

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Detekce zájmových genů v transgenním potomstvu jarního
ječmene SCLW-GP-PHYA a ověření přenosu
do orgánů krmených brojlerů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Autor: | Barbora Štefková |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2017 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Barbora Štefková |
| Název práce | Detekce zájmových genů v transgenním potomstvu jarního ječmene SCLW-GP-PHYA a ověření jejich přenosu do orgánů krmných brojlerů |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2017 |
| Abstrakt | <p>Kyselina fytová je důležitá zásobní látka fosforu a dalších kationtů, které využívá rostlinný organismus pro růst a vývoj. Zároveň ale plní funkci antinutričního faktoru, protože monogastriční živočichové nejsou schopni fytáty v krmných směsích degradovat. Přídavek trávicích enzymů nebo anorganického fosforu do krmiv je finančně náročný a neřeší omezení v dostupnosti fosforu. Související nárůst ekologické zátěže v oblasti velkochovů hospodářských zvířat, způsobený znečišťováním vody a půdy fosfáty, přiměl genetiky vyvíjet linie se sníženým obsahem kyseliny fytové v semenu, nebo s vneseným genem kódující enzym, schopný degradovat fytáty. Byly detekovány geny <i>phyA</i> a <i>bar</i> v sedmé a osmé generaci transgenního jarního ječmene a byla určena stálost vnesených genů v porovnání s generací T6. Dále byla ověřena možnost přenosu transgenů do orgánů krmných brojlerů. Téma geneticky modifikovaných organismů a jejich vlivu na lidskou populaci vyvolává mnoho otázek po celém světě. Bylo dokázáno, že při krmení hospodářských zvířat krmivem z transgenních linií nedochází k přenosu transgenů do jejich krve ani do jater.</p> |
| Klíčová slova | Fytasa, ječmen jarní, kyselina fytová, transgen. |
| Počet stran | 53 |
| Počet příloh | 3 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Barbora Štefková |
| Title of thesis | Detection of transgenes in spring barley SCLW-GP-PHYA and in organs of broilers |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D. |
| The year of presentation | 2017 |
| Abstract | <p>Phytic acid is an important source of phosphorus and other cations that plant use for growth and development. However, it also functions as antinutritional factor because monogastric animals are unable to degrade phytates in compound feeds. Addition of digestive enzymes or inorganic phosphorus to feed is costly and does not address the limitations in the availability of phosphorus. The related increase in ecological burdens in farm livestock, caused by water and soil pollution by phosphates, has led to the development of lines with reduced phytic acid in the seed, or to a gene encoding an enzyme capable of degrading phytates. The <i>phyA</i> and <i>bar</i> genes in transgenic spring barley of the seventh and eighth generation were detected and the stability of the introduced genes relative to the T6 generation was determined. Furthermore, the possibility of transfer of transgenes into organs of fed broilers was verified. The topic of genetically modified organisms and their impact on the human population raises many questions around the world. It has been shown that feeding of livestock by feeding from transgenic lines does not transfer the transgenes into their blood or liver.</p> |
| Keywords | Phytic acid, phytase, transgene, spring barley. |
| Number of pages | 53 |
| Number of appendices | 3 |
| Language | Czech |

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis

Ráda bych poděkovala mé vedoucí Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, podporu a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tomášovi Vlčkovi za cenné rady při psaní této práce a za všestrannou pomoc v laboratoři.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Cíle práce..... | 7 |
| 2 | Úvod | 8 |
| 3 | Současný stav řešené problematiky | 9 |
| 3.1 | Ječmen jako významná plodina | 9 |
| 3.1.1 | Přehled doporučených odrůd ječmene | 11 |
| 3.2 | Kyselina fytová | 12 |
| 3.2.1 | Význam kyseliny fytové ve výživě zvířat | 13 |
| 3.3 | Fytasa | 14 |
| 3.3.1 | Rostlinné fytasy | 15 |
| 3.3.2 | Mikrobiální fytasy | 15 |
| 3.3.3 | Rozdělení fytas podle mechanismu katalýzy | 16 |
| 3.4 | Emise fosforu a dusíku do životního prostředí | 19 |
| 3.5 | Význam drůbežního masa..... | 20 |
| 3.6 | Genetické modifikace | 21 |
| 3.7 | Metody transformace genů u rostlin | 22 |
| 3.7.1 | Transformace mikroprojektilovým přenosem | 23 |
| 3.7.2 | Transgenoze pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 23 |
| 3.7.3 | Transgenoze genu kódujícího fytasu..... | 24 |
| 3.8 | Detekce transformovaných genů metodou PCR..... | 24 |
| 4 | Materiál a metodika | 26 |
| 4.1 | Rostlinný materiál..... | 26 |
| 4.2 | Specifikace geneticky modifikovaného organismu..... | 26 |
| 4.3 | Cíle polních pokusů..... | 26 |
| 4.4 | Ošetřování porostu během vegetace..... | 27 |
| 4.5 | Kontrola a odběry vzorků | 27 |
| 4.6 | Charakteristika oblasti Olomouc..... | 28 |
| 4.7 | Izolace DNA z listů ječmene pro PCR | 29 |
| 4.8 | Izolace DNA z krve brojlerů..... | 29 |
| 4.9 | Molekulárně biologická detekce genů kódujících <i>phyA</i> a <i>bar</i> | 30 |
| 4.9.1 | Podmínky polymerázové reakce | 30 |
| 5 | Výsledky..... | 32 |
| 5.1 | Molekulární detekce <i>phyA</i> a <i>bar</i> v linii SCLW-GP-PHYA generace T7 | 32 |
| 5.2 | Molekulární detekce <i>phyA</i> a <i>bar</i> v orgánech krmných brojlerů..... | 36 |
| 6 | Diskuse | 38 |
| 7 | Závěr..... | 40 |
| 8 | Literatura..... | 41 |
| 9 | Přílohy..... | 48 |
| A | Struktura ploch osevů v roce 2014 a 2015 v České republice | 48 |
| B | Plánek pokusu 2015..... | 49 |
| C | Fotografie..... | 50 |

1 Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Detekovat gen *phyA* a *bar* v listech jarních ječmenů.
3. Detekovat *phyA* a *bar* v krvi krmných brojlerů.
4. Detekovat *phyA* a *bar* v járech krmných brojlerů.
5. Ověřit hypotézu přenosu transgenů do krve a orgánů hospodářských zvířat.

2 Úvod

Ječmen patří mezi nejstarší hospodářské plodiny, které našly uplatnění v potravinářství a jako krmivo pro hospodářská zvířata. V této práci je věnována pozornost kyselině fytové a jejím solím.

Kyselina fytová (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát) je syntetizovaná rostlinou především během vývoje semen a dále využívána jako zásobní forma fosforu a minerálních látek pro klíčení. Fosfor je esenciální pro růst a vývoj všech buněk a hraje důležitou roli nejen v metabolických drahách. U živočichů je nedílnou součástí kostí a zubů a zajišťuje další významné funkce v těle.

V rostlinách tvoří kyselina fytová soli ve formě fytátů, jenž se dají označit za antinutriční faktor. Zatímco u přežvýkavců jsou fytáty v důsledku přítomnosti bakteriální mikroflóry nutričně plně využity, u nepřežvýkavých (monogastrických) živočichů však není fosfor s navázanými minerály v této formě dostupný. Nevyužitý fosfor vyloučený v exkrementech tak přispívá k znečištění životního prostředí, protože umožňuje například nárůst nežádoucích heterotrofních bakterií ve vodních zdrojích. Proto jsou ve velkochovech do rostlinných krmných směsí přidávány mikrobiální enzymy – fytasy nebo anorganické fosfáty. Tyto způsoby jsou ale ekonomicky náročné a plošná aplikace anorganického fosfátu vede k vyčerpání jeho zdroje.

Genetické modifikace umožňují získat takové odrůdy plodin, které zvyšují hospodářskou kvalitu rostlin. Biotechnologický výzkum se proto v případě zvýšení využitelnosti fosforu soustředí na postupy, které mají za úkol redukovat množství kyseliny fytové a zvýšení aktivity fytasy. Jedním z aplikovaných přístupů je transformace genů kódujících enzym, který je schopný hydrolyzovat kyselinu fytovou. Zvýšený podíl volného fosforu v obilnině může významně přispět k ochraně životního prostředí a ekonomicky přispět v oblasti krmivářství.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Ječmen jako významná plodina

Ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*) je samosprašná, krytosemenná, jednoděložná obilnina z čeledi lipnicovitých. Rod ječmene zahrnuje 25 druhů planého ječmene a jeden druh kulturní – ječmen setý, pěstovaný v ozimé a jarní formě. Podle Českého statistického ústavu jsou osevní plochy jarního ječmene téměř třikrát větší než osevní plochy ozimého ječmene, viz tabulka 1 – příloha A (<https://www.czso.cz>). Ječmen setý je kulturně významná plodina, jejíž zrno je ze 70 % celosvětové produkce využíváno především pro své vysoké nutriční hodnoty v krmných směsích. Část nejkvalitnější produkce (v České republice asi 30 % jarních ječmenů) je využívána ve sladovnictví. Ječmen slouží dále jako surovina pro výrobu lihu, či kosmetických a farmaceutických přípravků. Ječmen lze vzhledem k jeho mnohostrannému využití rozdělit na sladovnický, krmný, průmyslový a potravinářský ječmen.

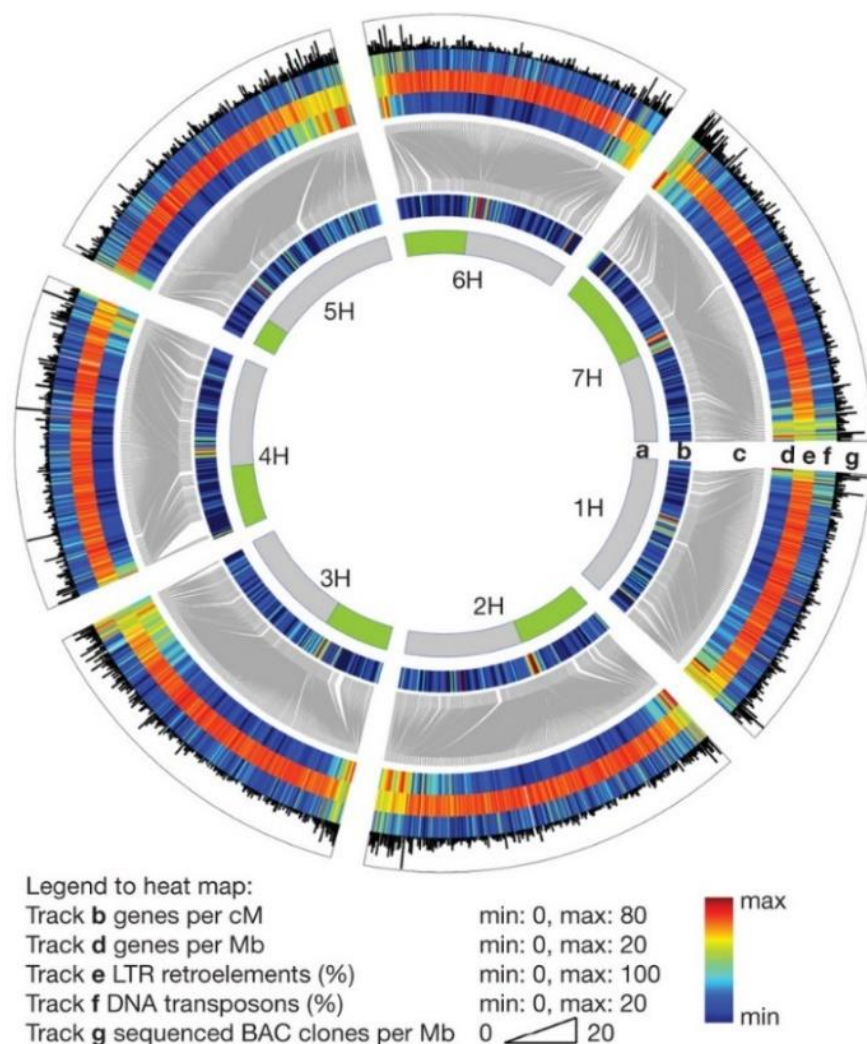
Ječmen setý je diploidní, tetraploidní a hexaploidní organismus s velikostí genomu 5,1 Gb, který je využíván jako modelová rostlina pro rostlinný genetický výzkum. Dnes reprezentuje čtvrtou, nejvíce se vyskytující obilninu na světě a druhou v České republice. Ječmen je považován za obilninu budoucnosti.

Ječmen má svazčité kořeny, které jsou v porovnání s dvouděložnými rostlinami slabší a netloustnou. Zárodečné kořínky pronikají až do hloubky 140 cm a podílejí se na zásobení vláhou hlavně v období dlouhotrvajícího sucha. Adventivní kořeny jsou mohutnější, rozprostřené v ornici v hloubce 30 – 50 cm. Stéblo tvoří 4 – 8 internodií a dosahuje výšky 80 – 130 cm. Listy má ječmen pravotočivé a jsou umístěny nad sebou ve dvou řadách. Listová čepel je čárkovitě přímá, v porovnání s ovsem a pšenicí má světlejší zelenou barvu. Květenstvím ječmene je složený nerozvětvený klas (lichoklas), tvořený smáčknutým větvenem, na stranách obrveným, které je rozděleno na jednotlivé články se třemi klásky, jejichž plodnost či sterilita určuje řadovost ječmene. Plevy jsou většinou úzké, štětinovité. Jednotlivé kvítky jsou chráněné pluchou a pluškou. Obilka je složena ze tří částí: obalů, endospermu a zárodku. U ječmenů pěstovaných v naší oblasti je obilka světle žlutá (Zimolka a kol., 2006).

Na nutriční hodnotě ječmene se podílejí zejména sacharidy a vitamíny skupiny B a E. Vyzrálá obilka ječmene obsahuje 12 – 14 % vody, 60 – 65 % škrobu (amylóza, amylopektin), 1 – 2 % sacharózy. Z polysacharidů se v obilce nachází β -glukany, a to z 3,3 – 4,9 %, pentosany z 9 % a obsah celulózy je od 4 do 7 %. Tuky tvoří 3,5 % a fosfáty (fytin) jsou v obilce v zastoupení 0,9 % (MacGregor a kol., 1993).

