerantním GM švestek. Byly testovány GM švestky odolné proti viru (s pomocí exprese jednoho z virálních genů) neštovic u švestek (plum pox virus-PPV) a nemodifikované švestky. Oboje spolu rostly v experimentálních sadech po 6-8 let. PPV viry byly izolovány a sérologicky zkoumány jak u odolných stromů tak u konvenčních. Bylo zjištěno, že neexistuje rozdíl mezi viry z obou typů rostlin. Výsledky tedy ukázaly, že GM švestky neinicují vznik nových variant PPV viru (Zagrai a kol., 2011).

### **Vznik odolných škůdců**

V souvislosti s pěstováním Bt bavlny se již objevil vznik jedinců rezistentních na působení Bt toxinů. Tím vzniká riziko rozšíření těchto odolných škůdců. To by mohlo mít negativní dopady zejména na zemědělce (hlavně ekologické), kteří aplikují Bt bakterie jako ochranný prostředek (Bioinstitut, 2008).

Od roku 1996 byly objeveny minimálně dva druhy hmyzu s přirozenou resistencí k Bt toxinům. Pravděpodobnost vzniku resistance může velmi snížit vkládáním několika rozdílných toxických genů, Jedná se o nákladnou strategii, nicméně může dlouhodobě omezit vznik rezistentních škůdců. Mezi další účinná opatření patří vysazování nemodifikované odrůdy vysazované nedaleko od té modifikované. V nemodifikované části se mohou rozmnožovat nerezistentní škůdci a křížit se s těmi rezistentními a zároveň jim konkurovat. Tato strategie je závislá na spolupráci pěstitelů a může ztroskotat, pokud nebude užívána na všech farmách. Zatím se ale ukazuje jako fungující, jelikož zatím nedošlo k žádnému většímu rozšíření rezistentních škůdců (Murphy, 2011)

### **Omezení biodiverzity**

Dle britských výzkumů, počet bezobratlých žijících na poli úzce souvisí s plevelem, který tam roste. Na poli s GM řepkou se nacházelo o 80 procent méně plevelů a o 60 procent méně bezobratlých. Dochází také k úbytku včel a motýlů, jelikož se na těchto pozemcích nachází méně nektaru (Bioinstitut, 2008).

Intenzivní a efektivní používání k herbicidům tolerantních rostlin vede k velmi čistým plochám kulturních rostlin. Tento způsob omezování biodiverzity není problémem zdaleka jen GM plodin. Spočívá spíše v celkovém přístupu k likvidaci plevelů herbicidy a vyskytuje

se u všech monokultur (Andrová, 2011). Problém pro biodiverzitu spojený čistě s GM plodinami by mohl spíše nastat v souvislosti s vlivem Bt proteinů na necílové organismy. To by mohlo mít negativní následky na celý agroekosystém a jeho okolí. V laboratorních studiích byl zjištěn obsah Bt toxinu Cry1Ab z modifikované kukuřice u necílových fytofágních členovců a jejich predátorů (Scholte and Dicke, 2005).

Dostupná data ukazují, že Cry3Bb1 protein vložený do kukuřice (odrůdy MON 88017, MON 853 a MON 863) nemá žádný negativní vliv na necílové členovce ani další necílové organismy jako jsou kroužkovci, měkkýši, nematody, půdní mikroorganismy, ani na ptáky a savce. Jediné ovlivnitelné organismy jsou z cílové skupiny brouků, ale jen v případě kdy jsou vystaveny dostatečným koncentracím. Někteří brouci se často živí na kukuřici a jsou považováni za významné škůdce. Necíloví brouci z této čeledi se na polích s kukuřicí nevyskytují příliš často. Nejohroženější jsou jejich larvy, které mohou pozřít pyl rozprášený na jejich hostitelských rostlinách. Riziko je poměrně nízké, protože je nepravděpodobné, že by se dostaly k dostatečnému množství pylu. Rovněž u dospělců je pravděpodobnost úmrtí nízká vzhledem k nízké účinnosti Cry3Bb1 proteinu na dospělé jedince (Devos a kol., 2012).

Prvním v přírodě dokumentovaným případem přirozeně vzniklé resistance na Bt rostlinu je *Spodoptera frugiperda*. Vyvinula se u něj resistance na protein Cry1F využívaný v modifikované kukuřici. Testy potvrdily, že jeden z jeho hlavních predátorů *Coleomegilla maculata* nebyl negativně ovlivněn, když se krmil na larvách resistantního hmyzu plných Bt toxinu. Zjistilo se, že Bt toxiny se skrze trofické řetězce neakumulují, ale spíše rozředují (Tian a kol., 2011).

