

Transgenóze rostlin

Oldřich Navrátil

Ústav experimentální botaniky AV ČR

165 02 Praha 6, Rozvojová 135; e-mail: navratil@ueb.cas.cz

1 Úvod

Stále se rozšiřující poznatky z biologie a následně z genetiky dovedly lidstvo k poznání, že dědičná informace rostlinných druhů prochází v přírodních podmínkách podstatnějšími změnami, než jakými jsou prosté záměny jednotlivých bází nukleových kyselin. Při takových změnách je rostlinám podsouvána nová informace v podobě celých genů a tyto cizorodé geny jsou pak rostlinou použity. Do tohoto přirozeného procesu bylo možné vstoupit a vybírat si k přenosu do rostlin konkrétní geny se známým projevem. Výsledkem aktivního zasahování do souboru genů rostliny je v současnosti nepřehledné množství geneticky modifikovaných rostlin, které se svými vlastnostmi od původního rostlinného druhu více či méně odlišují a které mohou mít často zcela nečekané použití.

2 Transgenóze rostlin

2.1 Současné rozšíření transgenních rostlin

Údaje o současném rozšíření pěstování transgenních rostlin každoročně uvádí International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Za tímto účelem vydává ISAAA Briefs (http://www.isaaa.org/kc/bin/isaaa_briefs/index.htm). V čísle 32 jsou uvedeny údaje za rok 2004 a v čísle 34 údaje za rok 2005. Z publikovaných dat je patrný neustálý nárůst plochy zemědělské půdy s transgenními rostlinami. Tento meziroční nárůst byl proti roku 2003 v roce 2004 dvacetiprocentní a proti roku 2004 v roce 2005 jedenáctiprocentní. V roce 2005 tedy byly transgenní rostliny pěstovány na celkové ploše 90 miliónů hektarů v 21 státech světa, mezi něž je již zahrnuta i Česká republika. Pro představu o skutečné velikosti plochy osázené transgenními rostlinami lze uvést rozlohu veškeré orné půdy v České republice, která činí 3,091 miliónů hektarů (plocha téměř třicetkrát menší).

Proti 17 státům pěstujícím transgenní rostliny v roce 2004 jsou transgenní rostliny pěstovány v roce 2005 již v 21 státech. Zatímco 99 % takto využívané zemědělské půdy bylo soustředěno v roce 2004 ve 14 státech, v roce 2005 již to bylo v 8 státech světa. Z toho vyplývá, že k dalšímu rozšiřování ploch pro pěstování transgenních rostlin dochází především ve státech, kde bylo použití transgenních rostlin nej-

rozšířenější. V roce 2005 bylo nejvíce takových ploch ve Spojených státech (49,8 miliónů hektarů) a následovaly Argentina (17,1 miliónů hektarů) s Brazílií (9,4 miliónů hektarů). Brazílie pak meziročně vykázala nejvyšší přírůstek v ploše osázené transgenními rostlinami (4,4 miliónů hektarů).

Tento zkrácený výčet použití transgenních rostlin v zemědělství dostatečně dokumentuje, jaký přínos tyto rostliny mají pro ekonomiku jednotlivých států, které na jejich využití nerezignovaly. V dalších kapitolách si ozřejmíme, čím jsou takové rostliny přínosné. Nejdříve si však vysvětlíme, proč máme dnes k dispozici něco takového, jako jsou transgenní rostliny.

2.2 Historie objevu přípravy transgenních rostlin

Využití transgenóze u rostlin lze považovat za nenáhodný jev, který zákonitě vyplynul z postupně shromažďovaných poznatků o rostlinách jako důležitého zdroje potravy. Jedním z poznatků byla polhavlčnost rostlin a jev křížení, který pro položení základů genetiky využil Gregor Mendel.

Jestliže pak první habilitovaný rostlinný fyziolog na Karlově univerzitě v Praze Julius Sachs v roce 1887 vyslovil hypotézu, že v rostlinách jsou produkovány transportovatelné látky (pozdějšími následovníky identifikované jako fytohormony), které v nízkých koncentracích ovlivňují diferenciaci rostlinných dělivých pletiv, pak v roce 1907 (Townsend a Smith) bylo zřejmé, že bakterie, které u rostlin svou přítomností vyvolávají tvorbu kalusů, těmto rostlinám cosi předávají. V době, kdy již byly základní typy fytohormonů popsány, v roce 1958 (Braun) bylo skutečně prokázáno, že kalusy ke svému růstu *in vitro* na rozdíl od rostlin nevyžadují externí přísun fytohormonů a mají tedy jiný silný vnitřní zdroj. V roce 1969 (Morel a Tempé) pak v kalusech vyrostlých v přítomnosti bakterií byly nalezeny nové aminokyseliny (tzv. opiny), které se v rostlinách normálně nevyskytují, avšak v bakteriích ano. Když v roce 1974 Jeff Schell v těchto bakteriích identifikoval Ti plasmid s geny kódujícími jak tvorbu opinů tak tvorbu fytohormonů, nastalo pracné hledání způsobů, jak prokázat přirozeně se vyskytující přenos genů z tohoto plasmidu do rostlin. Důvěryhodný důkaz byl podán v roce 1980 a to již vědecká obec vážně uvažovala o tom, jak tento přirozený jev využít v laboratorních podmínkách. Proto není divu, že již za tři roky vyšla první publikace o přípravě fertlních transgenních rostlin v laboratoři. V roce 1985 by patentován transgenní tabák rezistentní k herbicidu. V roce 1994 byl celý zákonitý proces završen uvedením první transgenní plodiny na trh (rajče FlavrSavr).