Studium genomu ječmene a identifikace genů zodpovědných za důležité znaky umožní vědcům a šlechtitelům vylepšit kvalitu a výnos jednotlivých odrůd a pomůže bojovat

proti chorobám. Metodou shotgun sekvenování byla sestavena fyzická mapa, která znázorňuje asi 1,9 Gb genomu ječmene, kultivaru Morex (viz obr. 1). Charakteristikou genomu ječmene je hojný výskyt repetitivní DNA. Bylo zjištěno, že téměř 84 % zkoumané části genomu sestává z mobilních elementů a dalších repetitivních sekvencí (Mayer a kol., 2012).



Obr. 1 Mapa části genomu ječmene

Dráha **a** znázorňuje sedm chromozómů ječmene. Zelená/ šedá barva zobrazuje závislost pevného fingerprintu (FPC) s přiřazeným chromozómovým ramenem založeným na specifické shotgun sekvenci chromozómu. Jedině pro chromozóm 1H byla celá zkoumaná sekvence dostupná.

Dráha **b** – rozložení genů kolem genetické mapy. Dráha **c** spojuje souvislost pozice genů mezi genetickou a integrovanou fyzickou mapou znázorněnou v dráze **d**. Dráha **e** zobrazuje pozici a distribuci LTR retroelementů a dráha **f** DNA transpozónů. Dráha **g** znázorňuje distribuci a pozici sekvencí BAC.

(Převzato z Mayer a kol., 2012).

3.1.1 Přehled doporučených odrůd ječmene

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně poskytl v roce 2009 seznam doporučených odrůd ječmene jarního a ozimého. Výchozím kritériem pro doporučení sladovnické odrůdy ječmene jarního byl výnos předního zrna, sladovnická kvalita, odolnost proti napadení padlím travním, rzí ječnou, hnědými skvrnitostmi a v neposlední řadě odolnost proti poléhání. U nesladovnické odrůdy ječmene byl sledován taktéž výnos zrna, obsah dusíkatých látek, obsah škrobu, odolnost proti poléhání a odolnost proti napadení škůdců.

Odrůdy Aksamit, Blaník, Bojos, Radegast a Tolar jsou doporučeny Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva. Nesladovnická odrůda Tocada je ceněna pro vysoký výnos zrna. Polopozdní nesladovnická odrůda Azit, která byla součástí experimentální části této práce – sloužila jako kontrola, má taktéž vysoký výnos zrna, vykazuje střední odolnost proti napadení hnědou skvrnitostí, avšak menší odolnost proti napadení padlím travním na listu. U ječmene ozimého se pro doporučení jednotlivých odrůd sledují stejná kritéria jako u ječmene jarního, a navíc ještě zimovzdornost. Sladovnická jakost se nesleduje, protože ozimý ječmen se u nás běžně nesladuje (Seznam doporučených odrůd, 2009).

3.2 Kyselina fytová

Kyselina fytová (*myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-*hexakisfosfát*, Ins P₆) je cyklický alkohol, ester *myo*-Inositolu a kyseliny fosforečné (viz obr. 2).

Fytáty jsou soli kyseliny fytové, které jsou považovány za přirozeně se vyskytující antinutriční faktory, protože vytváří nerozpustné komplexy s řadou důležitých látek.

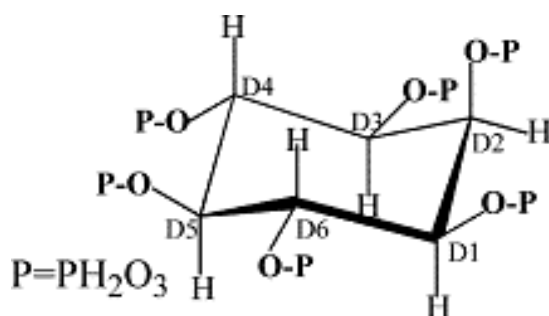
Fytáty – sloužící jako zásobárna fosforu – se vytvářejí po opylení a akumulují se během zrání zrna v tzv. globoidech – v těliscích v aleuronové vrstvě nebo v těliscích v endospermu (Zimolka a kol., 2006). První zmínky o kyselině fytové pochází již z roku 1855, kdy Hartig (1856) našel v semenech rostlin granule, jež pojmenoval „globoidy“, které považoval za zdroj esenciálních živin pro klíčení semen a růst rostlin. Soli kyseliny fytové (fytát a fytin), vznikají vazbou kationtů vápníku, železa, draslíku, hořčíku, manganu a zinku na kyselinu fytovou v důsledku její chelatační schopnosti. Fytin je sůl kyseliny fytové s ionty vápníku nebo hořčíku.

Kyselina fytová a její deriváty se uplatňují při klíčení rostlin, při exportu RNA z jádra, při opravách DNA, rekombinaci DNA (Hanakahi a West, 2002), signalizaci, endocytóze, vezikulárním transportu (Saiardi a kol., 2002) a dokonce jsou schopny vázat volné ionty železa a tím jsou řazeny mezi antioxidanty (Graf a kol., 1987).

Kyselina fytová je jednou z nejčastěji se vyskytujících forem fosforu v rostlinných organismech. V letech 1980 až 1990 se objasnilo, že Ins P₆ je všudypřítomný v eukaryotních organismech a je hlavní formou zásobního fosforu v semenech rostlin (Sasakawa a kol., 1995, Irvine, 2005).

Při chromatografické analýze kyseliny fytové se studie zaměřily na zastoupení jednotlivých inositolfosfátů. Ukázaly, že Ins P₆ a jeho deriváty zahrnují ještě vysoce polární a vysoce fosforylované pyrofosfátové skupiny jako 5-PP-Ins(1,2,3,4,6)P₅ a 5,6-bis-PP-Ins(1,2,3,4)P₄. Ins P₆ spolu se signální molekulou Inositoltrifosfátem (IP₃) reprezentuje hlavní, metabolicky aktivní Inositol. Pyrofosfát inositol slouží jako ligand v přenosu a regulaci signálu, v transdukcii a ATP regeneraci (Safrany a kol., 1999).

Ins P₆ představuje v suchých semenech asi 75 ± 10 % celkového fosforu. Zbytek tvoří anorganický fosfát (Pi) a fosfát vázaný v buněčných strukturách např. v nukleových kyselinách, fosforylovaných proteinech, v lipidech a sacharidech. Uvedeno na příkladu, typické vyzrálé suché semeno obsahuje 4 mg celkového P g⁻¹, takže asi 3 mg bude zastávat přímo kyselina fytová a méně než 0,5 mg další Ins fosfáty (ze skupiny slabě fosforylovaných Ins(1,3,4,5) P₄ i vysoce fosforylovaných PP Ins fosfátů) (Dorsch a kol., 2003).



Obr. 2 *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát (převzato z Raboy, 2003).

3.2.1 Význam kyseliny fytové ve výživě zvířat

V kontextu lidské výživy a krmení hospodářských zvířat je zřejmé, že kyselina fytová je kriticky důležitá. I přes svůj antioxidační vliv na zdraví jedince však plní ve výživě funkci antinutričního faktoru.

Nepřežvýkaví živočichové, kam řadíme prasata, drůbež a ryby, vykazují v trávicím traktu nízkou aktivitu enzymů hydrolyzujících fytáty. Nedostatečný potenciál fytasy pro degradaci fytátu vede k nízké absorpci fosforu a většina fytátu je nepřežvýkavým zvířetem vyloučena. Důsledkem je zatížení životního prostředí v oblastech intenzivní živočišné produkce. Nízká dostupnost fosfátu v krmivech obsahující obilná zrna navíc vyžaduje, ve snaze zásobovat monogastrické živočichy dostatečným množstvím fosfátu, velkou míru suplementace anorganickým fosfátem. Tento způsob ale není dlouhodobě udržitelný, protože fosfor pochází z neobnovitelného zdroje. Nadbytek nevyužitého fosfátu je i v tomto případě opět vyloučen do životního prostředí.

Degradace fytátů během trávení je u **přežvýkavých** živočichů způsobena aktivitou přirozené mikrobiální flory obsažené v tlustém střevě. Vzhledem k tomu, že monogastričtí živočichové postrádají v gastrointestinálním traktu dostatečnou aktivitu enzymů hydrolyzujících fytáty, přidávají se uměle do potravy. Tak dochází k lepšímu trávení potravy bohaté na fytáty (Konietzny a Greiner, 2002). Fytasa je tedy zodpovědná za zvýšení rychlosti degradace fytátů a schopnosti využít fosfát (Yanke a kol., 1998). Fytáty také inhibují trávicí enzymy jako je amylasa, pepsin a trypsin a vytváří tak rezistenci vůči proteolytickému trávení (Tamminga, 1990).

Potrava, která obsahuje adekvátní množství fytasy, snižuje potřebu umělé a drahé suplementace anorganickými fosfáty do krmiv monogastrických zvířat. Proto se biochemický výzkum této oblasti zaměřil především na genetickou modifikaci hospodářských plodin a vnášení genů kódující fytasy do jejich genomu. Výsledkem je zvýšený příjem důležitých látek z krmiv a životní prostředí není zatěžováno nadměrným množstvím vyloučeného fosforu.

3.3 Fytasa

Fytasa nebo také *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát fosfohydroláza je enzym, který je schopen rozkládat kyselinu fytovou a její soli na volný fosfát a další *myo*-inositolové produkty (nižší InsP nebo koncový *myo*-Inositol).

Obecně jsou fytasy monomerní jednotky s molekulovou hmotností mezi 40 až 50 kDa. Byly identifikovány dva hlavní typy enzymů hydrolyzujících fytát. Enzymy s pH optimem 5 – kyselé pH a enzymy s optimem pH 8 – zásadité pH. Většina dnes popsanych enzymů jsou aktivní v kyselém prostředí (Konietzny a Greiner, 2002).

Vzhledem k tomu, že je fytasa schopna hydrolyzovat fytáty, je používána jako doplněk stravy pro monogastriční zvířata. Důvodem je lepší využití fosforu vázaným na fytát, který představuje hlavní zásobní formu fosforu v rostlinných semenech. V posledních 25 letech přitáhla tato třída enzymů značnou pozornost vědců i podnikatelů v oblasti výroby surovin pro lidskou výživu. Důvodem je degradace fytátů v potravě, a tak stoupající dosažitelnost minerálních látek (zinek, železo, vápník, hořčík) na ně vázaných. Schopnosti fytasy jsou známé především z *in vitro* analýz (Igbasan a kol., 2000, Pallauf a kol., 1997, Knuckles a kol., 1985) a informace o jejich *in vivo* funkcích jsou spíše omezené.

Fytasy byly identifikovány v rostlinách, houbách, mikroorganismech a některých živočišných tkáních – poprvé byla identifikována v játrech a krvi telat (McCollum a Hart, 1908). Při dalším výzkumu byla však fytasa detekována pouze v krvi nižších obratlovců, jako jsou ptáci, plazi a ryby a v krvi savců byla její přítomnost minimální (Rapoport a kol., 1941). Vzhledem k tomu, že kyselina fytová silně ovlivňuje minerální rovnováhu (Pointillart a kol., 1987), byla zkoumána přítomnost a aktivita fytát degradujících enzymů v gastrointestinálním traktu u řady zvířat. Fytát degradující aktivita byla detekována v sliznici tenkého střeva u krys, králíků, kuřat, telat i člověka (Bitar a Reinhold, 1972; Cooper a Gowing, 1983; Iqbal a kol., 1994).

U monogastričních zvířat podporuje trávení fytátu především mikrobiální flóra v tlustém střevě, která produkuje fytát degradující enzymy. Trávení monogastričních živočichů může být tak podpořeno umělou suplementací těchto enzymů (Cromwell a kol., 1995). První komerčně vyráběná fytasa byla uvedena na trh již v roce 1991.

3.3.1 Rostlinné fytasy

Fytát degradující enzymy se nachází hlavně v zrně, semenech a pylu vyšších rostlin. (Hara a kol., 1985, Raboy, 2001). Byly objeveny v pšenici (Nagai a kol., 1962; Lim a kol., 1971; Nakano a kol., 1999), žitu (Greiner a Konietzny, 1998), ječmeni (Greiner a Konietzny, 2000), hrachu (Guardiola a kol., 1971), fazolích (Maiti a kol., 1974), sóji (Hamada a kol., 1996), kukuřici (Hubel & Beck, 1996; Maugenest a kol., 1999), rýži (Hayakawa a kol., 1989), rajčatech (Li a kol., 1997) a dalších. Fytasy se uplatňují během klíčení – uvolňují fosfát, minerály a *myo*-Inositol potřebný pro růst a vývoj rostlin (Reddy a kol., 1989). V kořenech byla naměřena nízká aktivita fytasy. Obecně nejvyšší aktivitu fytas vykazují obilniny (rýže, pšenice, ječmen) v aleuronové vrstvě (Gabard a kol., 1986). V luštěninách byla největší fytasova aktivita zjištěna v děložních lístcích (Hegeman a kol., 2001).

Laboure a kol. (1993) purifikoval a charakterizoval fytasu z 5 – 7 dní klíčících semen kukuřice. Nativní protein byl vysoce hydrofobní, s pH optimem 4,8 a reakční teplotou 55 °C pro degradaci fytátu. Protein byl složen ze dvou podjednotek, o celkové molekulové hmotnosti 76 kDa. Analýza imunoblotem vyhodnotila nejvyšší fytasovou aktivitu právě během prvních 7 dnů klíčení semene. Tento enzym vykazoval vysokou afinitu vůči mnoha fosforylovaným substrátům, především vůči pentafosfátovým a trifosfátovým esterům *myo*-Inositolu.

Dionisio (2011) demonstroval, že pšenice, ječmen, kukuřice a rýže obsahují purple acid phosphatase (PAP) geny, které kódují plně funkční fytasy (PAPhys). Charakterizoval tři geny kódující ječmennou fytasu: HvPAPhy_a, HvPAPhy_b1, and HvPAPhy_b2. Ječmenné fytasy byly z 86 % – 99 % identické.