Mezi hlavní kauzy ohledně Bt plodin byl případ motýlů Monarchů v USA. Ti se krmili na listech klejichy hedvábné pokrytých pylem Bt kukuřice. Larvy, které tento pyl jedly, vykazovaly zpomalený růst. Motýli spadají do skupiny hmyzu, kterou mohou Bt toxiny ohrožovat. Poškození by nemělo být možné při přímé konzumaci, nicméně při kontaktu larvy s pylem takové riziko existuje. K tomuto případu byla vypracována rozsáhlá studie, při které se tento účinek vskutku prokázal. Nejvyšší účinek byl zjištěn u Bt kukuřice Bt176, která obsahovala Bt gen Cry1Ab. Tento gen obsahovaly i další dvě testované rostliny, ale jeho účinek byl zřetelně nižší. V dnešní době již v USA není kukuřice Bt176 komerčně pěstována (Slater a kol., 2008).

## **Socioekonomická rizika**

GMO plodiny jsou ve většině případů vlastněny obřími nadnárodními koncerny. To dle nevládních organizací a některých států vede k růstu závislosti na těchto společnostech a ke ztrátě potravinové bezpečnosti a soběstačnosti. Technologie terminátor genu společnosti Monsanto například brání vzklíčení semena transgenní rostliny, a tak je zemědělec zcela závislý na nákupu osiva od této společnosti. Dochází také k vytlačování lokálních odrůd rostlin modifikovanými rostlinami globálně prosazovanými těmito firmami.

Argumentace zastánců transgenních plodin často zmiňuje, že mohou vyřešit problémy světového hladu. Ten dle OSN není způsoben nedostatkem potravin, ale jejich nerovnou distribucí. A jelikož jsou GM plodiny patentovány biotechnologickými korporacemi, může dojít spíše k zhoršení světové potravinové situace (Bioinstitut, 2008).

Technologie terminátor spočívá v tom, že je osivo před prodejem ošetřeno speciální směsí TPS, která zastaví vývoj rostliny před tím, než se dovyvine a stane se plodnou. Tržní hodnota jí zůstává, jelikož semena nejsou jinak znehodnocena. Tato technologie má chránit zisky společnosti co vlastní osivo, aby si ho farmáři neschovávali na příští rok a museli si ho kupovat znovu. V roce 2000 bylo Konvencí pro Biologickou Diverzitu při Spojených Národech doporučeno národním vládám, aby neschvalovaly terminátor technologii ani pro polní testy ani pro komerční užití. To je dnes považováno za mezinárodní moratorium a v roce 2006 bylo ještě posíleno. V dnešní době není tato technologie komerčně využívána. I když Monsanto dříve proklamovalo, že nemělo žádný zájem na prodeji semen obsahujících tuto technologii, pokusy s ní pokračují dodnes (Slater a kol., 2008).

Nemožnost zachování osiva na další rok tedy nespočívá v technologii terminátor. Jedná se o problém duševního vlastnictví. Transgenní osivo je majetkem dané společnosti a farmář ho nesmí znovu vysadit a musí si ho znovu každý rok koupit. Patentní zákony související s transgenním osivem dávají společnostem, které ho vlastní mnohem větší vlastnická práva než by mohly mít na osivo konvenční. Tato komerční strategie je velmi výhodná i z důvodu, že pokud si farmář koupí Ht osivo, je povinen nakoupit jej i s herbicidem, na který je rostlina resistantní (Murphy, 2011)

Několik nejdůležitějších technologií patří pouze několika korporacím, což spolu s legislativními opatřeními a nejistými reakcemi veřejnosti zpomaluje rozšíření GM plodin do zemí třetího světa. V souvislosti s duševním vlastnictvím technologií první generace transgenních plodin, vznikají celé řady lokálních iniciativ z rozvojových zemí, které mají

spolu s veřejným sektorem začít vyvíjet vlastní GM plodiny. Například brazilská výzkumná organizace EMBRAPA vyvinula transgenní odrůdy sóji, alternativní k RoundupReady odrůdám od Monsanto. V Malajsii jsou ve výzkumu transgenní odrůdy olejových palem a v Indii se vyvíjí lokální variace Bt lilku. Díky velkým cenám GM osiva a přísné patentní ochraně transgenních plodin se v rozvojových zemích rozrostl černý trh. V Indii se ilegálně prodává GM osivo křížené s lokálními odrůdami. Podíl na trhu osiv Bt bavlny byl např. v roce 2005 u na černo prodávaných semen až 70 procent (FAO, 2011).

Vstup menších firem na trh s GMO je limitován obrovskou konkurencí největších firem, které se v tomto odvětví pohybují. Mají stálou pozici na trhu a velké finance. Na jejich straně stojí také patentový systém a nákladný výzkum (Stratilová, 2012). Například jen společnost Monsanto věnuje na výzkum téměř 2 miliony dolarů denně (Steiner, 2006). Další generace GM plodin pravděpodobně již nebude doménou jen těchto velkých firem, jak naznačuje jejich vývin např. v Číně a Indii (Roudná, 2008).