2.3 Příprava transgenních rostlin

Po úspěšné transformaci prvních bakterií (O. T. Avery, C. MacLeod a M. McCarty, 1944) byly úspěšně rozvíjeny metody přímé transformace buněk za použití holé DNA. Postupně vyvíjené techniky byly aplikovány i na rostlinný materiál. Kromě dnes již tradiční transformace rostlinných protoplastů v přítomnosti polyethylenglykolu nebo za použití elektroporace se nejvíce používá biobalistika. V oblasti

transformace obilovin získala záhy dominantní postavení. DNA se vnáší do jader rostlinných buněk nabalená na kovových mikroprojektilích, obvykle připravovaných z wolframu nebo zlata, které jsou ve vakuu vymrštěny proti rostlinnému materiálu. Kinetická energie mikroprojektilů stačí k proražení buněčných stěn a k průniku do nitra buňky. Uvolněná DNA působením obvyklých reparačních a rekombinačních mechanismů integruje do jaderného genomu. Účinnost této techniky má však výrazné limity. Jen 7-10 % mikroprojektilů pronikne alespoň do buněk pokožky, které však nejsou schopné regenerace v novou rostlinu. Projektily, které proniknou až do buněk mesofylu (ty umožňují zregenerovat transgenní rostlinu), z 95 % skončí v cytoplasmě buněk, kde se nemohou uvolněné geny prepisovat. Pokud nakonec projektily vstoupí do jader buněk, což je místo, kam měly být nové geny přeneseny, 98 až 99 % těchto buněk do 48 hodin zahyne. Tyto výrazné limity jsou kompenzovány obrovským množstvím použitého materiálu ať již DNA nebo počtu opracovávaných buněk. Nadbytečné množství DNA však často vede k mnohonásobné transformaci jedné buňky, při které následné regenerační a rekombinační procesy navozují nežádoucí přeuspořádání vnášených genů. Taková přeuspořádání mají negativní dopad na expresi vnesených genů. Pro transformaci biobalisticou lze použít celé rostlinné orgány, včetně regenerujících embryí a pylu, a nové geny mohou být touto cestou vsunuty též do chloroplastů.

Svémi výhodami proti biobalisticě (cílené vnášení genetické informace přímo do jádra buněk a limitovaný počet vnesených kopií genů) si přední postavení v transformačních technikách rostlin získává tzv. agroinfekce za použití bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (viz kapitola 2.2). Tato gram-negativní, půdní bakterie je schopna infikovat poraněná místa na povrchu dvouděložných rostlin a přenášet do rostlinných buněk část své genetické informace. Životní strategie této bakterie spočívá ve vytvoření speciální ekologické niky, kde je zvýhodněna v růstu proti svým konkurentům. Působením přenesených genů z bakterie do rostlinného genomu dochází k proliferaci rostlinné tkáně a k vytváření rostlinných tumorů. Tumorové buňky navíc produkují speciální chemické látky, tzv. opiny, které je agrobaktérium jako jediný organizmus schopno využívat jako výlučný zdroj energie, uhlíku a dusíku. Za virulenci bakterií je zodpovědný velký plasmid pTi, který nese většinu funkcí potřebných k přenosu svého vlastního úseku DNA, tzv. T-DNA (z angl. transferred DNA), ale obsahuje také geny potřebné k využití rostlinou produkováných opinů.

Z hlediska genových manipulací jsou na tomto bakteriálním systému důležité dva aspekty. Za prvé, z celé T-DNA jsou pro vlastní přenos nezbytné jen dvě krajní, hraniční sekvence - konzervativní přímé repetice o velikosti 25 bp. Vše ostatní z celé T-DNA (až 20 kbp) lze podle našich potřeb odstranit a nahradit jinými sekvencemi DNA. Druhou důležitou vlastností systému je existence tzv. oblasti virulence - vir, který kóduje proteiny zodpovědné za přenos T-DNA do jádra rostlinné buňky konjugacním přenosem.

Tyto vlastnosti transformačního systému umožnily vytvoření tzv. binárních plasmidů. Jiný plasmid nese transferové funkce oblasti vir a je trvale přítomen v agrobaktériu. Binární plasmid má všechny vlastnosti malých klonovacích vektorů pro jednoduchou manipulaci v baktérii *Escherichia coli* a navíc nese modifikovanou T-DNA, kterou lze tak poměrně jednoduchým způsobem pozměňovat, přidávat nebo odebrat vhodné sekvence DNA. Po požadované modifikaci v oblasti T-DNA se plasmid z baktérie *Escherichia coli* přenáší konjugací nebo transformací (elektroporace) do agrobaktéria a z něj, působením produktů oblasti vir, je T-DNA přenášena do rostlinné buňky.