3.3.2 Mikrobiální fytasy

Fytasová aktivita byla detekována u řady mikroorganismů. Zdroje mikrobiálních genů kódující fytasu pochází především z *Aspergillus niger* (Hamada a kol., 1994), ale také z dalších mikroorganismů jako je *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Escherichia coli*, *Schwanniomyces occidentalis* a *Selenomonas ruminantium*.

Většina mikroorganismů produkuje pouze intracelulární fytasy. Extracelulární fytasová aktivita byla zaznamenána výhradně ve vláknitých houbách, prostřednictvím čehož byl *Aspergillus niger* identifikován jako její největší producent (Gargova a kol., 1997). Mikroorganismy účastníci se fermentace (*S. cerevisiae*, *S. castellii*) byly zkoumány pro svou schopnost degradovat fytáty v průběhu fermentačního procesu. Také tyto kvasinky produkují jak intracelulární, tak i extracelulární fytát degradující enzymy (Nakamura a kol., 2000, Lambrechts a kol., 1992).

Obecně jsou fytasy mikrobiálního původu více pH stabilní a více termo stabilní než rostlinné fytasy. Stabilita většiny rostlinných enzymů se dramaticky snižuje pod hodnotami pH 4 nebo hodnotami vyššími než 7,5. Zatímco většina příslušných mikrobiálních enzymů je stabilní dokonce při pH nižším než 3 a přesahujícím 8 (Simon a Igbasan, 2002). Rostlinné fytasy byly inaktivovány již během pár minut při teplotách přesahujících 70 °C, zatímco mikrobiální fytasy si zachovaly značnou aktivitu i při delším působení vysokých teplot (Konietzny a Greiner, 2002).

3.3.3 Rozdělení fytas podle mechanismu katalýzy

Počet enzymů popisovaných jako fytasy se v posledním desetiletí zvýšil. Ale ne všechny tyto enzymy jsou strukturně podobné ani všechny neštěpí fosfátové skupiny stejným mechanismem. Rozmanitá katalytická činnost těchto enzymů odráží rozdílné způsoby, kterými organismy defosforylují fytáty. Výzkum aktivního místa a mechanismu syntézy nám umožňuje rozdělit fytasy na specifické třídy enzymů.

Podle počáteční pozice hydrolýzy fytátu je dělíme na 3 – fytasy (EC 3.1.3.8), 5 – fytasy (EC 3.1.3.72) a 6 – fytasy (3.1.3.26). Číslo 3, 5 nebo 6 před názvem označuje, na které pozici dochází k hydrolýze esterové vazby mezi *myo*-Inositolem a fosfátovou skupinou (Cosgrove, 1970).

Fytasa vykazuje fytát degradující aktivitu v závislosti na optimálním pH. Na základě toho dělíme obecně fytasy mezi kyselé, neutrální nebo zásadité.

Dle katalytického mechanismu fytasy dělíme na čtyři strukturně odlišné třídy enzymů: HAP (histidine acid phosphatase), BPP (β – propeller phosphatase), PAP (purple acid phosphatase) a cysteinové fosfatázy (Greiner a Konietzny, 2006; Mullaney a Ullah, 2003).

HAP, (EC 3.1.3.8) je velká skupina enzymů, jejichž aktivita je zaznamenána ve zvířatech, rostlinách a mikroorganismech (Wodzinski a Ullah, 1996; Mullaney a kol., 2000; Konietzny a Greiner, 2002). Společná charakteristika enzymů této třídy je katalytický mechanismus. Aminokyseliny, které tvoří aktivní místo, obsahují na N konci motiv RHGXRXP a na C konci motiv HD. Ale pouze správné složení těchto sekvencí poskytuje aktivní katalytické místo, které iniciuje hydrolýzu fosfomonoesteru, jenž probíhá ve dvou krocích. (Ullah a kol., 1991). Zbytek N konce slouží jako nukleofil. Asparagová kyselina na zbytku C konce funguje jako donor protonu atomu kyslíku, nacházející se ve fosfoesterové vazbě. Tyto enzymy sice mají společné katalytické místo, ale nesdílí stejnou schopnost degradace *myo*-Inositolu hexakisfosfátu. Ne všechny HAP jsou katalyticky aktivní jako fytasy. Mezi HAP ezymy řadíme phyA, phyB a AppA.

PhyA byla izolována z vláknitých hub, bakterií, kvasinek a rostlin (Mullaney a kol., 2000). Při objevení trojrozměrné sktruktury molekuly phyA, bylo zjištěno, že se nachází šest různých aminokyselin v substrátově specifickém místě (SSS – substrate specificity site) – K91, K94, E228, D262, K300, a K301, které obklopují dutinu aktivního místa HAP enzymu. Fytasa phyA z *A. niger* NRRL 3135 je vysoce specificky aktivní. Tento charakter phyA je způsoben tím, že aktivní místo je schopno nejlépe vázat právě negativně nabitě molekuly kyseliny fytové. Tento model také nabízí vysvětlení, proč se ostatní, méně nabitě molekuly, neváží tak efektivně (Mullaney a Ullah, 2003). PhyA má optimum pH 2,5 – 5 (Ullah a Gibson, 1987). Vzhledem k ověřené účinnosti je využívána jako aditivum do krmiv hospodářských zvířat. Komerčně je prodávána pod značkami Natuphos a RoNozyme.

Vedle phyA patří do HAP třídy enzymů ještě další, příbuzná molekula phyB, izolována taktéž z *A. niger* NRRL 3135 (Ullah a Cummins, 1987). Kostrewa a kol. (1999) zjistili, že phyB má pH optimum 2,5 na rozdíl od phyA, která má optimum 2,5 – 5. Substrátově specifická místa obou enzymů jsou odlišná. Aktivní místo phyB je složeno pouze ze dvou aminokyselin D75 a E272. To znamená, že tato molekula je více elektrostaticky neutrální. Další rozdíl mezi těmito HAP enzymy je v tom, že aktivní forma phyA je monomer, zatímco aktivní forma phyB tetramer (Wyss a kol., 1998). Tato struktura poskytuje na jedné straně termostabilitu, ale na straně druhé neschopnost renaturace. PhyA schopnost renaturace naopak má. Mezi HAP fytasy patří dále appA, která byla izolovaná z *E. coli*. (Mullaney a Ullah, 2003).

BPP, (EC 3.1.3.8) je skupina enzymů původem z bakterie rodu *Bacillus*. Název této skupiny pochází z molekulové struktury, která má podobu β otáčejícího se listu. Studie prokázaly, že BPP vykazují schopnost vázat substrát (fytin) až po vazbě Ca^{2+} iontů do aktivního místa. Optimum fytasové aktivity je neutrální (Oh a kol., 2001). BPP má dvě aktivní místa, pro něž je důležité obsazení fosfátových skupin obou dvou míst. Tento enzym má schopnost hydrolyzovat každý druhý fosfát. Konečným produktem hydrolýzy je *myo*-Inositol trifosfát. Jejich termostabilita, stejně jako u HAP enzymů, nese výhodu při technickém zpracování krmiva, při kterém se používá vysoká teplota. BPP nejsou zatím komerčně dostupné. Do budoucna však mohou být používány také jako aditivum do krmiv, nebo nabídnou nové způsoby pro vylepšení zemědělské produktivity.

PAP, (EC 3.1.3.2) jsou metalohydrolasy vázající v aktivním centru dva kovové ionty, potřebné pro následnou hydrolýzu substrátu. Jeden z iontů je obvykle trojmocné železo, druhým může být v rostlinných PAP zinek, mangan nebo dvojmocné železo. Ionty jsou zodpovědné za barvu enzymu (Vogel a kol., 2001). První PAPhy gen byl popsán GmPhy, izolovaný z kotyledonů klíčící sóji (Hegeman a Grabau, 2001). Velikost enzymu se pohybuje v rozmezí 70 – 72 kDa. GmPhy má pět motivů aktivního místa

(DxG/ GDx2Y/ GNH (E, D) / Vx2H/ GHxH). Jestliže ji porovnáme s phyA z *A. niger*, zjistíme, že fytoaktivita GmPhy bude podstatně nižší, vzhledem k minimální schopnosti vázat fytát (Mullaney a Ullah, 2003; Mullaney a kol., 2000).

Cysteinové fosfatázy jsou specifickou skupinou monomerních enzymů o velikosti 46 kDa, s pH optimem 4,5 – 5 a optimální reakční teplotou 50 – 55 °C. Byly získány z anaerobní bakterie *Selenomonas ruminantium*. Při studiu této nově objevené skupiny enzymů jejich krystalová struktura prozradila, že nejde ani o HAP ani BPP enzymy. Aktivní místo má motiv HCXXGXXR(T/S) a je inhibováno kationy železa a dalšími kovy. Struktura jejich SSS váže dobře plně fosforylovanou *myo*-Inositolovou skupinu, jejíž hydrolyza končí produktem *myo*-Inositol 2-monofosfát (Chu a kol., 2004; Lei a kol., 2007).

3.4 Emise fosforu a dusíku do životního prostředí

Znečištění může být definováno jako nežádoucí změna fyzických, chemických nebo biologických vlastností vzduchu, vody nebo půdy, škodící lidem a dalším živočišným druhům (Thyagarajan a Sakthivadivu, 2013). Záměrem environmentálních věd je redukovat toto znečištění.

Živiny, na které je v posledních letech upírána největší pozornost jsou dusík a fosfor. Přestože jsou oba prvky vyžadovány při růstu rostlin, je na ně zároveň nahlíženo jako na potencionální škodliviny vstupující do životního prostředí prostřednictvím živočišného hnojiva. Dusík je potencionálním polutantem podzemních i povrchových vod. Na rozdíl od dusíku je fosfor relativně nerozpustný v půdě a obvykle se nedostává do podzemních vod. Přebytek fosforu a dusíku v půdě je převeden do forem ve vodě nerozpustných, které se spojují s částicemi půdy a mohou tak biologicky narušit jezera, potoky a řeky. Vymíláním částic zeminy, obsahující sloučeniny fosforu a dusíku, se totiž stimuluje v povrchových vodách růst řas a jiných vodních rostlin. Výsledné přemnožení a následný rozklad těchto rostlin snižuje přítomnost kyslíku ve vodě a vytváří tak toxické prostředí, které je nevhodné pro většinu či celou rybí populaci i další organismy v potravním řetězci (Carter a Kim, 2013, Schindler, 1977).

Rostoucí potřeba redukovat antropogenní živiny prostupující do vodních ekosystémů je účelem pro ochranu pitné vody. Redukování eutrofizace zamezuje růst vodního květu a tzv. „mrtvých zón“ v přímořských ekosystémech (Kardinaal a kol., 2005, Diaz a kol, 2008).

Fosfor je uveden jako polutant v drůbežím hnoji, který obsahuje okolo 4 % celkového dusíku a 2 % celkového fosforu. Kyselině fytové je tak přisuzována vysoká exkrece fosforu monogastričnými zvířaty, která vede k environmentálnímu znečišťování (Xin a kol., 2011).

Ma a kol., (2017) vyvinuli a optimalizovali metodu pro stanovení celkového fosforu v přírodních vodách. S použitím levného přenosného vaříče a vysoce rozpustného persíranu sodného namísto široce používaného persíranu draselného, který má rozpustnost slabší, jsou sloučeniny fosforu převedeny na orthofosfát. Ten je následně možné spektrofotometricky kvantifikovat.

3.5 Význam drůbežího masa

Konzumace drůbežího masa dosáhla v posledních letech enormního nárůstu v mnoha místech na světě. Chov drůbeže hraje významnou roli v zásobování lidské populace kvalitním proteinem prostřednictvím produkce masa a vajíček (Speedy, 2003). Rostoucí produkce drůbežího masa významně přispívá ke zmírnění chudoby a podvýživy v řadě rozvojových zemí (Bloem a kol., 2001). Na celosvětové úrovni zaujímá brojeří maso asi 85 % veškeré produkce drůbežího masa (Huyghebaert a kol., 2009). Významným důvodem tak velké produkce je také to, že žádné náboženství nebrání jeho konzumaci.

3.6 Genetické modifikace

Již po staletí lidé zlepšovali rostliny a živočichy selektivním křížením. Vybírali odrůdy s výhodnějšími znaky a křížili je mezi sebou za vzniku odrůd nových. Běžné šlechtitelské postupy, které jsou využívány dodnes, vytváří odlišné formy znaků. Organismy s těmito znaky jsou kříženy s vybranými organismy nebo odrůdami a tím jsou stabilizovány požadované vlastnosti. Šlechtění je však poměrně časově náročná metoda. Na rozdíl od běžného šlechtění, **genetické modifikace** umožňují zlepšit vlastnosti vybraného organismu za kratší dobu pro dosažení požadovaných znaků. Genetické modifikace jsou moderní metodou šlechtění, při které dochází k překonání tzv. přirozené reprodukční bariéry. Výsledkem je získání organismů se zcela novými vlastnostmi, nebo naopak organismů s potlačenými, nežádoucími vlastnostmi. Genetická modifikace je podle zákona č. č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, § 2 definovaná jako: cílená změna dědičného materiálu spočívající ve vnesení cizorodého dědičného materiálu do dědičného materiálu organismu nebo vynětí části dědičného materiálu organismu způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací.

První geneticky modifikovaný organismus byl vytvořen v roce 1973 vložím genu podmiňujícího rezistenci vůči tetracyklinu do plasmidu bakterie *E. coli* (Cohen a kol., 1973). Vložený gen je označován jako exogenní, tedy má původ v jiném organismu. O rok později vytvořil Rudolf Jaenisch (1974) prvního transgenního živočicha na světě vložím opičí virové DNA (SV40) do myšího embrya.

Pěstování obilnin odolných proti hmyzím škůdcům, virům nebo proti herbicidům, našlo také komerční uplatnění. V roce 1987 byl vytvořen první tabák, transformovaný genem *bar*, rezistentní vůči herbicidům s obsahem glufosinátu (De Block a kol., 1987). S omezením použití hnojiv a pesticidů se dají snížit škody, způsobené chemickým znečištěním. Nejrozšířenější transgenní hospodářskou plodinou je Bt kukuřice s vloženým genem z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis*, který kukuřici propůjčuje odolnost proti škodlivému zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) nebo bázlivci kukuřičnému (*Diabrotica virgifera*). V České republice se Bt kukuřice pěstuje od roku 2005.