## 4. Závěr

Rostlinné biotechnologie stojí za mnoha úspěchy moderního zemědělství. Jedná se o velmi sofistikované vědecké metody, které se neustále vylepšují a do budoucna slibují mnohá další vylepšení. V dnešní době patří k nejvíce rostoucím a skloňovaným zemědělským technologiím především transgenní metody modifikace rostlin. Jejich první generace je už 16 let široce využívána po celém světě a nezdá se, že by se její růst i přes silný odpor a mnohé kontroverze snižoval.

I když se může zdát, že se jedná o relativně novou techniku, dalo by se říci, že člověk geneticky modifikuje organizmy už od nepaměti. Člověk si tento svůj vliv zpočátku neuvědomoval, ale už počátky zemědělství a selekce organismů, které člověku poslouží lépe, jsou ve své podstatě genetickou manipulací. Proto se může zdát, že uvědomělé genetické modifikace jsou logicky dalším krokem. V souvislosti s touto technologií platí velká předběžná opatrnost, což se rozhodně o všech oborech lidské činnosti říci nedá (Vondrejs, 2010). Tento dvojitý metr platí i v rámci samotných biotechnologií. Například mutageneze na sebe nikdy nepřipoutala takovou pozornost jako GMO, ač mutageneze může vyvolat mnohé neočekávané výsledky, protože není tak přesná. Většina lidí ani neví, že spousta jídla, které jedí, bylo vypěstováno na rostlinách, které byly touto technologií vyšlechtěny. Důvody tohoto mohou být například to, že mutageneze byla často vyvíjena veřejným sektorem a díky tomu, že není tak snadno patentovatelná, nebyla v takové míře přijata velkými korporacemi. Také je rozsáhle využívána v pomoci zemím třetího světa (Murphy, 2011) Ani v ekologickém zemědělství neplatí zákaz užívat odrůdy vyšlechtěné pomocí mutageneze.

Jedním z největších problémů, které odpůrci transgenních technologií spatřují, je to, že je většinou vlastněna a využívána obrovskými firmami pro jejich vlastní zisk. Mohl by to být ten největší problém, jelikož jak je vidět i v této práci ty skutečně vědecké problémy zatím nebyly v souvislosti s GMO potvrzeny. Změnu v této oblasti by snad mohly přinést technologie druhé generace GM plodin, které jsou více orientovány na spotřebitele, a jejich vývoj nespadá pouze pod nadnárodní koncerny. Což by mohlo mít pozitivní následky, jak pro země třetího světa, tak by to i mohlo pomoci vylepšit vztahy ekologického zemědělství a genetického inženýrství.

Ekologičtí zemědělci by si měli položit otázku, co mohou nabídnout planetě, kde se neustále zvyšuje počet obyvatel, když jeho výnosy jsou v průměru nižší. V zemích třetího světa je ekologické zemědělství praktikováno od nepaměti, ale problémy místního hladu

nikdy nevyřešilo. Je pochopitelné, že ekologické zemědělství, které vychází z forem tradičního zemědělství lpí na své nezávislosti, kterou by zajisté při adopci současných GM technologií ztratilo (Nátr, 2002). Odpor ekologického zemědělství k GM plodinám, také souvisí s tím, že jeho zákazníci si tuto technologii prostě nepřejí, než přímo s vědeckými důkazy. Je pochopitelné, že k herbicidům tolerantní rostliny nemají pro ekologického farmáře smysl, ale třeba Bt plodiny by smysl mít mohly. Až postupem času se ukáže, jestli je tato propast překlenutelná a jestli se vůbec tato forma hospodaření pod obrovskou konkurencí biotechnologického byznysu udrží.