Hostitelské spektrum *A. tumefaciens* je v přírodě omezeno na určité dvouděložné rostliny. Avšak vyzkoušené kombinace laboratorních technik při současné aplikaci těchto bakterií nyní umožňují transformovat též jednoděložné rostliny včetně ekonomicky důležitých plodin. Tato usnadněná agroinfekce napomáhá vstupu baktérie do rostliny poraněním rostlinných buněk mikrojuhličkami vytvořenými z karbidu křemíku nebo z méně toxického borátu hliníku. Pro úspěšnou transformaci je možné přidat k rostlinnému materiálu acetosyringon, který funguje jako chemický atraktant baktérie.

Způsob provedení agroinfekce je poměrně jednoduchý. Části rostliny se ponoří na určitou dobu do suspenze bakterií. Následně jsou přeneseny na živné médium s takovou kombinací fytohormonů, která podpoří tvorbu kalusů z transformovaných buněk. Ty jsou selektovány od buněk netransformovaných přítomností selekčního agens v médiu (zpravidla antibiotika nebo herbicidu). Agrobaktérium je odstraněno z rostlinného materiálu použitím jiného antibiotika, které neomezuje v růstu rostlinné buňky. Následně jsou části rostliny přeneseny na jiné médium, ve kterém kombinace fytohormonů stimuluje na kalusech tvorbu stonků. Na živném médiu bez jakýchkoliv fytohormonů pak přesazené stonky vytvoří kořeny a stávají se kompletními rostlinami. Schopnost regenerace celých rostlin z kalusu však není vlastní všem rostlinným druhům, ba ani všem vyšlechtěným odrudám téže plodiny.

Agrobaktérium lze aplikovat na listové disky, stonkové nebo kořenové segmenty, hypokotyle i jiné tkáně, nebo lze metodou kokultivace transformovat kultury rostlinných protoplastů. Výsledné transgenní rostliny zpravidla obsahují jednu vnesenou kopii T-DNA na buňku, která je zpravidla nepoškozena přeuspořádáním, ale i při vnesení dvou nebo tří kopií T-DNA do jádra zůstává genetická informace nepoškozena.

2.4 Polní pokusy s transgenními rostlinami a legislativa

Možnost širšího použití transgenních rostlin v zemědělství musí být nejprve důkladně ověřeno v polních pokusech. O úspěšnosti přípravy transgenních rostlin napovídá údaj o počtu transgenních plodin, které byly ve státech Evropské unie takto testovány (k 17.10. 2005 celkem 72). Přirozeně nejvíce polních pokusů bylo prováděno s nejrozšířenějšími plodinami. Na prvním místě s kukuřicí (571 polních pokusů), pak řepkou (468), cukrovkou (248) a bramborem (239). V současnosti se příprava nových

transgenních rostlin soustřeďuje z těchto čtyř plodin nejvíce na kukuřici a na brambor. Stejně tak se v průběhu let mění a přístup k přípravě a ověřování transgenních rostlin v jednotlivých členských státech Evropské unie. I když se dlouhou dobu na čele v počtu prováděných polních pokusů s transgenními rostlinami držela Francie (a zaujímá první místo v Evropské unii i nadále s 553 provedenými pokusy), v 90. letech minulého století od praxe výzkumu transgenních rostlin značně ustoupila. I přes protesty části veřejnosti polní pokusy s transgenními rostlinami pokračovaly ve Velké Británii (celkem 226 pokusů). Protipólem ve využívání transgenních rostlin je v Evropě Rakousko (se 3 pokusy uskutečněnými do roku 1992) a Norsko (s jediným polním pokusem). Přesto Evropa celkově zaostává ve výzkumu transgenních rostlin za Spojenými státy. Pokud porovnáme například počty polních pokusů s transgenním bramborem ke dni 20.3.2005, pak v evropských státech bylo takových pokusů provedeno jen 231, zatímco ve Spojených státech 819. V České republice v současnosti probíhá 5 polních pokusů s transgenními rostlinami (zejména s transgenním bramborem), ale obdobné pokusy s transgenními rostlinami probíhaly již dříve, takže celkový počet je k dnešnímu datu určitě vyšší.

Takové polní pokusy u nás probíhaly ještě pře přijetím prvního zákona o nakládání s geneticky modifikovanými organismy (GMO) (zákon č. 153/2000 Sb.), avšak vždy v intencích daných směrnicemi Evropské unie pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy. V současnosti na našem území platí již třetí verze takového zákona (zákon č. 346/2005 Sb.), která byla přijata, aby se zohlednily především naše závazky v nakládání s GMO jako nově přijatého člena Evropské unie. V Evropské unii se v současnosti povoluje nakládání s GMO podle dvou platných směrnic. Je to směrnice 2001/18/EC a 1829/2003. Právě podle poslední směrnice jsou v současnosti nejčastěji podávány žádosti pro povolení obchodování s GMO (legislativně tzv. uvolňování do oběhu).