Genetické inženýrství je využíváno nejen v biotechnologiích, ale i lékařství. Transgenní bakterie produkují například lidský inzulin (Goeddel a kol., 1979) – původní způsob jeho získávání z vepřových a hovězích slinivek by vzrůstající světové spotřebě nestačil. Dále je pomocí geneticky modifikovaných organismů produkován lidský růstový hormon – STH (Martial a kol., 1979), řada vakcín a také antibiotik.

„The international scientific and development community“ uvedla, že zdvojnásobení nebo ztrojnásobení světové produkce jídla a krmiva do roku 2050, kterou bude nutné zvýšit pro potřeby 11 miliard celosvětové populace, nemůže být dosaženo bez využití biotechnologií (James a kol., 1986 –1995).

Po genetické manipulaci nese výsledný organismus označení „geneticky modifikovaný organismus“, známý pod zkratkou GMO. **Cisgenní** organismy jsou vytvářeny přenosem genů, jež jsou vlastní danému rostlinnému nebo živočišnému druhu nebo pocházejí z blízce příbuzného druhu. Za cisgenní jsou považovány rostliny, do jejichž dědičné informace byly přeneseny úplné geny – tedy geny obsahující všechny introny s připojenými regulačními a terminačními sekvencemi. Do **transgenní** rostliny byl přenesen jeden či několik genů z organismů, z nichž by se tyto geny nemohly přenést tradičním křížením. Často jde o geny či jejich části převzaté z dědičné informace zástupců jiných říší (Schouten a kol., 2006).

3.7 Metody transformace genů u rostlin

Biotechnologie jsou mezioborové vědní disciplíny, využívající živé organismy a jejich produkty (enzymy, sekundární metabolity). Expandují do oblastí jako je hospodářství, potravinářství, medicína a kosmetika.

Mezi hlavní biotechnologické cíle hospodářských plodin patří vylepšení agronomických charakteristik (odolnost vůči biotickým a abiotickým faktorům) a zkvalitnění vlastností výrobku (zvýšení výnosu a zlepšení nutriční kvality potravin a krmiv). Rostliny patří v současné době k nejčastějším objektům genové manipulace. Modifikací jejich vlastností lze alespoň zčásti zabránit hladomorům v rozvojových zemích světa. V současné době probíhá mnoho vědeckých činností optimalizující používané metody a vyvíjející nové mutantní a transgenní linie.

Transformace je proces cílené integrace klonovaných genů z donorového genomu organismu do recipientního organismu. Pro integraci cizorodých klonovaných genů do genomu v eukaryontních buňkách se používá přesnější pojem transgenóze. Pojmem transgen lze označit klonovaný gen, jenž byl vnesen do genomu a došlo k jeho integraci do chromozómu. Transformace probíhá přirozeně v mnoha bakteriálních buňkách. Jako první byla transformace objevena v bakterii *Streptococcus pneumoniae* Frederickem Griffithem v roce 1928. Od slavného objevu je intenzivně studována v *in vitro* experimentech. Obecně se využívají pro transformaci přirozeně kompetentní bakterie, protože mají rychlý životní cyklus a jsou tedy schopné rychlého klonování zájmových genů v laboratorních podmínkách.

Nejrozšířenější metodou je transgenóze genů pomocí *Agrobacterium tumefaciens* a pomocí mikroprojektilového přenosu DNA (particle bombardment). Další metody transformace jsou fúze protoplasů, elektroporace nebo mikroinjekce.

Travella a kol., (2005) porovnával dvě metody, kterými byla vytvořena transgenní linie ječmene. Transformace pomocí *Agrobacteria* dosáhla dvakrát větší efektivity než transformace mikroprojektilovým přenosem. 100 % linií transformovaných pomocí

Agrobacteria neslo jednu až tři kopie transgenu, 60 % linií transformovaných mikroprojektilovým přenosem obsahovalo více než osm kopií transgenu.

3.7.1 Transformace mikroprojektilovým přenosem

Přímou a velmi rozšířenou metodou je transformace pletiva pomocí mikroprojektilového přenosu DNA. Při využití této metody lze úspěšně transformovat velké množství jednoděložných a dvouděložných rostlinných druhů. První zařízení pro přenos částic do pletiv vyvinul Sanford a kol., (1987). Nosičem DNA jdou mikroprojektily, zlaté nebo wolframové kuličky o velikosti 0,3 – 6 µm, které jsou spolu s navázanou plazmidovou DNA vstřelovány pomocí přístrojového zařízení do zájmových buněk. Zlaté částice jsou považovány za vhodnější, protože nepůsobí na DNA toxicky a v důsledku své větší hustoty pronikají hlouběji do pletiva. Transformovaná pletiva se následně přenesou na médium vhodné pro tvorbu kalusů, později pak na médium pro selekci transgenních pletiv (Ondřej a Drobník, 2002).

3.7.2 Transgenoze pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Transgenoze *Agrobacteriem* je nepřímá metoda transformace, založena na využití přenašečů, kteří jsou schopni na základě své infekční strategie integrovat část své genetické informace do hostitelské buňky. Obecně používaným přenašečem jsou gram-negativní půdní bakterie rodu *Agrobacterium* z čeledi *Rhizobiaceae*, zahrnující čtyři druhy: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* a *A. rubi*. Infekce *Agrobacteriem* způsobuje tvorbu nádorů na kořenové soustavě dvouděložných rostlin. Příčinou je průnik malého segmentu DNA, T_i plasmidu, do rostlinné buňky a jeho následné začlenění do genomu rostliny. Tento přirozený genový mechanismus je využíván v genovém inženýrství pro přenos a integraci fragmentů cizí DNA do chromozómu rostliny (Hamilton a kol., 1996). Bakteriální kmeny, které neobsahují plazmid T_i nejsou virulentní, tj. neindukují nádory. T_i plazmid obsahuje dvě důležité oblasti, označeny jako oblast T-DNA a oblast *vir*, jenž jsou nezbytné pro indukci nádoru. Oblast T-DNA je vymezena dvěma nedokonalými repeticemi o velikosti 25 bp, označenými jako levý a pravý okraj (Gelvin, 2003). Oblast *vir* T_i plasmidu není přenášena do hostitelské buňky. Obsahuje sedm lokusů (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* a *virG*), které kódují většinu virulentních proteinů (proteiny Vir) potřebných pro transport T-DNA a integraci do genomu hostitele (Zupan a Zambryski 1995).

3.7.3 Transgenoze genu kódujícího fytasu

Transgenní rostliny s produkcí heterologní fytasy v obilkách mají vyšší nutriční hodnotu. Tabulka 1 uvádí příklady transformace genů pro zvýšení aktivity fytasy u významných obilovin a luštěnin.

Tab. 1 - Transformace genů pro zvýšení aktivity fytasy (obilniny a luštěniny)

| Rostlina | Původ genu | Rok | Autor |
|---|------------------------------------|------|--------------------------------|
| Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> (L.)) | <i>Aspergillus niger</i> | 1997 | (Li 1997) |
| | <i>Aspergillus ficuum</i> | 2009 | (Li et al. 2009) |
| Ječmen (<i>Hordeum vulgare</i> L.) | <i>Aspergillus niger</i> | 1998 | (Larson a kol., 1998) |
| Kukuřice (<i>Zea mays</i> L.) | <i>Aspergillus niger</i> | 2000 | (Raboy a kol., 2000) |
| Pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) | <i>Aspergillus niger</i> | 2000 | (Brinch-Pedersen a kol., 2000) |
| | <i>Schwanniomyces occidentalis</i> | 2004 | (Hamada a kol., 2004) |
| Rýže (<i>Oryza sativa</i> L.) | <i>Pichia pastoris</i> | 2011 | (Dionisio a kol., 2011) |

3.8 Detekce transformovaných genů metodou PCR

Metoda polymerázové řetězové reakce (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), amplifikující DNA, je efektivní a citlivá technika s rozsáhlým využitím na poli molekulární biologie, biotechnologií, genetiky, biochemie, medicíny a forenzní analýzy.

Metoda PCR je pro detekci transgenních rostlin nejčastěji využívaná metoda. Aby bylo možné detekovat daný gen, je nutné provést před samotnou polymerázovou reakcí izolaci DNA o dostatečné čistotě i koncentraci. Edwards a kol. (1991) popisuje snadnou a rychlou metodu izolace i z velmi malého množství rostlinné DNA pro PCR analýzu. Tuto metodu je možné aplikovat na celou škálu rostlinných druhů a má tu výhodu, že nevyžaduje extrakci fenolem nebo chloroformem. Je tedy možné provést extrakci rostlinné DNA během 15 minut a to bez použití zdraví škodlivých rozpouštědel.

Během samotné PCR dochází k exponenciální amplifikaci úseku DNA *in vitro*. Tyto jsou označeny na 3' koncích tzv. primery (specifické oligonukleotidy o délce 18 – 25 bp). Dále je nutná přítomnost směsi volných deoxyribonukleosidtrifosfátů a vysoce termostabilní DNA polymerázy nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus* (Taq polymeráza) (Tindall a kol., 1988). PCR probíhá v termocykleru, který je schopný měnit teplotu během několika sekund a při každém cyklu, za ideálních podmínek, zdvojnásobí množství zájmové DNA. Na konci

procesu vzniká obrovské množství kopií původní sekvence DNA, podle vzorce 2^n , kde n představuje počet cyklů.

Postup je rozdělen na po sobě jdoucí, opakující se úseky (Mullis, 1987). Během denaturace dochází působením vysoké teploty k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a separaci jednovláknových molekul DNA. Na vzniklé ssDNA mohou nasedat primery na základě jejich komplementarity s vedoucím řetězcem. Této části říkáme annealing, při které teplota poklesne v závislosti na teplotě tání produktů a primerů. Při optimální teplotě Taq polymerázy dochází k samotné syntéze (elongaci) DNA ve směru od 5' k 3' konci. Po tomto kroku je celý proces opakován. Po posledním cyklu je zařazena tzv. extenční fáze, kdy je reakce dokončena a DNA renaturuje (Mullis a Falloona, 1987, Watson, 2012).

Metodu PCR vyvinul v roce 1983 Kary Mullis a za její objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.

4 Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál

V rámci projektu Výzkumného centra 1M06030 Genomika a proteomika ve šlechtění rostlin (2006-2011), V002 a V012 byly na řešitelském pracovišti ÚEB AV ČR v.v.i v Olomouci získány transgenní linie jarního ječmene odrůdy Golden Promise které vykazují zvýšenou aktivitu heterologní fytasy v obilce. Linie byly označeny SCLW-GP-PHYA.

4.2 Specifikace geneticky modifikovaného organismu

Jarní ječmen, odrůda Golden Promise, byl geneticky modifikován vložením genu *phyA*, který byl izolován z houby *Aspergillus niger* pro produkci heterologního enzymu fytasy, umožňující rozklad fytátů a tím účinnější využití fosforu, zvýšení příjmu kationtů Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} a také aminokyselin z krmiva.

Od roku 2008 byly vybrány transgenní linie pěstované v uzavřeném prostředí ve fytotronu a ve skleníku Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, v režimu uzavřeného nakládání. Funkční vzorek SCLW-GP-PHYA byl registrován v roce 2013. Na základě molekulárních analýz byly pro polní pokusy v roce 2015 vybrány rostliny, které vykazují vysoký stupeň homozygotnosti a zvýšenou aktivitu fytasy.

Pro polní experimenty v roce 2015, které byly součástí navazujícího výzkumného programu PŘF UP Olomouc, Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, byly vybrány tyto linie jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou aktivitou fytasy:

- 1.) transgenní linie 1015 – 7, 880 – 4, které pocházely z polních pokusů.
- 2.) DH linie generace T7, která byla pěstována ve skleníku Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a v rámci polního pokusu v roce 2015 v Olomouci, Holicích.

Osivo vyšeté v Olomouci v roce 2015 pocházelo ze dvou lokalit, Olomouce a Lukavce.

Pro uvedení geneticky modifikovaného ječmene do životního prostředí bylo uděleno Univerzitě Palackého v Olomouci Ministerstvem životního prostředí ČR dne 3. května 2012 povolení 35905/ENV/12 k uvádění geneticky modifikovaného jarního ječmene SCLW-GP-PHYA se zvýšenou produkcí enzymu fytasy do životního prostředí.

4.3 Cíle polních pokusů

Cílem programu polních pokusů bylo ověření agronomických charakteristik, potvrzení stability a bezpečnosti přenosu transgenu *phyA* u potomstva jarního ječmene SCLW-GP-PHYA.

4.4 Ošetřování porostu během vegetace

Agrotechnika, která byla použita pro polní pokusy s jarním ječmenem SCLW-GP-PHYA, je totožná s technikami běžně používanými pro geneticky nemodifikovaný jarní ječmen.

V průběhu vývojové fáze odnožování byla všechna transgenní potomstva ošetřena herbicidem Basta 15 v koncentraci 0,3 % s cílem selekce transgenních rostlin a likvidace plevelu. Vzhledem k tomu, že transgenní ječmen SCLW-GP-PHYA obsahuje gen *bar*, který vykazuje rezistenci vůči aktivní látce, glufosinátu amonnému, nebyl z experimentálního pohledu během vegetace aplikován jiný herbicid.

4.5 Kontrola a odběry vzorků

Po 14 dnech po provedené selekci přípravkem Basta 15 byl proveden odpočet přeživších rostlin (viz tab. 2).

Po 14 dnech po provedené selekci přípravkem Basta 15 byl proveden odběr vzorku listů z vybraných rostlin. Z každé rostliny bylo odebráno z nejmladšího listu přibližně 100 mg rostlinné hmoty. Odebraná hmota, určená k molekulárním analýzám, byla vložena do plastových mikrozkušavek, označených příslušným kódem a neprodleně zamražena v tekutém dusíku.