## 5. Zdroje

- Andrová, J. 2011. Transgenní plodiny a třetí svět – aktualizace gymnaziálního učiva biologie. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Praha. s. 32
- Benbrook, Ch. M. 2012. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years. *Benbrook Environmental Sciences Europe* 2012, 24:24
- Bioinstitut. 2008. Ekologické zemědělství a gmo otázky koexistence. Bioinstitut. Olomouc. s. 37. ISBN: 978 80 904174 6 5
- D'Agnolo, G., 2005. GMO: Human health risk assessment. *Veterinary Research Communications*, 29(Suppl. 2), 7–11
- Devos, Y., Schrijver, Clercq, P., Kiss, J., Romeis, J. 2012. Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms. *Transgenic Research*. December 2012. Volume 21. Issue 6. 1191-1214
- Dunwell, J.M. 1999. Transgenic Crops: The Next Generation, or an Example of 2020 Vision. *Annals of Botany* 84, 269 -277
- FAO. Biotechnologies for agricultural development. 2011. FAO. Rome. p. 569. ISBN: 978 92 5106906 6
- Fojta, J. (ed.). 2006. Vývoj biotechnologie a průmyslové chemie. Národní technické muzeum. Praha. s. 144. ISBN: 80 7037 156 0
- James, C., 2010. A global overview of biotech (GM) crops Adoption, impact and future prospects. *GM Crops* January/February 2010, 8-12
- Mahesh, S. 2009. *Plant Molecular Biotechnology*. New Age Science Limited.. India. p. 420. ISBN.: 978 1906574 14 7
- Moo-Young, M. (ed.). 2011. *Comprehensive Biotechnology* 2nd edition. Volume 4 – agricultural and related biotechnologies. Elsevier. Amsterdam. p. 785. ISBN: 978 0 44 453352 4
- Murphy, D. 2011. *Plants, biotechnology and agriculture*. CABI. Cambridge University Press. Cambridge. p. 310. ISBN: 978 1 84593 688 4
- Nátr, L. 2002, *Fotosyntetická produkce a výživa lidstva*. ISV nakladatelství. Praha. s. 423. ISBN: 80 85866 92 7

Poulsen, L. K. 2004. Allergy assessment of foods or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel foods. *Molecular Nutrition Food Research* 2004, 48, 413 – 423

Právní předpisy pro ekologické zemědělství a produkci biopotravin. 2012. Ministerstvo zemědělství. Praha. s. 148. ISBN: 978 80 7434 059 8

Roudná M. (Ed.). (2008): Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika. Ministerstvo životního prostředí, Praha, s. 48. ISBN: 978 80 7212 493 0

Roudná M. (Ed.) a kol. (2011): Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti. Ministerstvo životního prostředí, Praha, s. 84. ISBN: 978 80 7212 566 1

Shu, Q.Y, Forster, B.P., Nakagawa, H. (eds.). 2012. Plant mutation breeding and biotechnology. CABI. Oxfordshire. p. 608. ISBN: 978 1 78064 085 3

Slater A., Scott N. W., Fowler M. R. 2008. Plant Biotechnology the genetic manipulation of plants second edition. Oxford University Press. New York. p. 376. ISBN: 978 0 19 928261 6

Stratilová, Z. 2012. GMO bez obalu. Ministerstvo zemědělství Odbor bezpečnosti potravin. Praha. s. 31. ISBN: 978 80 7434 057 4

Tian, J.C., Collins, H. L., Romeis, J., Naranjo, S. E., Hellmich, R. L., Shelton, A. M. 2012. Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. *Transgenic Research*. December 2012. Volume 21. Issue 6. 1303-1310

Todd, J. H., Ramankutty, P., Barraclough, E. I., Malone, L. A. 2008. A screening method for prioritizing non-target invertebrates for improved biosafety testing of transgenic crops. *Environ. Biosafety Res.* 7 (2008) 35–56

Vondrejs, V. 2010, Otazníky kolem genového inženýrství. Academia. Praha. p. 134. ISBN: 978 80 200 1892 2

Xu, Y. 2010. Molecular Plant Breeding. CABI. Wallington. p. 734 ISBN: 978 1 84593 392 0

Zangrai, I., Ravenlonardo, M., Gaboreanu, I., Ferencz, B., Scorza, R., Zagrai, L., Kelemen, B., Pamfil, D., Popescu, O. 2011. Transgenic plums expressing plum pox virus coat protein gene do not assist the development of virus recombinants under field conditions Journal of plant pathology. 93. 159-156

### **Internetové zdroje**

Bioinstitut. Ekologické zemědělství. [cit. 2013 – 03 - 27] Dostupné z <<http://www.bioinstitut.cz/ekologicke.html> >

Scholte, EJ., Dicke, M. 2005. Effects of insect-resistant transgenic crops on non-target arthropods: first step in pre-market risk assessment studies [online] [cit 2013 04 5] Dostupné z <<http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/effects-of-insect-resistant-transgenic-crops-on-non-target-arthropods-first-step-in-pre-market-risk-assessment-studies>>

Steiner, J. Innovating for the Future:World Trends, Seed Traits and Crop Inputs, Minnesota Crop Production Retailers December, 5, 2006. [online] [cit 2013 04 7] Dostupné z <[http://agronomy.cfans.umn.edu/prod/groups/cfans/@pub/@cfans/@agronomy/documents/asset/cfans\\_asset\\_289379.pdf](http://agronomy.cfans.umn.edu/prod/groups/cfans/@pub/@cfans/@agronomy/documents/asset/cfans_asset_289379.pdf)>

Van, L. B., 2009. Transgenic plants: second generation. [online] [cit. 2013 – 04 - 5] Dostupné z <<http://cnx.org/content/m27709/latest/PlantBioVI-SECOND%20GENERATION.pdf>>