Mezi taková povolení patří i povolení k prodeji osiva transgenních rostlin jednotlivým zemědělcům. K tomu, aby transgenní plodina mohla být pěstována například v České republice, musí projít jako jakákoliv jiná odrůda státními zkouškami a pokud vyhoví příslušným kritériím, je zapsána do Národního katalogu odrůd ČR. Poté může být podána odpovídající žádost k příslušnému výboru Evropské komise a pokud výbor posoudí rovněž příslušnou plodinu jako bezpečnou, je zapsána do Společného katalogu odrůd EU. Pak může být transgenní plodina pěstována v kterémkoliv členském státě EU. V současnosti je v tomto katalogu schváleno k pěstování zemědělcem 34 transgenních odrůd kukuřice (v roce 2006 přihlásilo Španělsko do katalogu 14 nových transgenních odrůd). Zatímco Španělsko je největším pěstitelem transgenní kukuřice v Evropě (v současnosti pěstována na 53225 hektarech, což představuje 12 % z produkce kukuřice ve Španělsku), čeští zemědělci začínají tuto možnost teprve využívat. Vedou je k tomu i výsledky ze srovnávacích pokusů, které byly uskutečněny i u nás (v letech 2002 a 2003) a podle kterých transgenní kukuřice odolná vůči hmyzím škůdcům má ekonomický přínos pro pěstitele kukuřice.

ce ve Střední Evropě od 7 do 22 %. Proto se v České republice začala transgenní kukuřice pěstovat v roce 2005 na 270 hektarech a v roce 2006 by mohla být pěstována až na 2000 hektarech. Evidenci pěstebních ploch vede Ministerstvo zemědělství, které pro pěstování transgenních plodin vydalo i příslušnou vyhlášku (č. 89/2006 Sb. "o bližších podmínkách pěstování geneticky modifikované odrůdy").

2.5 Typy transgenních rostlin

První transgenní rostliny většinou obsahovaly jako nový gen geny rezistence k některému z herbicidů. Uvedme například první patentovanou transgenní rostlinu Roundup-ready tabák (viz kapitola 2). Svědčí o tom i první registrované polní pokusy s transgenním bramborem. Belgie a Francie prováděly polní pokusy s fosfinothricin rezistentním bramborem v roce 1987 a Nový Zéland se sulfonylmočovina rezistentním bramborem v roce 1988. Vyplývalo to z počátečních problémů detekce přenesené T-DNA v transgenní rostlině (rovněž kapitola 2.2). Vnesením genu rezistence k herbicidu se tento problém zjednodušil přímou aplikací herbicidu na transgenní rostliny.

Polní plodiny odolné k působení účinků některého z herbicidů se ukázaly záhy výhodnými pro boj s plevelem na poli. Mohly být použity zcela nové strategie ošetřování porostu herbicidem, které s použitím neselektivního herbicidu (například Roundup nebo Liberty) vedly k účinnější ochraně pole před plevelem a napomáhaly i ochraně půdy před erozí. K takto geneticky modifikovaným rostlinám přibývaly prakticky souběžně rostliny, které jsou díky genetické modifikaci odolné vůči hmyzím škůdcům. V těchto modifikacích jsou především využívány geny z bakterií *Bacillus thuringiensis*, které kódují tzv. delta toxin. Brambor nesoucí gen cryIIIA, který zaručuje rostlině ochranu před mandelinkou bramborovou, byl poprvé testován v polním pokusu v roce 1990 ve Spojených státech. O rok dříve byl v polních pokusech, rovněž ve Spojených státech, testován brambor, u kterého byla navozena odolnost proti rostlinným virům PVY a PVX. V tomto případě byly použity geny pro pláštěvé proteiny z obou virů. Technologie zavádění genů pro pláštěvé proteiny se nadále používá pro ochranu rostlin před virovými chorobami a v současnosti již byla využita proti působení virů z 11 různých skupin.

Všechny výše uvedené genové modifikace rostlin mají společný cíl, tj. zabránit ztrátám výnosů plodin v průběhu pěstování. Formálně se takovým transgenním rostlinám dostalo označení geneticky modifikované rostliny I. typu. Z výše uvedeného vyplývá, že hlavními zdroji vnášených genů byly (zvláště na počátku technologie transgenóze) viry, bakterie a rostliny. Dnes však jsou díky rozvíjejícím se technologiím příslušné geny počítačově navrhovány, tak aby v nejvyšší možné míře vyhovovaly buněčnému aparátu konkrétního rostlinného druhu, a syntetizovány. Zcela pozmeněné proti původním genům se používají zejména geny pro delta toxiny. V současnosti se stále častěji využívají takové transgenní rostliny, které současně obsahují gen rezistence k herbicidu a gen rezistence k hmyzímu škůdci. Geny pro delta toxiny jsou často v jedné rostlině zdvojovány, tj. jsou do rostliny zavedeny geny pro dva odlišné

toxinu, což má snížit riziko vzniku rezistence k toxinu v populaci hmyzího škůdce. Austrálie v současnosti povoluje používání jen takto upravených transgenních rostlin.

2.5.1 Ovlivňování cukerného metabolismu jako příklad II. typu

Joint Research Centre v italské Ispře uvádí seznam všech vlastností, které byly u rostlin navozeny genovou modifikací. Seznam obsahuje 265 položek. Z těchto vlastností je 59 pojmenováno jako tolerance nebo rezistence a naprostá většina takových vlastností odpovídá geneticky modifikovaným rostlinám I. typu. Další velkou skupinu vlastností (celkem 98) charakterizuje slovo syntéza. Patří sem také vlastnosti, které se jen obtížně u výsledné transgenní rostliny popisují. V řadě případů syntéza například určitého enzymu zlepšuje užitečné vlastnosti produktu rostlinného původu. Tak je tomu i u rajčete FlavrSavr, první geneticky modifikované plodiny uvedené na trh (viz kapitola 2.). Jedná se tedy o zlepšení vlastností důležitých pro posklizňové zpracování a užití transgenní rostliny. V tomto případě mluvíme o geneticky modifikovaných rostlinách II. typu.