Tab. 2 - Počty rostlin vyšetřovaných na parcelách v Olomouci, Holicích

| Parcela | Počet rostlin (m ²) | Celkový počet uhynulých rostlin (řádek) |
|----------------------|---------------------------------|---|
| 1. Kontrola 0309 | 180 | - |
| 2. 1015 – 7 LUK 2012 | 102 | 70 |
| 3. 1015 – 7 OL 2013 | 230 | 85 |
| 4. 1015 – 7 LUK 2013 | 100 | 85 |
| 5. 1015 – 7 OL 2012 | 170 | 55 |
| 6. Kontrola GPUK 99 | 170 | - |
| 7. 880 – 4 LUK 2013 | 125 | 25 |
| 8. 880 – 4 LUK 2012 | 150 | 90 |
| 9. 880 – 4 OL 2012 | 170 | 40 |
| 10. DH směs | 124 | 50 |
| 11. DH | - | - |
| 12. Kontrola – AZIT | 100 | - |

Zkratka *Ol* označuje lokalitu Olomouc a *Luk* označuje lokalitu Lukavec.

Během kontroly vyšetřovaných rostlin nebyla zjištěna přítomnost albinů ani chimér.

4.6 Charakteristika oblasti Olomouc

Pozemek, na kterém byl v roce 2015 uveden geneticky modifikovaný jarní ječmen SCLW-GP-PHYA, je ve vlastnictví Univerzity Palackého v Olomouci.

Nachází se v městské části Olomouc – Holice na adrese Šlechtitelů 11, Olomouc.

Název katastrálního území a parcelní číslo: Holice u Olomouce 641227, parcela č. 1721/13.

Souřadnice polohy transgenního pole: 49.5743350N, 17.2841278E.

Druhem pozemku je orná půda. Podle půdní mapy České Republiky jde o fluvizem, jenž je charakterizovaná vrstevnatostí a nepravidelností rozložení organických látek s obsahem > 0,3 % do hloubky 0,60 m (Němeček, 2008). Fluvizemě se nacházejí ve větších plochách, zejména nížinách. Obsah humusu je střední.

Velikost pokusné plochy včetně osevu byla 1180 m², z toho 464 m² zaujímal GMO. Ochranným obsevem byl konvenční jarní ječmen, odrůdy Bojos, který byl likvidován dva dny před sklizní. Veškerý rostlinný materiál byl rozdrčen mulčovačem a zapraven do půdy střední orbou. Bylo aplikováno N hnojivo DAM390 na podporu rozkladných procesů. Sklizeň proběhla 6. 8. 2015. Byl použit maloparcelkový kombajn (viz příloha C).

Pokusná parcela byla rozdělena na 12 částí, na kterých byly vysety potomstva transgenních linií generace T7, označené 1 – 9, viz příloha B.

4.7 Izolace DNA z listů ječmene pro PCR

DNA byla izolována z mladých listů (Edwards et al. 1991) odebraných v poslední fázi sloupkování. Následně byly vzorky použity pro molekulárně biologickou detekci metodou PCR.

- 1) Přibližně 100 mg mladých listů jarního ječmene bylo homogenizováno za použití tekutého dusíku v 1,5 ml mikroskopických.
- 2) K rozdrčenému materiálu bylo přidáno 400 µl extrakčního pufru (EB), směs byla 5 vteřin vortexována.
- 3) Extrakce DNA ze směsi probíhala 30 – 60 min při laboratorní teplotě a poté byl extrakt centrifugován při 13000 rpm 2 min.
- 4) 300 µl supernatantu bylo přepipetováno do nové 1,5 ml mikroskopické a bylo přidáno stejné množství (300µl) vychlazeného isopropanolu. Směs byla opatrně promíchána.
- 5) Následovala centrifugace při 13000 rpm 5 min.
- 6) Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 300 µl 75% ethanolu a vzorek byl centrifugován 5 min při 5000 rpm.
- 7) Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen v laminárním boxu.
- 8) DNA se rozpustila v závislosti na množství peletu v 30 – 50 µl sterilní vody DNA/RNA free a vzorky byly uloženy v lednici.
- 9) Další den byly vzorky s DNA krátce vortexovány, centrifugovány 30 vteřin při 5 000 rpm a sterilní voda obsahující DNA byla odebrána do nové mikroskopické.
- 10) Koncentrace DNA byla spektrofotometricky stanovena a hodnota zapsána.

4.8 Izolace DNA z krve brojlerů

DNA byla izolována z krve brojlerů podle postupu Bailes a kol., (2007). Následně byly vzorky použity pro molekulárně biologickou detekci metodou PCR.

- 1) Byla odebrána krev z brojlerů do mikroskopické s EDTA a zamražena v -20 °C.
- 2) Na ledu bylo vychlazen 500 µl STM v 1, 5 ml mikroskopické a přidáno do ní 10-30 µl vzorku krve. Vzorky byly zamíchány a centrifugovány 5 min při 1000 g.
- 3) Supernatant byl dekantován.
- 4) Pelet byl rozuspendován v 100 µl (příp. 200 µl) Pronasy a inkubován 2 hodiny při 37 °C na třepačce při 160 rpm.
- 5) Proteasa K byla inaktivována ve vodní lázni při 65 °C po dobu 30 min.
- 6) Byl přidán stejný objem isopropanolu a vzorky uloženy 8 minut na ledu.
- 7) Proběhla centrifugace 10 min při 14000 g.

- 8) Supernatant byl dekantován a bylo přidáno 300 μ l 75% etanolu.
- 9) Centrifugace proběhla 5 min při 5000 g, následně byl dekantován etanol a vzorky byly vysušeny ve flowboxu.
- 10) Pelet byl rozpuštěn v 50 μ l RNA/DNA free H₂O.

4.9 Molekulárně biologická detekce genů kódujících *phyA* a *bar*

4.9.1 Podmínky polymerázové reakce

Podmínky metody PCR byly optimalizovány pro detekci genu *phyA* a selekčního genu *bar*. Jako reakční směs byl použit REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Co. R2523) a primery PhyF 21-mer 5' – GGC AGT CCC CGC CTC GAG AAA 3' (T_m 67 °C), a PhyR 21-mer 5' – AAA CAC TCC GCC CAA TCA CCC – 3' (T_m 63 °C). Dále primery BAF1 5' – GGT CTG CAC CAT CGT CAA CC – 3' a BAF2 5' – GTC ATG CCA GTT CCC GTG CT – 3' pro transgen *bar*. Dle tabulky 3 byla připravena reakční směs. Množství pro jednu reakci bylo upraveno vynásobením počtem vzorků. Do každé mikrozkušavky bylo za sterilních podmínek ve flowboxu pipetováno 8 μ l reakční směsi a 2 μ l templátové DNA. Objem byl kompatibilní pro zvolený typ cycleru – BioRad T100 thermocycler. Podmínky PCR byly stanoveny podle tabulek 4 a 5.

Tab. 3 - Složení reakční směsi pro PCR

| Reagencie | Objem reakční směsi pro jednu reakci | Vzorek |
|--------------------|--------------------------------------|------------|
| ddH ₂ O | 2,5 μ l | |
| ReadyMix | 5 μ l | |
| Primer phyF / BAF1 | 0,25 μ l | |
| primer phyR / BAF2 | 0,25 μ l | 8 μ l |
| Templátová DNA | | 2 μ l |
| Celkový objem | | 10 μ l |

Tab. 4 - Podmínky PCR analýzy pro gen *phyA*

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

Tab. 5 - Podmínky PCR analýzy pro gen *bar*

| Cyklus | Teplota | Čas |
|--------------------------|---------|---------|
| Počáteční denaturace | 94 °C | 60 s |
| Denaturace opakována 24x | 94 °C | 30 s |
| Annealing opakován 24x | 70 °C | 90 s |
| Elongace opakována 24x | 72 °C | 150 s |
| Konečná elongace | 72 °C | 8 min |
| Závěrečná fáze | 4 °C | 4 min + |

Amplifikovaný fragment byl elektroforeticky separován na 1% agarózovém gelu, připraveném smícháním 0,8 g agarózy, 80 ml TAE pufru a přidáním 1 µl ethidium bromidu pro vizualizaci fragmentu. Po ukončení elektroforézy byl gel detekován na UV transiluminátoru SYNGENE G-BOX a výsledky archivovány.

Velikost produktu *phyA* byla 1347 bp a produktu *bar* 421 bp.

Seznam přístrojů:

Tecan Infinite® 200 PRO spektrofotometr

Retsch MM 301 homogenizátor

Eppendorf 5418 Microcentrifuge stolní centrifuga

MJ Research PTC-200 cycler

BioRad T100™ Thermal Cycler

BioRad Power Pac™ Basic Power Supply elektroforetický zdroj

UV transiluminátor Syngene G-Box

5 Výsledky

5.1 Molekulární detekce *phyA* a *bar* v linii SCLW-GP-PHYA generace T7

Na začátku sloupkování bylo odebráno 197 vzorků a následně analyzováno.

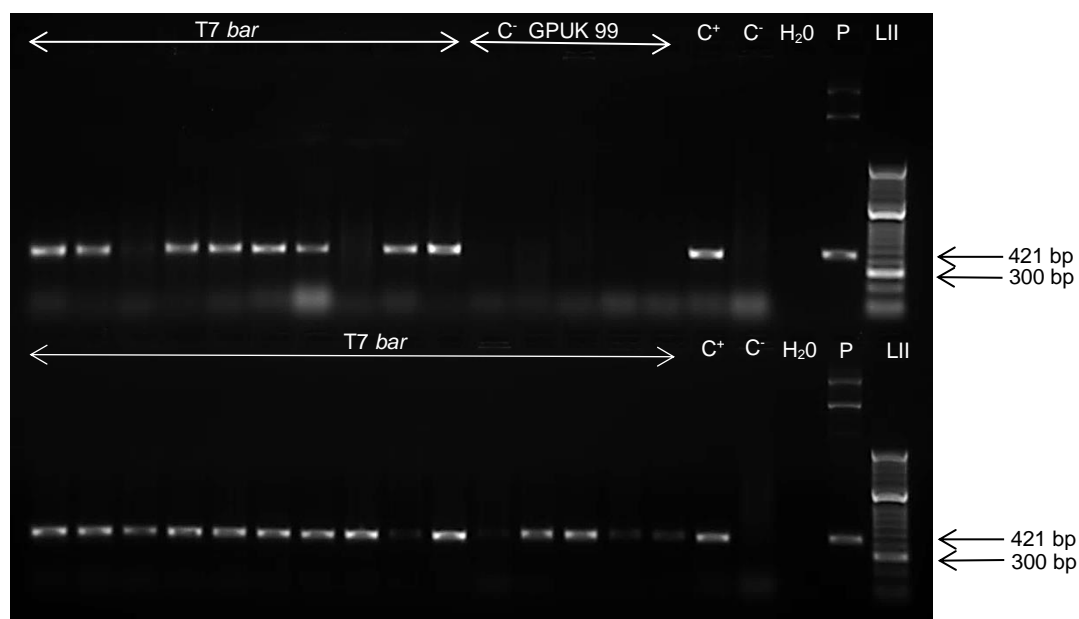
V generaci T6 byla potvrzena přítomnost heterologního genu *phyA* u všech analyzovaných transgenních linií (Vlčko a kol., 2013).

V generaci T7 byla zjištěná snížená stabilita transgenu *phyA* a *bar* u většiny analyzovaných transgenních linií. Z každé linie bylo analyzováno 8 – 10 náhodně vybraných zdravých rostlin. Tabulky 6 a 7 shrnují pozitivní i negativní analyzované rostliny jednotlivých linií. Všechny pozitivní rostliny s přítomnými geny *phyA* a *bar* jsou vypsány v tabulce 6 a 7.

Největší procento pozitivních rostlin (100 %) vykazují čtyři linie: 1015 – 7 OL 2013, 1015 – 7 LUK 2013, 880 – 4 LUK 2013 a 880 – 4 OL 2012.

Nejmenší obsah transgenu *phyA* vykazují linie 1015 – 7 OL 2012 (50 %) a 880 – 4 LUK 2012 (25 %).

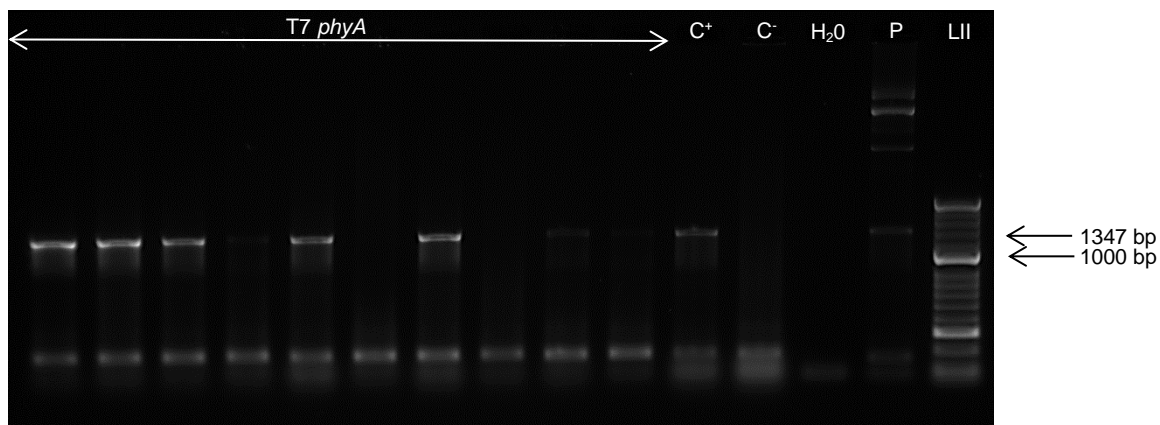
DH směs vykazuje pouze 10 % přítomnost transgenu *phyA*, stabilita vneseného genu je generaci T7 velmi nízká.



Obr. 3 – Elektroforetogram PCR produktů genu *bar* transgenní linie **1015 – 7** (nahore) a **880 – 4** (dole).

C⁺ – pozitivní kontrola, **C⁻** – negativní kontrola, **P** – plazmid, **LII** – marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (50 bp – 2000 bp). Použitý pár primerů *barF*, *barR*.

Fragment má velikost 421 bp.



Obr. 4 – Elektroforetogram PCR produktů *phyA* transgenní linie **1015 – 7 OL 2012**.