Jiným typickým příkladem genetické modifikace II. typu jsou změny v cukerném metabolismu bramboru. Zdrojem genů k navození změn byly doposud nejčastěji samotný brambor, dále bakterie, jiné rostliny a kvasinky. Změny se mohou například týkat složení škrobu, resp. v zastoupení dvou škrob utvářejících složek, amylosy a amylopektinu, tam kde uvažujeme o užití bramborových hlíz k produkci škrobu. Změny v zastoupení škrob utvářejících složek mění fyzikálně chemické vlastnosti škrobu a vlastnosti výrobků z tohoto škrobu (jde především o biodegradovatelné plastické hmoty). Transgenní brambor s těmito vlastnostmi je v současnosti testován v polních pokusech v několika státech Evropské unie. V Ústavu experimentální botaniky AV ČR se pomocí genetické modifikace snažíme změnit jinou bramboru danou vlastnost. Brambor, původem z vyšších poloh And, v hlízách hromadí poměrně značné množství cukrů (sacharosy, glukosy a fruktosy) a toto množství zabraňuje vymrznutí hlíz při nízkých teplotách a zabezpečuje tak přežívání rostliny v nepříznivých klimatických podmínkách. Z pohledu nutriční hodnoty bramboru jako potraviny se nejedná o negativní jev. Vysoký obsah zejména redukcujících cukrů (glukosy a fruktosy) v hlízách bramboru začíná vadit při zpracování na výrobky, které procházejí smažením. Při zahřátí hlízy na teplotu okolo + 170° C dochází k tzv. Maillardově reakci, která má za následek rychlé zhnědnutí výrobku (bramborové lupínky, hranolky, bramboráky). Tmavá barva výrobku znesnadňuje rozpoznání, je-li výrobek již dostatečně tepelně opracován. Při těchto teplotách ze stejného důvodu vzniká akrylamid, který je považován za potenciální karcinogen. Při přípravě bramborových lupínků může v průměru vzniknout až 1,2 mg akrylamidu na kilogram výrobku. Přestože byla provedena lékařská studie, která nepotvrdila souvislost mezi dlouhodobou konzumací smažených výrobků z brambor a výskytem tří různých druhů rakovinných nádorů, nelze akrylamid v žádném případě hodnotit jako životu prospěšnou látku. Snížením obsahu redukcujících cukrů v hlízách lze prokazatelně

pozitivně ovlivnit obě výše uvedené vlastnosti. Jednou z možností je posílení glykolytické dráhy bramboru za podmínek nízké teploty. V této dráze jsou redukující cukry odbourávány a její funkce je u bramboru značně omezena již při nižší teplotě (po + 12° C). Proto jsme glykolytickou dráhu rostliny posílili zavedením potřebného genu z bakterie, který kóduje enzym plně funkční i při nízkých teplotách okolo nuly. Příslušný gen je přitom realizován pouze v hlízách a nikoliv v zelené nadzemní části rostliny. Několik transgenních rostlin bramboru vykazuje v porovnání s původní odrůdou v hlízách dlouhodobě skladovaných při nízké teplotě šedesátiprocentní pokles obsahu redukujících cukrů. Tato nová vlastnost je přitom stabilní po dobu minimálně šesti let.

2.5.2 Příklady III. typu

Stále rychleji se rozšiřující soubor dostatečně popsáných genů (zejména jejich účinků) z nejrůznějších živých organismů přináší nové podněty pro genetické modifikace již lidmi využívaných rostlin. Jedním z příkladů je nedávno přihlášený polní pokus v Dánsku firmou Aresa biodetection ApS pod evidenčním číslem B/DK/06/01 (v seznamu Joint Research Centre). Firma sofistikovaným způsobem modifikovala huseníček Thalův (*Arabidopsis thaliana*) tak, aby změnou své barvy (ze zelené na červenou) reagoval při růstu na půdě znečištěné výbušninou (jeden z genů reaguje na přítomnost oxidu dusičitého, který se z výbušnin uvolňuje). Jak změna barvy rostliny, tak i příčina této změny, jsou vlastnostmi, které huseníček doposud neměl a evolucí je pravděpodobně nikdy nemohl získat. V případě takovýchto zcela nových vlastností hovoříme o geneticky modifikovaných rostlinách III. typu. Další příklady takových rostlin, mezi které patří i geneticky modifikovaný brambor, uvádím v následujících kapitolách.

2.5.2.1 Transgenní rostliny a produkce plastických hmot

Jak je známo, plastické hmoty, které jsou nedílnou součástí nekonečné řady výrobků, jsou připravovány z neobnovitelného zdroje, jakým je ropa. Ropy je zatím dostatek a plasty z ní vyráběné jsou poměrně levné (pod 1 USD za kilogram). Avšak tento neobnovitelný zdroj suroviny je využíván též k jiným nezbytným účelům a proto je na místě uvažovat, jak tento zdroj suroviny nahradit. Jednou z takových možností jsou obnovitelné porosty rostlin. Takové rostliny by však při současné ceně plastických hmot vyráběných z ropy musely odpovídat surovinu produkovat v množství představujícím 15 % suché váhy. Takové geneticky modifikované rostliny již existují, avšak jejich dlouhodobé pěstování zatím naráží na přirozenou překážku.