C⁺ – pozitivní kontrola, **C⁻** – negativní kontrola, **P** – plazmid, **LII** – marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (50 bp – 2000 bp). Použitý pár primerů *phyF*, *phyR*.

Fragment má velikost 1347 bp.

Tab. 6 - Detekce zájmového genu *phyA* a selekčního genu *bar* v náhodně vybraných rostlinách různých linií jarního ječmene SCLW-GP-PHYA pěstovaných v Olomouci v roce 2015

| Linie SCLW-GP-PHYA | | Rostlina | <i>phyA</i> + | <i>bar</i> + | | | | | |
|--------------------|-------------------------|----------|---------------|--------------|------|------------------------|----|---|---|
| Potomstvo č. | Označení | | | | | | | | |
| Č. 1 | 1015 – 7 LUK 2012 | 1 | + | + | Č. 5 | 880 – 4 LUK 2013 | 1 | + | + |
| | | 2 | + | + | | | 2 | + | + |
| | | 3 | - | - | | | 3 | + | + |
| | | 4 | + | + | | | 4 | + | + |
| | | 5 | + | + | | | 5 | + | + |
| | | 6 | - | + | | | 6 | + | + |
| | | 7 | + | + | | | 7 | + | + |
| | | 8 | + | - | | | 8 | + | + |
| | | 9 | - | + | | | 9 | + | - |
| | | 10 | + | + | | | 10 | + | + |
| Č. 2 | 1015 – 7 OL 2013 | 1 | + | + | Č. 6 | 880 – 4 LUK 2012 | 1 | / | / |
| | | 2 | + | + | | | 2 | - | - |
| | | 3 | + | - | | | 3 | + | + |
| | | 4 | + | + | | | 4 | + | + |
| | | 5 | + | + | | | 5 | - | - |
| | | 6 | + | + | | | 6 | - | - |
| | | 7 | + | + | | | 7 | / | / |
| | | 8 | + | - | | | 8 | - | + |
| | | 9 | + | + | | | 9 | - | + |
| | | 10 | + | + | | | 10 | - | + |
| Č. 3 | 1015 – 7 LUK 2013 | 1 | + | - | Č. 7 | 880 – 4 OL 2012 | 1 | + | + |
| | | 2 | + | + | | | 2 | + | + |
| | | 3 | + | + | | | 3 | + | + |
| | | 4 | + | + | | | 4 | + | + |
| | | 5 | + | + | | | 5 | + | + |
| | | 6 | + | + | | | 6 | + | + |
| | | 7 | + | + | | | 7 | + | + |
| | | 8 | + | + | | | 8 | / | / |
| | | 9 | + | + | | | 9 | + | + |
| | | 10 | + | + | | | 10 | + | + |
| Č. 4 | 1015 – 7 OL 2012 | 1 | + | + | Č. 8 | DH směs | 1 | - | + |
| | | 2 | + | + | | | 2 | + | + |
| | | 3 | + | + | | | 3 | - | + |
| | | 4 | - | + | | | 4 | - | + |
| | | 5 | + | - | | | 5 | - | + |
| | | 6 | - | + | | | 6 | - | + |
| | | 7 | + | + | | | 7 | - | - |
| | | 8 | - | + | | | 8 | - | + |
| | | 9 | - | + | | | 9 | - | + |
| | | 10 | - | + | | | 10 | - | + |

Tab. 7 - Přítomnost genů *phyA* a *bar* u vybraných transgenních linií SCLW-GP-PHYA pěstovaných v Olomouci v roce 2015

| Označení linie | Počet analyzovaných rostlin | Pozitivní | | | Pozitivní | | |
|--|-----------------------------|------------|--------------|---------------|------------|--------------|---------------|
| | | PhyA + | rostliny (%) | Poz:Neg | Bar + | rostliny (%) | Poz:Neg |
| 1 1015 – 7 LUK 2012 | 10 | 7 | 70 | 7:3 | 8 | 80 | 8:2 |
| 2 1015 – 7 OL 2013 | 10 | 10 | 100 | 10:0 | 8 | 80 | 8:2 |
| 3 1015 – 7 LUK 2013 | 10 | 10 | 100 | 10:0 | 9 | 90 | 9:1 |
| 4 1015 – 7 OL 2012 | 10 | 5 | 50 | 5:5 | 8 | 80 | 8:2 |
| 5 880 – 4 LUK 2013 | 10 | 10 | 100 | 10:0 | 9 | 90 | 9:1 |
| 6 880 – 4 LUK 2012 | 8 | 2 | 25 | 2:6 | 5 | 62,5 | 5:3 |
| 7 880 – 4 OL 2012 | 9 | 9 | 100 | 9:0 | 9 | 100 | 9:0 |
| 8 DH směs | 10 | 1 | 10 | 1:9 | 9 | 90 | 9:1 |
| 9 DH | 120 | 77 | 64 | 77:43 | 106 | 95 | 106:14 |
| Celkem linie 1015 – 7 | 40 | 32 | 80 | 32:8 | 33 | 82,5 | 33:7 |
| Celkem linie 880 – 4 | 27 | 21 | 77,7 | 21:6 | 24 | 88 | 24:3 |
| Celkem DH | 130 | 78 | 60 | 78:52 | 115 | 88 | 115:15 |
| Celkový počet analyzovaných rostlin | 197 | 131 | 66,5 | 131:66 | 172 | 87 | 172:25 |

Zkratka *Ol* a *Luk* označuje lokalitu Olomouc a Lukavec.

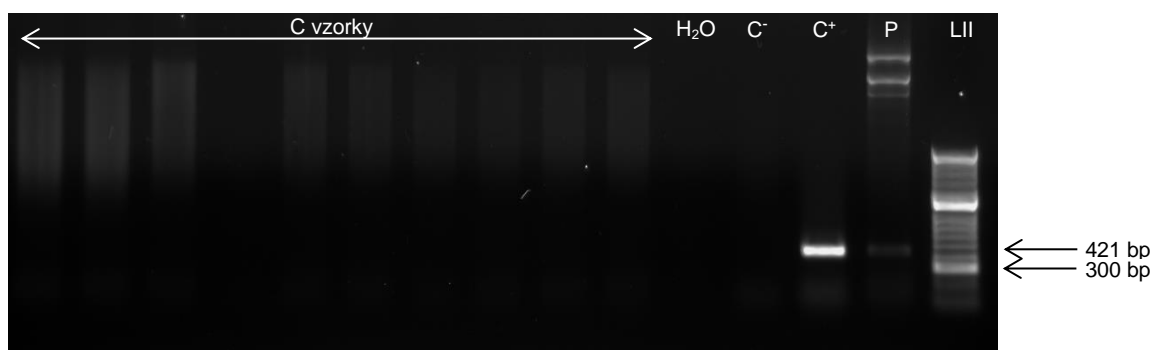
2012 a 2013 označují rok výsadby linií transgenních ječmenů v lokalitách Olomouc a Lukavec.

5.2 Molekulární detekce *phyA* a *bar* v orgánech krmných brojlerů

K analýze bylo použito 20 vzorků jater brojlerů a 9 vzorků krve brojlerů, kteří byli krmni transgenním ječmenem SCLW-GP-PHYA.

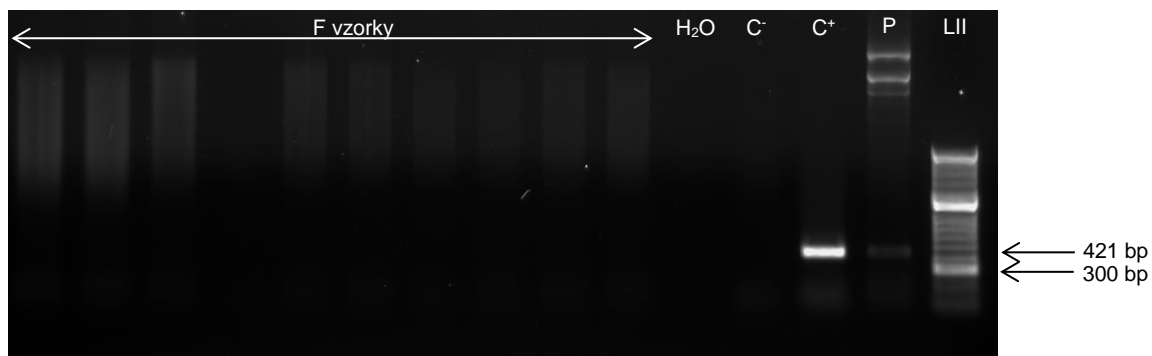
Brojleři Ross 308 byly chováni na speciálním pracovišti Mendelovy univerzity v Brně. Od osmi dnů byla kuřata po osmi umístěna do chovných klecí o velikosti 850 x 1000 mm. Brojleři byli po dobu 23 dnů krmni speciální směsí, která obsahovala 40 % transgenního jarního ječmene s vysokým obsahem fytasy. Z usmrčených 10 kuřat, která byla krmna transgenním ječmenem (F skupina) a z 10 kontrolních kuřat, která byla krmna netransgenním ječmenem (C skupina) byla vypreparována játra a odebrána krev. Vzorek krve byl ošetřen protisrážlivým činidlem heparinem. Játra byla rozdělena jednotlivě do sáčků, 10 jater bylo označeno štítky C a 10 jater štítky F. Játra byla uchovávána v mrazničce v -20 °C.

U všech vzorků DNA izolované z krve a jater brojlerů krmných transgenním ječmenem linie SCLW-GP-PHYA nebyla zjištěna přítomnost žádného ze zájmových genů. Výsledky PCR dokázaly, že k přenosu transgenů do krve nedochází. Amplikony genu *phyA* a *bar* v analyzovaných vzorcích nejsou přítomny (viz obr. 6, 7, 8).



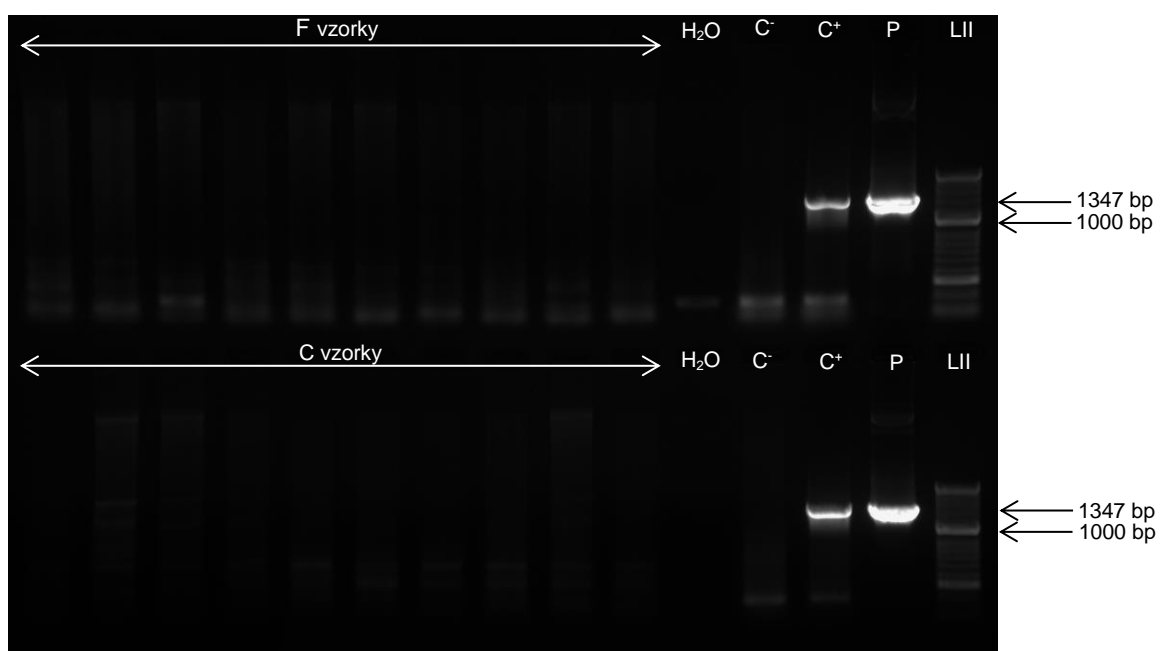
Obr. 6 – Elektroforetogram PCR produktů *bar* z jater brojlerů vzorků C.

C⁺ – pozitivní kontrola, C⁻ – negativní kontrola, P – plazmid, LII – marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (50 bp – 2000 bp). Použitý pár primerů *barF*, *barR*.



Obr. 7 – Elektroforetogram PCR produktů *bar* z jater brojlerů vzorků **F**.

C⁺ – pozitivní kontrola, **C⁻** – negativní kontrola, **P** – plazmid, **LII** – marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (50 bp – 2000 bp). Použitý pár primerů *barF*, *barR*.



Obr. 8 – Elektroforetogram PCR produktů *phyA* z jater brojlerů – vzorky **F** (nahore), vzorky **C** (dole).

C⁺ – pozitivní kontrola, **C⁻** – negativní kontrola, **P** – plazmid, **LII** – marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (50 bp – 2000 bp). Použitý pár primerů *phyF*, *phyR*.

6 Diskuse

V rámci bakalářské práce byla studována přítomnost transgenů *phyA* a *bar* u linií jarních ječmenů SCLW-GP-PHYA a v orgánech brojlerů, kteří byli krmeni tímto transgenním ječmenem. U linií ječmenů byl ověřován počet pozitivních rostlin v generaci T7. Analýza orgánů brojlerů měla za úkol ověřit hypotézu přenosu transgenů do orgánů hospodářských zvířat, krmených transgenním krmivem.

Stabilita (stálost) vnesených transgenů může být ovlivněna mnoha faktory, jako jsou například rozdílné pěstební podmínky plodin jednotlivých generací, nebo působením biotických a abiotických činitelů v neúnosné míře. V rámci bakalářské práce byla zjištěna 100% stabilita přenosu transgenů *phyA* a *bar* u transgenního ječmene po dobu šesti generací (T6). U potomstva sedmé generace (T7) se vyskytuje nižší procento transgenů. Důvod náhlého poklesu přítomnosti genů *phyA* a *bar* u linií 1015 – 7 OL 2012, linie 880 – 4 LUK 2012 a DH směsi může být způsoben změnou ve struktuře transgenů, která může být vyvolána mutací. Chováním transgenů napříč dvěma generacemi se zabývá Vain a kol., (2002). Podle Vaina a jeho kolektivu právě nestabilita transgenů na strukturální úrovni (tzn. nedochází k přenosu transgenů do nějaké nebo všech generací) je z hlediska dědičnosti významnější než nestabilita na úrovni exprese genu (snížená exprese, silencing). Z doposud získaných výsledků je pravděpodobné, že v T8 generaci by stabilita opět poklesla.