Touto rostlinou je huseníček Thalův. Některé z geneticky modifikovaných rostlin produkují 14% suché váhy jako surovinu pro výrobu plastů. Výjimečně byly nalezeny rostliny, které tuto surovinu tvořily až do 40% suché váhy. Surovina je však natolik nepřírozenou sloučeninou pro rostliny, že tyto vysoce produkční huseníky měly výrazně zpomalený růst a celkově změněný vzhled. Opakovaným vyséváním semen z těchto rostlin se jejich produkční schopnost ztrácela. Surovinou, kterou transgenní rost-

lina produkuje, je polyalkanát. Polyalkanáty ve větší míře umí produkovat některé bakterie, které také byly zdrojem do rostlin zaváděných genů. Jednou z bakterií je *Ralstonia eutropha*, která v čisté kultuře dokáže narůst do neuvěřitelné hustoty buněk a polyalkanáty vylučuje na svém povrchu. Přesto schopnosti této bakterie produkovat polyalkanáty nejsou dostatečné k tomu, aby surovina mohla cenově konkurovat ropě (pětkrát dražší produkce). Uhlíkaté řetězce polyalkanátů, které *Ralstonia eutropha* tvoří, jsou spíše kratší, s třemi až pěti jednotkami. Plastické hmoty z této suroviny jsou tužší. Druhou bakterií je *Pseudomonas oleovorans*. Tato bakterie je schopna tvořit delší řetězce se čtyřmi až osmi jednotkami a plastická hmota z této suroviny vyrobená je pružnější. Oba tyto zdroje genů byly využity k genetickým modifikacím většího počtu rostlinných druhů jak byl bavlník (zlepšily se izolační vlastnosti bavlny – lépe se zahřívá a pomalu vychládá), řepka, cukrovka, len, tabák a také brambor. Právě brambor se ukázal jako rostlina, které produkce polyalkanátů výrazně vadí. Problémem vůbec bylo získat transgenní rostliny, pokud geny byly exprimovány z konstitučního promotoru (tedy trvale). První rostlinky byly získány až tehdy, když geny z bakterie byly exprimovány z indukibilního promotoru (tedy jen za určitých vnějších podmínek). Nadpoloviční většina těchto rostlin však nebyla schopna vytvářet hlízy, což je považováno za hlavní nedostatek, neboť právě hlízy měly být produkčním orgánem rostliny. Navíc se očekává, že v hlízách bude vznikat směsná surovina pro výrobu plastické biodegradovatelné hmoty (směs se škrobem). Nejvyšší produkce polyalkanátů bylo dosaženo v suspenzní kultuře buněk z transgenní rostliny, které byl navíc do média přidáván prekurzor tvorby polyalkanátů. Maximální produkce však byla jen 0.9% suché váhy a pro porovnání, celé rostliny produkovaly dvacetkrát méně požadované suroviny.

2.5.2.2 Transgenní rostliny a produkce pavoučího vlákna

Pavoučí vlákno má v porovnání s jinými materiály (např. ocel) větší pevnost a pružnost. Pokud bychom z pavoučího vlákna dokázali vyrobit lano o tloušťce obyčejné tužky, pak takové lano udrží na zemi při vzletu Boeing 747. Je pevnější než KEVLAR, který se používá na výrobu neprůstřelných vest. Vlákno má pravidelný povrch, takže se využívá i při přípravě dutých optických vláken (úspěšné pokusy v Číně). Velké naděje se vkládají do využití pavoučích vláken v medicíně (šití ran, náhrada poškozené kůže, podpurná membrána pro růst savčích buněk). Bylo již zkoušeno více systémů k produkci většího množství vlákna. Největšího úspěchu bylo dosaženo při produkci pavoučích proteinů v kozím mléce (kanadská firma Nexia), avšak i rostliny jsou schopné produkovat dostatečné množství pavoučích proteinů. Přitom schopnost produkce pavoučího proteinu na rozdíl od produkce polyalkanátů (viz kapitola 5.2.1.) při opakované kultivaci rostlin neklesá. Produkce proteinů bylo dosaženo v huseníčku, v tabáku a rovněž v hlízách transgenního bramboru.

Pro genetickou modifikaci bramboru byl použit syntetický gen, jehož jedna část byla vytvořena podle genu pro protein šplhacího vlákna sítě nefily americké (*Nephila clavipes*) a druhá část byla tvořena stonásobným opakováním jednotky lidského elastinu. Tento protein je rostlinou velmi dobře snášen a v hlízách tvoří až 4 % rozpustných proteinů. Až 69% transgenních rostlin produkovalo syntetický protein v množství větším než 0,5 % všech rozpustných proteinů, což také svědčí o tom, že tyto proteiny jsou rostlinami dobře snášeny. Pavoučí proteiny je snadné oddělit od ostatních proteinů, neboť jejich agregace a rozpustnost má reverzibilní charakter v závislosti na změnách teploty. Tak lze napřed rozpustné rostlinné proteiny vysrážet při teplotě + 95° C a z takto přečištěné tekutiny následně selektivně vysrážet pavoučí protein. Ten lze následně rozpustit za nízké teploty v limitovaném objemu vody a dosáhnout vysoké koncentrace roztoku proteinu. Z roztoku lze připravit vysušené membrány, které se dají dobře skladovat, nebo lze přímo vytahovat vlákno. V současnosti se především řeší technický problém strojového vytažení vlákna a jeho spřádání. Transgenní brambory se syntetickým genem jsou ověřovány v polním pokusu v Gatersleben (Německo) (žádost B/DE/04/160), který byl povolen 10.5.2005.

2.5.2.3 Transgenní rostliny a produkce protilátek

Již od roku 1987 bylo ověřováno, jestli by rostliny dokázaly syntetizovat protilátky, tedy proteiny, které se v rostlinách přirozeně nevyskytují. Záhy bylo ověřeno, že lehké a těžké řetězce, které tvoří protilátku, se v rostlině skládají do správné struktury. Výsledek byl publikován poprvé v roce 1989. Protilátky produkované rostlinami mají shodné vlastnosti s protilátkami produkovanými v savčích systémech a mají tedy i stejné použití. Hodí se tedy v medicíně k prevenci před nákazami u lidí a zvířat, k vyvíjení diagnostických testů, nebo přímo k léčbě onemocnění. Poslední způsob využití má také první komerční protilátka produkovaná tabákem s komerčním označením Guy's 13. Jedná se o protilátku účinnou proti povrchovému antigenu bakterie *Streptococcus mutans*, která se podílí na rozvoji zubního kazu. Rostliny tabáku dokázaly protilátku produkovat v množství 1% všech rozpustných proteinů. Jiné protilátky produkované rostlinami na své využití v medicíně čekají. Klinické testy s různými protilátkami byly zahájeny v roce 2005. V průmyslové výrobě vakcín by protilátky tvořené rostlinami umožnily levnější a účinnou purifikaci těchto vakcín.

Jestliže protilátky izolované z transgenních rostlin dokáží chránit zdraví člověka, pak dokáží chránit také zdraví rostlin. V takovém případě zůstávají a působí v samotné rostlině. Od roku 1993 je používán transgenní artyčok odolný vůči virové nákaze. V současnosti se intenzivně řeší právě problematika odolnosti hlavních plodin proti virovým nákazám (viz kapitola 5.). Zatímco zaváděním genů pocházejících z různých virů pro plášťový protein řeší otázku odolnosti jen k jednomu konkrétnímu viru, nalezením cílové struktury, která je nezbytná pro rozvoj virové nákazy a společná pro celé skupiny virů, a

následným zavedením genů pro tvorbu odpovídající protilátky by transgenní rostlina získala odolnost proti širokému spektru virových chorob.

2.5.2.4 Transgenní rostliny jako jedlé vakcíny

Myšlenka připravovat vakcíny za pomoci geneticky modifikovaných rostlin je rovněž staršího data. Při těchto úvahách se vycházelo ze skutečnosti, že tak bude možné vakcínu připravit ve velkém množství, že bude možné takovou vakcínu skladovat stejným způsobem jako sklizené plodiny, dokonce v některých případech ji uchovávat a převážet po vysušení, což by byla velká výhoda proti podmínkám, za kterých se skladují a převážejí vakcíny připravované přímo původců chorob. Rovněž administrace (v podobě přijímané potravin – odtud název jedlá vakcína) bude jednodušší než při injekční aplikaci klasické vakcíny. Bylo spočítáno, že náklady na vakcinaci se v průměru sníží tisícinásobně.

První vakcínou připravenou v rostlinách (patentově chráněnou) byl povrchový antigen A z bakterie *Streptococcus mutans* (patent z roku 1990). Jedná se o stejnou bakterii, proti níž byla vyvinuta komerční protilátka Guy's 13 (viz kapitola 5.2.2.). Při přípravě jedlých vakcín nebyly brány v úvahu pouze nemoci člověka a jejich původci, ale i nemoci hospodářských zvířat. Byly proto vybírány nejrůznější rostliny. Jetel plazivý byl použit pro přípravu vakcíny proti dobytčímu zápalu plic způsobenému bakterií *Mannheimia haemolytica*. Proti dobytčímu moru virového původu byla jedlá vakcína připravena v podzemnici olejné. Jedlá vakcína z rotaviru, který vyvolává onemocnění zvířat i lidí, byla připravena v rostlinách vaječné žlutky. Pro léčení lidí byla vybrána například mrkev (vakcína proti spalničkám) nebo kukuřice (vakcína proti enterotoxické *Escherichia coli*).

Od samého počátku vzniku myšlenky využití jedlých vakcín byl za nejvhodnější rostlinu považován banánovník. Jeho plody jsou chutné a dají se jíst syrové, konzumace celosvětově rozšířená a strom se pěstuje v tropických oblastech, kde jsou největší problémy s klasickou vakcinací. Koncem devadesátých let byly již k dispozici všechny nezbytné náležitosti k přípravě geneticky modifikovaného banánovníku (systém přenosu DNA do rostlin pomocí agrobaktéria, vhodné regulační sekvence pro expresi vnášených genů), avšak úspěchu bylo dosaženo až v roce 2005. V Indii byly připraveny transgenní rostliny banánovníku se zabudovaným genem pro povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg). V rostlinách, které nejvíce antigen exprimovaly, byl tento nalezen a kvantifikován v listech. V plodech však nebyl v době publikování HBsAg nalezen, pouze bylo ověřeno, že i v plodech se příslušný gen přepisuje. Dnešní doba však použití banánovníku jako jedlé vakcíny příliš nepřeje. Bude třeba napřed zachránit banánovník jako rostlinný druh. Nejvíce rozšířená odrůda banánovníku Cavendish, která pochází z Indie, je napadená chorobou Sigatoga (způsobenou houbou *Mycosphaerella fijiensis*). Protože se jedná o sterilní odrůdu, nelze k jejich záchraně použít klasické přikřížování genů odolnosti z příbuzných druhů a dokud se tento banánovník nepodaří ochránit proti chorobě genovou modifikací (například zavedením