Z experimentálního hlediska by bylo zajímavé v navazující práci určit počet pozitivních rostlin generace T8 (popřípadě dalších generací) a sledovat rozdíl poklesu pozitivních rostlin jednotlivých linií v porovnání s generacemi předchozími. Avšak pro maximalizování výnosů pozitivních rostlin by bylo výhodnější vysít transgenní ječmen opět od první generace. Další možností, jak udržet vysoký výnos je pokračovat v pěstování následujících generací, avšak jen linií se 100% přenosem transgenů (1015 – 7 OL 2013, 1015 – 7 LUK 2013, 880 – 4 LUK 2013 a 880 – 4 OL 2012). V každé generaci by bylo opět vhodné detekovat transgeny a sledovat případné změny v přenosu na další generaci. Huang a kol. (2014) a Notomi a kol., (2000) vyvinuli metodu k detekci fyto-sóvého genu – rychlou, citlivou, vysoce specifickou loop-mediated isothermal amplification (LAMP) metodu, jejíž amplifikace je viditelná bez gelové elektroforézy. Z hlediska ověření výsledků by metoda LAMP mohla být porovnána s metodou PCR a následným ELFO v dalším experimentu při detekci transgenů u GMO.

Dále byla v šesté generaci SCLW-GP-PHYA měřena aktivita fytasy, která vykazovala nižší aktivitu než v T5 generaci (Vlčko a kol., 2013). Lze tedy předpokládat, že aktivita fytasy v generaci T7 bude opět nižší než v generaci T6.

Je známé pozitivní působení **mikrobiální** fytasy Natuphos, která je přidávána do krmných směsí drůbeže i prasat. Výsledky prokázaly, že suplementace mikrobiální fytasy

do krmných směsí brojlerů zlepšila vstřebání P, Ca, Mg a Zn. Dále vzrostla hmotnost holenní kosti a relativní hmotnost jater u kuřat brojlerů (Qian a kol., 1996, Viveros a kol., 2002). Proto by bylo vhodné zjistit, jestli je v T7 generaci SCLW-GP-PHYA dostačující aktivita fytasy, jaké množství **transgenní** fytasy by ovlivnilo kvalitu kostí a zubů, a zda by bylo prokázáno působení fytasy v dalších fyziologických funkcích v tělech živočichů krmných transgenním ječmenem SCLW-GP-PHYA.

Analýza krve a orgánů brojlerů byla prováděna z důvodu ověření hypotézy přenosu cílových genů z transgenního krmiva. Krev je hlavní tkáň zapojená do absorpce krátkých fragmentů DNA. Vzhledem k tomu, že DNA molekuly jsou transportovány organismem přes krevní oběh, krev je pro detekci trasgenů velmi vhodná. Analýza jater byla taktéž významná, protože játra jsou centrální orgán látkové výměny. Díky vysokému prokrvení slouží jako centrum zpracování potravy, proto je v této práci zahrnuta i jejich analýza.

Výsledky neprokázaly přítomnost transgenů ani v jednom z těchto orgánů. Důvodem, proč nedošlo k přenosu a vstřebání transgenů, je citlivost DNA na trávicí enzymy a žaludeční šťávy. Většina DNA, ať už transgenní nebo ne, je v trávicím traktu rozložena na malé jednotky. Stejný důvod podal i Ma a kol. (2013), v jejichž publikaci byly transgenní *phyA2* gen a protein rychle v zažívacím traktu rozloženy a nebyly detekovány v krvi, srdci, játrech, slezině, ledvinách, prsu ani vejcích nosnic krmných krmivem obsahujícím transgenní fytasu. Naopak Mazza a kol., (2005) souhlasí s většinou literatury, která uvádí přítomnost DNA z krmiva ve zvířecích tkáních a podporuje hypotézu, že DNA fragmentována během trávicího procesu může přetrvávat ve střevě a být vstřebána střevním epitelem. Mazza a kol. prokázali, že v živočišných tkáních mohou být detekovány malé fragmenty DNA, které pochází z krmiva. V tomto případě jde však o detekci fragmentů, ne celých transgenů. Tato bakalářská práce se věnovala detekci celých transgenů, u kterých může dojít k expresi.

Transgen by se teoreticky mohl přenést do krve a dalších orgánů pouze v případě jeho odolnosti vůči trávicím enzymům.

V dnešních diskuzích vyvstává otázka, zda GM rostliny v živočišných krmivech představují vyšší riziko než tradiční postupy krmení. Beever a Kemp (2000) uvedl, že na základě bezpečnostních analýz požadovaných pro každou plodinu by měla být konzumace mléka, masa a vajec vyrobených ze zvířat krmných geneticky modifikovanými plodinami považována za stejně bezpečnou jako tradiční postupy.

7 Závěr

PCR detekce transgenů *phyA* a *bar* u modifikovaného ječmene SCLW-GP-PHYA v generaci T7, který byl pěstován v polních podmínkách na lokalitě v Olomouci ukázala, že u většiny linií, v různém poměru dochází ke snižování podílu jak genu *phyA* tak i genu *bar*. Pouze u linie 880-4, která byla pěstována v roce 2012, všechny analyzované rostliny vykazovaly přítomnost obou transgenů. Prezence genu *phyA* byla také zjištěna u všech analyzovaných rostlin ze dvou parcel linie 1015-7.

Přítomnost transgenů *phyA* a *bar* byla také analyzovaná v játrech a krvi kuřecích brojlerů, kteří byli po dobu 24 dnů krmeni směsí obsahující transgenní ječmen SCLW-GP-PHYA. Nebylo prokázáno, že dochází k přenosu transgenů *phyA* a *bar* do krve brojlerů. Přítomnost transgenů nebyla detekována ani v jaterní tkáni.

8 Literatura

- Bailes, S. M., et al. An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry science*, 2007, 86.1: 102-106.
- Beever, D. E.; Kemp, C. F. Series B: Livestock Feeds and Feeding Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. In: *Nutrition Abstracts and Reviews, Series B: Livestock Feeds and Feeding*. 2000.
- Bitar, Kamal; Reinhold, John G. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1972, 268.2: 442-452.
- Bloem, Martin W.; Moench-Pfanner, Regina; Kiess, Lynnda. Combating micronutrient deficiencies--an important component of poverty reduction. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2001, 14.1-2: 92-97.
- Carter, Scott D.; Kim, Haejin. Technologies to reduce environmental impact of animal wastes associated with feeding for maximum productivity. *Animal frontiers*, 2013, 3.3: 42-47.
- Cohen, Stanley N., et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, 70.11: 3240-3244.
- Cooper, John R.; Gowing, Helen S. Mammalian small intestinal phytase (EC 3.1.3.8). *British Journal of Nutrition*, 1983, 50.3: 673-678.
- Cosgrove, D. J. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1970, 23.5: 1207-1220.
- Cromwell, G. L., et al. Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *Journal of Animal Science*, 1995, 73.7: 2000-2008.
- De Block, Marc, et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO journal*, 1987, 6.9: 2513.
- Diaz, Robert J.; Rosenberg, Rutger. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *science*, 2008, 321.5891: 926-929.
- Dionisio, Giuseppe, et al. Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytases from wheat, barley, maize, and rice. *Plant physiology*, 2011, 156.3: 1087-1100.
- Dorsch, John A., et al. Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. *Phytochemistry*, 2003, 62.5: 691-706.
- Edwards, K.; Johnstone, C.; Thompson, C1. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 1991, 19.6: 1349.
- Gabard, Kenneth A.; Jones, Russell L. Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. *Physiologia plantarum*, 1986, 67.2: 182-192.

- Gargova, S.; Roshkova, Z.; Vancheva, G. Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology techniques*, 1997, 11.4: 221-224.
- Gelvin, Stanton B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2003, 67.1: 16-37.
- Goeddel, David V., et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76.1: 106-110.
- Graf, Ernst; Empson, Katherine L.; Eaton, John W. Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262.24: 11647-11650.
- Greiner, R.; Jany, K. D.; Alminger, M. Larsson. Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Cereal Science*, 2000, 31.2: 127-139.
- Greiner, Ralf; Konietzny, Ursula. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44.2: 123-140.
- Greiner, Ralf; Konietzny, Ursula; Jany, Klaus-Dieter. Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food Biochemistry*, 1998, 22.2: 143-161.
- Guardiola, J. L.; Sutcliffe, J. F. Mobilization of phosphorus in the cotyledons of young seedlings of the garden pea (*Pisum sativum* L.). *Annals of Botany*, 1971, 35.4: 809-823.
- Hamada, Jamel S. Isolation and identification of the multiple forms of soybean phytases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, 73.9: 1143-1151.
- Hamada, Jamel S. Use of polyethylene glycol and high-performance liquid chromatography for preparative separation of *Aspergillus ficuum* acid phosphatases. *Journal of Chromatography A*, 1994, 658.2: 371-380.
- Hamilton, Carol M., et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93.18: 9975-9979.
- Hanakahi, Les A.; West, Stephen C. Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *The EMBO journal*, 2002, 21.8: 2038-2044.
- Hara, Akira, et al. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, 49.12: 3539-3544.
- Hartig, Th. Weitere Mitteilungen, das Klebermehl (Aleuron) betreffend. *Bot. Z*, 1856, 14: 257-269.
- Hayakawa, Toshiro; Toma, Yoshiaki; Igaue, Ikuo. Purification and characterization of acid phosphatases with or without phytase activity from rice bran. *Agricultural and biological chemistry*, 1989, 53.6: 1475-1483.
- Hegeman, Carla E.; Grabau, Elizabeth A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiology*, 2001, 126.4: 1598-1608.
- Huang, Xin, et al. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. *Food chemistry*, 2014, 156: 184-189.
- Hubel, Frank; Beck, Erwin. Maize root phytase (purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate). *Plant Physiology*, 1996, 112.4: 1429-1436.

- Huyghebaert, G., et al. Phosphorus supply and usage. In: *World Poultry Science Association (WPSA), 17th European Symposium on Poultry Nutrition, Edinburgh, UK, 23-27 August, 2009*. World Poultry Science Association (WPSA), 2009. p. 21-32.
- Chu, Hsing-Mao, et al. Structures of Selenomonas ruminantium phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*, 2004, 12.11: 2015-2024.
- Igbasan, F. A., et al. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Archives of Animal Nutrition*, 2000, 53.4: 353-373.
- Iqbal, T. H.; Lewis, K. O.; Cooper, B. T. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut*, 1994, 35.9: 1233-1236.
- Irvine, Robin F. Inositide evolution – towards turtle domination? *The Journal of physiology*, 2005, 566.2: 295-300.
- Jaenisch, Rudolf; Mintz, Beatrice. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1974, 71.4: 1250-1254.
- James, Clive; Krattiger, Anatole F. Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 to 1995. *ISAAA Briefs*, 1996, 1.
- Kardinaal, W. Edwin A.; Visser, Petra M. Dynamics of cyanobacterial toxins. *Harmful Cyanobacteria Aquatic Ecology Series, Springer, Dordrecht, the Netherlands*, 2005, 41-64.
- Knuckles, B. E.; Kuzmicky, D. D.; Betschart, A. A. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on in vitro protein digestibility. *Journal of Food Science*, 1985, 50.4: 1080-1082.
- Konietzny, Ursula; Greiner, Ralf. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International journal of food science & technology*, 2002, 37.7: 791-812.
- Konietzny, Ursula; Greiner, Ralf. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International journal of food science & technology*, 2002, 37.7: 791-812.
- Kostrewa, Dirk, et al. Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 1999, 288.5: 965-974.
- Laboure, Anne-Marie; Gagnon, Jean; Lescure, Anne-Marie. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochemical Journal*, 1993, 295.2: 413-419.
- Lambrechts, Christel, et al. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnology Letters*, 1992, 14.1: 61-66.
- Lei, Xin Gen, et al. Phytase: source, structure and application. In: *Industrial enzymes*. Springer Netherlands, 2007. p. 505-529.
- Li, Minggang, et al. Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1997, 43.1: 179-190.
- Lim, P. E.; Tate, M. E. The phytases. I. Lysolecithin-activated phytase from wheat bran. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1971, 250.1: 155-164.

- Ma, Qiugang, et al. Detection of transgenic and endogenous plant DNA fragments and proteins in the digesta, blood, tissues, and eggs of laying hens fed with phytase transgenic corn. *PLoS One*, 2013, 8.4: e61138.
- Ma, Jian, et al. Determination of total phosphorus in natural waters with a simple neutral digestion method using sodium persulfate. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2017.
- Macgregor, Alexander W.; Bhatta, Rattan S. *Barley: chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, 1993.
- Maiti, I. B.; Majumder, A. Lahiri; Biswas, B. B. Purification and mode of action of phytase from *Phaseolus aureus*. *Phytochemistry*, 1974, 13.7: 1047-1051.
- Martial, Joseph A., et al. Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science*, 1979, 205.4406: 602-607.
- Maugenest, Sébastien, et al. Structure of two maize phytase genes and their spatio-temporal expression during seedling development. *Plant molecular biology*, 1999, 39.3: 503-514.
- Mayer, K. F., et al. "A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome." *Nature*, 2012, 491.7426: 711-716.
- Mazza, Raffaele, et al. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Research*, 2005, 14.5: 775-784.
- Mccollum, E. V.; Hart, E. B. On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1908, 4.6: 497-500.
- Mullaney, Edward J.; Daly, Catherine B.; Ullah, Abul Hj. Advances in phytase research. *Advances in applied microbiology*, 2000, 47: 157-199.
- Mullaney, Edward J.; Ullah, Abul Hj. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003, 312.1: 179-184.
- Mullis, Kary B. *Process for amplifying nucleic acid sequences*. U.S. Patent No 4,683,202, 1987.
- Mullis, Kary B.; Faloona, Fred A. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 1987, 155: 335-350.
- Nagai, Yasutoyo; Funahashi, Saburo. Phytase (myoinositolhexaphosphate phosphohydrolase) from Wheat Bran: Part I. Purification and Substrate Specificity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1962, 26.12: 794-803.
- Nakamura, Yoshihiro; Fukuhara, Hiroshi; SANO, Konosuke. Secreted phytase activities of yeasts. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2000, 64.4: 841-844.
- Nakano, Tadao; Tokumoto, Emi; Hayakawa, Toshiro. Purification and characterization of phytase from bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin# 61. *Food Science and Technology Research*, 1999, 5.1: 18-23.
- Notomi, Tsugunori, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 2000, 28.12: e63-e63.
- Oh, Byung-Chul, et al. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry*, 2001, 40.32: 9669-9676.

- Pallauf, J.; Rimbach, G. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives of Animal Nutrition*, 1997, 50.4: 301-319.
- Pointillart, Alain; Fourdin, Annie; Fontaine, Nicole. Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *The Journal of nutrition*, 1987, 117.5: 907-913.
- Qian, H., et al. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological and other tibial bone characteristics and performances of broilers fed semi-purified diets. *Poultry Science*, 1996, 75.5: 618-626.
- Raboy, Victor. myo-Inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*, 2003, 64.6: 1033-1043.
- Raboy, Victor. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends in plant science*, 2001, 6.10: 458-462.
- Rapoport, S., et al. Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 1941, 139: 621-632.
- Safrany, Stephen T., et al. Diphosphoinositol polyphosphates: the final frontier for inositide research?. *Biological chemistry*, 1999, 380.7-8: 945-951.
- Saiardi, Adolfo, et al. Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99.22: 14206-14211.
- Sanford, John C., et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, 1987, 5.1: 27-37.
- Sasakawa, Nobuyuki; Sharif, Mohammed; Hanley, Michael R. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochemical pharmacology*, 1995, 50.2: 137-146.
- Schindler, D. W. Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 1977, 195.4275: 260-262.
- Schouten, Henk J.; Krens, Frans A.; Jacobsen, Evert. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO reports*, 2006, 7.8: 750-753.
- Simon, Ortwin; Igbasan, Francis. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *International journal of food science & technology*, 2002, 37.7: 813-822.
- Speedy, Andrew W. Global production and consumption of animal source foods. *The Journal of nutrition*, 2003, 133.11: 4048S-4053S.
- Tamminga, S., et al. Biotechnology and improvement of animal nutrition. *Biotechnology and improvement of animal nutrition.*, 1990, 55.4: 1373-1382.
- Thyagarajan, M. Barathi; R Sakthivadivu, D. Risk mitigation of poultry industry pollutants and waste for environmental safety. *Global Journal of Science Frontier Research*, 2014, 14.1.
- Tindall, Kenneth R.; Kunkel, Thomas A. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 1988, 27.16: 6008-6013.
- Travella, S., et al. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant cell reports*, 2005, 23.12: 780-789.

Ullah, Abul Hj; Cummins, B. J. Purification, N-Terminal Amino Acid Sequence and Characterization of pH 2.5 Optimum Acid Phosphatase (EC 3.1. 3.2) from *Aspergillus Ficum*. *Preparative biochemistry*, 1987, 17.4: 397-422.

Ullah, Abul Hj; Cummins, Barry J.; Dischinger, H. Charles. Cyclohexanedione modification of arginine at the active site of *Aspergillus ficuum* phytase. *Biochemical and biophysical research communications*, 1991, 178.1: 45-53.

Ullah, Abul Hj; Gibson, Donna M. Extracellular phytase (EC 3.1. 3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Preparative biochemistry*, 1987, 17.1: 63-91.

Vain, P., et al. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105.6: 878-889.

Viveros, Agustín, et al. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. *Poultry Science*, 2002, 81.8: 1172-1183.

Vogel, Andreas; Spener, Friedrich; Krebs, Bernt. Purple acid phosphatase. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2001.

Vlčko, T., a kol. Charakteristika linií jarních ječmenů s nízkým obsahem kyseliny fytové a zvýšenou aktivitou fytasy, 2013.

Wodzinski, Rudy J.; Ullah, A. H. J. Phytase. *Advances in applied microbiology*, 1996, 42: 263-302.

Wyss, Markus, et al. Comparison of the Thermostability Properties of Three Acid Phosphatases from Molds: *Aspergillus fumigatus* Phytase, *A. niger* Phytase, and *A. niger* pH 2.5 Acid Phosphatase. *Applied and environmental microbiology*, 1998, 64.11: 4446-4451.

Xin, Hongwei, et al. Environmental impacts and sustainability of egg production systems. *Poultry science*, 2011, 90.1: 263-277.

Yanke, L. J., Et Al. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 1998, 144.6: 1565-1573.

Zupan, John R.; Zambryski, Patricia. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*, 1995, 107.4: 1041.

Bibliografie

Němeček, Jan. *Taxonomický klasifikační systém půd České republiky*. Česká zemědělská univerzita, 2001.

Ondřej, Miloš; Drobník, Jaroslav. *Transgenoze rostlin*. Academia, 2002.

Reddy, N. R., et al. *Phytates in cereals and legumes*. CRC Press, 1989.

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně. Seznam doporučených odrůd, 2009.

Watson, J. D. *The polymerase chain reaction*. Springer Science & Business Media, 2012.

Zimolka, Josef. Ječmen – formy a užitkové směry v České republice. Profi Press, 2006.

Webové stránky

Český statistický úřad, ČSÚ. Soupis ploch osevů – 2015, [online], [cit. 26.4. 2016].
Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-ploch-osevu-2015>

Ministerstvo životního prostředí. Zákon č. 78/2004 Sb., [online], [cit. 12.3. 2017].
Dostupné z:
[http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/538509B51D97A94FC125690B00263A23/\\$file/Z%2078_2004.pdf](http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/538509B51D97A94FC125690B00263A23/$file/Z%2078_2004.pdf)

9 Přílohy

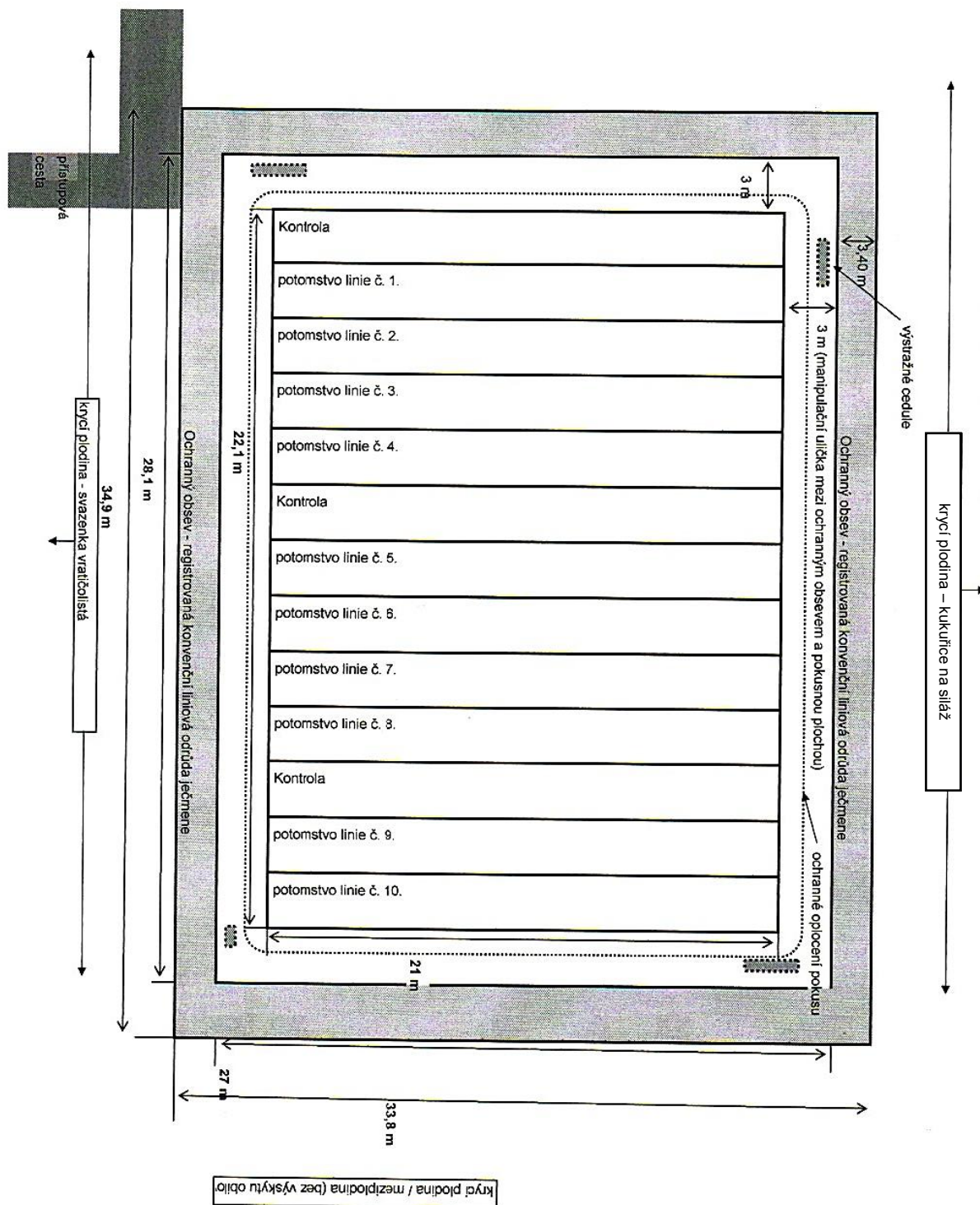
A) Struktura ploch osevů v roce 2014 a 2015 v České republice

| Plodina | 2014 | 2015 | Rozdíl +,- | Index (%) | Struktura 2015 (%) |
|---------------------------------|------------------|------------------|----------------|--------------|-----------------------|
| Osevní plocha celkem | 2 468 700 | 2 457 465 | -11 235 | 99.5 | 100.0 |
| Zrniny celkem | 1 431 484 | 1 436 570 | 5 086 | 100.4 | 58.5 |
| Obiloviny celkem | 1 411 314 | 1 403 430 | -7 884 | 99.4 | 57.1 |
| Pšenice celkem | 835 941 | 829 820 | -6 122 | 99.3 | 33.8 |
| Pšenice ozimá | 790 690 | 778 200 | -12 491 | 98.4 | 31.7 |
| Pšenice jarní | 45 251 | 51 620 | 6 369 | 114.1 | 2.1 |
| Žito ozimé a jarní | 25 137 | 21 980 | -3 157 | 87.4 | 0.9 |
| Ječmen celkem | 350 518 | 365 946 | 15 428 | 104.4 | 14.9 |
| Ječmen ozimý | 102 927 | 104 540 | 1 612 | 101.6 | 4.3 |
| Ječmen jarní | 247 590 | 261 406 | 13 816 | 105.6 | 10.6 |
| Oves | 42 289 | 42 395 | 106 | 100.3 | 1.7 |
| Tritikale | 48 497 | 42 891 | -5 606 | 88.4 | 1.7 |
| Kukuřice na zrno | 100 453 | 93 575 | -6 879 | 93.2 | 3.8 |
| Ostatní obiloviny | 8 478 | 6 824 | -1 653 | 80.5 | 0.3 |
| z toho: směsky ozimé | 939 | 308 | -631 | 32.8 | 0.0 |
| směsky jarní | 3 291 | 2 513 | -778 | 76.4 | 0.1 |
| Luskoviny na zrno celkem | 20 170 | 33 139 | 12 969 | 164.3 | 1.3 |
| Hrách setý na zrno | 14 449 | 23 876 | 9 427 | 165.2 | 1.0 |
| Lupina na zrno | 2 106 | 2 550 | 444 | 121.1 | 0.1 |
| Ostatní luskoviny | 3 615 | 6 714 | 3 098 | 185.7 | 0.3 |
| Okopaniny celkem | 87 317 | 80 860 | -6 458 | 92.6 | 3.3 |
| Brambory celkem | 23 992 | 22 681 | -1 312 | 94.5 | 0.9 |
| Brambory rané | 1 582 | 1 214 | -368 | 76.7 | 0.0 |
| Brambory ostatní | 19 162 | 18 643 | -519 | 97.3 | 0.8 |
| Brambory sadbové | 3 248 | 2 823 | -425 | 86.9 | 0.1 |
| Cukrovka technická | 62 959 | 57 612 | -5 346 | 91.5 | 2.3 |
| Krmná řepa | 332 | 500 | 168 | 150.4 | 0.0 |
| Ostatní okopaniny | 34 | 67 | 33 | 199.0 | 0.0 |

Převzato z <https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-ploch-osevu-2015>.

B) Plánek pokusu 2015

Transgenní jarní ječmen SCLW-GP-PHYA se zvýšenou aktivitou enzymu fytasy v zrně do životního prostředí, povolení 35905/ENV/12.



C) Fotografie



Obr. 14 – Transgenní linie SCLW-GP-PHYA před sklizní v Olomouci, srpen 2015.



Obr. 15 – Sklizeň transgenního ječmene maloparcelkovým kombajnem v Olomouci, srpen 2015.



Foto: Ohnoutková

Obr. 16 – Brojleři Ross 308, speciální pracoviště Mendelovy univerzity v Brně, chovné klece byly umístěny v klimatizované místnosti.



Foto: Ohnoutková

Obr. 17 – Kuřata byla v chovných klecích (850 x 1000 mm) umístěna po osmi.



Foto: Ohnoutková

Obr. 18 – Usmrcení kuřat ze dne 12. 2. 2015, Olomouc.



Foto: Blahoušek

Obr.19 – Vzoroky jater z brojlerů pro izolaci DNA, v pozadí Kit na izolaci DNA z živočišné tkáně.



Foto: Blahoušek

Obr. 20 – Vzorke brojeřích jater, uchovávaných jednotlivě v sáčcích v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.