protilátky, viz kapitola 5.2.3.) a znovu dostatečně rozmnožit, je práce na přípravě jedlých vakcín neekonomická.

Jinou, značně rozšířenou plodinou, je brambor. Brambor byl, na rozdíl od banánovníku, použit pro přípravu jedlé vakcíny již vícekrát. Účinnost takto připravených vakcín byla prokázána na myších a také na lidských dobrovolnících. Na myších byla potvrzena účinnost jedlé vakcíny proti choleře a proti viru HPV, jehož přítomnost v lidském těle vyvolává rakovinu. Přímo u lidí byla potvrzena účinnost jedlé vakcíny proti Norwalk viru (gen pro kapsidový protein), viru hepatitidy B (gen pro hlavní povrchový antigen) a enterotoxické *Escherichia coli* (B podjednotka labilního toxinu). V posledně uvedené klinické studii dobrovolníci dostali jednou týdně, třikrát po sobě, dávku syrových brambor 50 g nebo 100 g. U dobrovolníků byla prokázána mukosální a sérologická imunita proti patogenní baktérii. Stejně úspěšné byly i klinické zkoušky s jedlou vakcínou proti Norwalk viru. Na lidských dobrovolnících byly doposud testovány i jedlé vakcíny v podobě kukuřičné mouky, listů salátu a listů špenátu. Žádný s testů neprokázal negativní vedlejší účinky po požití vakcín.

3 Závěr (Možná budoucnost a brzká skutečnost)

Příklady transgenóze rostlin dokládají prospěšnost této techniky genových modifikací nejenom pro pěstitele (geneticky modifikované rostliny I. typu), ale též pro zpracovatele a spotřebitele (geneticky modifikované rostliny II. typu). Plochy, na kterých jsou geneticky modifikované rostliny pěstovány, se každým rokem zvětšují (zejména ve státech, kde již mají s použitím transgenních rostlin dobré zkušenosti). Velice významnou roli pro další rozvoj lidské společnosti budou v blízké budoucnosti hrát geneticky modifikované rostliny III. typu. Uvedl jsem zde jen několik důležitých příkladů využití transgenních rostlin jako léčiv, nebo jako nových zdrojů doposud nevyužívaných surovin pro rozvíjející se odvětví průmyslu.

Úvahy o využití schopností transgenních rostlin však dnes směřují dokonce za hranice pozemské biosféry. Takový příkladem jsou úvahy o osídlení planety Mars. I když Mars má také atmosféru, pak tato atmosféra není pro člověka dýchatelná, neboť obsahuje jen 0,13 % kyslíku (proti pozemským 21 %). Je pravděpodobné, že rostliny, které by měly k dispozici marsovskou vodu, jejíž přítomnost již prokázala sonda Mars Express, by do atmosféry potřebný kyslík dodaly. Existenci rostlin na Marsu (kromě vysokých dávek záření) brání také nízké teploty povrchu (v průměru $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$), které se pohybují od $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ do snesitelných $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v letních měsících na rovníku). Zdrojem vhodných genů, které by mohly ochránit rostliny před nízkými teplotami, je také bakterie *Pyrococcus furiosus*. Tato bakterie je schopná přežít bez jakékoliv újmy na životaschopnosti náhlé změny teploty životního prostředí o více jak $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato schopnost s velkou pravděpodobností souvisí s přítomností dvou proteinů CipA a CipB (cold-inducible proteins). Účinky těchto dvou proteinů budou testovány v několika druzích rostlin.

Pokud rostliny produkující proteiny Cip budou schopny přežít při nízkých teplotách, bude to první krůček na cestě k osídlení tak nehostinného prostředí, jakým je v současnosti povrch Marsu.

DOPORUČENÁ LITERATURA

Pro bližší seznámení s přípravou a použitím transgenních rostlin doporučuji především knihy:

Ondřej M. (1992) Genové inženýrství kulturních rostlin. Academia Praha.

Ondřej M., Drobník J. (2002) Transgenóze rostlin. Academia, Praha.

Aktualizovaný přehled o pěstování transgenních rostlin naleznete na webových stránkách ISAAA
URL: <www.isaaa.org/kc/bin/isaaa_briefs/index.htm>.

Přehled o polních pokusech v Evropě s geneticky modifikovanými rostlinami (včetně informací o provedených modifikacích) naleznete na webových stránkách JRC URL: <gmoinfo.jrc.it>.

KLÍČOVÁ SLOVA

Agrobaktérium

Agroinfekce

Biobalistika

Geneticky modifikované rostliny

Jedlá vakcína

Polní pokusy

Transgenní rostliny